

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, TOXICOLOGÍA Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA



**BIOMONITORIZACIÓN DE CADMIO, CROMO,
MANGANESO, NÍQUEL Y PLOMO EN MUESTRAS DE
SANGRE TOTAL, ORINA, VELLO AXILAR Y SALIVA EN
UNA POBLACIÓN LABORAL EXPUESTA A METALES
PESADOS**

MEMORIA PRESENTADA POR

CLAUDIA MARQUEZ ESTEVEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR EN MEDICINA

GRANADA, SEPTIEMBRE 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Claudia Marquez Estevez
D.L.: GR 997-2013
ISBN: 978-84-9028-499-5

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de investigación subvencionado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) titulado “*Estudio de biomarcadores de exposición (Cr, Mn y Ni) en población laboral del sector siderúrgico*” (referencia PI06/1306) cuyo investigador principal ha sido el profesor Fernando Gil Hernández.

Parte de los resultados de la presente Memoria de Tesis Doctoral han sido publicados en la revista *The Science of the Total Environment* cuya referencia completa es:

Gil F, Hernández AF, Márquez C, Femia P, Olmedo P, López-Guarnido O, Pla A. Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population. Sci Total Environ. 2011; 409(6):1172-1180. PMID: 21211822.

Datos bibliométricos de la publicación: Factor de Impacto: 3.286 (2011); Campo del Conocimiento: Environmental Sciences; Posición: 29/204 (Q1); Nº de Veces Citado: 5

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
<u>I. JUSTIFICACIÓN, HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</u>	13
<u>I.1. JUSTIFICACIÓN</u>	15
<u>I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	18
<u>I.3. OBJETIVOS</u>	19
<u>II. INTRODUCCIÓN</u>	21
<u>II.1. LA BIOMONITORIZACIÓN EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL</u>	23
II.1.1. Indicadores biológicos o biomarcadores	23
<u>II.2. CONSIDERACIONES ANALÍTICAS GENERALES</u>	26
<u>II.3. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES</u>	28
II.3.1. Biomarcadores de exposición	29
II.3.2. Biomarcadores de respuesta o efecto	31
<u>II.4. VIGILANCIA AMBIENTAL FRENTE A VIGILANCIA BIOLÓGICA</u>	31
II.4.1. Valores límites ambientales en la normativa española	34
<u>II.5. LA SOLDADURA METÁLICA</u>	34
II.5.1. Peligros de la soldadura para la salud	36
II.5.2. Manifestaciones clínicas	37
II.5.3. Prevención	41
II.5.3.a. Condiciones higiénicas de trabajo	41
II.5.3.b. Control de riesgos	42
<u>II.6. METALES PESADOS</u>	43
II.6.1. Cadmio	43
II.6.1.a. Fuentes de intoxicación	43
II.6.1.b. Etiología	43
II.6.1.c. Toxicocinética	45
II.6.1.d. Efectos tóxicos	45
II.6.1.e. Diagnóstico	47
II.6.2. Cromo	47
II.6.2.a. Fuentes de intoxicación	47
II.6.2.b. Etiología	48
II.6.2.c. Toxicocinética	49
II.6.2.d. Efectos tóxicos	49
II.6.2.e. Diagnóstico	50
II.6.3. Manganeso	50
II.6.3.a. Fuentes de intoxicación	50
II.6.3.b. Etiología	51
II.6.3.c. Toxicocinética	52
II.6.3.d. Efectos tóxicos	52
II.6.3.e. Diagnóstico	53
II.6.4. Níquel	53

II.6.4.a. Fuentes de intoxicación	53
II.6.4.b. Etiología	54
II.6.4.c. Toxicocinética	55
II.6.4.d. Efectos tóxicos	55
II.6.4.e. Diagnóstico	55
II.6.5. Plomo	56
II.6.5.a. Fuentes de intoxicación	56
II.6.5.b. Etiología	58
II.6.5.c. Exposición	59
II.6.5.d. Toxicocinética	60
II.6.5.e. Efectos tóxicos	61
II.6.5.f. Diagnóstico y control	63
<u>II.7. MUESTRAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES</u>	64
<u>II.8. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA EL CADMIO, CROMO, MANGANESO, NIQUEL Y PLOMO</u>	68
II.8.1. Espectrometría de absorción atómica con horno de Grafito	69
II.8.2. Otras técnicas de análisis	70
<u>II.9. LA VALIDACIÓN ANALÍTICA EN LA ESTANDARIZACIÓN METODOLÓGICA</u>	71
<u>III. MATERIAL Y METODOS</u>	73
<u>III.1. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (EAA)</u>	75
<u>III.2. REACTIVOS</u>	76
III.2.1. Comunes	76
III.2.2. Cadmio	76
III.2.3. Cromo	77
III.2.4. Manganeso	77
III.2.5. Níquel	77
III.2.6. Plomo	78
<u>III.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN</u>	78
<u>III.4. METODOLOGIA PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR</u>	79
III.4.1. Procedimiento	79
III.4.1.a. Curva patrón	79
III.4.1.b. Muestras	79
III.4.2. <u>Condiciones en el espectrofotómetro de absorción Atómica</u>	80

<u>III.5. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CROMO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR</u>	81
III.5.1. Procedimiento	81
III.5.1.a. Curva patrón	81
III.5.1.b. Muestras	81
III.5.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica	82
<u>III.6. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE MANGANESO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR</u>	83
III.6.1. Procedimiento	83
III.6.1.a. Curva patrón	83
III.6.1.b. Muestras	83
III.6.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción Atómica	84
<u>III.7. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE NÍQUEL EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR</u>	85
III.7.1. Procedimiento	85
III.7.1.a. Curva patrón	85
III.7.1.b. Muestras	85
III.7.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción Atómica	86
<u>III.8. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR</u>	87
III.8.1. Procedimiento	87
III.8.1.a. Curva patrón	87
III.8.1.b. Muestras	87
III.8.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción Atómica	88
<u>III.9. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL MÉTODO</u>	89
III.9.1. Límite de detección y cuantificación (IUPAC)	89
III.9.2. Intervalo de linealidad	89
III.9.3. Curvas de calibrado	90
III.9.4. Precisión	90
III.9.5. Exactitud	92
III.9.6. Concentración característica	92
III.9.7. Recuperación	93
III.9.8. Incertidumbre del método	93
III.9.9. Interferencia de matriz	98
<u>III.10. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS Y CHEQUEO DEL EQUIPO</u>	98

III.10.1. Control de calidad de los ensayos	98
III.10.2. Chequeo del equipo	99
<u>III.11. MATERIALES DE REFERENCIA (CRMs)</u>	99
<u>III.12. LIMPIEZA DEL MATERIAL</u>	100
<u>III.13. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN (CADMIO, CROMO, MANGANESO, NIQUEL Y PLOMO) EN TRABAJADORES DEL SECTOR SIDEROMETALÚRGICO. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN</u>	100
III.13.1. Diseño epidemiológico	100
III.13.2. Diseño del muestreo	101
III.13.3. Análisis estadístico de los datos	104
<u>IV. RESULTADOS Y DIUSCUSIÓN</u>	107
<u>IV. 1. VALIDACIÓN METODOLÓGICA</u>	109
<u>IV. 2. NIVELES DE CD, CR, MN, NI Y PB EN POBLACIÓN TRABAJADORA DEL SECTOR SIDERÚRGICO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR</u>	134
<u>V. CONCLUSIONES</u>	169
<u>VI. BIBLIOGRAFÍA</u>	173
<u>VII. ANEXOS</u>	189

ABREVIATURAS

AAS: atomic absorption spectrometry (espectrometría de absorción atómica).

ACGHI: American Conference Governmental Industrial Hygienists (Conferencia Americana de higienistas industriales gubernamentales)

ALA: ácido delta amino levulínico

ALA -D: deshidratasa del ácido delta amino levulínico

EAA: espectrofotometría de absorción atómica

EPIs: equipos de protección individual

INSHT: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

MMT: metilciclopentadienil-manganeso-tricarbonilo

TLV: threshold limit value (valor límite umbral)

VLA: valor límite ambiental

VLB: valor límite biológico

RESUMEN

Título: Biomonitorización de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en muestras de sangre total, orina, vello axilar y saliva en una población laboral expuesta a metales pesados

Numerosos metales entre los que se encuentran Cd, Cr, Mn, Ni y Pb, tienen gran importancia en la industria siderúrgica y en particular, en soldadura y fundición dada su gran toxicidad. La biomonitorización en Toxicología Industrial se ha realizado clásicamente mediante el estudio de biomarcadores de exposición (en nuestro caso, metales pesados) en sangre y orina, siendo numerosas las referencias en la literatura científica a estos fluidos. Sin embargo, los procedimientos para la determinación de metales en saliva y pelo, como muestras alternativas a las anteriores, son muy escasos no existiendo ningún método validado que cuantifique éstos en las 4 muestras biológicas que se describen: sangre total, orina, saliva y vello axilar. Por otra parte, la validación metodológica es actualmente un requisito imprescindible para los laboratorios que se dedican al control oficial. Este trabajo representa la primera validación analítica incluyendo todos los parámetros recomendados por Directivas Europeas así como por la norma ISO/IEC 17025:2005 que son: límite de detección y cuantificación, rango de linealidad, precisión (mínima, intermedia y reproducibilidad), exactitud, recuperación (en el caso de la saliva), masa característica e incertidumbre. El límite de detección fue de 0.03, 0.19, 0.12, 0.24 y 0.83 µg/l para Cd, Cr, Mn, Ni y Pb. La precisión mínima osciló entre 1.76 y 4.36 % para el Mn y Cr, respectivamente. La precisión intermedia se situó en el intervalo entre 2.32 y 4.94% para el Cr y Cd, respectivamente y la reproducibilidad menor fue del 2.98% para el Pb siendo la mayor del 4.88% (Ni). La exactitud se evaluó mediante patrones certificados en sangre (0.28-5.26 %), orina (1.20-6.59%) y pelo (0.23-4.68%). Puesto que no existen patrones de saliva, se realizaron ensayos de recuperación mediante la adición de cantidades de dichos elementos obteniendo recuperaciones que oscilaron entre el 98.25 y 105.40%.

Asimismo en el presente trabajo se indican los niveles en sangre total y orina, así como en saliva y vello axilar como muestras alternativas a las anteriores, en 178 trabajadores. Se trata además de comprobar la validez de estas muestras alternativas.

El análisis descriptivo mostró unos niveles medios de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb en saliva de 0.14, 3.11, 6.94, 7.79 y 3.03 $\mu\text{g/l}$, mientras en vello axilar fueron 0.07, 3.43, 2.35, 3.29 y 24.33 $\mu\text{g/g}$ para Cd, Cr, Mn, Ni y Pb respectivamente. La influencia de ciertas variables sobre los niveles de metales en dichas muestras se valoró mediante una encuesta que incluía entre otros ítems edad, sexo, ubicación de la vivienda, antigüedad en el puesto, hábito tabáquico y alcohólico y consumo de alimentos.

En cuanto a la asociación de los niveles de elementos metálicos estudiados con los estilos de vida y otros posibles factores de confusión, el análisis multivariante ha encontrado una asociación positiva en los siguientes casos: Cd en orina con el Cd en vello axilar y la edad y Cd en sangre con el hábito tabáquico. Los niveles de Cr en sangre se asociaron con los de orina y con la antigüedad en el puesto de trabajo. El Cr en orina se asoció con el Cr en sangre y en saliva, influenciándose además por el consumo de conservas. Se observó igualmente asociación entre los niveles de Cr en vello axilar y saliva. Por su parte, el Mn en sangre se asoció con la residencia en el centro de las ciudades. Los niveles de Ni en sangre y orina se correlacionaron entre sí así como los de Ni en saliva y vello axilar. El Ni en saliva mostró asociación con el hábito alcohólico y la antigüedad en el puesto de trabajo. Finalmente se observó asociación entre los niveles de Pb en sangre y los de orina y vello axilar así como entre los niveles de Pb en orina y vello axilar con el hábito alcohólico.

I. JUSTIFICACIÓN, HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

I.1. JUSTIFICACIÓN

Las numerosas características de los metales han dado lugar a su uso en un gran número de actividades industriales destacando entre ellas la minería y las industrias de transformación, fundiciones y metalurgia en general. No obstante, este uso conlleva una amplia gama de peligros potenciales para la salud de los trabajadores, pudiendo tener además un impacto ambiental considerable.

Las intoxicaciones por metales pesados constituyen probablemente una de las parcelas más importantes de la toxicología industrial. Como se ha mencionado anteriormente, son muchas las actividades laborales en las que se manipulan estos compuestos, tal y como recoge de forma específica el Real Decreto 1299/2006, por el que se aprobó el nuevo cuadro de enfermedades profesionales.

De todos los trabajadores del sector del metal, los que presentan un mayor riesgo de exposición a metales pesados son los soldadores. Estos trabajadores, muy extendidos en diferentes industrias, se encuentran expuestos a chispas, partículas y vapores de metales durante su jornada laboral, por lo que en ellos se prioriza el control del riesgo para evitar las consecuencias nocivas de la exposición, es decir, para prevenir la aparición de intoxicaciones crónicas. La soldadura es una importante actividad laboral y, aunque cada vez se encuentran más aplicaciones para los procedimientos automáticos de soldadura, la de arco manual sigue siendo aún el principal método empleado en la soldadura industrial.

La forma de evaluar el riesgo de los soldadores por exposición a metales pesados se puede realizar bien a través del control atmosférico (viendo si se respetan o no los límites tolerables de exposición y las concentraciones máximas permisibles) o bien mediante la biomonitorización, que tiene notoria importancia en las exposiciones crónicas y que constituyen sin duda un método muy valioso para valorar cuantitativamente la exposición a contaminantes industriales, incluyendo los humos metálicos.

La inmensa mayoría de los biomarcadores de exposición a metales pesados se determinan en sangre y en orina. Mientras la orina es una muestra aceptada y de fácil recolección en la población laboral, no ocurre igual con la sangre donde las

extracciones constituyen un método cruento, no bien aceptado por la mayoría de los trabajadores. Por ello, se considera de utilidad buscar nuevos fluidos o muestras biológicas como muestras complementarias o alternativas para valorar la exposición, entre las que destacan la saliva y el vello axilar. El pelo, en general, ha demostrado utilidad para valorar exposiciones crónicas, debido a que los metales pesados se incorporan a la matriz capilar por donde se eliminan, aunque esta vía de excreción es cuantitativamente poco relevante. Por otro lado, la saliva, también constituye una muestra de gran utilidad para la biomonitorización según han puesto de manifiesto diversos estudios previos.

Según el Observatorio de Enfermedades profesionales del Ministerio de Trabajo, hay una tendencia a la infradeclaración de las enfermedades profesionales. Las enfermedades de origen ocupacional cuyo agente etiológico es la exposición a agentes químicos constituyen la cuarta causa de enfermedades ocupacionales, por detrás de los agentes físicos, enfermedades de la piel y enfermedades provocadas por inhalación de agentes tóxicos. El hecho de que ocupen este cuarto puesto puede deberse a la falta de adecuados sistemas de biomonitorización que faciliten el control de la exposición crónica a este tipo de sustancias nocivas.

En el contexto de los metales, y más concretamente en el sector de la soldadura, los metales pesados con mayor relevancia por sus riesgos para la salud de los trabajadores son el cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo.

Respecto del *cadmio* cabe resaltar sus múltiples usos que lo convierten en un material muy utilizado en la industria del metal. Proporciona resistencia a la corrosión al acero, hierro y diversos productos por lo que su uso es muy frecuente en aleaciones para piezas automotrices, soldaduras y maquinaria industrial. A través de la galvanoplastia, el cadmio forma parte del recubrimiento de muchos materiales mejorando así sus características físicas. La exposición al cadmio suele ocurrir en el empleo de diversos productos metálicos, sobre todo en soldadores que trabajan con varillas que contienen este metal, en materiales recubiertos por el mismo o en aleaciones que lo contienen como el bronce. La importancia de la biomonitorizar la exposición a este metal radica en su potencial capacidad carcinogénica.

El *romo* se utiliza frecuentemente en el sector del metal, sobre todo en las aleaciones con el acero y la galvanoplastia. En ambos usos se generan partículas y vapores o gases que pueden ser inhalados por el trabajador, sobre todo si se encuentra en espacios cerrados o con cierto grado de confinamiento. Es importante destacar su acción cancerígena y mutagénica en el caso de la exposición a cromatos, dicromatos o cromo hexavalente y sus sales.

El *níquel* se emplea en la fabricación de ánodos de las cubas electrolíticas para el niquelado (galvanoplastia), en baterías alcalinas de níquel-cadmio, monedas, colorantes (óxidos de níquel) para esmaltes cerámicos, como catalizador químico en la industria de plásticos y aceites industriales y, sobre todo, en las aleaciones con diversos metales entre los que destacan el hierro (acero inoxidable), el cobre y el aluminio. El níquel también es carcinogénico, capaz de provocar cáncer de seno etmoidal, nasal y broncopulmonar.

El *manganeso* forma parte de los recubrimientos de electrodos para soldadura y se emplea también en aleaciones con diversos metales, especialmente con el hierro. Por este motivo, los soldadores son el personal probablemente más expuesto a los efectos nocivos de este metal.

Por último, el *plomo* debe su importancia a sus amplios y frecuentes usos en el sector del metal, encontrándose en muchas y muy diversas facetas de la soldadura que abarcan la construcción, fontanería, revestimientos, etc. Las aleaciones de plomo que se emplean en soldaduras generan partículas y vapores o gases de este metal pudiendo ser inhalados por el trabajador, sobre todo si se trata de espacios cerrados o confinados. Si además los soldadores trabajan en superficies con pinturas a base de plomo, el riesgo se multiplica al contener usualmente estos vapores mayor concentración de dicho elemento. Los talleres y fábricas donde se utiliza, son una gran fuente de exposición, pudiendo contaminar el aire, el agua y el suelo. La prevención de la toxicidad crónica por este metal se ha considerado un reto a conseguir mediante programas de vigilancia médica y biológica en empresas con objeto de garantizar una exposición segura y lo más importante, una salud laboral integral, concepto de máxima relevancia en el ámbito preventivo de la salud laboral.

Por todo lo anteriormente mencionado, el cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo, se perfilan como los principales elementos tóxicos más representativos para los trabajadores del sector de la soldadura. Su biomonitorización en sangre y orina puede ser útil para comprobar el nivel de impregnación de estos trabajadores y para prevenir las consecuencias negativas según las estimaciones de riesgo que se obtengan al realizar los análisis. Además, para una evaluación más precisa de los resultados obtenidos es esencial disponer de datos relativos a los hábitos del trabajador, en especial a su alimentación, al consumo de alcohol y tabaco, así como factores laborales como la antigüedad en el puesto de trabajo o el uso de equipos de protección individual (EPIs). Por este motivo resulta necesario que los trabajadores objeto del presente estudio cumplimenten una encuesta epidemiológica.

Los trabajadores de la industria siderúrgica y soldadura presentan unas altas tasas de sinistralidad laboral debido a los numerosos riesgos a los que se exponen durante su jornada laboral. Por eso, este estudio evaluará de forma indirecta la eficacia de los equipos de protección, tanto colectivos como individuales, de donde se puede desprender la necesidad de inculcar en los trabajadores una mayor concienciación acerca del uso efectivo de medidas de prevención en su puesto de trabajo. Un trabajador bien protegido con su correspondiente mascarilla, guantes, pantalla, etc. presentará, *a priori*, unos niveles más bajos de metales en las muestras biológicas, reduciendo así el riesgo de desarrollar enfermedades profesionales como consecuencia de exposiciones prolongadas.

I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo, son cinco de los principales agentes tóxicos a los que están expuestos los trabajadores del sector de la siderurgia, incluyendo a los trabajadores de la soldadura. La biomonitorización de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en trabajadores del sector de la siderurgia, incluyendo a los trabajadores de la soldadura constituye una herramienta de gran eficacia para la prevención de las enfermedades profesionales causadas por la exposición a dichos metales ya que contribuye a identificar situaciones de exposición excesiva en los controles biológicos rutinarios. Además, el empleo de muestras alternativas o

complementarias a las clásicas (sangre y orina) como la saliva y el vello axilar son de gran ayuda con fines de biomonitorización, ya que son muestras menos cruentas y excelentes vehículos de excreción de los metales pesados.

I. 3. OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL:** Comprobar la validez de la determinación de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en muestras de saliva y vello axilar respecto de otros fluidos clásicos (sangre y orina).

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**
 - Establecer métodos validados de análisis para determinar cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en sangre total, orina, saliva y vello axilar empleando la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con horno de grafito.
 - Determinar los niveles de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en sangre, orina, saliva y vello axilar de los trabajadores del sector siderometalúrgico.
 - Comparar estos niveles de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo con los valores de referencia, determinando el grado de exposición (o de impregnación) en estos trabajadores.
 - Establecer, de acuerdo con lo anterior, la posible existencia de riesgos a medio o largo plazo en función del nivel de impregnación detectado, evaluando la eficacia de las medidas preventivas.
 - Evaluar si existe correlación entre las muestras alternativas de saliva y vello axilar y las clásicas de sangre y orina con el fin de establecer un sistema de biomonitorización menos cruento.
 - Analizar, mediante una encuesta, la posible influencia de factores laborales y de hábitos alimentarios y tóxicos, sobre los niveles de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en la población de nuestro estudio y que pudieran actuar como factores de confusión.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

II.1. LA BIOMONITORIZACIÓN EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL

Uno de los aspectos fundamentales y de actualidad en materia de higiene industrial y vigilancia de la salud lo constituye la evaluación del riesgo frente a contaminantes químicos industriales. Esta evaluación permitirá conocer si un determinado colectivo, en nuestro caso el de trabajadores del sector siderúrgico incluyendo a soldadores, sufrirá las consecuencias nocivas derivadas de la exposición a dichos contaminantes.

La presencia de un tóxico en el ambiente laboral implica un riesgo, no obstante para hablar de impregnación (contacto o exposición al contaminante) es necesario detectar la sustancia tóxica o sus metabolitos en algún fluido biológico, o bien alteraciones inducidas por la misma sobre componentes celulares, bioquímicos o funcionales de un organismo (intoxicación) (Gil y Rodrigo, 2012).

La evaluación del riesgo requiere como paso previo la evaluación de la exposición que, en higiene industrial, se suele realizar mediante el control atmosférico de los contaminantes industriales y/o su biomonitorización en fluidos biológicos de trabajadores expuestos. Asimismo, también se pueden utilizar biomarcadores de respuesta tóxica precoz en fluidos biológicos, que tienen especial interés en alteraciones orgánicas específicas producidas tras exposiciones prolongadas.

II.1.1. Indicadores biológicos o biomarcadores

Un biomarcador sería un parámetro que se mide en un medio biológico del trabajador (aire exhalado, orina, sangre y otros), en un determinado momento, y que está asociado directa o indirectamente con la exposición global a un contaminante químico presente en el ámbito laboral, es decir, por cualquiera de las vías de entrada o absorción. La medida puede indicar una exposición reciente, la exposición promedio diaria o la cantidad total del agente acumulada en el organismo, denominada también

carga corporal total. Se entiende por valor límite biológico (VLB) el límite de la concentración en el medio biológico adecuado del agente químico o de uno de sus metabolitos, o de otro indicador biológico directa o indirectamente relacionado con los efectos de la exposición del trabajador al agente en cuestión (Real Decreto 374/2001).

En un amplio sentido del término, el concepto de biomarcador incluye la presencia de un contaminante en un medio biológico de un trabajador (usualmente fluido) y/o las alteraciones sobre los componentes celulares, rutas bioquímicas, procesos o funciones en su organismo, susceptibles de cuantificarse, y por tanto de objetivarse. Se trata, por ello, de un indicador de la respuesta biológica que produce sobre dicho organismo frente a la agresión de un xenobiótico a consecuencia bien de una exposición relativamente reciente (aguda o subaguda), bien a lo largo del tiempo (crónica).

Según Silbergeld y Davis (1994) un biomarcador es una señal fisiológica que refleja exposición a agentes químicos, alteración celular o funcional precoz o una mayor predisposición al desarrollo de alteraciones orgánicas, y que permite establecer una estrategia adecuada en la resolución del problema e investigar las causas con la finalidad de disminuir los efectos nocivos derivados de la exposición.

Esta definición contempla no sólo la exposición y el efecto, sino también la susceptibilidad.

El grupo de trabajo del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo y otros autores, al hablar de VLB, consideran únicamente dos tipos de indicadores biológicos: a) indicador biológico de dosis, parámetro que mide la concentración del agente químico o de alguno de sus metabolitos en un medio biológico del trabajador expuesto; b) indicador biológico de efecto, parámetro que puede identificar alteraciones bioquímicas reversibles, inducidas de modo característico por el agente químico al que está expuesto el trabajador (Bartual et al., 2001). Como podemos observar no contemplan el concepto de susceptibilidad, que valoraría la mayor o menor sensibilidad individual frente a un contaminante.

Los criterios de toxicidad ambiental (VLA o TLV, en las normativas española y americana, respectivamente) hacen referencia exclusivamente a la vía de absorción respiratoria y se establecen para medias poblacionales, no considerando las variaciones interindividuales (de carácter toxicocinético o toxicodinámico) e intraindividuales (como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un periodo de tiempo determinado), permitiendo así una evaluación globalizada de la exposición capaz de reflejar cambios subclínicos reversibles de gran utilidad preventiva.

Sin embargo la biomonitorización también presenta sus limitaciones. Una es la imposibilidad de aplicación a aquellos contaminantes que ejercen una toxicidad global e instantánea, o bien aquellos cuya tasa de absorción sea mínima y, en consecuencia, su concentración en fluidos suele estar generalmente por debajo de los límites de detección analítica. Otra limitación es su inespecificidad. Aun cuando existen algunos biomarcadores específicos, como por ejemplo, los niveles de un metal en sangre u orina, en muchos otros casos nos encontramos con un alto grado de inespecificidad, por ejemplo cuando se mide un metabolito común a varios contaminantes. En este sentido la complementariedad entre los biomarcadores pueden ser de gran ayuda para aumentar su potencia diagnóstica.

Así, se puede definir como biomarcador ideal aquel que cumpla los siguientes requisitos (clasificados por orden de importancia):

- La muestra donde se va a valorar debe recogerse fácilmente y ser éticamente aceptable.
- Debe reflejar una alteración subclínica y reversible, por lo tanto será útil en la prevención de posibles alteraciones futuras.
- Debe ser lo más específico posible, garantizando así un diagnóstico correcto.
- Su análisis debe ser fácil.

II.2. CONSIDERACIONES ANALÍTICAS GENERALES

Algunos contaminantes precisan de indicaciones específicas en relación con el momento en el que se toma la muestra, sobre todo como consecuencia de factores toxicocinéticos. Así, podemos distinguir cinco supuestos (Bartual et al, 2001; Bernal et al, 2002; ACGIH, 2003):

1. Aquellos en los que es independiente u opcional el momento en que se obtiene la muestra. Es el caso de los metales pesados, tóxicos típicamente acumulativos cuya absorción supera con creces la eliminación.
2. Recogida al comienzo de la semana, tras aproximadamente dos días sin exposición.
3. Recogida al final de la semana, tras cuatro o cinco días de exposición consecutivos (lo ideal sería tomarla al final del último día de trabajo).
4. Recogida al final del turno de trabajo, en las dos últimas horas de su jornada o lo antes posible justo después de cesar la exposición.
5. Recogida durante el turno, una vez que el trabajador ha estado expuesto durante un mínimo de dos horas.

Un aspecto a tener en cuenta es la *expresión de los resultados*, especialmente en muestras de orina, ya que pueden verse influidas por el efecto de dilución de la muestra que no ocurriría si se dispusiera de la diuresis de 24 horas. Sin embargo en el medio laboral es muy difícil obtener la orina de 24 horas y las muestras suelen recogerse en un momento concreto o puntual, de ahí que se opte por expresar los resultados en microgramos o miligramos del metabolito de interés respecto a los gramos de creatinina, marcador de filtración glomerular cuya eliminación suele mantenerse constante en el tiempo, considerándose válidas aquellas muestras cuya creatinina se encuentre comprendida en el intervalo entre 0,5 y 3,0 g/l (Bartual et al, 2001; ACGIH, 2003).

Otra cuestión relevante son las unidades y la necesidad de aportar el valor de normalidad. Es conveniente diferenciar entre valor de normalidad y valor límite. Además, hay que considerar que en algunos casos el valor de referencia se ha

obtenido a partir de ensayos en animales de experimentación, con la dificultad que supone la extrapolación a la especie humana.

Otro aspecto de enorme interés lo constituye la interpretación de resultados. En torno a ella subyacen tres cuestiones a considerar: el resultado analítico en sí mismo, el valor de referencia con el cual va a ser comparado y las características del propio sujeto. En el resultado analítico, las principales fuentes de error pueden provenir de:

- La muestra: en muchos casos no es la adecuada; por ejemplo la determinación de plomo sobre una muestra de sangre recogida en un tubo con activador de la coagulación. En este caso se dispondrá de suero pero no de sangre total, que es la muestra idónea teniendo en cuenta que el plomo se encuentra ligado en un 95% al eritrocito. También son interesantes los aspectos relacionados con la conservación, fuentes de contaminación e interferencia con el anticoagulante.
- El método analítico: Las técnicas deberán ser lo más sensibles y específicas posible, debiendo ser métodos validados que incluyan como mínimo el límite de detección de la técnica analítica, la precisión y la exactitud. Existen unas normas UNE relacionadas con la determinación de algunos marcadores (Métodos de ensayo para evaluar los riesgos producidos por sustancias peligrosas en el lugar de trabajo. Bernal et al, 2002; Gil, 2012b):
 - UNE 81592: 1992. Determinación de la actividad del ALA-D¹ en sangre.
 - UNE 81593: 1992. Determinación de ALA² en orina.
 - UNE 81594: 1992. Determinación de protoporfirina cinc en sangre.
 - UNE 81751: 1997 y UNE 81751/1M: 1999. Determinación de estireno en aire exhalado.
 - UNE 81591:1991 y UNE 81590: 1992. Determinación de plomo en sangre.
 - UNE 81595: 1998. Determinación de mercurio en orina.
- La expresión de resultados, ya comentada con anterioridad.

¹ Deshidratasa del ácido delta-amino levulínico

² Ácido delta-amino levulínico

Por tanto dada la variabilidad natural de las concentraciones de contaminantes en las muestras biológicas, los resultados no deben corresponder a una única muestra, sino a la media obtenida a partir del análisis de muestras repetidas.

Hay que insistir que el hecho de que un trabajador supere un límite biológico, no necesariamente implica una exposición excesiva, aunque se deben investigar las causas y establecer las medidas encaminadas a la reducción de la exposición.

II.3. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

En la actualidad pueden distinguirse tres tipos de biomarcadores: de exposición, de respuesta o efecto y de susceptibilidad. La exposición a un determinado contaminante implica una dosis interna capaz de interactuar con sus receptores o dianas en los diferentes órganos y sistemas, dando lugar a una respuesta biológica que, a su vez, está modificada por la diferente susceptibilidad individual.

1. Biomarcadores de exposición. Se trata de un compuesto químico, o bien un producto formado en su metabolización, que se determina en un medio biológico (sangre, orina, pelo, saliva, uñas, aire espirado) y que refleja exposición al mismo. Sería compatible con el concepto de indicador biológico de dosis.
2. Biomarcadores de respuesta o efecto. Como consecuencia de la presencia de un contaminante en el organismo, pueden alterarse actividades enzimáticas o parámetros en rutas bioquímicas, provocar interacciones con macromoléculas, estrés oxidativo, etc. Equivale al concepto de indicador biológico de efecto; no obstante, cualquier indicador biológico de efecto, en sentido estricto también lo sería de exposición, ya que para que se origine una determinada respuesta es condición necesaria la exposición previa al contaminante (Gil y Hernández, 2009; Gil, 2012b).
3. Biomarcadores de susceptibilidad. En general son debidos a factores genéticos y se reconocen estudiando variantes alélicas de genes polimórficos que codifican determinadas proteínas o enzimas implicadas en la toxicocinética o toxicodinámica permitiendo así valorar la sensibilidad individual frente a un contaminante químico

en el medio laboral. En este apartado encontramos las enzimas de fase I y II del metabolismo. Así, por ejemplo, en la fase I destaca el sistema polimórfico activador del complejo isoenzimático del citocromo P- 450, y en la fase II, algunas enzimas implicadas en los procesos de detoxificación, destacando sobre todo las N-acetiltransferasas y las glutatión-S-transferasas.

En la actualidad los biomarcadores más empleados en vigilancia de la salud son los de exposición y efecto, de los que nos vamos a ocupar a continuación.

II. 3.1. Biomarcadores de exposición

Dentro de los indicadores biológicos de exposición más usuales en el medio laboral, nos ocuparemos más concretamente del grupo de metales pesados muy empleado en la industria y especialmente en el sector siderúrgico (cromo, níquel, manganeso, cadmio y plomo). En la siguiente tabla se indica el valor de la normalidad que haría referencia a datos obtenidos a partir de estudios poblacionales y que garantizarían la no aparición de alteraciones (Lauwerys y Hoet, 1993).

El límite biológico se corresponde con el VLB propuesto por el INSHT o bien por la American Conference Governmental Industrial Hygienists (ACGHI). (Bartual et al, 2001; ACGIH, 2003).

Tabla 1. Valores de la normalidad, límites biológicos y momentos de muestreo de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en muestras biológicas obtenidos a partir de estudios poblacionales

Contaminante	Medio biológico	Valor de la normalidad	Límite biológico	Momento de muestreo
Cadmio(Cd)***	Sangre		5 µg/l	O
	Orina	< 2 µg/g creat	5 µg/g creat	
Cromo VI(Cr)	orina	< 5 µg/g creat	10/30 µg/g creat	FJL/FSL
Manganeso(Mn)	Sangre	<1µg/100 ml		
	Orina	< 3 µg/g creat		
Níquel(Ni)	Plasma	< 0,05µg/100 ml	30 µg/g creat*	O
	Orina	< 2 µg/g creat		
Plomo(Pb)	Sangre	<30-40** µg/100ml	70µg/100 ml	

*Valor propuesto por Lauwerys y Hoet (1993); FJL: final de la jornada laboral; FSL: final de la semana laboral; O: opcional o indiferente.

** En el caso del plomo la primera cifra del valor de la normalidad hace referencia a mujeres en edad fértil (30 µg/100ml).

*** Los niveles de cadmio se ven influidos por el hábito tabáquico.

II.3.2. Biomarcadores de respuesta o efecto

En este apartado nos ocuparemos concretamente del plomo, único metal pesado que posee biomarcadores de respuesta o efecto de uso frecuente en salud laboral.

Tabla 2. Valores de la normalidad, límites biológicos y momentos de muestreo de biomarcadores de respuesta o efecto frente a la exposición a plomo

Contaminante químico-metabolito	Medio biológico	Valor de normalidad	Límite biológico	Momento de muestreo
Plomo				
<i>Porfirina libre</i>	Eritrocitos	75 µg/100ml erit	80 µg/100ml erit*	
<i>ZZP</i>	Sangre	<40 µg/100ml	40 µg/100ml*	
		<2,5 µg/g Hb	3 µg/g Hb*	
<i>ALA</i>	Orina	< 4,5 mg/g creat	5 mg/g creat*	
<i>Coproporfirinas</i>	Orina	< 100mg/g creat	100mg/g creat*	
<i>ALA-D</i>	Eritrocitos	>100U/10 ⁶ erit	<70U/10 ⁶ erit	

*Valores propuestos por Lauwerys y Hoet (1993). ZZP: Protoporfirina zinc; ALA: ácido delta amino levulínico; ALA-D: ácido delta amino levulínico deshidratasa; erit: eritrocitos; creat: creatinina; Hb: Hemoglobina

II.4. VIGILANCIA AMBIENTAL FRENTE A VIGILANCIA BIOLÓGICA

Ante la imposibilidad de eliminar la presencia de contaminantes tóxicos en el ambiente laboral, y la continua aparición de nuevos productos químicos, se hace imprescindible fijar unos niveles que garanticen la salud y el bienestar de los

trabajadores. No obstante, la variabilidad individual, así como la falta de datos precisos respecto de los posibles efectos tóxicos a medio y largo plazo, obliga a la revisión periódica de estos límites. Conviene destacar el hecho de que sólo puede prevenirse aquel riesgo que sea previamente detectado y evaluado.

Los límites tolerables de exposición se establecen a partir de la experimentación animal, de estudios epidemiológicos y de la experiencia industrial. Los organismos internacionales más importantes encargados de establecerlos son (Bernal et al, 2002):

- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), que propone los Recommended Exposure Limits (REL).
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA), que establece los Permissive Exposure Limits (PEL).
- American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH), que se encarga de promulgar los Threshold Limit Values (TLV).
- Comité mixto de la Organización Internacional del Trabajo/Organización Mundial de la Salud (OIT/OMS).
- Control of Substances Hazardous to Health (COSHH), que propone los Occupational Exposure Standard (OES), entre los que se encontrarían los Maximum Exposure Limits (MEL).

Sin duda los que tienen mayor prestigio en el ámbito de la higiene industrial son los TLV de los que se distinguen varias modalidades (Falagán, 2005; Lauwerys, 1994; Fuentes et al, 1999; ACGIH, 2003):

- TLV-TWA (*Time Weighted Average*). Concentración media de sustancia química en el aire ambiental que, respirada a razón de 8 horas diarias y 5 días a la semana (40 h semanales) durante toda una vida profesional (aproximadamente 30 años), no produce lesión alguna en la media de la población trabajadora.

Conviene hacer algunas consideraciones. En primer lugar, son valores que presuponen como única vía de entrada la respiratoria, de ahí que si

penetra además por vía cutánea, el TLV ambiental no representaría un elemento de seguridad al no contemplar esta otra vía de absorción. Por otra parte, en la definición se alude a que no provoca efectos lesivos en la media de la población trabajadora, es decir, puede que existan trabajadores que como consecuencia de factores que modifiquen su toxicidad (en la absorción, alteraciones de la función hepática que impidan una adecuada metabolización, lesiones en el sistema renal, etc.), no se incluyan en esa población media estándar y puedan desarrollar efectos adversos, no evitando así el TLV el escalón de seguridad individual.

- TLV- STEL (*Short Term Exposure Limits*). Límite de exposición a corto plazo. Es la concentración media que, respirada a razón de exposiciones máximas de 15 min al día, espaciadas al menos 1 h, y con un máximo de 4 exposiciones en la jornada laboral, no producen lesión en la media de la población trabajadora.
- EEL (*Emergency Exposure Limits*). También denominada concentración inmediatamente peligrosa para la vida y la salud (IPVS). Representa la concentración que puede tolerarse durante 30 min sin riesgo de síntomas graves ni efectos irreversibles para la salud, siendo posible la aparición de efectos reversibles. Pueden ser tolerados de forma excepcional, normalmente en exposiciones breves y únicas en la vida laboral, a consecuencia de accidentes.
- MAC (Maximum Allowable Concentration) o TLV-C (Ceiling). Concentración de sustancia química en el aire ambiente que nunca debe ser sobrepasada. Se denomina también valor techo (TLV-C). Una sustancia se clasifica en esta categoría cuando produce irritación intolerable, daños tisulares irreversibles o narcosis. Por ejemplo el TLV-C es relevante en los gases irritantes.

II.4.1. Valores límites ambientales en la normativa española

El Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, recoge la normativa sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo, e indica los valores límites ambientales (VLA).

Los VLA, al igual que los TLV propuestos por la ACGIH, representan unas condiciones que, basándose en los conocimientos actuales, la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos diariamente durante toda su vida laboral, sin que sufran efectos adversos para su salud. Sin embargo, nuevamente se habla de la mayoría y no de la totalidad debido a las diferencias inter e intraindividuales; por otra parte, sirven exclusivamente para la evaluación y el control de los riesgos por inhalación y vía respiratoria de los agentes químicos incluidos en la lista de valores propuesta por el grupo de trabajo del INSHT (Falagán, 2005).

Cuando alguno de estos agentes se absorba también por vía cutánea, bien por manipulación directa o a través del contacto de los vapores con las partes desprotegidas de la piel, y esta aportación pueda resultar significativa para la dosis absorbida por el trabajador, el agente en cuestión aparece señalado en la lista con la notación vía dérmica (RD 374/2001; Falagán, 2005).

Esta llamada advierte, por una parte, que la medición de la concentración ambiental puede no ser suficiente para cuantificar la exposición global y, por otra, de la necesidad de adoptar medidas para prevenir la absorción cutánea.

II.5. LA SOLDADURA METÁLICA (Rojas, 2009)

Este procedimiento es un método de unión con amplias posibilidades en la industria y la construcción. A través de la aplicación de calor o presión se unen metales mediante una soldadura ligera, con la fuerza y resistencia aproximada del metal original.

La soldadura es una actividad intensiva de trabajo. Aunque cada vez se encuentran más aplicaciones para los métodos automáticos de soldadura, la de arco manual continúa siendo el procedimiento más utilizado.

A principios del siglo XIX se tecnificó el proceso de soldadura, que hasta ese momento se conseguía utilizando las fraguas, el yunque y el martillo. Así, se introdujo el soplete oxiacetilénico y, a finales de dicho siglo, empezó a usarse la soldadura eléctrica. En la actualidad existen diversos procedimientos de soldadura: MIG, MAG, TIG, láser, plasma, haz de electrones, etc. Todos estos nuevos procesos se basan en el mismo principio: elevar la temperatura del punto de unión hasta conseguir la fusión del metal, de tal forma que al enfriarse se forme una unión homogénea.

Los procesos de soldadura dan lugar inevitablemente a la aparición de humos y gases que, en conjunto, se denominan humos de soldadura. La inhalación de los mismos por parte de los operarios implicados puede ocasionar alteraciones de la salud en forma de intoxicaciones agudas así como de enfermedades profesionales de diversa naturaleza, dependiendo del tipo de soldadura, materiales soldados, continuidad de la exposición, efectividad de la ventilación, etc. Sin embargo, los trabajadores de la soldadura no solo están expuestos a los humos correspondientes, sino también a otros riesgos para la salud tanto de tipo físico (radiaciones ópticas, quemaduras, explosiones, riesgos eléctricos, ruido), como mecánicos (proyección de partículas) y ergonómicos (manipulación de cargas).

Los humos de soldadura consisten en una mezcla de partículas y gases que se producen tras el fuerte calentamiento y descomposición de los compuestos presentes en el punto de soldadura en las inmediaciones del operario, a saber las piezas a soldar, los recubrimientos de las superficies de estas piezas, los materiales de aporte utilizados en el proceso y la contaminación del aire de la zona de soldadura. Las partículas están constituidas por óxidos metálicos y los gases por dióxido de carbono, monóxido de carbono, óxidos nitrosos y ozono.

La cantidad de humos que inhalan los soldadores depende de varios factores, entre ellos el total de humos que se producen durante la jornada de trabajo, la posición del soldador en relación al punto de soldadura, la ventilación del puesto de trabajo, la pantalla de soldadura y la utilización de equipos de protección individual para proteger las vías respiratorias. La cantidad total de humos producidos varía según el proceso de soldadura y, dentro de cada uno de ellos influyen varios factores. En

general éstos son el tiempo efectivo de soldadura, la cantidad de materiales de aporte consumida, la potencia calorífica aplicada y el tipo de recubrimiento de las piezas (pinturas, barnices, plásticos, etc.).

II.5.1. Peligros de la soldadura para la salud (Lewis, 1999; Rojas, 2009)

La inhalación de humos de soldadura puede perjudicar la salud. Los órganos afectados y la gravedad de las lesiones dependen de los contaminantes presentes en los humos y de la cantidad inhalada. Cada contaminante tiene asignada una concentración máxima en el aire conocida como valor límite ambiental (VLA) que, si no se supera durante toda la vida laboral, con el conocimiento científico actual se puede considerar que no sufrirán problemas de salud. Si se superan los VLA, entonces aumenta la probabilidad de que se produzcan los daños sobre la salud.

Para algunos de los contaminantes que pueden estar presentes en los humos de soldadura, tales como metales pesados (cromo, cadmio), gases (monóxido de carbono), aniones (fluoruros), se dispone también de valores límite biológicos (VLB) por lo que mediante el análisis de muestras biológicas se puede obtener información sobre la exposición que es complementaria a la obtenida en los muestreos ambientales.

La *soldadura de arco metálico (SAM)* con protección para unir acero ligero es el uso más común. La principal exposición es al óxido de hierro, y el depósito pulmonar de este material particulado no fibrógeno ha originado el desarrollo de neumoconiosis benigna. La exposición a vapores de manganeso y fluoruro puede ser considerable cuando se utilizan ciertas varillas de soldadura.

Las propiedades de resistencia a la corrosión del acero inoxidable se deben a una concentración elevada de cromo (del 18 al 30%). También suele haber níquel y manganeso en diferentes aleaciones del acero inoxidable. La exposición al cromo (que incluye Cr VI), níquel y manganeso pueden ser considerables, en particular, con el *proceso de arco metálico con gas (AMG)*. La superficie del acero inoxidable refleja la radiación ultravioleta y puede formar óxidos de nitrógeno y ozono. La soldadura con

hidrógeno bajo de acero inoxidable genera concentraciones altas de vapores de cloruro.

Casi todos los soldadores de aluminio utilizan el *método con gas inerte tungsteno (GIT)*. Al igual que con el acero inoxidable, se origina la formación de ozono. También es considerable la formación de óxido de aluminio y polvo.

Las soldaduras de arco y con gas generan vapores metálicos. Se utiliza una antorcha de acetileno para generar una llama intensa. La soldadura de plata puede generar la exposición a óxido de cadmio capaz de causar lesión pulmonar aguda y la muerte, especialmente en zonas cerradas y poco ventiladas. Asimismo se han descrito consecuencias similares debidas a la alta concentración de los óxidos de nitrógeno originados durante soldaduras con gas. En todos los casos, el factor crítico que originó el peligro fue la ventilación inadecuada.

La radiación y el calor originan las lesiones más comunes en los soldadores: la fotoqueratitis (chispazo de los soldadores) y las quemaduras térmicas, a menudo relacionadas con el uso inadecuado de lentes protectoras, guantes y pantallas. Las chispas o desechos que se desprenden pueden causar quemaduras o lesiones oculares. La exposición al ruido suele exceder 80 dB en el proceso de soldado, en particular en las operaciones de cortado a acanalado; en la soldadura de plasma (donde se genera calor intenso), los valores pueden aproximarse a 120 dB. Las condiciones ambientales también influyen en la producción del ruido. Además, el choque eléctrico es un peligro constante y requiere aislamiento y protección de cables y equipos.

Los recubrimientos o contaminantes pueden constituir peligros adicionales, en particular cuando no se sospecha su presencia ni se sospecha su peligro potencial. La formación de gases, vapores o humos tóxicos suele deberse al calentamiento de un metal recubierto o tratado.

II.5.2. Manifestaciones clínicas

A) Exposición aguda

Los efectos agudos aparecen como consecuencia de exposiciones a altas concentraciones de contaminantes, muy superiores a los VLA durante cortos periodos de tiempo y que en el caso de los trabajos de soldadura pueden corresponder a una jornada laboral. Tendrían la calificación de accidentes de trabajo y los más frecuentes son:

1. Fotoqueratitis: resulta de la exposición de la córnea a radiación ultravioleta en los límites de 280 a 315 nm (UVB). La duración de la exposición necesaria para inducir este efecto varía con la distancia desde el arco y la intensidad de la luz. Tras varios segundos de exposición, el trabajador presenta dolor, ardor o una sensación de “arena” en el ojo. El examen físico muestra infección conjuntival y la exploración con lámpara de hendidura puede revelar depresiones puntiformes sobre la córnea.

2. Fiebre por vapores metálicos: es un trastorno benigno que se cura de manera espontánea, caracterizado por el inicio tardío (8 a 12 horas) de fiebre, escalofríos, tos, mialgias y sabor metálico. El antecedente de soldadura en metal galvanizado sugiere el diagnóstico (Blanc et al, 1993). Los humos metálicos, sobre todo los del cinc, producen fuertes temblores y otros síntomas similares a los de la gripe que aparecen durante la noche siguiente a la exposición y que remiten sin dejar secuelas.

3. Irritación de vías respiratorias superiores: puede deberse a exposición a diversos contaminantes químicos en la soldadura, como polvos, ozono, óxidos de aluminio, de nitrógeno, de cadmio y fluoruros. También suelen presentarse cuadros asmáticos como resultado de la irritación o alergia inespecífica (especialmente a cromo y níquel).

4. Lesión pulmonar: aunque es poco común, la exposición a óxidos de nitrógeno y de cadmio puede causar lesión pulmonar aguda y edema pulmonar tardío. Un antecedente de soldadura con arco o de gas en un espacio cerrado o mal ventilado, o donde se trabaje con láminas de metal, debe preocupar y ser indicador para una valoración y observación médica cuidadosa (Billing y Howard, 1993). La irritación de vías respiratorias da origen a inflamación y edema pulmonar (neumonitis). Las dos variables más importantes para la severidad de este trastorno son la concentración del gas o vapor inhalado y el tiempo de exposición.

5. Asfixia química: debido a la inhalación de altas concentraciones de monóxido de carbono (CO) y monóxido de nitrógeno (NO). En los casos más leves producirían dolor de cabeza, aturdimiento y malestar crecientes, conforme aumenta la dosis inhalada, hasta inconsciencia y muerte en caso de trabajar en espacios confinados sin la ventilación adecuada (Rojas, 2009).

6. Traumatismos musculoesqueléticos: las lesiones por estrés isométrico en las extremidades superiores durante el trabajo con soldadura pueden presentarse como dolor de cuello y hombro después de una actividad prolongada. El daño muscular asintomático puede incrementar ligeramente los valores de creatin- fosfoquinasa en suero.

7. Quemaduras térmicas y lesiones eléctricas: debido a las altas temperaturas que alcanza la llama, las chispas y el material que se está soldando, son frecuentes las quemaduras en la soldadura. Las lesiones eléctricas son importantes en la soldadura de cables o torres de alta tensión.

B) Exposición crónica

Los efectos crónicos son el resultado de largos periodos de exposición a concentraciones moderadas de contaminantes, generalmente por encima de los VLA. Estos efectos son los más característicos en el entorno industrial y se manifiestan después de muchos años de trabajo, incluso una vez finalizada la vida laboral, debido a la acumulación progresiva en el organismo o al deterioro de los órganos afectados. Algunos de estos efectos, de naturaleza y gravedad variables, se corresponden con enfermedades profesionales. La mayoría de ellos son alteraciones crónicas sobre el aparato respiratorio, aunque si el contaminante industrial se absorbe por los pulmones puede alcanzar el torrente sanguíneo y producir efectos sistémicos a nivel de otros órganos diana, como el sistema nervioso, huesos, riñones, hígado, etc (Rojas, 2009).

1. Siderosis: se debe a la acumulación de partículas de óxido de hierro no fibrógenas en el pulmón. En tanto que el aspecto radiológico puede ser espectacular, con pruebas de densidades reticulonodulares difusas, los estudios sobre déficit de la función

pulmonar no han sido consistentes, lo que sugiere un efecto leve o mínimo. En soldadores que también han estado expuestos a sílice cristalina o asbesto es difícil distinguir radiológicamente la siderosis de una fibrosis pulmonar. El engrosamiento o la calcificación pleural no se han relacionado con la soldadura en ausencia de exposición a asbesto.

2. Otros efectos crónicos: los soldadores presentan un importante conjunto de síntomas respiratorios y presentan una mayor frecuencia de bajas laborales por enfermedades respiratorias. Aun no se ha podido comprobar que la soldadura produzca un déficit claro de la función pulmonar, por lo que, en la actualidad, no hay evidencias de deterioro respiratorio crónico por soldadura. Para valorar a un soldador con enfermedad pulmonar crónica, es esencial una historia médica y laboral cuidadosa, dirigida a exposiciones a soldadura y otros factores relacionados (Ozdemir et al, 1995).

3. Efectos sensibilizantes: los humos de soldadura, dependiendo de las características del proceso seguido, pueden contener algunas sustancias sensibilizantes capaces de actuar sobre el sistema respiratorio (Rojas, 2009).

4. Efectos cancerígenos: La Agencia internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC) clasifica los humos de soldadura en general dentro del grupo 2B, correspondiente a los agentes posiblemente cancerígenos para humanos. Algunos estudios epidemiológicos indican una mayor incidencia de cáncer broncopulmonar en los soldadores que en la población general, aunque sin distinguir entre los diferentes procesos de soldadura (Rojas, 2009).

Los estudios de cáncer pulmonar en soldadores tampoco han sido consistentes, y comparten las limitaciones de la mayor parte de estudios respiratorios. Algunos investigadores atribuyen el pequeño exceso de cáncer pulmonar que han encontrado varios estudios a la exposición a cromo y níquel en la soldadura de acero inoxidable, que constituye una pequeña proporción de todas las exposiciones a soldadura. Los estudios que incluyen soldadores en astilleros durante la primera mitad del siglo pasado no son concluyentes ya que también presentaban una importante exposición secundaria a asbesto (Sjögren et al, 1994).

5. Efectos teratógenos: en los humos de soldadura existen sustancias capaces de afectar el desarrollo del embrión-feto durante la gestación. Es el caso del plomo y monóxido de carbono y posiblemente también del cadmio y del pentóxido de vanadio.

Otros estudios también indican la presencia de oligoespermia y efectos adversos sobre la reproducción en los soldadores. Además se han recogido efectos neuro-psicológicos sutiles (Lewis, 1999).

II.5.3. Prevención

Casi todas las lesiones o intoxicaciones agudas relacionadas con los procesos de soldadura pueden prevenirse. El uso de procedimientos adecuados de seguridad y, sobre todo, de higiene industrial evitará quemaduras, lesiones oculares, choque eléctrico y exposición a agentes químicos. Prestar atención a una adecuada ventilación es la mejor protección contra la exposición excesiva accidental a contaminantes en el aire. Los equipos de protección individual (EPI) con suministro de aire son esenciales en espacios cerrados, en particular, en aquellos procesos de soldadura que originan óxidos de nitrógeno.

Son precisos nuevos estudios en el futuro para valorar de forma óptima el posible efecto de la soldadura sobre la función respiratoria y el desarrollo de cáncer pulmonar. Estos efectos, si existen, se podrían reducir al mínimo con medidas que disminuyan las exposiciones de los soldadores a través de protecciones de ingeniería, ventilación y el uso adecuado de EPI.

II.5.3.a. Condiciones higiénicas de trabajo

La valoración precisa de cómo pueden afectar los humos de soldadura a los trabajadores exige el análisis de las condiciones de trabajo por parte de técnicos superiores de prevención para identificar la naturaleza y cantidad de contaminantes inhalados. La información que suministra el trabajador es muy valiosa para efectuar la

evaluación higiénica, parte importante de la evaluación de riesgos del puesto de trabajo (Rojas, 2009).

II.5.3.b. Control de riesgos

Los riesgos por inhalación de humos de soldadura se consideran razonablemente controlados cuando las concentraciones de contaminantes a las que se encuentra expuesto el soldador son inferiores a los VLA. Aun así, siempre se tratará de reducir o incluso eliminar la exposición con los recursos y conocimientos técnicos disponibles.

Las medidas preventivas a aplicar dependerán de los resultados de la evaluación de riesgos realizadas en cada puesto de trabajo concreto. No obstante, en general deberán aplicarse las siguientes (Rojas, 2009):

- Actuación sobre el foco contaminante: eliminación o sustitución de contaminantes, aplicación de procesos de soldadura de menor contaminación
- Actuación sobre el medio de propagación: sistemas de extracción localizada y ventilación general
- Actuación sobre el propio trabajador (EPIs), cuando los riesgos no han sido controlados adecuadamente y se han agotado las medidas preventivas sobre el foco y el medio de propagación de los contaminantes. Su selección estará en función del tipo de contaminantes y de las condiciones de trabajo.
- Vigilancia de la salud. Los reconocimientos médicos específicos de los soldadores corren a cargo de los médicos de trabajo adscritos a los servicios de prevención, quienes establecerán los protocolos de vigilancia de la salud que corresponda aplicar a cada trabajador en particular, definiendo en ellos los distintos reconocimientos médicos a realizar así como su periodicidad.

II.6. METALES PESADOS

II.6.1. Cadmio

Metal de color blanco-metálico con matiz azulado, brillante y dúctil. Constituye un subproducto de procesos de refinado del cinc y en la naturaleza se encuentra como sulfuro de cadmio. Es fácilmente atacado por ácidos.

II.6.1.a. Fuentes de intoxicación

Desde el punto de vista industrial, destacan los óxidos, sulfuros, cloruros, bromuros, sulfatos o carbonatos, según las diversas aplicaciones. En unión al selenio forma seleniuros. Además, existen fuentes de intoxicación extraprofesionales, entre las cuales destacan la ingesta de bivalvos que pueden contener hasta 1 mg/Kg.

Hace algunos años también aparecían impregnaciones importantes por consumo de alimentos conservados en latas galvanizadas que contenían cadmio o preparados en utensilios culinarios fabricados con aleaciones al cadmio. Este metal, al igual que el plomo, se disuelve en los ácidos orgánicos, incorporándose así a los alimentos. En la actualidad estos envases y utensilios están sometidos a una legislación específica al respecto (Gil et al, 2010; Mataix y Gil, 2009).

II.6.1.b. Etiología

La intoxicación por cadmio está reconocida como enfermedad profesional en el RD 1299/2006 apartado A nº3. Las intoxicaciones industriales por el cadmio resultan de la exposición excesiva a polvos y humos que se desprenden en la producción del metal y sus sales. Entre los procesos destacan (Desoille et al, 1986; Lauwerys, 1994; Gil y Gisbert, 2004; Gil, 2012a):

- Preparación del cadmio por procesado del cinc, el cobre o plomo.
- Aleaciones de cadmio con acero y cobre, aumentando así su resistencia.
- Fabricación de baterías alcalinas níquel-cadmio.

- Fabricación de lámparas fluorescentes.
- Galvanoplastia electrolítica (metalizado) por su resistencia a la corrosión.
- Fabricación de pigmentos (pinturas, tintes, textil, papel, plásticos, cerámica, pirotecnia) a partir de sulfuros (amarillos y naranjas) o sulfoseleniuros (rojos).
- Contaminante de abonos fosfatídicos.
- Aditivo de plásticos (estearato de cadmio).
- Aleaciones para soldadura en la que el cadmio sustituye al estaño, formando electrodos de manganeso-cadmio.

Según el RD 1299/2006, las principales actividades relacionadas con la manipulación de cadmio que pueden producir enfermedades profesionales son:

- Preparación del cadmio por procesado del zinc, cobre o plomo.
- Fabricación de acumuladores de níquel-cadmio.
- Fabricación de pigmentos cadmíferos para pinturas, esmaltes, materias plásticas, papel, caucho y pirotecnia.
- Fabricación de lámparas fluorescentes.
- Cadmiado electrolítico.
- Soldadura y oxicorte de piezas con cadmio.
- Procesado de residuos que contengan cadmio.
- Fabricación de barras de control de reactores nucleares.
- Fabricación de células fotoeléctricas.
- Fabricación de varillas de soldadura.
- Trabajos en horno de fundición de hierro o acero.
- Fusión y colada de vidrio.
- Aplicación por proyección de pinturas y barnices que contengan cadmio.
- Barnizado y esmaltado de cerámica.
- Tratamiento de residuos peligrosos en actividades de saneamiento público.
- Fabricación de pesticidas.
- Fabricación de amalgamas dentales.
- Fabricación de joyas.

II.6.1.c. Toxicocinética

Absorción

El cadmio penetra en el organismo por inhalación, sobre todo, en los procesos de fundición y refinado de los minerales que lo contienen, y en los de molienda y envasado de los pigmentos cádmicos (Gil, 2012a).

Distribución

En la sangre se fija a los hematíes y a la metatoleina (proteína de bajo peso molecular, rica en grupos -SH) en un 90-95%. En los tejidos se fija a dicha proteína, cuya síntesis estimula el propio metal, lo que explicaría el carácter acumulativo. El cadmio se acumula principalmente en riñón y en hígado (50-75%), aunque también puede hacerlo en tejido óseo, pulmones, páncreas, tiroides, testículos y glándulas salivales en menos proporción.

Eliminación

Se elimina principalmente por el riñón, con una vida media biológica de 8 a 30 años. La excreción renal del cadmio aumenta después de una exposición crónica por deterioro de la reabsorción tubular proximal, siendo una manifestación de nefrotoxicidad por cadmio (Van Sittert et al, 1993).

II.6.1.d. Efectos tóxicos

La intoxicación aguda suele ser secundaria a la inhalación de humos procedentes de óxidos de cadmio, y genera un cuadro de irritación pulmonar grave (neumonitis química) con disnea, cianosis y tos, a veces precedida por un intervalo de latencia que oscila entre 1 y 8 horas. Pueden apreciarse síntomas premonitorios que recuerdan los de la fiebre de los soldadores (fiebre, escalofríos, sensación gripal, cefaleas, etc.). La evolución suele ser favorable hacia la curación completa.

Sin embargo, lo más frecuente en el ámbito laboral suele ser la intoxicación crónica, cuyos efectos son renales y de afectación del sistema esquelético. También provoca hipertensión arterial y es cancerígeno.

- *Efectos renales.* En el organismo el cadmio se acumula en el hígado y los riñones. Inicialmente localizado en el hígado, sería progresivamente transportado hacia el riñón, siendo éste el órgano crítico. Se estima que una concentración por encima de 200 µg/g de tejido fresco implica afectación renal. El cuadro clínico es una nefritis tubular intersticial; primero, y de forma selectiva, se ve afectado el primer tramo del túbulo proximal, que se manifiesta por una proteinuria cádmica caracterizada por la aparición en la orina de proteínas de bajo peso molecular como la β 2- microglobulina, la proteína fijadora de retinol (RBP), la lisozima, la alanina aminopeptidasa (AAP) y la N- acetil β - glucosaminidasa (NAG), todas ellas empleadas como biomarcadores (Gil y Pla, 2001; Gil y Hernández, 2009). A la larga esta disfunción renal progresa hasta aparecer hipercalciuria, calculosis renal, y más raramente, osteomalacia y afectación tubular distal.
- *Afectación del sistema esquelético.* Como consecuencia de la hipercalciuria, y probablemente porque el cadmio impide la incorporación del calcio a los huesos, incrementando así su eliminación urinaria, se produce una alteración ósea en forma de osteomalacia con fisuras óseas simétricas radiológicas, a menudo localizadas en el cuello del fémur y la pelvis (estrías de Milkman- Looser). Esta forma de toxicidad ósea parece asociada al metabolismo del calcio, y afecta especialmente a las mujeres después de la menopausia, provocando dolores intensos en la pelvis y miembros inferiores, lo que explica la denominación onomatopéyica de esta enfermedad en Japón (Itai-Itai), descrita en una población que consumía arroz contaminado por una fundición de cadmio de cadmio próxima a una plantación.
- *Hipertensión.* La ingesta crónica de pequeñas cantidades de cadmio puede inducir hipertensión arterial, cuya patogenia podría deberse a un exceso en la retención de sodio, vasoconstricción, aumento de los niveles de renina y elevación del gasto cardiaco, aunque existen datos contradictorios.

- *Acción cancerígena.* Es de localización prostática preferente (especialmente por la exposición a óxidos). También otros autores lo han relacionado con el cáncer de pulmón, sobre todo tras exposición a sulfato, sulfuro y óxidos.
- *Otros efectos.* Efectos sobre el sistema inmune como la supresión de la fagocitosis en macrófagos pulmonares; trastornos respiratorios, como rinitis irritante con anosmia (coriza cádmica), bronquitis y enfisema pulmonar, y dientes cádmicos, pigmentación amarilla del esmalte en forma de bandas o anillos debidos a la formación de sulfuro de cadmio, que respeta el borde libre de los dientes y las encías (Gil y Gisbert, 2004).

II.6.1.e. Diagnóstico

Se basa en la determinación de la concentración de cadmio en sangre y orina, cuyos niveles de normalidad son de 5 µg/l y 2,5 µg/g de creatinina, respectivamente. La concentración en sangre de individuos no expuestos suele ser inferior a 1 µg/l. En fumadores los niveles son más elevados ya que este metal es un contaminante habitual del tabaco (Benedetti et al, 1994).

La analítica incluirá determinaciones de urea, creatinina, glucosuria, aminoaciduria y, a ser posible, proteinuria total, investigando las proteínas de bajo peso molecular y, muy especialmente, la β2- microglobulina (Lauwerys, 1994).

II.6.2. Cromo

Elemento de aspecto metálico, muy resistente a la corrosión y al ataque por ácidos, sobre todo si contiene carbono. El cromo se utiliza principalmente en metalurgia para aportar resistencia a la corrosión y un acabado brillante.

II.6.2.a. Fuentes de intoxicación

Como metal carece de toxicidad, sin embargo sus productos de oxidación, como el ácido crómico (usado en galvanoplastia), y sus sales, cromatos y dicromatos, son muy tóxicos por su acción caustica. (Desoille et al, 1986; Gil y Gisbert, 2004).

II.6.2.b. Etiología

La intoxicación por cromo se recoge en el Apartado A, número 5 del RD 1299/2006 de 10 de Noviembre de 2006 de enfermedades profesionales.

Entre las aplicaciones destacan:

- Aleaciones con el acero: acero al cromo y al cromo-níquel.
- Cromado de metales (galvanoplastia).
- Fabricación de pigmentos para textiles, curtido de pieles, donde se emplea el cromato potásico.
- Industria del cemento.
- Recubrimiento refractario de hornos mediante óxido de cromo.
- Industria química de síntesis de antraceno, antraquinona y ácido nicotínico a partir de cromatos en solución ácida.

Según el RD 1299/2006, las principales actividades que pueden producir enfermedades profesionales son la reparación, empleo y manipulación de los compuestos de cromo, en especial los cromatos, dicromatos alcalinos y el ácido crómico, principalmente en:

- Fabricación de catalizadores, productos químicos para la curtición, y productos de tratamiento de la madera que contengan compuestos de cromo.
- Fabricación y empleo de pigmentos, colorantes y pinturas a base de compuestos de cromo.
- Aserrado y mecanizado de madera tratada con compuestos de cromo.
- Aplicación por proyección de pinturas y barnices que contengan cromo.
- Curtido al cromo de pieles.
- Preparación de clichés de fotograbado por coloides bicromados.
- Fabricación de cerillas o fósforos.
- Galvanoplastia y tratamiento de superficies de metales con cromo.
- Decapado y limpieza de metales y vidrios (ácido sulfocrómico o ácido crómico).
- Fabricación de cromatos alcalinos.
- Litograbados.

- Fabricación de aceros inoxidables.
- Trabajos que implican soldadura y oxicorte de aceros inoxidables.
- Fabricación de cemento y sus derivados.
- Procesado de residuos que contengan cromo.

II.6.2.c. Toxicocinética

El tóxico se absorbe por vía digestiva, respiratoria y cutánea. Posteriormente se distribuye a sangre y se fija a proteínas, formando complejos con las mismas. Algunos compuestos (como el cromo trivalente y hexavalente) son agentes desnaturalizantes de las proteínas y precipitantes de los ácidos nucleicos. Finalmente se elimina lentamente por la orina (Gil y Gisbert, 2004).

II.6.2.d. Efectos tóxicos

En el medio industrial, las acciones tóxicas de mayor importancia son sin duda la causticidad (especialmente del ácido crómico y sus sales), el poder sensibilizante y la acción cancerígena. La intoxicación aguda cursa con una acción irritante y caústica en los órganos y tejidos que entran en contacto con el cromo. Los vapores de dioxiclورو de cromo son muy irritantes de la piel y mucosas.

La intoxicación crónica se debe normalmente al cromo hexavalente y afecta a tres niveles clínicos fundamentalmente:

- a) Dermatológico: las dermatosis se manifiestan bajo dos formas clínicas:
- Úlceras cutáneas: indoloras, de bordes regulares, a veces con costra y de localización variable (piel, tabique nasal, conjuntiva, cornea y paladar).
 - Dermatosis por sensibilización: normalmente secundarias al cromo hexavalente, que son las dermatosis profesionales más frecuentes. Las lesiones asientan alrededor de las glándulas sudoríparas.

- b) Respiratorio: cursa con cuadros traqueobronquiales, caracterizados por tos, dolor retroesternal y broncoespasmo, o cuadros de asma bronquial tipo alérgico, sobre todo en trabajadores que también tienen dermatosis alérgicas.
- c) Acción cancerígena y mutagénica: Los cromatos y dicromatos (de calcio, plomo, etc.) son capaces de provocar cáncer broncopulmonar. El cromato de cinc es un potencial carcinógeno gástrico. El cromo hexavalente y sus sales son mutágenos según se ha comprobado en ensayos de toxicidad específicos (Lauwerys, 1994; Gil y Gisbert, 2004).

II.6.2.e. Diagnóstico

Se basa en la medición de los niveles de cromo en orina y suero. Los niveles de normalidad en sujetos no expuestos son inferiores a 5 microgramos/gramo de creatinina y a 0,05 microgramos/100 ml en orina y suero, respectivamente. Los niveles en orina son indicativos de la absorción de cromo hexavalente. El límite máximo permisible en orina es de 30 microgramos/gramo de creatinina (Lauwerys y Hoet, 1993; Gil y Gisbert, 2004).

No debemos olvidar la importancia de la anamnesis e historia laboral para llegar a un diagnóstico cierto.

II.6.3. Manganeso

Metal de color y brillo acerado, fácilmente oxidable. España es un importante productor y exportador de este metal (minas de Huelva).

II.6.3.a. Fuentes de intoxicación

En la naturaleza se encuentra en forma de óxidos, siendo el dióxido el más importante y estable. Cuando actúa como metaloide forma los ácidos mangánico y permangánico, con sus sales correspondientes. Como metal, forma compuestos manganosos y mangánicos, estos últimos muy tóxicos. También forma compuestos organometálicos, entre los que destaca el metilciclopentadienil-manganeso-tricarbonilo (MMT) (Gil y Gisbert, 2004).

II.6.3.b. Etiología

La intoxicación por este metal está recogida como enfermedad profesional en el apartado A, número 4 del RD 1299/2006. Sus principales usos industriales son (Desoille et al, 1986):

- Trabajos en minas y metalurgias
- Aleaciones con diversos metales, sobre todo con el hierro.
- Limpieza del vidrio de los humos de horno de recocido (dióxido de manganeso).
- Recubrimientos de electrodos de soldadura.
- Fabricación de colorantes de uso en cerámica y pirotecnia.
- Producción de permanganato potásico.
- Aditivo en fuel oíl y como antidetonante en las gasolinas sin plomo (MMT).

Según el RD 1299/2006, las principales actividades relacionadas con la manipulación de manganeso que pueden producir enfermedades profesionales son:

- Extracción, manipulación, transporte y tratamiento de la pirolusita, la manganita, el silomelano y la rodoprosita.
- Fabricación de aleaciones ferrosas y no ferrosas con bióxido de manganeso, especialmente ferromanganeso (acero Martin-Siemens).
- Fabricación de pilas secas.
- Fabricación de vidrio al manganeso.
- Fabricación de briquetes de manganeso.
- Soldadura con compuestos del manganeso.
- Preparación de esmaltes.
- Preparación de permanganato potásico.
- Fabricación de colorantes y secantes que contengan compuestos de manganeso.
- Envejecimiento de tejas.
- Manipulación y transporte de escorias Thomas.
- Preparación, utilización, manutención y transporte de abonos con sulfato de manganeso.
- Fabricación de baterías.

- En la industria química como agente oxidante, preparación de oxígeno, cloro, fabricación de aditivos alimentarios; utilización como agente antidetonante.
- Soldadura con electrodos de manganeso.
- Curtido de pieles.
- Uso de compuestos órgano-mangánicos como aditivos de fuel oil y algunas naftas sin plomo.

II.6.3.c. Toxicocinética

Se absorbe fundamentalmente por vía respiratoria. Posteriormente se distribuye y se acumula en la mitocondria sobre todo de los hepatocitos, y en menor proporción de otros órganos, como en cerebro, riñón, pulmón, testículo e intestino. Actúa como un oligoelemento en el metabolismo de glúcidos, ácidos grasos y como cofactor enzimático (superóxido dismutasa, piruvato carboxilasa y arginasa). La eliminación se produce por vía biliar-fecal de forma muy lenta, siendo mínima a través de la orina (Gil y Gisbert, 2004).

II.6.3.d. Efectos tóxicos

En la intoxicación *aguda*, generalmente secundaria a la inhalación de los vapores o humos manganosos, destaca un cuadro de neumonitis química con reacción pleural de evolución variable asociado a un síndrome febril similar a la fiebre de los fundidores.

En la intoxicación *crónica*, tras un período de exposición de varios años, la sintomatología se sucede en varias fases. En la primera existe un malestar general (cuadro pseudogripal) con trastornos psíquicos como confusión mental, labilidad, excitabilidad e incluso alucinaciones visuales (locura del manganeso). En la segunda fase cronológica aparecen alteraciones de la audición, en la voz (monótona), en la palabra (irregularidad) y en la escritura (ilegible, junto con trastornos neurovegetativos). Finalmente, en la tercera fase, aparece un síndrome extrapiramidal

de tipo parkinsoniano por reacción degenerativa sobre los núcleos grises subcorticales (pálido y estriado), que se caracteriza por temblor intencional, ataxia, amimia, rigidez y trastornos de la marcha (los enfermos andan apoyándose sobre la punta de los pies, marcha de bailarina o marcha de gallo). La evolución suele ser desfavorable e irreversible hacia una incapacidad permanente (Desoille et al, 1986; Lauwerys, 1994; Gil, 2012a;).

II.6.3.e. Diagnóstico

Será imprescindible para ello la historia profesional y la anamnesis. No obstante, el diagnóstico de certeza se basa en la medida de los niveles de manganeso en fluidos biológicos (sangre, suero y orina). Los valores normales en sangre oscilan entre 1 y 8 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, en suero inferiores a 0,1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ y en orina inferiores a 3 $\mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina. La heparina suele tener un contenido en manganeso superior al de la sangre, de ahí que deban emplearse otros anticoagulantes. Algunos autores defienden las heces como muestra biológica más eficaz, siendo motivo de incapacidad valores superiores a 60 mg/Kg de heces (Gil y Gisbert, 2004; Desoille et al, 1986; Lauwerys y Hoet, 1993).

II.6.4. Níquel

Metal de brillo similar a la plata, que se ataca con facilidad por ácidos fuertes, siendo también algo soluble en los ácidos débiles (ácido acético).

II.6.4.a. Fuentes de intoxicación

Entre los compuestos orgánicos más importantes se encuentran los óxidos, hidróxidos, sulfuros, sulfatos y cloruros. También es importante un compuesto organometálico, el níquel carbonilo, que es un líquido incoloro que a partir de 60° C se descompone en monóxido de carbono y níquel. Es muy volátil, inflamable, explosivo y extremadamente tóxico. (Gil y Gisbert, 2004).

II.6.4.b. Etiología

La intoxicación por níquel se recoge en el apartado A, número 6 del RD 1299/2006, siendo las profesiones de mayor riesgo las siguientes (Desoille et al, 1986; Gil y Gisbert, 2004; Gil, 2012a):

- Fabricación de ánodos de las cubas electrolíticas para el niquelado (galvanoplastia).
- Fabricación de baterías alcalinas de níquel-cadmio.
- Fabricación de monedas.
- Aleaciones con diversos metales (hierro: acero inoxidable; cobre, aluminio, etc.)
- Catalizador químico en la industria de plásticos y aceites industriales.
- Fabricación de colorantes para esmaltes cerámicos (óxidos de níquel).

Según el RD 1299/2006, las principales actividades relacionadas con la manipulación de níquel capaces de producir enfermedades profesionales son:

- Fundición y refinado de níquel, producción de acero inoxidable, fabricación de baterías.
- Producción de níquel por el proceso Mond.
- Niquelado electrolítico de los metales.
- Trabajos de bisutería.
- Fabricación de aleaciones con níquel (cobre, manganeso, zinc, cromo, hierro, molibdeno).
- Fabricación de aceros especiales al níquel (ferroníquel).
- Fabricación de acumuladores al níquel-cadmio.
- Empleo como catalizador en la industria química.
- Trabajos que implican soldadura y oxicorte de acero inoxidable.
- Trabajos en horno de fundición de hierro y de acero inoxidable.
- Desbarbado y limpieza de piezas de fundición.
- Industria de cerámica y vidrio.
- Aplicación por proyección de pinturas y barnices que contengan níquel.
- Procesado de residuos que contengan níquel.

II.6.4.c. Toxicocinética

La absorción se realiza vía respiratoria. El níquel carbonilo además es capaz de atravesar la piel intacta. Posteriormente se distribuye a la sangre sin originar acumulaciones tisulares específicas; su eliminación se realiza por la orina (Gil y Gisbert, 2004).

II.6.4.d. Efectos tóxicos

Al igual que ocurre con muchos metales, la intoxicación aguda suele deberse a la inhalación de humos, lo que provoca un cuadro de neumonitis química que suele ir acompañada de fiebre elevada y mialgias. El níquel carbonilo también origina el mismo cuadro, además de la posible toxicidad derivada del monóxido de carbono que produce al descomponerse dando lugar a cefaleas, vértigos, vómitos, etc.

La intoxicación crónica da lugar a lesiones cutáneas que consisten en una dermatosis (sarna del níquel), que comienza como un eritema puntiforme entre los dedos de la mano, que se transforma después en pápulas muy pruriginosas y dolorosas. Las lesiones se extienden al dorso de la mano, muñecas y antebrazos, hasta alcanzar el tronco y la cara, y pueden llegar a ulcerarse en estadios finales.

Asimismo, el níquel es carcinogénico, capaz de provocar un carcinoma pulmonar de células escamosas y cáncer de seno etmoidal. El níquel carbonilo también produce cáncer nasal y broncopulmonar, habiéndose descrito efectos teratógenos experimentalmente (Lauwerys, 1994; Gil y Gisbert, 2004; Goyer, 1996).

II.6.4.e. Diagnóstico

Se realiza a partir de la historia profesional y de la anamnesis. La confirmación se basa en la determinación de níquel en orina y plasma, donde las concentraciones suelen ser inferiores a 2 µg/g de creatinina y 1 µg/100ml (la media oscila entre 0,2 y 0,4 µg/100 ml), respectivamente (Lauwerys y Hoet, 1993; Gil y Gisbert, 2004).

II.6.5. Plomo

El plomo es un metal gris azulado, dúctil y maleable. En la naturaleza se encuentra normalmente en forma de sulfuro, mineral que recibe el nombre de galena. Es un metal resistente a la acción de algunos ácidos fuertes como el ácido sulfúrico; sin embargo suele ser fácilmente atacado por ácidos orgánicos, como el ácido acético, e incluso por aguas ricas en nitratos, sales de amonio o de carácter ácido.

El plomo no tiene una función biológica útil en el hombre. La liberación de plomo en el ambiente por emisiones de automóviles, pinturas y combustión del carbón, así como su bioacumulación en muchos organismos, entre ellos el hombre, tiene grandes implicaciones en materia de salud pública. Durante los últimos veinticinco años ha habido cada vez mayor preocupación por los efectos sobre la salud pública de la exposición a bajas concentraciones de plomo y la carga corporal “normal” de plomo. En los lugares de trabajo se ha estado determinando el nivel de exposición “sin efectos adversos” y la preocupación por el control de los efectos de este metal sobre el ser humano llevó a la elaboración de un protocolo de vigilancia biológica (RD 374/2001, de 6 de abril de 2006).

II.6.5.a. Fuentes de intoxicación

Están representadas por el metal y sus derivados. El plomo metal es capaz de emitir vapores tóxicos a partir de 500 °C. Respecto a sus derivados, podemos distinguir (Gil, 2012a):

- Inorgánicos: poco solubles y, por lo tanto, de escasa toxicidad. Entre ellos tenemos los óxidos (el más conocido es el minio u óxido de plomo rojo, que es la base de pinturas anticorrosivas), el cromato (se usa como colorante amarillo), el arseniato de plomo (presente en algunos plaguicidas), el carbonato (empleado como pigmento blanco) y el sulfuro o galena (utilizado por ceramistas y alfareros).
- Orgánicos: entre ellos se encuentran el acetato de plomo o sal de Saturno (muy soluble; se empleó como abortivo), el estearato (un aditivo de plásticos), el naftenato

de plomo (empleado en aceites industriales) y el plomo tetraetilo (que se ha usado durante bastante tiempo como antidetonante en los carburantes).

Según el RD 1299/2006, las principales actividades relacionadas con la manipulación de plomo que pueden producir enfermedades profesionales son:

Extracción, tratamiento, preparación y empleo del plomo, sus minerales, sus aleaciones, sus combinaciones y de todos los productos que lo contengan, y especialmente:

- Extracción, tratamiento, metalurgia, refinado, fundición, laminado y vaciado del plomo, de sus aleaciones y de metales plumbíferos.
- Fabricación, soldadura, rebabado y pulido de objetos de plomo o sus aleaciones.
- Estañado con ayuda de aleaciones de plomo.
- Recuperación de plomo viejo y de metales plumbíferos.
- Fabricación de zinc; fusión de zinc viejo y de plomo en lingotes.
- Temple en baño de plomo y trefilado de los aceros templados en el baño de plomo.
- Revestimiento de metales por pulverización de plomo o el llenado de vacíos.
- Fabricación y reparación de acumuladores de plomo.
- Fabricación de municiones y artículos pirotécnicos.
- Fabricación y aplicación de pinturas, lacas, barnices o tintas a base de compuestos de plomo.
- Trabajos con soplete de materias recubiertas con pinturas plumbíferas.
- Trabajos de fontanería.
- Trabajos de imprenta.
- Cromolitografía efectuada con polvos plumbíferos.
- Talla de diamantes donde se usen "gotas" de plomo.
- Industria del vidrio.
- Industria de la cerámica y la alfarería.
- Industria de la construcción.
- Fabricación y manipulación de los óxidos y sales de plomo.

- Utilización de compuestos orgánicos de plomo en la fabricación de materias plásticas.
- Fabricación y manipulación de derivados alcoilados del plomo (plomo tetrametilo, plomo tetraetilo): preparación y manipulación de las gasolinas que los contengan y limpieza de los tanques.
- Preparación y empleo de insecticidas con compuestos de plomo.

II.6.5.b. Etiología

La intoxicación por el plomo ha sido una de la más importantes en el mundo laboral y se recoge en el RD 1299/2006 en su apartado A con el número 1 (Villanueva, 2004).

Los principales usos industriales son:

- Manufactura de baterías (uno de sus usos principales).
- Utilización de compuestos orgánicos de plomo en la fabricación de materias plásticas (por ejemplo, el estearato de plomo utilizado como estabilizador del cloruro de polivinilo- PVC-).
- En aleaciones de plomo (principalmente con antimonio y estaño) que se usan en tuberías y revestimientos de cable para proporcionar resistencia a ácidos y humedad.
- En soldaduras, las aleaciones de plomo con estaño y otros se emplean para aplicaciones eléctricas y para la construcción.
- Los compuestos de plomo se utilizan en pinturas como pigmentos y estabilizadores. Entre ellos: el “minio” u óxido de plomo rojo (constituye la base de las pinturas anticorrosivas), el “litargirio” o protóxido de plomo y el bióxido de plomo.
- Fabricación de cristales con óxido de plomo (flintglass).
- Para barnices que dan brillo y dureza a la cerámica.
- En la construcción para disminuir el sonido y la vibración, así como en la protección frente a la radiactividad.
- El tetraetilato de plomo se utilizó como antidetonante en la gasolina, aunque su uso ha disminuido de manera importante hasta llegar a desaparecer.

- Otros usos incluyen municiones (balas de plomo), bronce y latón, cosméticos, joyería.

II.6.5.c. Exposición

- Laboral: la inhalación e ingestión son vías potenciales de exposición al plomo en minería, en particular a sus compuestos más solubles (minerales de carbonato y sulfato). Las actividades de pulverización y aglutinado producen altas concentraciones de polvo y vapores de plomo. Los trabajadores que se encargan de la recuperación de plomo de fuentes secundarias tienen el peligro de exposición a ese metal. La exposición es un riesgo constante en la manufactura de baterías de plomo. Los fabricantes de pinturas y pigmentos están expuestos a los aditivos de plomo. Los pintores también pueden exponerse al plomo, en especial durante las actividades de pintura a pistola. Las llamas de sopletes empleados para eliminar pinturas a base de plomo, producen cantidades importantes de vapores de este elemento. Los soldadores con máquina y con latón llegan a estar expuestos ante aleaciones de plomo, fundentes y recubrimientos. Quienes trabajan en plantas con municiones y campos de tiro pueden exponerse a polvo de plomo. Por último, los fabricantes de vidrio, artistas y trabajadores de cerámica suelen exponerse, sin saberlo, a concentraciones elevadas de plomo contenidas en numerosos pigmentos y barnices (Villanueva, 2004; Gil, 2012).
- Ambiental: puede haber exposición ambiental cerca de fundiciones de plomo por la contaminación del aire y suelo. Se ha descrito en ciertos países, como por ejemplo en Méjico, el síndrome Pica donde los niños que habitaban en casas viejas con rentas baratas, lograban ingerir trocitos de pintura de plomo que estaría en las estructuras deterioradas o exponerse a polvos de plomo. La cerámica en contacto con ácidos débiles (por ejemplo, el ácido acético presente en los escabeches) puede liberar plomo, en especial hacia alimentos y bebidas ácidas.
- Otras: remedios botánicos, cosméticos con plomo, inhalación de gasolina y balas incrustadas. La contaminación del agua por tuberías de plomo es una fuente importante de exposición en muchas casas antiguas, aunque afortunadamente se han eliminado de la construcción actual sustituyéndose por el PVC.

II.6.5.d. Toxicocinética

Absorción

El plomo puede ingresar en el organismo por vía respiratoria, digestiva o cutánea. La absorción por vía respiratoria depende del tamaño de las partículas, la ventilación pulmonar y la solubilidad del compuesto. Por esta vía se inhalan vapores, polvos y humos de polvo. Aquellas partículas inferiores a 1 μm penetran hasta el alveolo. Por vía digestiva sólo se absorbe un 10 % del plomo ingerido, siendo eliminado el 90% restante por las heces. En el caso de los niños, dada la mayor permeabilidad de la mucosa intestinal, la absorción puede alcanzar hasta un 30 %. También influye aquí la solubilidad del compuesto, y de forma especial e inversamente proporcional, la riqueza de calcio y potasio en la dieta. La vía cutánea suele ser exclusiva de los derivados orgánicos (naftenato, tetraetilato, etc.). También es importante destacar la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los niños (Villanueva, 2004).

Distribución

El plomo se distribuye en el organismo unido en un 95% a los hematíes. Existe además, una fracción ligada a proteínas ricas en azufre, nitrógeno y oxígeno, así como una fracción ligada a los tejidos, de gran importancia en la exposición laboral dado el carácter acumulativo del compuesto..De este modo, por ejemplo, se acumula en el hígado, el riñón, el sistema nervioso y, sobre todo, en el tejido óseo, en forma de trifosfato en las epífisis de los huesos largos, zonas donde el metabolismo del calcio es más activo, dada la afinidad del plomo por el calcio. Determinadas situaciones que puedan provocar una movilización del calcio óseo (acidosis, neoplasias, alteraciones metabólicas, etc.) podrían conllevar la liberación a sangre del plomo almacenado. Además, es capaz de atravesar la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica en desarrollo, aspecto este último de enorme trascendencia en niños (Lanphear et al, 2000; Gil, 2012a).

Eliminación

El plomo se excreta fundamentalmente por vía renal (75%) y aquellas fracciones no absorbidas se eliminan por las heces. En menor proporción intervienen las faneras (pelos y uñas), el sudor, la leche y/o la saliva.

II.6.5.e. Efectos tóxicos

Incluso cuando puede originar intoxicaciones agudas, lo que más interesa en toxicología industrial son las intoxicaciones crónicas. El límite sin efectos biológicos en el adulto se sitúa en 40 µg/100 ml de sangre. Los efectos se manifiestan sobre (Villanueva, 2004):

- Sistema hematopoyético: los efectos hematológicos son de dos tipos: metabólicos y morfológicos. Los efectos metabólicos derivan del bloqueo enzimático de tres enzimas (deshidratasa del ácido delta amino levulínico, [ALA-D]- la más específica-, coproporfirinógeno III oxidasa y ferroquelatasa o hemosintetasa) implicadas en la biosíntesis del grupo hemo en los eritroblastos de la médula ósea. Además se observa un aumento del hierro sérico, secundario a la inhibición de la ferroquelatasa, así como una ligera disminución en la vida media de los eritrocitos, probablemente por una mayor fragilidad de la membrana. Los efectos morfológicos se traducen en la aparición precoz de reticulocitos atípicos en la médula ósea y en la sangre circulante, que son hematíes con granulaciones basófilas. La consecuencia final es una anemia que cursa con coloración pálida, laxitud, cefaleas, astenia y anorexia, presencia de hematíes con granulaciones basófilas, hierro sérico normal o elevado y los precursores metabólicos de la hemoglobina (Hb) elevados en sangre (protoporfirinas) o bien en orina (ALA, coproporfirinas).
- Efectos sobre el sistema nervioso central: el cuadro típico es una encefalopatía que aparece generalmente con cifras de plomo superiores a 80 µg/100 ml de sangre en los adultos, y que cursa con somnolencia, irritabilidad, cefaleas, temblores, ataxia, amnesia, y que puede dejar secuelas como epilepsia, hidrocefalia e idiocia, o bien evolucionar hasta un cuadro convulsivo, con pérdida de consciencia y muerte. En niños

puede aparecer a partir de 50-60 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ debido a la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y puede cursar como un cuadro de hipertensión craneal o como un síndrome pseudomeningeo. Se han descrito cuadros de déficit intelectual, así como alteraciones en el comportamiento y desarrollo en niños que residían en zonas próximas a industrias que manipulaban este compuesto (Satcher, 2000).

- Efectos sobre el sistema nervioso periférico: en el electromiograma se observa un enlentecimiento de la conducción nerviosa motora. Cuando la afectación es más intensa, se observa uno de los trastornos neurológicos más característicos: la parálisis saturnina que se trata de una polineuritis tóxica de predominio motor, localizada en el antebrazo, que interesa al nervio radial sin afectar a la inervación del supinador largo, lo cual interfiere la extensión de los dedos de la mano excepto del índice, originando el signo de la mano de hacer cuernos, poco frecuente en la actualidad gracias a la mayor prevención. También puede haber alteraciones sensoriales, tanto anestesia como hiperestesia.
- Otros efectos: en el ámbito renal se instaura una nefritis tóxica por afectación de los túbulos renales, que evoluciona hasta esclerosis renal y que puede terminar en un coma urémico. Las alteraciones gastrointestinales pueden limitarse a un cuadro de diarrea, dolor epigástrico, náuseas, vómitos y anorexia que aparece con concentraciones de plomo alrededor de 80 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, o bien pueden llegar a un cuadro de cólico florido (cólico saturnino con espasmos de la musculatura lisa abdominal y dolores muy intensos) con niveles superiores a 90-100 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

Asimismo, experimentalmente se conoce la capacidad del plomo para producir alteraciones cromosómicas, especialmente por encima de 65 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. En fases iniciales (presaturnismo) puede aparecer el ribete gingival de Burton, que consiste en una línea azulada delgada por depósito de sulfuro de plomo en el borde libre de las encías, ligada a ausencia de higiene buco-dental. El hígado también se ve afectado, lo que da lugar a un estado subictérico, instaurándose paulatinamente una cierta atrofia hepática.

II.6.5.f. Diagnóstico y control

El diagnóstico y control se basa en la historia laboral, la sintomatología clínica y, sobre todo, en el estudio de los siguientes biomarcadores:

- Plumbemia: es el más fiable de todos, es el objeto de nuestro estudio, y mide la absorción. Suele ser inferior a 20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ y el límite superior de la normalidad es de 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.
- Protoporfirina-cinc en sangre: tiene bastante interés, pues es el primer marcador que se ve afectado y el último que se normaliza. Los valores de la normalidad se consideran inferiores a 2,5-3,0 $\mu\text{g}/\text{g}$ de Hb o 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.
- ALA en orina: índice de afectación precoz, muy fiable en el caso de impregnación. Es normal por debajo de 4,5 mg/g de creatinina.
- ALA-D eritrocitaria: muy sensible a la inhibición por el plomo. Cuanto menor sea su valor, mayor será el grado de inhibición. Se considera normal un valor superior a 100 $\text{U}/10^6$ hematíes. Valores inferiores a 70 $\text{U}/10^6$ implican una absorción importante de plomo.

Además pueden ser útiles la plumburia, cuyo valor de normalidad es inferior a 50 $\mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina, y las coproporfirinas en orina, cuyos valores de normalidad son inferiores a 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina (Lauwerys, 1994).

La legislación española considera trabajador expuesto a aquel que está en un ambiente donde hay más de 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y su plumbemia es mayor de 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, cifra que se rebaja a 30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ cuando se trata de trabajadoras en edad fértil.

II.7. MUESTRAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES

La inmensa mayoría de los biomarcadores de exposición frente a metales pesados se determinan en sangre o en orina. Mientras la orina es una muestra aceptada, y relativamente fácil de obtener en la población laboral, no ocurre igual con la sangre donde las extracciones suponen un método cruento, no bien aceptado por la mayoría de los trabajadores. Por ello, consideramos de utilidad la búsqueda de nuevos fluidos, medios biológicos o muestras donde valorar la exposición, y proponemos como alternativas la saliva y el vello axilar. El pelo, derivado del ectodermo, se ha demostrado uno de los vehículos de excreción de metales, enormemente útil en la valoración de intoxicaciones crónicas (la más frecuentes en exposición ocupacional) en función de su marcada afinidad por los grupos tiólicos de la cisteína presente en la queratina del pelo, pudiendo alcanzar concentraciones hasta 10 veces superiores a las existentes en muestras de sangre y orina. Otras ventajas adicionales del pelo son la existencia de una matriz estable, que no precisa de condiciones especiales de almacenamiento, de rápida disponibilidad mediante una técnica no invasiva y que no requiere necesariamente un equipo médico para su recolección (Bermejo-Barrera et al., 2000). Otros autores han propuesto el uso del pelo (Bencko, 1995) como biomarcador de exposición ocupacional, concediéndole un papel importante especialmente en el diseño de estudios piloto prospectivos, enfatizando un aspecto esencial ya que mientras las concentraciones en sangre y orina reflejan exposición reciente, el pelo es indicativo de exposición crónica. Asimismo es posible almacenar alícuotas de pelo fácilmente y que podrían servir para posibles comprobaciones futuras (por ejemplo, ante situaciones legales). Sin embargo, para valorar la exposición ocupacional es necesario disponer de un grupo poblacional lo suficientemente amplio (al menos 20 individuos por grupo).

No obstante, dado que el cabello se encuentra en contacto con el ambiente y, por tanto, sujeto a una posible contaminación externa, otros autores han propuesto el análisis de metales en el vello de la región axilar, comprobando que aún cuando puede existir una cierta variabilidad, los niveles en dicha muestra si se correlacionan positivamente con los existentes en el aire ambiente y en fluidos biológicos (Bader et al, 1999; Kucera et al, 2001). También consideran otras muestras alternativas, como las

uñas y la saliva, además de la sangre y la orina, para la monitorización biológica de diversos metales entre los que se encuentran el cromo, el manganeso y el níquel. Respecto a la determinación de metales en saliva, existen numerosos estudios que hacen referencia sobre todo a la determinación de níquel y cromo en pacientes portadores de fijaciones de ortodoncia (Agaoglu et al, 2001; Kocadereli et al, 2000). Aunque es infrecuente la presencia de dichas fijaciones ortodónticas en personal laboral (no olvidemos que suelen colocarse en edades tempranas para corregir a tiempo los defectos), es necesario conocer este detalle y valorar su posible presencia con objeto de descartar a aquellos trabajadores portadores de las mismas, evitando de este modo una sobreestimación en los valores de ambos metales. Por tanto, parece útil la realización de estudios epidemiológicos prospectivos para identificar las posibles alteraciones bioquímicas precoces derivadas de la exposición crónica a metales pesados (Cd, Cr, Mn, Ni, y Pb) que permitan realizar una intervención sanitaria preventiva individual, con enormes ventajas terapéuticas y sobre todo sociales y laborales al disminuir el absentismo y la morbilidad.

El plomo constituye uno de los más importantes modelos de monitorización, siendo la concentración de plomo en sangre el biomarcador más extendido para determinar la exposición a dicho metal. Sin embargo, aunque se acepte como indicador de exposición total a ese elemento, realmente indica exposición reciente (Barbosa et al, 2005). De ahí la importancia de encontrar nuevos métodos de biomonitorización para la población expuesta.

La saliva ha sido propuesta como muestra por su fácil obtención como se ha mencionado anteriormente (Silbergeld, 1993). Sin embargo, en el caso del plomo no es generalmente aceptada en la comunidad científica como una muestra válida debido a las variaciones que muestra en su composición antes, durante y después de las comidas. Además, la forma de recogida también puede afectar a su composición (si es estimulada o no) así como el estado nutricional y hormonal de cada individuo (Barbosa et al, 2005). Sin embargo, algunos estudios han demostrado asociación entre los niveles de plomo en saliva y en plasma (Omokhodion y Crockford, 1991).

El pelo es una muestra biológica de fácil obtención, con un mínimo coste y de fácil transporte y conservación en el laboratorio. Las limitaciones de la monitorización del plomo en el pelo residen en la distinción de qué parte de los niveles de plomo tienen un origen endógeno (absorbido en la sangre e incorporado a la matriz del pelo) y qué otra corresponde a una posible contaminación exógena. Supuestamente esta limitación es superada en el proceso de lavado de la muestra. Los principales determinantes de la concentración de plomo en pelo son la edad, sexo, color del pelo y el hecho de ser fumador. También es importante tener en cuenta la región de la que se toma la muestra, ya que se han descrito variaciones importantes entre la concentración del metal en región proximal y distal (Renshaw et al, 1976). Por último la comunidad científica aún no ha establecido el rango de los niveles de plomo en pelo que establecería como patológico.

Aunque existen numerosísimos estudios sobre la contaminación por plomo, pocos describen la relación entre el metal en sangre y orina. Una revisión sobre biomarcadores de exposición al plomo demuestra la existencia de una correlación no lineal entre ambas muestras (Sakai, 2000). Por otro lado, en trabajadores expuestos a plomo se ha encontrado una fuerte relación entre el plomo en sangre y en orina (Hirata et al, 1995; Fukui et al, 1999).

Respecto al cromo, la medición de sus niveles en sangre sigue siendo la determinación más extendida (Dennis et al, 1997). Con respecto a la orina, la biomonitorización en trabajadores expuestos a cromo hexavalente ha sido usada desde los años 60 (Gao et al, 1994). Numerosos investigadores han mostrado una fuerte correlación entre la exposición ocupacional a cromo hexavalente por vía inhalatoria y sus niveles urinarios (Tola et al, 1977; ATSDR, 1998). Sin embargo debemos tener en cuenta la rápida excrección urinaria y la corta vida media del cromo en el organismo, lo que haría muy probable que exposiciones intermitentes no lo detecten, por ejemplo no es plausible medir el cromo en orina un lunes si el último día de exposición fue el viernes anterior. Otra consideración a tener en cuenta es que los niveles de exposición ambiental deben de ser lo suficientemente elevados como para ser detectados en orina (Dennis et al, 1997).

Algunos estudios han observado una correlación entre los niveles de cromo hexavalente en sangre y pelo. Sin embargo no se puede distinguir entre la exposición a cromo trivalente y hexavalente, además de no poder establecer el tiempo de exposición (Saner et al, 1984).

La saliva es un método poco estudiado en este metal, pero podría ser de gran interés, teniendo en cuenta sus limitaciones que serían similares a las expuestas en la determinación del plomo en saliva.

El cadmio en sangre, considerado como el mejor biomarcador, puede ser empleado para conocer la exposición reciente a este metal tanto a nivel laboral como ambiental. La concentración de cadmio en sangre puede verse afectada por múltiples factores, entre los que destacan la dieta (ingesta de moluscos, huevos, leche, carne, pescado y cereales) y el hábito tabáquico, ya que un cigarrillo contiene aproximadamente entre 1-2 µg de cadmio (Svartengren et al, 1986).

La orina constituye, junto con la sangre, la mejor muestra para determinar exposición al cadmio (Jarup, 2009). Numerosos estudios han encontrado una alta correlación entre los niveles de Cd en sangre y orina (Berglund et al., 1994; Akesson et al., 2002; Vahter et al., 2007; Kippler et al., 2007).

Gervais et al (1981) encontraron en trabajadores expuestos a polvo y humo de Cd niveles elevados en saliva respecto a trabajadores no expuestos. A su vez, los niveles en saliva fueron más altos que los observados en sangre, lo que indica la utilidad de la saliva. Sin embargo, la saliva puede verse fácilmente contaminada. El uso de esta muestra siempre necesitará de la comparación de los niveles sanguíneos de Cd ya que como se ha mencionado anteriormente, los niveles de Cd en saliva son más elevados que los de sangre y eso podría conducir a errores en la interpretación de los resultados.

Respecto al cabello se puede extrapolar lo dicho anteriormente con el cromo.

La determinación de los niveles de níquel en sangre sigue siendo el método más extendido y aceptado para establecer la exposición laboral al contaminante. La determinación en orina también permite biomonitorizar la exposición en trabajadores,

aunque hay que tener los niveles de creatinina y de densidad urinaria dentro de los valores normales (Horng et al, 2002).

Los niveles de níquel en pelo muestran asociación con los de sangre (Wolfsperger et al, 1994), por lo que sería una buena muestra para monitorizar la exposición.

El manganeso constituye un elemento esencial para la vida del ser humano ya que forma parte de diversos complejos enzimáticos como: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, piruvato quinasa, piruvato carboxilasa, superóxido dismutasa y arginasa. Además, está asociado con la formación de tejido conectivo, con el crecimiento, la reproducción y el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.

La determinación de los niveles de manganeso es de especial interés en el ámbito laboral. Su concentración en sangre puede aumentar en personas sometidas a hemodiálisis ya que el líquido de diálisis contiene Mn. Este metal no presenta diferencias significativas respecto a los anteriores en relación a las muestras alternativas donde analizarlo (saliva, orina, cabello) según los resultados recogidos en numerosos estudios (Afridi et al, 2006).

II.8. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA EL CADMIO, CROMO, MANGANESO, NIQUEL Y PLOMO

Los procedimientos analíticos más comunes para medir concentraciones de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en muestras biológicas son la espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y la espectrofotometría de emisión atómica (AES). En la AAS la muestra se calienta por medio de una llama o se introduce en un horno hasta que se atomiza. El vapor atómico obtenido absorbe la radiación emitida por una fuente y un detector fotoeléctrico mide la intensidad de la radiación que recibe. En la AES se mide la radiación emitida por la energía térmica procedente de una llama o de una descarga de plasma (acoplado por inducción) (ICP), siendo la combinación de ICP y AES (ICP/AES) una técnica actualmente usual.

II.8.1. Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito

Este es el método más usado en la actualidad para la determinación de metales que incluyen los mencionados anteriormente, al ser relativamente simple y rápido, y poseer un límite de detección suficiente para la mayoría de las muestras biológicas y medioambientales. Los principales métodos para atomizar la muestra son la llama y el horno de grafito. La llama se usa generalmente para muestras líquidas que pueden ser aspiradas sin dificultad. Su límite de detección es superior al del horno, por lo que para muestras con concentraciones de metales más bajas, será necesaria la utilización de la EAA con horno de grafito. Las muestras pueden prepararse de diferentes formas, aunque suele ser frecuente la digestión húmeda con ácido nítrico lo que permite obtener buenos resultados en cuanto a exactitud y reproducibilidad. En el presente estudio no ha sido necesaria la digestión previa.

Otro aspecto importante en la técnica de EAA con horno de grafito es la modificación de la matriz, especialmente en el caso de muestras biológicas. La matriz puede ser modificada con diversos modificadores entre los que se encuentran el dihidrógeno fosfato amónico, nitrato magnésico u otros agentes tales como nitrato de paladio en el caso particular del cadmio (Moreira et al, 1995). Dicha modificación permite una atomización de la muestra más efectiva, al poder aumentar la temperatura de calcinación o mineralización.

Debido a la ubicuidad del cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo, y, es necesario minimizar el riesgo de contaminación durante el muestreo, procesamiento y análisis. Para ello los materiales se someten a un proceso de descontaminación lavándolos con disoluciones ácidas, por ejemplo especialmente cuando se trata de medir trazas del analito.

Las mejoras que se están realizando en la actualidad en la determinación de elementos traza, especialmente en fluidos biológicos, van orientadas a las fases de preparación de la muestra y de introducción de la misma en el analizador, con objeto de disminuir los límites de detección y el tiempo de análisis. Una serie de mejoras en la extracción, pre-concentración e introducción de la muestra ha permitido

conseguir límites de detección del orden de $\mu\text{g/l}$ (Almendro et al, 1992; Cordero et al, 1994).

II.8.2. Otras técnicas de análisis

Otro método usado para la determinación de metales, incluyendo el cadmio ha sido el análisis radioquímico de activación de neutrones (RNAA) (Tandon et al, 1994), procedimiento que incluye dos etapas rápidas de extracción con disolventes. También se han usado las resinas de intercambio iónico que permiten obtener una recuperación del 98% y un límite de detección de $4 \mu\text{g/kg}$. Otros métodos empleados han sido la espectrometría de masas acoplada a un plasma (ICP/MS) (Stroh, 1993), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Chang y Robinson, 1993), e incluso métodos electroquímicos tales como la voltametría, aplicados al análisis de pelo (Zhang et al, 1993), tejidos animales (LaBar y Lamberts, 1994) y fluidos biológicos (Ostapczuk, 1993).

II.9. LA VALIDACIÓN ANALÍTICA EN LA ESTANDARIZACIÓN METODOLÓGICA

La validación de un método analítico es el proceso de evaluación de las características del procedimiento de medida desarrollado y comprobación de que dichas características cumplen los requisitos preestablecidos. Se trata, por tanto, de confirmar que el método es apto para el uso previsto. Por ello es imprescindible conocer cuál será el uso que se va a hacer de los resultados para elegir el método de análisis y las características del mismo. La realización de un método de validación completo es una tarea que puede ser tediosa, aunque las consecuencias de no hacerlo conllevan sin duda, una pérdida de tiempo, dinero y recursos al no responder a las expectativas de calidad analítica.

Según la norma ISO/IEC 17025 (2005), en donde se establecen los requisitos generales relativos a las competencias de los laboratorios de ensayo y calibración, los laboratorios deben validar todos los métodos analíticos, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas u otros laboratorios.

Como paso previo, y al objeto de estandarizar la metodología analítica y más concretamente la determinación de Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en los cuatro tipos de muestras a emplear (sangre, orina, saliva y vello axilar), es absolutamente necesario realizar una validación analítica que permita conocer diversos parámetros de acuerdo a la Normativa Internacional y que incluyen los límites de detección y cuantificación, los intervalos de linealidad, la precisión (mínima, repetibilidad y precisión intermedia), la exactitud, la concentración característica, la recuperación y la incertidumbre.

III. MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (EAA)

La espectrometría de absorción atómica es la técnica elegida para la realización del presente estudio. Esta técnica como se ha mencionado anteriormente, se utiliza cuando se necesita disponer de límites de detección bajos. Dispone de unas condiciones operativas del sistema de atomización - horno de grafito - que se producen y optimizan de la siguiente forma (Welz, 1985):

a) Etapa de secado: el objetivo de esta etapa es evaporar el disolvente de la muestra (sin que se produzcan salpicaduras). La temperatura y el tiempo de secado son elegidos en función del volumen de muestra inyectada y de las características del disolvente de la muestra; se recomiendan dos etapas con el fin de asegurar el secado completo evitando proyecciones de la muestra.

b) Etapa de calcinación: el objetivo es eliminar, en la medida de lo posible, la matriz orgánica de la muestra antes de la atomización, lo cual disminuye las posibles interferencias químicas y la magnitud de la señal de fondo. Para esto muchas veces es necesario añadir a la muestra un modificador de matriz. El modificador de matriz permite estabilizar el elemento a analizar y someterlo a una mayor temperatura de calcinación para que ésta resulte más eficaz. El modificador de matriz también puede convertir las distintas especies de un mismo elemento en una especie común y así evitar la aparición de múltiples picos. La temperatura óptima de calcinación será 100 °C inferior a aquella en la que comienza a perderse el elemento de estudio. El tiempo de esta etapa estará en función del volumen de muestra inyectada y de la cantidad de matriz a eliminar.

c) Etapa de atomización: la muestra es atomizada para obtener los átomos en estado fundamental. La temperatura a utilizar dependerá de las propiedades del compuesto en el que se encuentra el elemento a analizar y debe ser la temperatura menor de atomización que produce la mayor señal de absorción.

El tiempo se establece teniendo en cuenta que el pico de la señal vuelva a la línea base una vez finalizada la etapa.

d) Etapa de limpieza: esta última etapa evita un posible efecto memoria. Se calienta el horno a la máxima temperatura durante 2-5 segundos, según el elemento a analizar y la naturaleza de la muestra.

En cada una de estas etapas se optimiza el tiempo necesario para alcanzar la temperatura seleccionada (tiempo de rampa). En la etapa de atomización el tiempo de rampa de 0 segundos (máxima potencia) proporciona, en general, el modelo más eficaz, o lo que es igual, la mayor sensibilidad.

Además hay que tener en cuenta el tiempo de vida útil de los hornos de grafito el cual depende del programa seleccionado y del número de determinaciones. Los tubos han de sustituirse cuando muestren pérdidas de sensibilidad y/o precisión. Antes de comenzar con un tubo de grafito nuevo, éste deberá acondicionarse aumentando la temperatura lenta y progresivamente hasta 2500 °C (mediante varias etapas) –programa de acondicionamiento- para así eliminar posibles impurezas y permitir una distribución uniforme de la temperatura en su interior.

III.2. REACTIVOS

III.2.1. Comunes

- Sistema Milli-Q, Millipore Corp., para la obtención de agua grado reactivo.
- Tritón X- 100, Merck, P.A.
- Solución de Tritón X-100 al 0,1 % (v/v): se diluyen 0,1 ml de Tritón X-100 hasta 1 l de agua Milli-Q. Se utiliza para la limpieza del inyector automático y para preparar el modificador de matriz.

III.2.2. Cadmio

- Solución patrón de cadmio, Carlo Erba, de 1 mg/ml ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en HCl).

- Ácido nítrico, HNO_3 , (65%), Merck, P.A.
- Solución de HNO_3 al 0,2% (v/v): se diluyen 0,2 ml de HNO_3 hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como diluyente de patrones.
- Nitrato magnésico, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, P.A.
- Paladio, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ / HNO_3 al 15%, Merck, P.A.
- Solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 0,03% (w/v) y $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ al 3,3% (v/v): se diluyen 0,03 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y 3,3 ml de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ con 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como modificador de matriz y como diluyente de las muestras.

III.2.3. Cromo

- Solución patrón de cromo, Carlo Erba, de 1 mg/ml.
- Solución de HNO_3 al 0,2% (v/v): se diluyen 0,2 ml de HNO_3 hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como diluyente de patrones.
- Solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 0,03% (w/v) y $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ al 3,3% (v/v): se diluyen 0,03 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y 3,3 ml de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ con 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como modificador de matriz y como diluyente de las muestras.

III.2.4. Manganeseo

- Solución patrón de manganeseo, Carlo Erba, de 1 mg/ml.
- Solución de HNO_3 al 0,2% (v/v): se diluyen 0,2 ml de HNO_3 hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como diluyente de patrones.
- Solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 1% (w/v) en solución de Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) y HNO_3 al 0,02% (v/v) que se utiliza como modificador de matriz y como diluyente de las muestras.

III.2.5. Níquel

- Solución patrón de níquel, Carlo Erba, de 1 mg/ml.
- Solución de HNO_3 al 0,2% (v/v): se diluyen 0,2 ml de HNO_3 hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como diluyente de patrones.

- Solución de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ al 1 % (w/v) en solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v) y HNO_3 al 0,02% (v/v) que se utiliza como modificador de matriz y diluyente de las muestras.

III.2.6. Plomo

- Solución patrón de plomo, Carlo Erba, de 1 mg/ml ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3).
- Dihidrogenofosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ Suprapur, Merck, P.A.
- Solución de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ al 1 % (w/v) en solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v): se pesan 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ y se enrasan hasta 50 ml de solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v). Se utiliza como modificador de matriz y como diluyente de las muestras.

III.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

- Agitador de tubos de ensayo, Heidolph, modelo REAX200.
- Balanza analítica Mettler, modelo AE 163.
- Baño de limpieza por ultrasonidos Selecta, modelo 514.
- Congelador Bosch a -32°C .
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo AAnalyst 800, equipado con corrector de fondo Zeeman.
- Lámparas de descarga sin electrodos (EDL) Perkin Elmer, de plomo y cadmio.
- Lámparas de cátodo hueco (HCL) Perkin Elmer, de cromo, níquel y manganeso.
- Tubos de grafito piropilizados con plataforma integrada de L'vov.
- Material de vidrio (matraces, probetas, vasos de precipitado y pesa-sustancias).
- Pipetas Biohit proline de volúmenes variables (5-50 μl , 50-200 μl , 200-1000 μl , 1-5 ml).
- Puntas de plástico desechables para las pipetas (se excluyen las de color amarillo para evitar la posible contaminación por cadmio)
- Tubos de propileno de 3 y 10 ml.
- Pocillos de fondo cónico de propileno de 1,5 y 5 ml.

III.4. METODOLOGIA PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR

III.4.1. Procedimiento

III.4.1.a. Curva patrón

Soluciones hijas

- a) Solución madre de 1000 µg/ml.
- b) Solución de 100 µg/ml: 500 µl de a) y 4,5 ml de HNO₃ 0,2%.
- c) Solución de 10 µg/ml: 500 µl de b) y 4,5 ml de HNO₃ 0,2%.
- d) Solución de 1 µg/ml: 500 µl de c) y 4,5 ml de HNO₃ 0,2%.
- e) Solución de 0,1 µg/ml: 500 µl de d) y 4,5 ml de HNO₃ 0,2%.
- f) Solución de 0,01 µg/ml: 500 µl de e) y 4,5 ml de HNO₃ 0,2%.

Patrones

Para realizar la curva patrón acuosa de cadmio se añadieron las cantidades de la solución de 0,01 µg/ml de Cd y de HNO₃ al 0,2% que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 3. Curva patrón de calibrado para la determinación del Cd

Concentración (µg/l)	ml Cd de 0,01 µg/ml	ml H ₂ O milli-Q
0,5	0,25	4,75
1	0,5	4,5
1,5	0,75	4,25

III.4.1.b. Muestras

Precisaron de la adición de un modificador de matriz. En nuestro caso se utilizó una mezcla de Mg (NO₃)₂ al 0,03% y Pd (NO₃)₂ al 3,3%. Según el tipo de muestra se efectuaron las siguientes diluciones:

a) *Muestras de sangre total*: se agregaron 600 μl de modificador de matriz a 100 μl de muestra (dilución final 1/7).

b) *Muestras de orina*: se agregaron 250 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/2).

c) *Muestras de saliva*: se agregaron 1000 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/5).

d) *Muestras de vello axilar*: se agregaron 1000 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/5).

III.4.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

- Lámpara de descarga sin electrodos para Cd
- Longitud de onda: 228,8 nm
- Rendija: 0,7 nm
- Modo de lectura: Área de pico
- Corrector de fondo: Zeeman

III.5. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CROMO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR

III.5.1. Procedimiento

III.5.1.a. Curva patrón

Soluciones hijas

- a) Solución de 1000 µg/ml del laboratorio
- b) Solución de 100 µg/ml: 500 µl de a) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- c) Solución de 10 µg/ml: 500 µl de b) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- d) Solución de 1 µg/ml: 500 µl de c) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- e) Solución de 0,1 µg/ml: 500 µl de d) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- f) Solución de 0,01 µg/ml: 500 µl de e) + 4.5 ml de H₂O milli-Q

Patrones

Para realizar la curva patrón de cromo se añadieron las cantidades de la solución 0,01 µg/ml y de H₂O milli-Q que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 4. Curva de patrón de calibrado para la determinación del Cr

Concentración (µg/ml)	ml Cr de 0,01 µg/ml	ml H ₂ O milli-Q
0,001	0,5	4,5
0,003	1,5	3,5
0,005	2,5	2,5

III.5.1.b. Muestras

Precisaron de la adición de un modificador de matriz. En nuestro caso se utilizó una mezcla de solución de Mg (NO₃)₂ al 0,03% y Pd (NO₃)₂ al 3,3%. Según el tipo de muestra se realizaron las siguientes diluciones:

- a) *Muestras de sangre total*: se agregaron 600 μl de modificador de matriz a 200 μl de muestra (dilución final 1/4).
- b) *Muestras de orina*: se agregaron 600 μl de modificador de matriz a 200 μl de muestra (dilución final 1/4).
- c) *Muestras de saliva*: se agregaron 250 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/2).
- d) *Muestras de vello axilar*: se agregaron 400 μl de modificador de matriz a 200 μl de muestra mineralizada (dilución final 1/3).

III.5.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

- Lámpara de descarga sin electrodos para Cr.
- Longitud de onda: 357,9 nm.
- Rendija: 0,7 nm.
- Modo de lectura: Área de pico.
- Corrector de fondo: Zeeman.

III.6. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE MANGANESO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR

III.6.1. Procedimiento

III.6.1.a. Curva patrón

Soluciones hijas

- a) Solución de 1000 µg /ml del laboratorio
- b) Solución de 100 µg /ml: 500 µl de a) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- c) Solución de 10 µg /ml: 500 µl de b) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- d) Solución de 1 µg/ml: 500 µl de c) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- e) Solución de 0,1 µg/ml: 500 µl de d) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- f) Solución de 0,01 µg/ml: 500 µl de e) + 4.5 ml de H₂O milli-Q

Patrones

Para realizar la curva patrón de manganeso se añadieron las cantidades de la solución 0,01 µg/ml de Mn y de H₂O milli-Q que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 5. Curva de patrón de calibrado para la determinación del Mn

Concentración (µg/ml)	ml Mn de 0,01 µg/ml	ml H ₂ O milli-Q
0,001	0,5	4,5
0,0025	1,25	3,75
0,005	2,5	2,5
0,01	5	-

III.6.1.b. Muestras

Precisaron de la adición de un modificador de matriz. En nuestro caso se utilizó una mezcla de solución de Mg (NO₃)₂ al 1%, Tritón X-100 al 0,1 % y NHO₃ al 0,02%. Según el tipo de muestra se efectuaron las siguientes diluciones:

- a) *Muestras de sangre total*: se agregaron 500 μl de modificador de matriz a 100 μl de muestra (dilución final 1/6).
- b) *Muestras de orina*: no se realizó ninguna dilución (volumen empleado 500 μl).
- c) *Muestras de saliva*: se agregaron 250 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/2).
- d) *Muestras de vello axilar*: se agregaron 450 μl de modificador de matriz a 150 μl de muestra mineralizada (dilución final 1/4).

III.6.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

- Lámpara de descarga sin electrodos para Mn.
- Longitud de onda: 279,5 nm.
- Rendija: 0,7 nm.
- Modo de lectura: Área de pico.
- Corrector de fondo: Zeeman.

III.7. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE NÍQUEL EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR

III.7.1. Procedimiento

III.7.1.a. Curva patrón

Soluciones hijas

- a) Solución de 1000 µg /ml del laboratorio
- b) Solución de 100 µg /ml: 500 µl de a) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- c) Solución de 10 µg /ml: 500 µl de b) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- d) Solución de 1 µg /ml: 500 µl de c) + 4.5 ml de H₂O milli-Q
- e) Solución de 0,1 µg /ml: 500 µl de d) + 4.5 ml de H₂O milli-Q

Patrones

Para realizar la curva patrón de níquel se adicionaron las cantidades de la solución 0,1 µl /ml y de agua milli-Q que se relacionan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Curva patrón de calibrado para la determinación del Ni.

Concentración (µg/ml)	ml Ni de 0,1 µg/ml	ml H ₂ O milli-Q
0,005	0,25	4,75
0,01	0,5	4,5
0,02	1	4

III.7.1.b. Muestras

Precisaron de la adición de un modificador de matriz. En nuestro caso se utilizó una solución de (NH₄) H₂PO₄ al 1 % en solución de Tritón X-100 al 0,1% y HNO₃ al 0,02%. Según el tipo de muestra se efectuaron las siguientes diluciones:

- a) *Muestras de sangre total*: se agregaron 600 μl de modificador de matriz a 200 μl de muestra (dilución final 1/4).
- b) *Muestras de orina*: se agregaron 600 μl de modificador de matriz a 200 μl de muestra (dilución final 1/4).
- c) *Muestras de saliva*: se agregaron 250 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/2).
- d) *Muestras de vello axilar*: agregaron 250 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/2).

III.7.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

- Lámpara de descarga sin electrodos para Ni.
- Longitud de onda 232,0 nm.
- Rendija 0,7 nm.
- Modo de lectura: Área de pico.
- Corrector de fondo: Zeeman.

III.8. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR

III.8.1. Procedimiento

III.8.1.a. Curva patrón

Soluciones hijas

- a) Solución madre de 1000 µg/ml.
- b) Solución de 100 µg/ml: 500 µl de a) y 4,5 ml de H₂O Milli-Q.
- c) Solución de 10 µg/ml: 500 µl de b) y 4,5 ml de H₂O Milli-Q.
- d) Solución de 1 µg/ml: 500 µl de c) y 4,5 ml de H₂O Milli-Q.

Patrones

Para realizar la curva patrón acuosa de plomo se adicionaron las cantidades de la solución de 1 µg/ml de Pb y de agua Milli-Q que se relacionan en la siguiente tabla:

Tabla 7. Curva patrón de calibrado para la determinación del Pb

Concentración (µg/l)	ml Pb de 1 µg/ml	ml H ₂ O Milli-Q
0,5	0,25	4,75
1	0,5	4,5
2	1	4

III.8.1.b. Muestras

Precisaron de la adición de un modificador de matriz. En nuestro caso se utilizó la solución de (NH₄)H₂PO₄ al 1 % (w/v) en solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v). Según el tipo de muestra se efectuaron las siguientes diluciones:

a) *Muestras de sangre total:* se agregaron 600 µl de modificador de matriz a 50 µl de muestra (dilución final 1/13).

b) *Muestras de orina*: se agregaron 250 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/2).

c) *Muestras de saliva*: se agregaron 1000 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/5).

d) *Muestras de vello axilar*: se agregaron 1000 μl de modificador de matriz a 250 μl de muestra (dilución final 1/5).

III.8.2. Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

- Lámpara de descarga sin electrodos para Pb
- Longitud de onda: 283,3 nm
- Rendija: 0,7 nm
- Modo de lectura: Área de pico
- Corrector de fondo: Zeeman

III.9. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL MÉTODO

En el presente estudio se han evaluado los siguientes parámetros para la determinación de la validez de los métodos empleados:

III.9.1. Límite de detección y cuantificación (IUPAC)

El límite de detección es la concentración de analito en la muestra que puede ser detectada aunque no necesariamente cuantificada como un valor exacto. El límite de cuantificación es el valor de la concentración mínima de analito en la muestra que puede ser cuantificada con un nivel de exactitud y precisión definidas.

Los límites de detección (LOD) y de determinación o cuantificación (LOQ) se establecen realizando diez lecturas del blanco, al cual se le calcula la desviación estándar (SD); se obtienen a partir de las siguientes expresiones:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{b} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{b}$$

Siendo:

SD: Desviación estándar de los diez blancos.

b: Pendiente de la recta de calibrado.

III.9.2. Intervalo de linealidad

Constituye el rango en el que el ensayo proporciona resultados directamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra.

Se realizan tantos puntos como sean necesarios hasta que la recta de regresión lineal pierda su linealidad, y es en este punto donde nuestra curva de regresión lineal tendrá su límite superior. Su límite inferior se corresponde con el límite de detección del método.

III.9.3. Curvas de calibrado

Diariamente se realiza una curva patrón acuosa. Para ello se preparan tres disoluciones patrón según el procedimiento de ensayo, conteniendo concentraciones crecientes del mismo y se establece el coeficiente de regresión lineal que debe ser al menos de 0.99.

- Patrón 1: generalmente coincide o se sitúa ligeramente por encima del límite de detección.
- Patrón 2: suele ser dos o tres veces el patrón 1.
- Patrón 3: suele ser dos o tres veces el patrón 2.

III.9.4. Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas. Estas condiciones dependen de los factores que varíen entre cada uno de los ensayos. Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. Mediante la precisión se evalúan los errores aleatorios. Por tanto, un resultado es exacto si simultáneamente es veraz (está libre de errores sistemáticos) y preciso (los errores aleatorios son aceptables). En la precisión a su vez distinguimos:

a) Precisión mínima: es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento repetidas veces en la zona baja y alta de la recta de calibrado. Se determina tomando diez lecturas (área o altura de pico) de diez disoluciones con concentraciones del analito en la zona baja y alta de dicha recta.

El coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa, se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\frac{SD_A \times 100}{\bar{X}_A} \qquad \frac{SD_B \times 100}{\bar{X}_B}$$

Siendo:

\bar{X}_A : Media de las lecturas de absorbancia en la zona alta.

SD_A : Desviación estándar de las lecturas de absorbancia en la zona alta.

\bar{X}_B : Media de las lecturas de absorbancia en la zona baja

SD_B : Desviación estándar de las lecturas de absorbancia en la zona baja.

b) Repetibilidad: es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento repetidas veces bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos, durante una misma sesión de trabajo y en un período corto de tiempo.

Se realizan diez lecturas de una misma muestra preparadas según el procedimiento del ensayo. Se calcula la desviación estándar de las diez lecturas (área o altura de pico) para así poder hallar el coeficiente de variación.

c) Precisión intermedia: es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento repetidas veces sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutado por diferentes analistas en días distintos, es decir, bajo condiciones diferentes.

Se realizan una serie de medidas de una muestra a lo largo de un periodo mayor de tiempo. Se mide una muestra una vez a la semana durante cinco semanas o más. Se calcula la desviación estándar de las lecturas (área o altura de pico) hallando así el coeficiente de variación.

III.9.5. Exactitud

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado. Por tanto, además de considerar los errores sistemáticos, el término exactitud considera también los errores aleatorios ya que están siempre presentes en el resultado de una medida. Es decir, la exactitud es la suma de dos conceptos: veracidad y precisión. Un resultado es veraz si está libre de error sistemático.

La exactitud se determina comparando los valores certificados correspondientes a un material de referencia (*Certified Reference Material, CRM*) con los encontrados tras la aplicación del procedimiento de ensayo al mismo. Para ello, se realiza el análisis de diez medidas (concentración) del CRM preparado por el mismo procedimiento que la muestra para controlar así posibles variaciones en los equipos, reactivos, condiciones ambientales, analista, etc.

El intervalo de confianza viene dado por la expresión:

$$\bar{X} \pm \frac{SD_x \times W}{\sqrt{n_r}}$$

Siendo:

SD_x : desviación estándar de las diez réplicas.

\bar{X} = media de las diez determinaciones del CRM

W = t de Student igual a 1 para $n_r=10$

n_r = número de réplicas

III.9.6. Concentración característica

La concentración o masa característica es la masa del analito en pg, que genera una señal de 0.0044 para medidas de área y de altura de pico. Para el cálculo de la masa característica es necesario realizar diez medidas de la señal de un blanco y diez de la de un patrón intermedio de la curva de calibrado. Se calcula la desviación estándar de las diez medidas y se establece la $m_c \pm 3 SD$.

Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$m_c = \frac{V \times C \times 0.0044}{A}$$

Siendo:

V: volumen de inyección.

C: concentración del patrón intermedio de la recta de calibrado en $\mu\text{g/l}$

A: lectura de la absorbancia del patrón intermedio de la recta de calibrado menos el blanco.

III.9.7. Recuperación

El porcentaje de recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido de la muestra. En el caso ideal se obtiene un 100%. En medidas experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores. La recuperación se realiza agregando a la muestra distintas cantidades de analito y comprobando, posteriormente, el porcentaje que se recupera.

$$\% \text{ recuperación} = \text{Valor medido} \times 100 / \text{Valor real}$$

III.9.8. Incertidumbre del método

Hoy en día es cada vez más importante que los resultados analíticos vayan acompañados de su incertidumbre. La metodología utilizada está basada en la norma ISO/IEC 17025. En esta norma no sólo se subraya la necesidad de estimar la incertidumbre del ensayo sino que también deben calcularse las incertidumbres asociadas a las calibraciones internas (es decir, las calibraciones que realiza el propio laboratorio) (ISO, 1993; EURACHEM, 1995).

La incertidumbre se define como un parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza el intervalo de valores que puede ser razonablemente atribuido al mensurando. El mensurando es la magnitud sujeta a medida. Por lo tanto, en análisis químico el mensurando se refiere al analito o la propiedad que estamos determinando. El concepto de incertidumbre refleja la duda acerca de la exactitud del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de error y se han aplicado las correcciones oportunas. La incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado ya que indica “cuanto puede alejarse” un resultado del valor considerado como verdadero, también denominado “valor diana”.

La metodología utilizada para determinar la incertidumbre divide el proceso de medida en sus partes fundamentales y cada una de estas se subdivide, a su vez, en contribuciones más pequeñas. Posteriormente, se calcula la incertidumbre de cada una de esas partes y se combinan para obtener la incertidumbre global del proceso de medida. Una vez identificadas todas las posibles fuentes de incertidumbre se cuantifican. La cuantificación de la incertidumbre a partir del análisis estadístico de los resultados da lugar a incertidumbres de tipo “A”. Este tipo de resultados suelen estar asociados a la variabilidad debida a errores aleatorios (por ejemplo, la repetibilidad o la precisión intermedia).

Sin embargo hay veces en las que no es posible calcular un componente de incertidumbre de forma experimental. En este caso, la incertidumbre debe evaluarse a partir de trabajos anteriores o bien a partir del criterio del analista y se denominarían incertidumbres de tipo “B”. Éstas se obtienen también a partir de la información proporcionada por los proveedores. Algunos ejemplos son la tolerancia del material volumétrico y los certificados de calibración de dicho material.

Antes de combinar las incertidumbres individuales para obtener la incertidumbre total, es necesario expresar todas las incertidumbres como “incertidumbres estándar”. En el caso de las de “tipo A”, la desviación estándar de los resultados equivale a la incertidumbre estándar. Para las de “tipo B”, muchas veces no se dispone de la información sobre la distribución, como es el caso del material

volumétrico. En estos casos se asume que es igual de probable que el valor esté en cualquier lugar dentro de los límites fijados por la tolerancia y entonces la incertidumbre estándar se obtendría dividiendo el valor de la tolerancia por $\sqrt{3}$ (Dietrich, 1991). La tolerancia del material volumétrico incluyendo el de las pipetas (error de la pipeta), es dada usualmente por el fabricante.

Los componentes de incertidumbre individuales deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene la incertidumbre total estándar, $U (CONT)$. Así, para calcular la incertidumbre asociada al procedimiento de ensayo en valores relativos (%) utilizamos la siguiente expresión:

$$\frac{U^2 (CONT)}{CONT^2} = \frac{U^2 (C_{est})}{C_{est}^2} + \frac{U^2 (V_{fin})}{V_{fin}^2} + \frac{U^2 (V_{inic})}{V_{inic}^2}$$

Siendo:

$U (CONT)$ = incertidumbre del contenido en el metal

$CONT$ = contenido en metal

$U (C_{est})$ = incertidumbre de la concentración del metal

C_{est} = concentración del metal

$U (V_{fin})$ = incertidumbre del volumen de la muestra diluida

V_{fin} = volumen de la muestra diluida

$U (V_{inic})$ = incertidumbre del volumen de la muestra

V_{inic} = volumen de la muestra

A cada uno de los sumandos de la ecuación anterior le asignamos un número; así el primero que se refiere a la incertidumbre de la concentración del metal será el (I), el segundo de la incertidumbre del volumen de la muestra diluida será el (II) y el último de la incertidumbre del volumen de la muestra será el (III).

Para calcular la $U (C_{est})$ del sumando (I) utilizamos la siguiente expresión:

$$U^2 (C_{est}) = U^2 (patrón) + U^2 (regres) + U^2 (precis)$$

(I.a) (I.b) (I.c)

Siendo:

U (patrón) = incertidumbre de la disolución patrón (I.a)

U (regres) = incertidumbre asociada a la recta de regresión que transforma absorbancias en concentraciones (I.b)

U (precis) = incertidumbre de la repetibilidad del método (I.c)

La U^2 (patrón) (I.a) puede considerarse la resultante de:

$$\frac{U^2(\text{patrón})}{C_{\text{patrón}}^2} = \frac{U^2(\text{madre})}{C_{\text{madre}}^2} + \left[\frac{U^2(V_{\text{inic}})}{V_{\text{inic}}^2} + \frac{U^2(V_{\text{fin}})}{V_{\text{fin}}^2} \right] \times n^{\circ} \text{ diluc}$$

Siendo:

$C_{\text{patrón}}$ = concentración del patrón

U (madre) = incertidumbre de la concentración de la disolución madre a partir de la cual se prepara el patrón.

C_{madre} = concentración de la disolución madre a partir de la cual se prepara el patrón

$U(V_{\text{fin}})$ = incertidumbre del volumen de la disolución madre diluida

V_{fin} = volumen de la disolución madre diluida

$U(V_{\text{inic}})$ = incertidumbre del volumen de la disolución madre

V_{inic} = volumen de la disolución madre

$n^{\circ} \text{ diluc}$ = número de diluciones seriadas realizadas a la disolución madre

Las expresiones $U(V_{\text{fin}})/V_{\text{fin}}$ y $U(V_{\text{inic}})/V_{\text{inic}}$ se calculan del mismo modo que los sumandos (II) y (III), teniendo en cuenta las pipetas que se han utilizado para la elaboración de los patrones de la recta patrón.

La U^2 (regres) (I.b) se obtendría del siguiente modo:

$$U^2(\text{regres}) = \frac{S_{\text{resid}}^2}{b^2} \times \frac{1}{n^{\circ} \text{ pat}} + d_c^2 \times \frac{S_b^2}{b^2}$$

Siendo:

S_{resid} = desviación estándar de los residuales

b = pendiente de la recta

n° pat = número de patrones de calibración

d_c = concentración de metal de un patrón concreto menos la media de la concentración de metal de los patrones usados en la calibración

S_b = desviación estándar de la pendiente

Todos estos parámetros se calculan a través del programa informático "Statgraphics".

La U^2 (pres) (I.c) se calcula mediante la fórmula:

$$U^2 (\text{precis}) = \left(\frac{S_{\text{reprod}}}{\sqrt{r}} \right)^2$$

Siendo:

S_{reprod} = desviación estándar de la repetibilidad

r = número de réplicas

Finalmente, el cálculo de los dos sumandos que nos faltan, es decir (II) y (III), se realizan usando la misma expresión:

$$U (V) = \frac{\text{Error pipeta}}{\sqrt{3}} = \frac{|\text{Exact}| + |\text{Prec}|}{\sqrt{3}}$$

Siendo:

Exact = exactitud de la pipeta (en valor absoluto)

Prec = precisión de la pipeta (en valor absoluto)

III.9.9. Interferencia de matriz

Para detectar el efecto de la matriz de una muestra se compara la pendiente de la curva de calibración obtenida por el método de adición con la obtenida por el método directo, proceso que se repite en varias muestras. Si las pendientes obtenidas mediante ambos métodos son similares no es necesario recurrir al método de adición. En caso contrario, es preciso analizarlas por el método de adición. En este último caso, si las pendientes de las curvas de adición para diferentes muestras de orina fueran similares entre ellas, se podría obtener un factor corrector que permitiera aplicarlo a la totalidad de las muestras. Otra opción sería preparar una curva patrón a partir de una “matriz artificial” de orina u otro material biológico exento del analito a medir. En el caso de que sean diferentes, cada muestra se analizará independientemente por el método de adición.

III.10. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS Y CHEQUEO DEL EQUIPO

III.10.1. Control de calidad de los ensayos

Consiste en la repetición, en la misma tanda de análisis, de la misma muestra, de una porción de ésta o de alícuotas de una de ellas. Esta actividad elimina errores accidentales (mala lectura de los datos, errores de cálculo, etc.) y mejora la estimación de nuestro valor verdadero de las muestras. Al mismo tiempo suministra información sobre la variabilidad inherente a la muestra y sobre la repetibilidad de los resultados. Generalmente, el 5% o más de las muestras a analizar fueron divididas en dos alícuotas, preparadas por separado y posteriormente se analizaron por duplicado para obtener datos acerca de la precisión de los análisis. Estas mismas muestras se adicionaron de los analitos y se calculó la recuperación de éstos para determinar la exactitud. Este proceso se repitió cada vez que se analizó un grupo de muestras o bien, se comenzaba una jornada de trabajo.

Durante el análisis de las muestras se analizó un patrón certificado cada 5 ó 10 muestras. El valor de dicho patrón nos sirvió también como control de calidad y para

asegurar la calibración óptima del instrumental. Además se analizaron los blancos del método con cada serie de muestras.

III.10.2. Chequeo del equipo

Se chequeó el equipo en cada sesión de trabajo en relación a la observación de tres parámetros:

- El coeficiente de correlación lineal de la recta de calibrado. Este debería ser al menos de 0,99.
- La concentración característica, la cual no debería diferir en más de un 25% de la establecida en la validación del procedimiento.
- Las medidas de precisión y exactitud deberían estar comprendidas entre la media $\pm 3SD$, siendo SD la desviación estándar correspondiente a la repetibilidad del método.

III.11. MATERIALES DE REFERENCIA (CRMs)

Con objeto de comprobar la exactitud de los diferentes métodos analíticos investigados, se utilizaron varios tipos de muestras certificadas de composición similar a la muestra en estudio, es decir, sangre total, orina, saliva y vello axilar.

Los materiales de referencia para las muestras de sangre (ref. 201505, 201605 y 201705) y orina (ref.201205) fueron suministrados por SERONORM™ (Billinngstaid, Noruega).

El Control de Calidad Interlaboratorios del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) también nos proporcionó un control externo para plomo en sangre total y cromo en orina, existiendo diferentes niveles de concentración de los metales a analizar. En general, se optó de forma rutinaria por utilizar los niveles más próximos a los resultados esperados.

El material de referencia para el pelo (NIES No.5), fue suministrado por el Instituto Nacional de Estudios Ambientales de la Agencia Ambiental de Japón.

Puesto que no existen muestras de referencia para metales pesados en saliva, se seleccionaron 10 muestras de saliva a las que se le añadieron los diferentes metales objeto de estudio a partir de una solución estándar en una concentración conocida.

III.12. LIMPIEZA DEL MATERIAL

Se empleó material desechable de polietileno previamente analizado para los elementos objeto del estudio, comprobando la ausencia de dichos metales. El resto del material no desechable de polietileno y vidrio se sumergió en agua con detergente dentro de un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. Se enjuagó con agua bidestilada y a continuación se sumergió en HNO₃ al 20% (v/v) situándolo de nuevo dentro del baño de ultrasonidos durante otros 30 minutos. Se enjuagó con agua bidestilada y, seguidamente, tres veces con agua milli-Q. Por último se secó en una estufa a 60 °C. Una vez seco, el material se guardó en bolsas de plástico estériles.

III.13. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN (CADMIO, CROMO, MANGANESO, NIQUEL Y PLOMO) EN TRABAJADORES DEL SECTOR SIDEROMETALÚRGICO. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN.

III.13.1. Diseño epidemiológico

El diseño epidemiológico que se ha seguido se encuadra dentro de los denominados estudios de prevalencia. Estos se denominan también estudios transversales, y son muy utilizados con fines descriptivos. Recogen información sobre la situación de salud de un grupo poblacional en un periodo concreto de tiempo establecido previamente en el diseño (Hernández, 2002). En nuestro caso, recogen información sobre los niveles de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en los trabajadores del sector siderometalúrgico, y más concretamente, relacionados con la

soldadura. La información adicional se ha obtenido a través de una encuesta específica que, simultáneamente a los datos de interés, incorpora aquellas variables que se consideran de interés (fumar, beber, datos relativos a la alimentación, edad...).

III.13.2. Diseño del muestreo

Una vez organizado el diseño experimental, se fijaron los criterios de selección de los sujetos que formaron parte del estudio. Como criterio de inclusión se estableció que el trabajador estuviera expuesto a metales en su ambiente laboral y como criterio de exclusión que su antigüedad en el puesto fuera inferior a 6 meses. Por tanto, no se trabajó con toda la población sino que se eligió un número determinado de casos a los que se denominó muestra.

a) Zona de procedencia

La muestra se tomó de varias empresas ubicadas en Córdoba, Martos (Jaén) y Palma de Mallorca (un total de 178 sujetos, que se distribuyeron en 55, 6 y 117, respectivamente). Las edades estaban comprendidas entre los 18 y 65 años.

Tabla 8. Muestreo final en la población trabajadora clasificado por edad y sexo

Población	Distribución por sexos		Número de individuos
	Hombres	Mujeres	
Córdoba	55	0	55
Martos (Jaén)	6	0	6
Palma de Mallorca	37	8	117

b) Toma de muestra

A cada sujeto de estudio se le extrajo una muestra de sangre, en un sistema tipo Vacutainer, utilizando tubos de 5 ml con EDTA como anticoagulante. También se tomó una muestra de orina de 30-40 ml aproximadamente (en recipiente estándar) y con tapón incoloro, al objeto de evitar la posible contaminación del colorante. Se procedió del siguiente modo: la sangre total con EDTA se agitó y se transfirió a dos tubos limpios (2 alícuotas). Seguidamente se identificaron las muestras y se congelaron a -20°C. Las muestras de orina no precisaron tratamiento alguno; tan solo se congelaron para su conservación.

Todas las muestras de saliva fueron recogidas antes del desayuno. Los participantes tuvieron que enjuagarse la boca durante 1 minuto con 10 ml de agua esterilizada (Braun Medical, SA) e inmediatamente después vertieron 6 ml de saliva, cuya producción no fue estimulada, en tubos de polipropileno. El primer ml de saliva fue desechado en todas las muestras y a continuación cada muestra fue centrifugada a 900g durante 5 minutos con el objetivo de sedimentar la materia celular. Posteriormente fueron congeladas a -20 °C para su mantenimiento hasta el análisis.

La recogida del vello axilar se realizó después del lavado por parte de cada trabajador de la zona con agua destilada y jabón neutro. La cantidad obtenida fue aproximadamente de 0,1g realizando el rasurado de la zona con una cuchilla de afeitar común. La longitud del vello axilar osciló entre 0.5 y 2 cm. Las muestras de vello fueron introducidas en tubos de polipropileno, previamente lavados con ácido. Posteriormente las muestras de vello axilar fueron lavadas mediante ultrasonidos con una solución de detergente no iónico (Tritón X-100). Seguidamente, el detergente fue retirado mediante abundantes enjuagues con agua Mili-Q y tras un nuevo lavado ultrasónico con una solución de etanol y nuevamente con agua Mili -Q. El vello lavado fue secado durante toda la noche a 70°C. Finalmente, fue molido usando un mortero de ágata a polvo fino y a continuación se le añadió 1 ml de HNO₃, 0,5 ml de HCl, 2 ml de H₂O₂ y 2 ml de H₂O y se introdujo en un digestor por microondas durante 30 minutos (Anton Parr, modelo multiwave 3000).

Todas las muestras fueron recogidas en viernes, al finalizar la jornada laboral, tras cinco días consecutivos de trabajo.

c) Codificación:

Ante las diferentes codificaciones de las muestras según su origen, una vez que un conjunto de muestras llegó de un mismo sitio al laboratorio, se les asignó un número que fue el mismo para cada lugar de procedencia, seguido de otro que se asignó por orden a cada una de las muestras individualizadas. A las muestras de orina, sangre total, saliva y vello axilar del mismo individuo le correspondía el mismo código, que fue a su vez anotado junto a su encuesta, consentimiento informado y la fecha para así evitar confusiones. Se optó así por nombrar a los individuos con una letra que dependería de la procedencia de la muestra (C: Córdoba, M: Martos y P: Palma de Mallorca) seguido de un número de dos cifras según el orden asignado en la codificación. Las correspondencias entre ambas nomenclaturas se introdujeron en la base de datos de SPSS 15.

d) Encuesta:

Previa firma de un consentimiento informado (ver Anexo I), los sujetos de estudio completaron una encuesta (ver Anexo II). Esta encuesta abarca diferentes ítems que proporcionan datos de interés para el estudio. Para cada uno de los citados ítems se le asignaron dos o más opciones al sujeto para que señalara una de ellas. Una vez recibidas en el laboratorio, los diferentes datos fueron comprobados, categorizados e introducidos en una base de datos (SPSS 15) para su posterior estudio. Ésta fue diseñada de manera específica para el estudio llevado a cabo. En los aspectos relativos a ingesta dietética se tomaron en consideración las principales fuentes bibliográficas de alimentación sobre metales pesados en España y en Andalucía (Moreiras y Cuadrado, 1993; Gómez et al, 1991; Gómez et al, 1992). Al objeto de comprobar todos los ítems valorados, en el anexo II, de la presente Memoria de Tesis, se recoge el protocolo de encuesta que se pasó a los trabajadores que participaron en este estudio.

III.13.3. Análisis estadístico de los datos

Todos los resultados se introdujeron en una base de datos generada en el programa informático SPSS versión 15 y se procesaron estadísticamente de la siguiente forma (Martín-Andrés y Luna del Castillo, 1993):

1. Análisis descriptivo:

- Inicialmente se estableció el perfil de los individuos mediante el cálculo de la distribución de frecuencias y las medidas de tendencia central y dispersión.
- Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (corrección de Lilliefors) para determinar la bondad de ajuste a una distribución normal y la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de las varianzas de cada una de las muestras comparadas.

2. Análisis bivariante:

- Las variables continuas se analizaron mediante la *t* de Student o análisis de la varianza de una vía. Cuando el análisis de la varianza para muestras independientes obtenía un valor *F* significativo, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Neuman-Keuls. En ausencia de normalidad, o cuando las varianzas fueron heterogéneas, se utilizó el test de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis para *K* muestras independientes y la prueba de *U* de Mann-Whitney para dos muestras independientes.
- Para evaluar la relación existente entre variables cuantitativas se utilizó el análisis de correlación de Pearson o, caso de que las variables no siguieran una distribución normal, el de Spearman.

3. Análisis multivariante:

Se construyó el modelo de regresión lineal múltiple utilizando el procedimiento paso a paso (*stepwise*) para estimar la proporción de variabilidad en los valores de los distintos parámetros analizados explicados por las variables más relevantes. En ellos, las variables dependientes fueron los metales en los diferentes fluidos biológicos y como variables independientes o predictoras se introdujeron las demás: edad, género, hábito tabáquico, consumo de alcohol, antigüedad en el puesto, antecedentes en la industria del metal y hábitos dietéticos, entre otras, que podrían actuar como posibles factores de confusión. Los criterios de inclusión y exclusión de las variables que se utilizaron en el modelo de regresión fueron: un nivel de significación inferior a 0,05 para la entrada y un nivel de significación superior a 0,1 para la salida de la variable.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 1. VALIDACIÓN METODOLÓGICA

La biomonitorización humana se ha convertido en una herramienta del máximo interés en el campo de la salud ambiental y ocupacional para la evaluación del grado de exposición a sustancias nocivas para la salud por parte de la población general y trabajadora, respectivamente (Schuhmacher et al, 2002). En el caso concreto de la exposición a metales pesados, la biomonitorización juega un papel cada vez más importante en el establecimiento de límites ocupacionales y ambientales y contribuye a reducir la exposición así como a evitar efectos perjudiciales sobre la salud (Gil y Hernández, 2009).

La presente Memoria de Tesis Doctoral pretende evaluar la eficacia del uso de muestras biológicas menos invasivas, como el vello axilar y la saliva, como muestras alternativas o complementarias de fluidos biológicos clásicos (sangre y orina) en la biomonitorización de dosis internas de metales pesados en individuos ocupacionalmente expuestos a los mismos. Este estudio es el primero recogido en la literatura científica internacional que lleva a cabo una biomonitorización simultánea de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb en cuatro muestras biológicas diferentes (sangre total, orina, vello axilar y saliva) y utiliza como población de estudio a 178 trabajadores del sector del hierro y del acero, encuadrados globalmente bajo el término de industria siderometalúrgica.

Sin embargo, actualmente en toxicología existe la necesidad permanente de obtener resultados analíticos de calidad que cumplan con los criterios de las normativas internacionales y, muy especialmente, a nivel europeo. Esto resulta especialmente útil en el caso de tóxicos industriales que son objeto de

biomonitorización en la población expuesta. Igualmente resulta pertinente la realización de dichos análisis sobre diferentes matrices biológicas que permitan establecer los límites de exposición permisibles con objeto de proteger así a los trabajadores frente a ciertos compuestos químicos y, muy especialmente, frente a metales pesados (Goullé et al, 2005; D'Ilio et al, 2008).

En este sentido, hay ciertas muestras relativamente novedosas, como por ejemplo la saliva o el vello axilar, que, *a priori*, mostrarían mayores ventajas prácticas en la biomonitorización de la exposición ocupacional que las mediciones de metales en los fluidos biológicos clásicos (como pueden ser la sangre y la orina). Por esta razón es fundamental asegurar estrictamente la calidad durante la extracción de las muestras y la realización de los análisis químicos, así como realizar una adecuada validación analítica de la metodología empleada.

La espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito es una técnica analítica altamente sensible y bien conocida para la realización de análisis de metales, principalmente en fluidos biológicos humanos. En la memoria de Tesis Doctoral que se presenta, se ha procedido a la validación de los procedimientos analíticos para la determinación de diversos metales en diferentes matrices biológicas (sangre, orina, saliva y vello axilar).

El uso de la espectrofotometría de absorción atómica permite el análisis de metales en muestras biológicas sin necesidad de separarlos de su matriz biológica y de llevar a cabo procedimientos de extracción complejos previos al análisis de los elementos. Por ejemplo, en el caso particular de la saliva, es suficiente hacer una mera dilución de las muestras para minimizar la interferencia y los efectos de matriz biológica ocasionados por las proteínas y sales (Kocadereli et al, 2000).

Además, el uso de modificadores químicos de matriz se ha convertido en una práctica rutinaria en espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito con el fin de obtener determinaciones libres de interferencias (Vilar-Fariñas et al, 2007). Así, una apropiada dilución con un modificador de matriz permite evitar el uso del método de adición lo que supone una gran ventaja no sólo en el tiempo de realización del análisis sino también en el coste del mismo. Por todo ello, siempre es recomendable una modificación química de la muestra al objeto de estabilizar la temperatura en el tubo de grafito, aconsejándose el uso de tubos con plataforma de L'vov, lo que permite aumentar la temperatura de pirolisis provocando así una reducción del efecto matriz interferente. Asimismo, este procedimiento también permite estabilizar el analito en la plataforma del tubo y separar la señal del analito de la correspondiente a la absorción de fondo.

En las tablas 9 a la 13 se resumen las condiciones instrumentales y programas del horno de grafito empleados para la cuantificación de cada uno de los elementos metálicos objeto del estudio en las diferentes muestras biológicas seleccionadas (orina, sangre total, vello axilar y saliva).

En la determinación de Ni y Pb (tablas 12 y 13) se empleó dihidrógeno fosfato como modificador químico, comprobándose que la incorporación de este compuesto en la solución evitaba la pérdida precoz de ambos analitos antes de la atomización. Sin embargo, en la determinación de Cd y Cr (tablas 9 y 10), la literatura científica especializada recomienda la utilización de una mezcla de nitratos de Pd y Mg como modificadores químicos universales, siendo ésta la que finalmente se empleó en el estudio que presentamos.

Tabla 9. Condiciones instrumentales y programa del horno de grafito empleados para la cuantificación de Cd en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

Longitud de onda (nm)	228.8
Programa del horno	
- Secado [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 100-10-5 2ª Etapa: 120- 5-10
- Calcinación [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 600-10-10 2ª Etapa: 700-10-5
- Atomización [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1600-0-5
- Limpieza [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	2600-3-5
Volumen de muestra/modificador (µl)	10/10
Modificador de matriz	Pd (NO ₃) ₂ + Mg (NO ₃) ₂
Dilución de las muestras	
Sangre	1/7
Orina	1/2
Vello axilar	1/5
Saliva	1/5
Gas inerte	Argón
Flujo (ml min ⁻¹)	250
Parada de flujo de gas	Etapa de atomización (etapa de lectura)
Corrector de fondo	Zeeman
Tubos HGA	Con plataforma integrada
Modo de lectura	Área de pico

Tabla 10. Condiciones instrumentales y programa del horno de grafito empleados para la cuantificación de Cr en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

Longitud de onda (nm)	357.9
Programa del horno	
- Secado [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 100-10-5 2ª Etapa: 120- 5-10
- Calcinación [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 600-10-10 2ª Etapa: 700-10-5
- Atomización [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1600-0-5
- Limpieza [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	2600-3-5
Volumen de muestra/modificador (μl)	10/10
Modificador de matriz	Pd (NO ₃) ₂ + Mg (NO ₃) ₂
Dilución de las muestras	
Sangre	1/4
Orina	1/4
Vello axilar	1/3
Saliva	1/2
Gas inerte	Argón
Flujo (ml min ⁻¹)	250
Parada de flujo de gas	Etapa de atomización (etapa de lectura)
Corrector de fondo	Zeeman
Tubos HGA	Con plataforma integrada
Modo de lectura	Área de pico

Tabla 11. Condiciones instrumentales y programa del horno de grafito empleados para la cuantificación de Mn en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

Longitud de onda (nm)	279.5
Programa del horno	
- Secado [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 110-1-30 2ª Etapa: 130-15-30
- Calcinación [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1300-15-30
- Atomización [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1800-0-5
- Limpieza [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	2450-3-5
Volumen de muestra/modificador (µl)	20/20
Modificador de matriz	Mg (NO ₃) ₂
Dilución de las muestras	
Sangre	1/6
Orina	Sin diluir
Vello axilar	1/4
Saliva	1/2
Gas inerte	Argón
Flujo (ml min ⁻¹)	250
Parada de flujo de gas	Etapa de atomización (etapa de lectura)
Corrector de fondo	Zeeman
Tubos HGA	Con plataforma integrada
Modo de lectura	Área de pico

Tabla 12. Condiciones instrumentales y programa del horno de grafito empleados para la cuantificación de Ni en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

Longitud de onda (nm)	232.0
Programa del horno	
- Secado [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 110-1-30 2ª Etapa: 130-15-30
- Calcinación [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1300-10-20
- Atomización [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	2200-0-5
- Limpieza [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	2500-3-5
Volumen de muestra/modificador (µl)	30/10
Modificador de matriz	(NH ₄) NO ₃) ₂ H ₂ PO ₄
Dilución de las muestras	
Sangre	1/4
Orina	1/4
Vello axilar	1/2
Saliva	1/2
Gas inerte	Argón
Flujo (ml min ⁻¹)	250
Parada de flujo de gas	Etapa de atomización (etapa de lectura)
Corrector de fondo	Zeeman
Tubos HGA	Con plataforma integrada
Modo de lectura	Área de pico

Tabla 13. Condiciones instrumentales y programas del horno de grafito empleados para la cuantificación del Pb en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

Longitud de onda (nm)	283.3
Programa del horno	
- Secado [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 100-10-10 2ª Etapa: 200-10-10
- Calcinación [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1ª Etapa: 800-10-10 2ª Etapa: 850-10-5
- Atomización [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	1700-0-5
- Limpieza [Temp (°C) -t rampa (s) - t mant. (s)]	2450-3-5
Volumen de muestra/modificador (µl)	10/10
Modificador de matriz	(NH ₄) NO ₃) ₂ H ₂ PO ₄
Dilución de las muestras	
Sangre	1/13
Orina	1/2
Vello axilar	1/5
Saliva	1/5
Gas inerte	Argón
Flujo (ml min ⁻¹)	250
Parada de flujo de gas	Etapa de atomización (etapa de lectura)
Corrector de fondo	Zeeman
Tubos HGA	Con plataforma integrada
Modo de lectura	Área de pico

Por otro parte, normalmente se aconseja el uso de un sistema de corrección del fondo para mejorar los altos índices de absorción de fondo (Lelis et al, 2002). En el presente estudio, los mejores resultados en términos de precisión analítica se obtuvieron con el sistema de corrección Zeeman en la determinación de todos los elementos (tablas 9-13). En el caso de muestras biológicas (por ejemplo, sobre sangre, orina y saliva), los mejores resultados para la determinación de niveles de metales pesados con interferencias de fondo inapreciables se obtuvieron también con el sistema Zeeman, el cual resulta especialmente idóneo para el análisis de metales en matrices biológicas de cierta complejidad (Dube, 1988; Strübel y Rzepka-Glinder, 1989; Burguera et al, 1998; Bruhn et al, 1999). No obstante, no es necesario insistir en la obligatoriedad del uso de la corrección del fondo cuando se trabaja en intervalos próximos al límite de detección.

En este estudio se emplearon tubos de grafito pirolizados con plataforma de L'vov y fueron sometidos a una media de 140 inyecciones sin que se apreciara pérdida de sensibilidad (reducción de la absorbancia en las soluciones estándar) o deterioro del revestimiento pirolítico, circunstancia que fue examinada de manera exhaustiva a partir de las 80 inyecciones.

Uno de los aspectos más importantes que se han estudiado desde el punto de vista analítico ha sido la *optimización de las condiciones de calcinación y atomización*. La calcinación es probablemente el paso más crítico dentro del proceso de análisis del metal en espectrofotometría de absorción atómica, puesto que en él se procede a la mineralización o digestión de la muestra sin que deba existir pérdida apreciable del analito. Se introdujeron directamente diferentes muestras (sangre, orina y saliva) para comprobar las condiciones de calcinación y atomización.

En el caso particular del vello axilar, la cuantificación de metales requiere la simplificación de la matriz al objeto de obtener una disolución efectiva de la muestra,

por lo que fue necesaria su mineralización previa para inyectar una solución analítica del vello previamente mineralizado. Para evitar la pérdida de algunos metales volátiles, incluidos el Cd y el Pb, se adoptó un procedimiento de digestión húmeda en sistema cerrado bajo presión empleando la energía de las microondas.

Las figuras 1 y 2 muestran las curvas de temperatura de calcinación y atomización de las muestras previamente diluidas.

Los mejores resultados se obtuvieron con la programación de temperaturas de carbonización o calcinación de 650, 1.500, 1.300, 1.300 y 800°C y de atomización de 1.600, 2.400, 1.800, 2.200 y 1.700°C para la determinación de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb, respectivamente (tablas 9-13). Las pruebas previas mostraron que temperaturas de calcinación inferiores a 1.200°C no fueron suficientes para la determinación de Cr en muestras biológicas (por ejemplo, en orina) ya que no se destruía por completo la matriz biológica (Dube, 1988).

Asimismo, la señal atómica disminuyó a temperaturas más elevadas de las indicadas. Se ajustaron los programas del horno con materiales de referencia certificados para sangre total y orina y las condiciones empleadas proporcionaron señales bien definidas, con niveles de absorción inespecífica despreciables así como una mayor sensibilidad evaluada mediante la masa característica de cada uno de los metales objeto del estudio. Los picos fueron siempre simétricos y con el fondo adecuadamente corregido. Por último, en todos los casos se incluyó una etapa de limpieza (tablas 9-13).

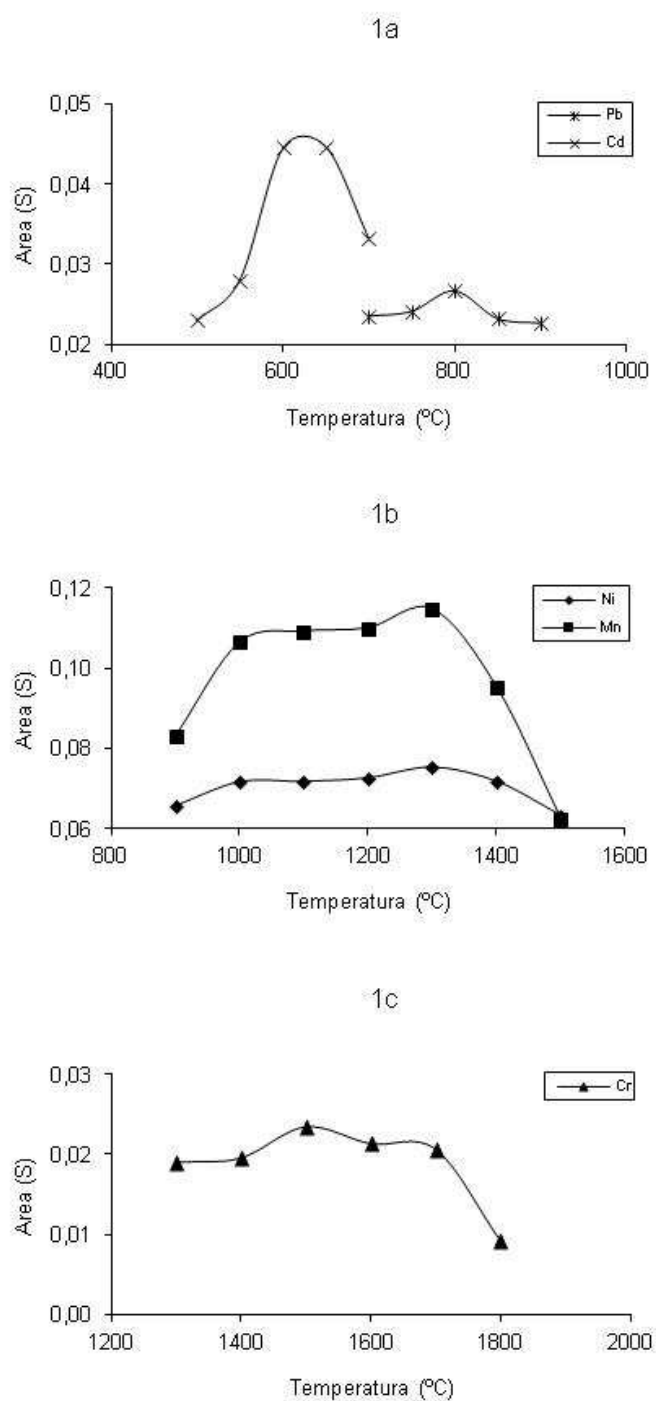


Figura 1. Curvas de calcinación del Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en muestras de sangre (nivel II) suministradas por Seronorm. La dilución de cada elemento está reflejada en las tablas 9 a la 13.

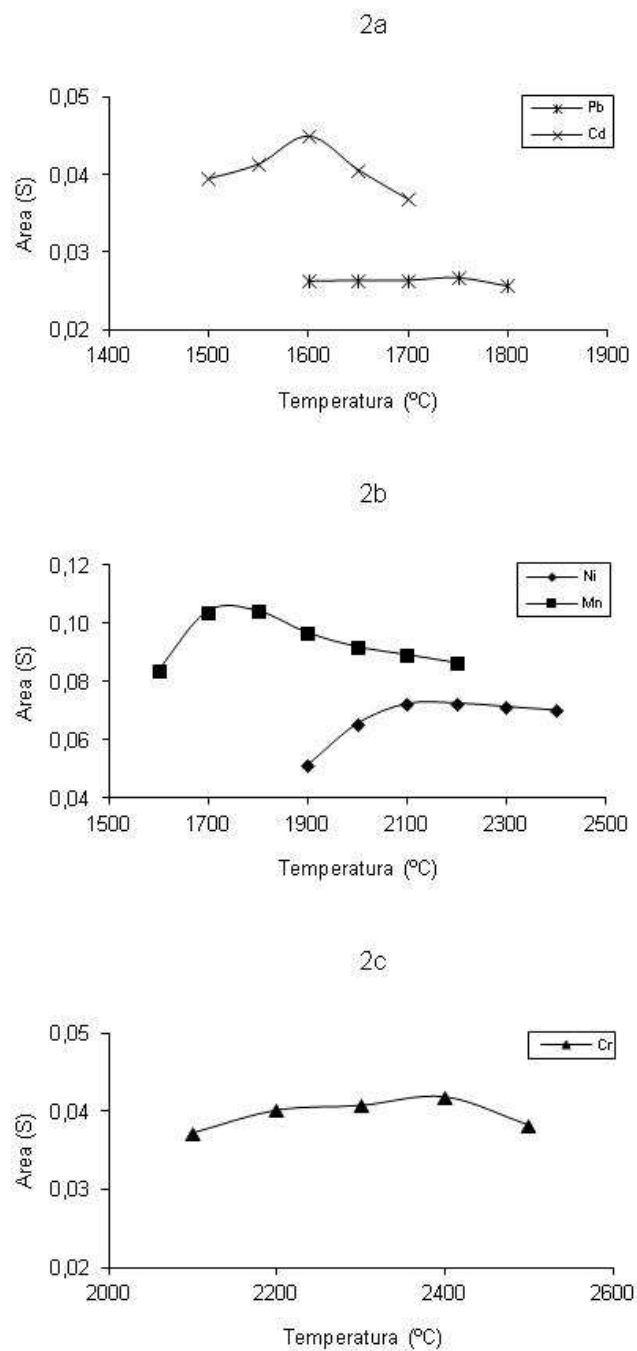


Figura 2. Curvas de atomización del Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en muestras de sangre (nivel II) suministradas por Seronorm. La dilución de cada elemento está reflejada en las tablas 9 a la 13.

En relación a la *validación de la metodología analítica*, las tablas 14 a 18 presentan los parámetros característicos del método analítico para cada uno de los metales analizados.

Tabla 14. Validación analítica de la determinación de Cd en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

LOD/LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		0.03/0.09
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g l}^{-1}$)		7
Ecuación lineal		$y = 0.0430x + 0.0035$
r		0.9960
Precisión (%)	Mínima	2.62
	Intermedia ¹	4.94
	Reproducibilidad	3.45
Exactitud (%)	Sangre ²	0.45
	Orina ²	1.70
	Vello axilar ³	0.23
Recuperación (%) ⁴	Saliva	98.25
	Sangre	101.19
	Orina	103.63
	Vello axilar	97.84
Masa característica (μg)		2.96

Los datos de precisión, exactitud y recuperación se han obtenido de la media de determinaciones repetidas (n= 10).

¹Los análisis de determinación intermedia fueron realizados en un período comprendido entre una y cinco semanas.

²CRM Seronorm

³CRM NIES

⁴Las muestras fueron enriquecidas con Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en solución estándar tal y como se muestra en la tabla 19.

Tabla 15. Validación analítica de la determinación de Cr en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

LOD/LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		0.19/0.64
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g l}^{-1}$)		30
Ecuación lineal		$y = 0.0058x + 0.013$
r		0.9984
Precisión (%)	Mínima	4.36
	Intermedia ¹	2.32
	Reproducibilidad	3.29
Exactitud (%)	Sangre ²	0.28
	Orina ²	1.60
	Vello axilar ³	3.33
Recuperación (%) ⁴	Saliva	104.57
	Sangre	99.15
	Orina	101.74
	Vello axilar	103.00
Masa característica (μg)		5.16

Los datos de precisión, exactitud y recuperación se han obtenido de la media de determinaciones repetidas (n= 10).

¹Los análisis de determinación intermedia fueron realizados en un período comprendido entre una y cinco semanas.

²CRM Seronorm

³CRM NIES

⁴Las muestras fueron enriquecidas con Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en solución estándar tal y como se muestra en la tabla 19.

Tabla 16. Validación analítica de la determinación de Mn en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

LOD/LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		0.12/0.39
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g l}^{-1}$)		20
Ecuación lineal		$y = 0.0156x + 0.027$
r		0.9972
Precisión (%)	Mínima	1.76
	Intermedia ¹	2.57
	Reproducibilidad	4.46
Exactitud (%)	Sangre ²	1.92
	Orina ²	3.71
	Vello axilar ³	1.45
Recuperación (%) ⁴	Saliva	103.66
	Sangre	99.52
	Orina	101.50
	Vello axilar	101.94
Masa característica (μg)		5.16

Los datos de precisión, exactitud y recuperación se han obtenido de la media de determinaciones repetidas (n= 10).

¹Los análisis de determinación intermedia fueron realizados en un período comprendido entre una y cinco semanas.

²CRM Seronorm

³CRM NIES

⁴Las muestras fueron enriquecidas con Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en solución estándar tal y como se muestra en la tabla 19.

Tabla 17. Validación analítica de la determinación de Ni en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

LOD/LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		0.24/0.81
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g l}^{-1}$)		15
Ecuación lineal		$y = 0.0054x + 0.0038$
r		0.9992
Precisión (%)	Mínima	2.78
	Intermedia ¹	4.50
	Reproducibilidad	4.88
Exactitud (%)	Sangre ²	5.26
	Orina ²	6.59
	Vello axilar ³	4.68
Recuperación (%) ⁴	Saliva	105.40
	Sangre	96.25
	Orina	98.21
	Vello axilar	107.80
Masa característica (μg)		9.32

Los datos de precisión, exactitud y recuperación se han obtenido de la media de determinaciones repetidas (n= 10).

¹Los análisis de determinación intermedia fueron realizados en un período comprendido entre una y cinco semanas.

²CRM Seronorm

³CRM NIES

⁴Las muestras fueron enriquecidas con Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en solución estándar tal y como se indica en la tabla 19.

Tabla 18. Validación analítica de la determinación de Pb en orina, sangre total, vello axilar y saliva.

LOD/LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		0.83/2.71
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g l}^{-1}$)		200
Ecuación lineal		$y = 0.0011x + 0.0079$
r		0.9995
Precisión (%)	Mínima	3.21
	Intermedia ¹	2.63
	Reproducibilidad	2.98
Exactitud (%)	Sangre ²	0.80
	Orina ²	1.20
	Vello axilar ³	0.75
Recuperación (%) ⁴	Saliva	99.47
	Sangre	101.80
	Orina	100.16
	Vello axilar	99.10
Masa característica (μg)		11.00

Los datos de precisión, exactitud y recuperación se han obtenido de la media de determinaciones repetidas (n= 10).

¹Los análisis de determinación intermedia fueron realizados en un período comprendido entre una y cinco semanas.

²CRM Seronorm

³CRM NIES

⁴Las muestras fueron enriquecidas con Cr, Cd, Mn, Ni y Pb en solución estándar tal y como se muestra en la tabla 19.

Como puede observarse, en todos los casos los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,997 y como mínimo superiores a 0.995 para aceptar la validez del proceso analítico y los resultados demostraron que la respuesta instrumental fue lineal en el rango de estudio. En dichas tablas se muestran las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración y los coeficientes de regresión lineal. Las curvas de calibración se crearon a partir de las concentraciones obtenidas una vez corregida la absorción de fondo y fueron lineales hasta 30, 7, 20, 15 y 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ para Cr, Cd, Mn, Ni y Pb, respectivamente. Los límites de detección obtenidos fueron de 0.19, 0.03, 0.12, 0.24 y

0.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ para Cr, Cd, Mn, Ni y Pb, respectivamente (tablas 14-18). Los resultados de las pruebas de recuperación resultaron especialmente destacables y siempre superiores al 95% en todos los metales estudiados y matrices biológicas empleadas. Los valores de recuperación de las cantidades conocidas de metales agregadas a la muestra oscilaron entre el 96.3 y el 107.8%, es decir, dentro del rango aceptable usualmente establecido entre el 90 y 110%.

Asimismo, para comprobar la validez de la calibración utilizando patrones acuosos, se prepararon varias muestras con diferentes cantidades de sangre total, orina y saliva, y se obtuvieron curvas de adición de patrón. Cada curva se creó a partir de tres o cuatro puntos, midiendo a su vez cada uno de ellos tres veces (es decir, se programó el equipo para que efectuara tres réplicas). Los resultados indicaron que las pendientes eran muy similares, lo cual corroboraba la ausencia de efecto matriz y validaba la calibración directa con patrones acuosos. No obstante, lo que sí resultó vital fue diluir previamente cada muestra de manera adecuada y los mejores resultados se obtuvieron con los factores de dilución recogidos en las tablas 9 a la 13. Dichos factores de dilución propuestos quedaron perfectamente verificados tras estudiar el efecto de la dilución de las concentraciones de los diferentes analitos sobre las diferentes muestras.

Las figuras 3 y 4 resumen la influencia de diversos factores de dilución sobre el porcentaje de valores certificados de los materiales de referencia de sangre total, orina y pelo.

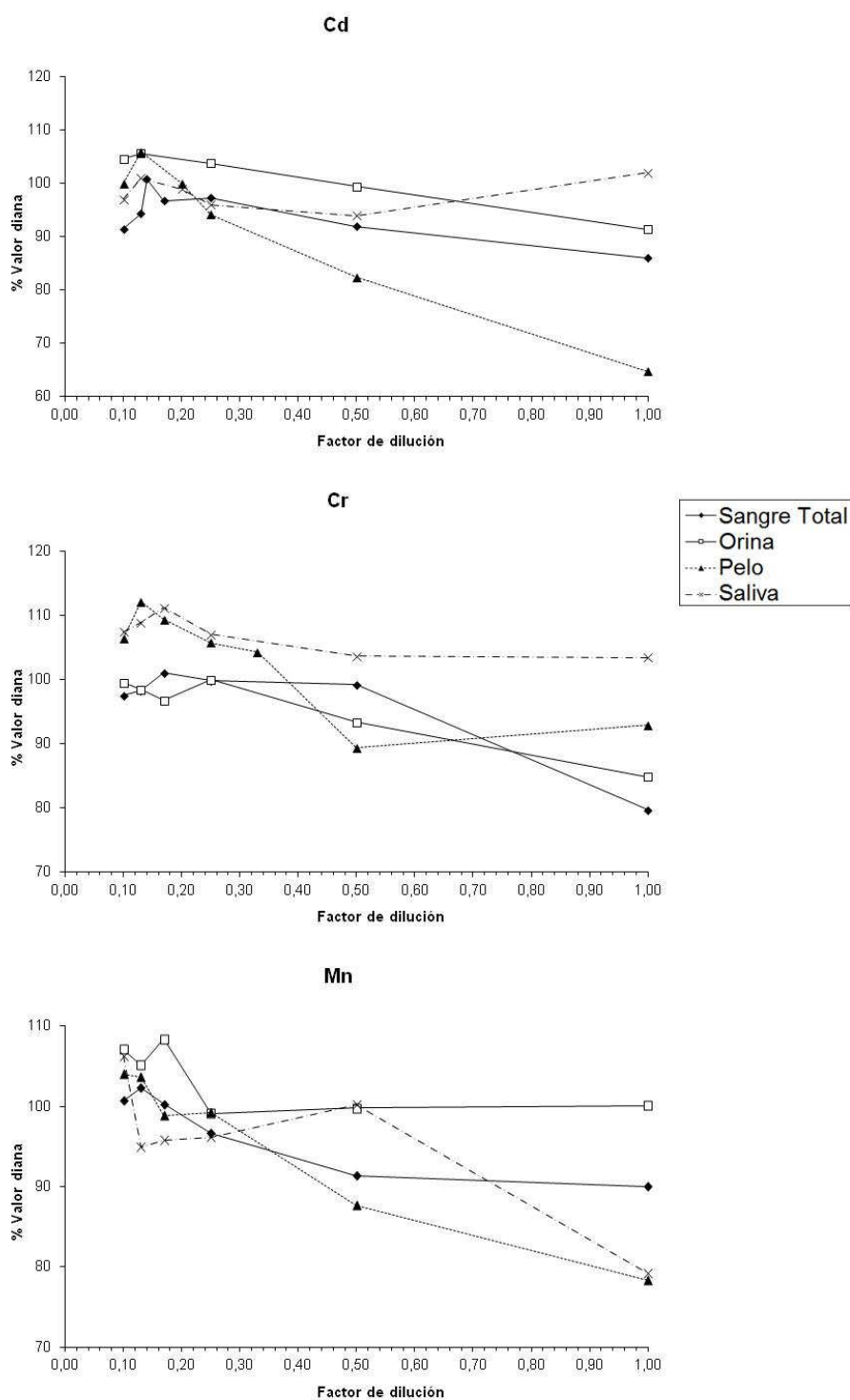


Figura 3. Influencia de los factores de dilución expresada en porcentaje sobre las muestras certificadas de los diferentes metales pesados objeto de estudio en sangre, orina y pelo axilar. En el caso de la saliva, al no existir patrones certificados comerciales, se enriquecieron muestras blanco con Cd, Cr y Mn hasta conseguir una concentración final de 1 $\mu\text{g/l}$, 5 $\mu\text{g/l}$ y 10 $\mu\text{g/l}$, respectivamente (tabla 19).

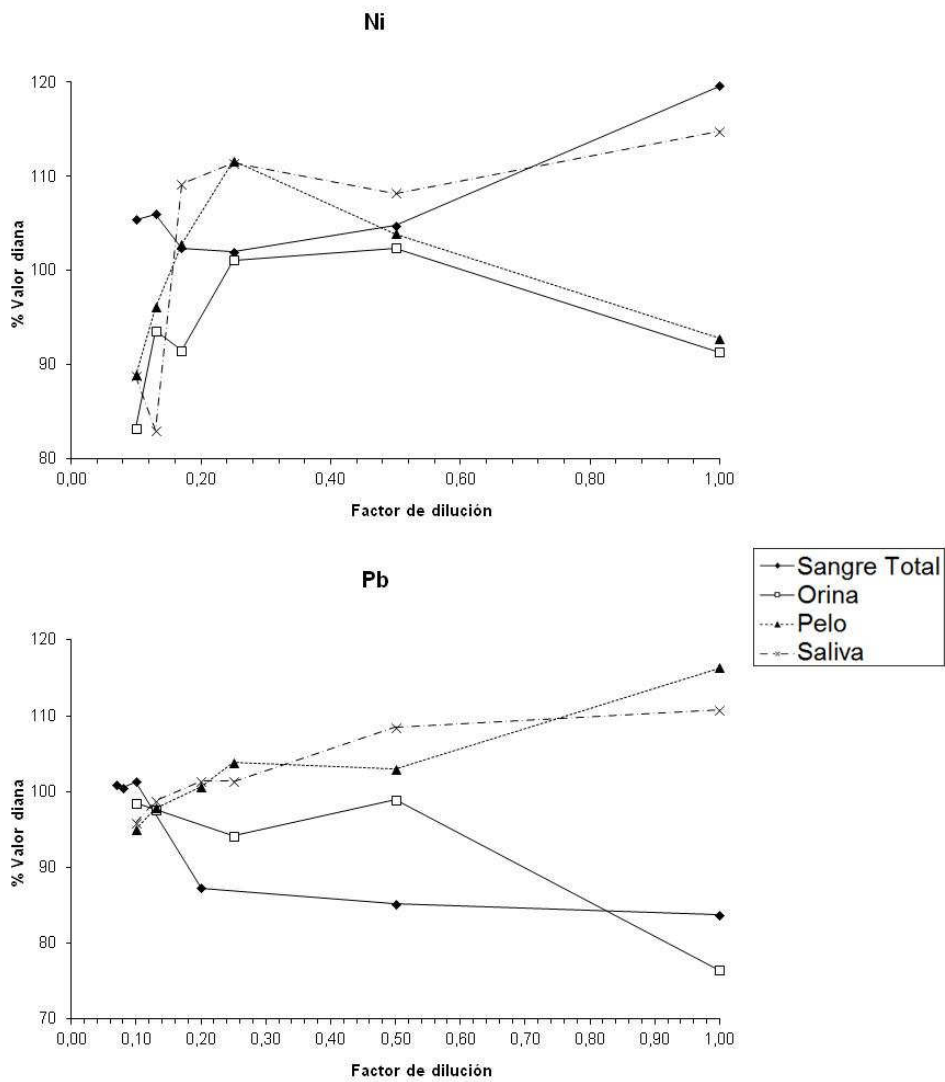


Figura 4. Influencia de los factores de dilución expresada en porcentaje sobre las muestras certificadas de los diferentes metales pesados objeto de estudio en sangre, orina y pelo axilar. En el caso de la saliva, al no existir patrones certificados comerciales, se enriquecieron muestras blanco con Ni y Pb hasta conseguir una concentración final de 5 $\mu\text{g/l}$ y 100 $\mu\text{g/l}$, respectivamente (tabla 19).

En el caso particular de la saliva y puesto que no existen materiales de referencia certificados para metales pesados, las muestras se fortificaron (con diferentes concentraciones de Cd ($1 \mu\text{g l}^{-1}$), Cr ($5 \mu\text{g l}^{-1}$), Mn ($10 \mu\text{g l}^{-1}$), Ni ($5 \mu\text{g l}^{-1}$) y Pb ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) según se puede apreciar en la tabla 19.

Tabla 19. Muestras biológicas de sangre, orina, vello axilar y saliva enriquecidas con diferentes concentraciones de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb

	Sangre	Orina	Vello axilar*	Saliva
Cr	7	11.5	30 (3.3)	5
Cd	1	1	2 (0.22)	1
Mn	12.5	7	50 (5.5)	10
Ni	5	7	50 (2.2)	5
Pb	100	100	55 (6.1)	100

Las concentraciones de expresan en $\mu\text{g/l}$ (a excepción del vello axilar que se ha expresado en $\mu\text{g/g}$).

*50 mg de vello axilar mineralizado en un volumen final de 5.5 ml

Además fue necesario incorporar tritón X-100 para facilitar la inyección de la muestra en el tubo de grafito. Se comprobaron varias concentraciones de tritón dentro del rango de 0,01-0,5% (w/v), alcanzándose una inyección adecuada de las soluciones de muestras y una óptima reproducibilidad con una concentración de tritón del 0,1% (w/v).

Para la totalidad de los elementos analizados, el porcentaje de desviación estándar para la precisión y repetibilidad mínima e intermedia nunca superó el límite del 20% (tablas 14-18), manteniéndose siempre por debajo del 5%, lo que constituye un resultado enormemente válido a tenor de los datos recogidos en la literatura científica.

El método analítico se controló mediante el uso de patrones certificados externos (*CRM- Certified Reference Material*) e internos. Así, se comprobó la fiabilidad del procedimiento propuesto mediante el análisis del contenido en metales de varias muestras de sangre total, orina y saliva adicionadas con metales pesados (tabla 19) y los índices de recuperación obtenidos demostraron estar en consonancia con los valores teóricos previamente adicionados (tablas 14-18).

Al comparar los resultados analíticos siempre sería necesario tener en cuenta la incertidumbre del método como un parámetro analítico de gran relevancia. Las incertidumbres del método para cada metal (Cd, Cr, Mn, Ni y Pb) se estimaron teniendo en cuenta todas las fuentes posibles de incertidumbre a lo largo de todo el proceso analítico tal y como se indicó en el apartado correspondiente de material y métodos. Cuando la concentración de Cd, Cr y Mn fue inferior a aproximadamente 1, 3 y 4 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente, la incertidumbre general cayó de modo muy significativo. Un comportamiento muy parecido se observó en el caso de concentraciones inferiores a 10 y 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ en el caso del Ni y el Pb, respectivamente (Figura 5).

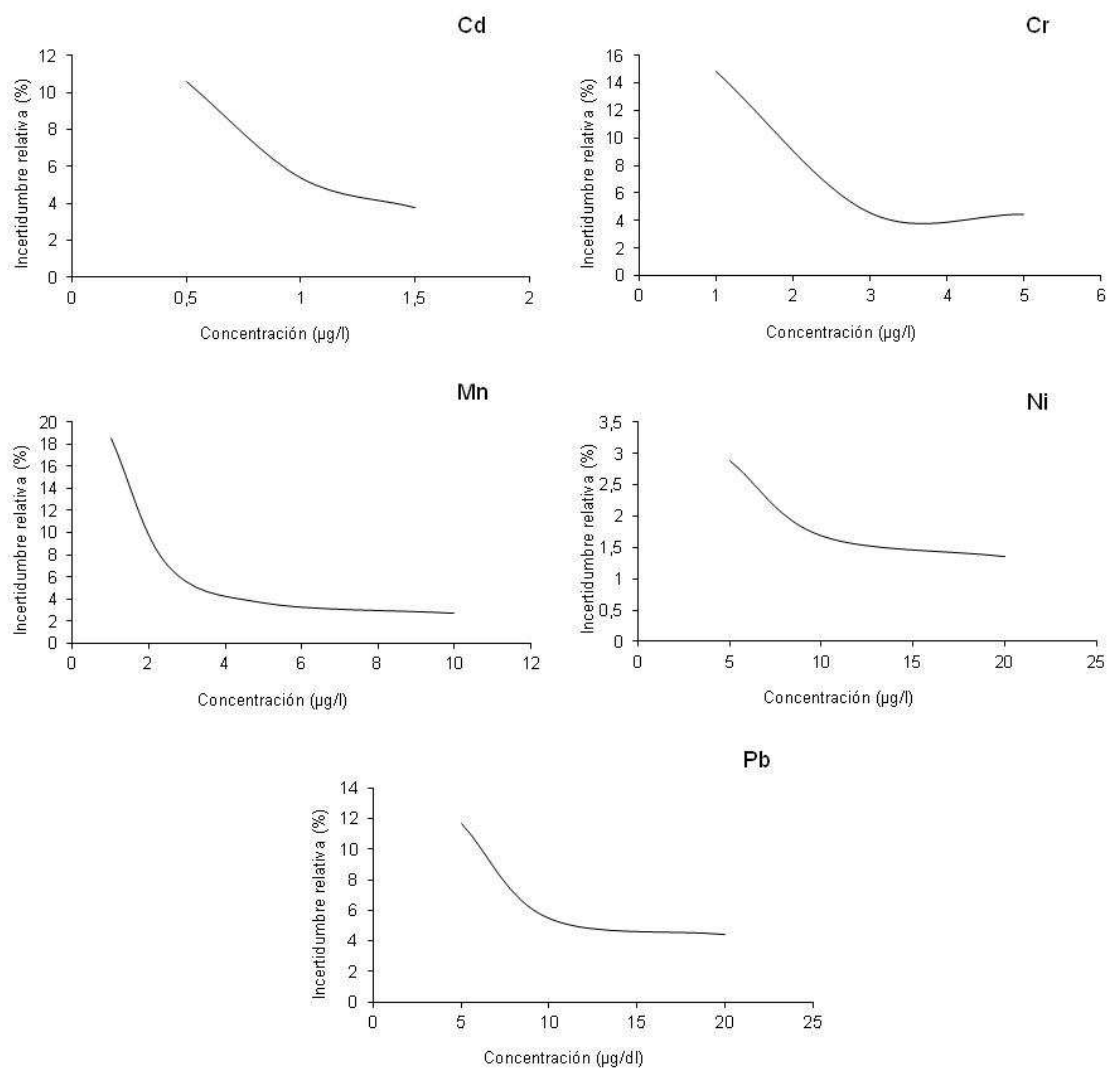


Figura 5. Incertidumbres del método para cada uno de los metales analizados (Cd, Cr, Mn, Ni y Pb).

En general, los resultados obtenidos en los estudios de validación metodológica realizados por otros autores son escasos y tan sólo tienen en cuenta una cantidad bastante más reducida de parámetros que los incluidos en la presente Tesis Doctoral, siendo usualmente el límite de detección, la precisión y/o la exactitud. Muchos de estos resultados están en concordancia con los presentados en este estudio, no obstante, los aquí reflejados pueden considerarse mejores en términos de masa característica (Burguera et al, 1998), límite de detección (Bruhn et al, 1999; Viitak y Volynsky, 2006; Kummron et al, 2008) y repetibilidad (Bermejo-Barrera et al, 1998). Por tanto, los métodos que se proponen demuestran ser fiables para la determinación de cinco elementos metálicos en cuatro muestras biológicas con diferente perfil toxicocinético, teniendo en cuenta que la sangre total y la saliva serían indicadores de exposición reciente, mientras que la orina y el vello axilar reflejarían exposición crónica.

Asimismo, el método validado cumple con los criterios de la Unión Europea en esta materia. Además, este método ofrece límites de detección satisfactorios gracias a la potencia analítica de la técnica espectrofotométrica empleada y demuestra ser un método preciso y exacto para la determinación de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb en cuatro muestras biológicas diferentes (sangre total, orina, vello axilar y saliva).

Sin embargo, probablemente uno de los aspectos más relevantes del estudio propuesto sea la hipotética aplicación y utilidad del método a la determinación de metales en población trabajadora en muestras de vello axilar y saliva. La hipótesis de partida es que los análisis de vello axilar y saliva complementarían de algún modo los realizados en fluidos clásicos tales como la sangre y la orina. Por su parte, se recomienda además, analizar el vello axilar en lugar de otro tipo más común que es el cabello, usualmente de la región occipital, debido a que las axilas serían mucho menos propensas a los procesos de contaminación externa por parte de metales pesados en forma particulada procedentes del ambiente laboral (Afridi et al, 2006; Crespón-Romero et al, 2007; Moreda-Piñeiro et al, 2007). No obstante, con el fin de poder

realizar estimaciones fiables de la posible presencia de metales pesados en el vello axilar, resultó necesario eliminar primero los metales procedentes de fuentes exógenas. Por todo ello y en consonancia con los trabajos previamente publicados, utilizamos un procedimiento de lavado con un detergente no iónico en un baño ultrasónico (Stauber et al, 1987; Leotsinidis y Kondakis, 1990).

Las soluciones de lavado clásicamente utilizadas en el pre-tratamiento del vello han sido: disolventes orgánicos, detergentes iónicos, detergentes no iónicos y agentes quelantes como por ejemplo el EDTA (Shamberger, 2002). Finalmente se decidió utilizar un método que combinara detergentes no iónicos y disolventes orgánicos acompañados de un proceso de sonicación.

Por otro lado, la saliva ha demostrado ser una matriz eficaz en la biomonitorización ocupacional. No obstante, la presencia de aparatos de ortodoncia, la mayoría de ellos metálicos, puede aumentar la cantidad de metales en la saliva. Además, la presencia de hemoglobina también puede afectar a los valores de ciertos metales (Gjerdet et al, 1991). Por ello, el análisis de metales en determinadas muestras biológicas debería incluir un cuestionario sobre la dieta debido a la posible influencia de la misma en el análisis de tóxicos, y más concretamente, de metales pesados (Fors y Persson, 2006).

Finalmente convendría hacer algunas consideraciones que merecen un comentario especial. Siempre que se aplique este método, sería necesario prestar especial atención a diversas cuestiones que consideramos relevantes con objeto que se pueda reproducir con fiabilidad lo descrito en la presente Memoria de Tesis:

- en el caso de la sangre y la orina, deberían extremarse las precauciones para evitar cualquier posibilidad de contaminación externa;

- en el caso del vello axilar, habría que medir la liberación de compuestos metálicos a partir del uso de tijeras o del instrumento de corte que se emplee; estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio revelaron la ausencia de transferencia de metales a partir de las tijeras empleadas. Igualmente debe realizarse el procedimiento estricto de lavado del vello y asegurarse que se alcanza la disolución completa del material mediante la oportuna digestión húmeda empleando, a ser posible, un digestor por microondas;
- en la saliva, habrá que excluir a sujetos con aparatos de ortodoncia o cualquier dispositivo metálico en el interior de la cavidad bucal;
- por último, verificar que se utilizan los factores de dilución adecuados y que resultaron ser críticos en la reproducibilidad metodológica (tablas 9 a la 13).

Se puede concluir, pues, que el método descrito es aplicable en la biomonitorización ocupacional de los metales pesados seleccionados sobre diversas muestras biológicas. Además, esta metodología se puede emplear en la evaluación del riesgo para la salud de individuos con exposición ocupacional a dichos metales, además de ser complementario en estudios epidemiológicos e investigaciones en salud laboral y toxicología industrial.

IV. 2. NIVELES DE CD, CR, MN, NI Y PB EN POBLACIÓN TRABAJADORA DEL SECTOR SIDERÚRGICO EN SANGRE TOTAL, ORINA, SALIVA Y VELLO AXILAR

Las tablas 20 a la 24 muestran la distribución de los niveles de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb en diferentes fluidos biológicos (sangre, orina, vello axilar y saliva) de la población objeto de estudio. Debido a que los valores no siguieron una distribución normal, se

incluyen las medianas rangos, rangos intercuartílicos y las medias geométricas de los datos de cada elemento y material biológico analizado. Asimismo, y con objeto de facilitar la comparación con otros estudios recogidos en la bibliografía internacional que únicamente aportan el valor medio obtenido, las tablas incluyen también las medias y desviación estándar.

Tabla 20. Niveles de Cd en sangre total, orina, vello axilar y saliva de los trabajadores objeto de estudio

	Sangre ¹	Orina ²	Vello axilar ³	Saliva ¹
n	162	161	178	144
Media ± SD	0.49 ± 0.61	0.25 ± 0.28	0.07 ± 0.13	0.14 ± 0.25
Rango	0.02 - 4.14	0.02 - 1.67	0.02 - 0.81	0.02 - 1.90
Media Geométrica	0.18	0.12	0.03	0.06
Mediana	0.22	0.18	0.01	0.06
Percentiles 5-95	0.01-1.62	0.01- 0.81	0.01- 0.37	0.01- 0.64

SD: desviación estándar; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 21. Niveles de Cr en sangre total, orina, vello axilar y saliva de los trabajadores objeto de estudio

	Sangre ¹	Orina ²	Vello axilar ³	Saliva ¹
n	178	177	178	178
Media ± SD	1.31 ± 3.01	0.95 ± 1.89	3.43 ± 7.93	3.11 ± 0.25
Rango	0.10 - 37.90	0.10 - 37.90	0.10 -19.65	0.10 - 60.22
Media Geométrica	0.58	0.45	0.95	0.73
Mediana	0.78	0.42	0.99	0.64
Percentiles 5-95	0.10 - 4.04	0.10 -3.28	0.10 -15.41	0.10 -11.57

SD: desviación estándar; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 22. Niveles de Mn en sangre total, orina, vello axilar y saliva de los trabajadores objeto de estudio

	Sangre ¹	Orina ²	Vello axilar ³	Saliva ¹
n	178	178	178	177
Media ± SD	8.68 ± 6.35	0.93 ± 4.00	2.35 ± 4.66	6.94 ± 10.15
Rango	0.12- 47.83	0.06 - 33.53	0.06 -52.58	0.12 - 70.47
Media Geométrica	7.05	0.18	0.97	3.70
Mediana	7.55	0.12	1.19	3.68
Percentiles 5-95	2.25 -17.74	0.04 -3.64	0.06 -6.92	0.62-28.86

SD: desviación estándar; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 23. Niveles de Ni en sangre total, orina, vello axilar y saliva de los trabajadores objeto de estudio

	Sangre ¹	Orina ²	Vello axilar ³	Saliva ¹
n	178	178	178	178
Media ± SD	0.96 ± 3.68	1.67 ± 5.09	3.29 ± 16.56	7.79 ± 21.96
Rango	0.12 - 34.44	0.12 - 51.01	0.12 - 215.80	0.12 - 188.50
Media Geométrica	0.23	0.44	0.80	1.45
Mediana	0.12	0.25	0.71	1.72
Percentiles 5-95	0.12-3.64	0.12-7.11	0.12-10.98	0.12-34.82

SD: desviación estándar; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 24. Niveles de Pb en sangre total, orina, vello axilar y saliva de los trabajadores objeto de estudio

	Sangre ¹	Orina ²	Vello axilar ³	Saliva ¹
n	162	161	178	153
Media ± SD	43.39 ± 52.65	22.28 ± 29.92	24.33 ± 51.43	3.03 ± 10.82
Rango	0.42 - 236.34	2.25 - 219.52	0.42 - 515.90	0.42 - 123.30
Media Geométrica	8.88	12.75	7.04	0.79
Mediana	27.23	9.42	7.22	0.42
Percentiles 5-95	0.42 - 157.533	3.69-80.35	0.42-95.41	0.42-11.40

SD: desviación estándar; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Las tablas 25 a 44 presentan los datos del análisis bivariante de la concentración de metales en sangre, orina, saliva y vello axilar, así como los principales factores de confusión en la población de estudio, incluyendo los hábitos alimenticios.

Tabla 25. Comparación de los valores medios de Cd obtenidos en las diferentes muestras biológicas analizadas por posibles factores de confusión

		Sangre ¹	Orina ²	Saliva ¹	Vello axilar ³
Género	Masculino	0.49 ± 0.61	0.24 ± 0.28	0.14 ± 0.23	0.08 ± 0.13
	Femenino	0.44 ± 0.67	0.32 ± 0.34	0.23 ± 0.46	0.02 ± 0.01*
Tabaco	No	0.15 ± 0.18	0.20 ± 0.19	0.13 ± 0.26	0.08 ± 0.14
	Sí	0.89 ± 0.69**	0.30 ± 0.35	0.15 ± 0.24	0.07 ± 0.12
Alcohol	No	0.47 ± 0.60	0.25 ± 0.32	0.17 ± 0.39	0.06 ± 0.08
	Sí	0.50 ± 0.62	0.25 ± 0.27	0.13 ± 0.20	0.08 ± 0.14
Residencia	Centro	0.51 ± 0.63	0.28 ± 0.30	0.15 ± 0.26	0.09 ± 0.15
	Periferia	0.43 ± 0.56	0.17 ± 0.18*	0.13 ± 0.19	0.03 ± 0.04*

* p < 0.05; ** p < 0.01; ¹ µg/l; ² µg/g creatinina; ³ µg/g

Tabla 26. Comparación de los valores medios de Cr obtenidos en las diferentes muestras biológicas analizadas por posibles factores de confusión

		Sangre ¹	Orina ²	Saliva ¹	Vello axilar ³
Género	Masculino	1.31 ± 3.05	0.90 ± 1.73	3.02 ± 8.87	3.07 ± 7.02
	Femenino	1.42 ± 1.99	2.03 ± 4.07	5.10 ± 9.54	10.90 ± 18.24*
Tabaco	No	1.14 ± 1.28	0.88 ± 2.12	2.41 ± 4.84	3.98 ± 8.07
	Sí	1.53 ± 4.22	1.05 ± 1.63	3.58 ± 11.46	2.87 ± 7.90
Alcohol	No	2.54 ± 6.45	0.90 ± 1.14	2.50 ± 3.82	2.49 ± 3.94
	Sí	1.03 ± 1.08	0.96 ± 2.03	3.03 ± 9.34	3.65 ± 8.63
Residencia	Centro	1.52 ± 3.48	1.09 ± 2.16	3.56 ± 10.26	1.96 ± 2.87
	Periferia	0.78 ± 0.82	0.57 ± 0.62	1.96 ± 2.87	4.22 ± 11.40

* p < 0.05; ¹ µg/l; ² µg/g creatinina; ³ µg/g

Tabla 27. Comparación de los valores medios de Mn obtenidos en las diferentes muestras biológicas analizadas por posibles factores de confusión

		Sangre ¹	Orina ²	Saliva ¹	Vello axilar ³
Género	Masculino	8.74 ± 6.49	0.94 ± 4.08	6.78 ± 9.97	2.44 ± 4.75
	Femenino	7.52 ± 0.96	0.77 ± 1.57	10.26 ± 13.76	0.34±18.24
Tabaco	No	8.62 ± 5.71	1.29 ± 5.41	6.46 ± 8.76	3.98 ± 0.32 ^{**}
	Sí	8.76 ± 7.14	0.56 ± 1.22	6.98 ± 10.28	2.59 ± 6.05
Alcohol	No	9.19 ± 4.96	1.13 ± 5.30	6.09 ± 7.93	2.14 ± 2.38
	Sí	8.57 ± 6.67	0.89 ± 3.66	6.79 ± 9.79	1.90 ± 2.06
Residencia	Centro	9.38 ± 7.01	0.89 ± 3.80	6.87 ± 9.63	2.47 ± 5.10
	Periferia	6.71 ± 3.48 [*]	0.41 ± 1.18	7.27 ± 11.62	2.92 ± 7.69

* p< 0.05; ** p< 0.01; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 28. Comparación de los valores medios de Ni obtenidos en las diferentes muestras biológicas analizadas por posibles factores de confusión

		Sangre ¹	Orina ²	Saliva ¹	Vello axilar ³
Género	Masculino	0.80 ± 2.95	1.39 ± 3.55	7.10 ± 20.82	3.26 ± 16.95
	Femenino	4.22 ± 10.94	7.43 ±17.64 [*]	22.38 ± 38.48	3.96 ± 4.96
Tabaco	No	0.94 ± 3.56	1.40 ± 4.07	8.27 ± 23.35	4.86 ± 22.69
	Sí	1.00 ± 3.90	1.96 ± 6.12	5.78 ± 15.65	1.60 ± 3.25
Alcohol	No	1.55 ± 5.44	1.40 ± 3.16	4.06 ±11.11	1.51 ± 2.29
	Sí	0.82 ± 3.15	1.71 ± 5.47	7.81 ± 21.53 ^{**}	3.72 ± 18.46
Residencia	Centro	0.91 ± 3.10	0.84 ± 5.84	8.19 ± 24.37	3.50 ± 19.03
	Periferia	1.10 ± 4.97	0.41 ± 1.86	6.87 ± 14.03	2.77 ± 7.03

* p< 0.05; ** p< 0.01; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 29. Comparación de los valores medios de Pb obtenidos en las diferentes muestras biológicas analizadas por posibles factores de confusión

		Sangre¹	Orina²	Saliva¹	Vello axilar³
Género	Masculino	44.21 ± 53.44	21.99 ± 30.01	3.01 ± 11.01	23.78 ± 51.97
	Femenino	27.70 ± 32.28	27.75 ± 29.48	3.34 ± 6.37	36.12 ± 38.84
Tabaco	No	43.05 ± 48.15	18.87 ± 28.13	2.11 ± 5.39	30.61 ± 62.00
	Sí	43.88 ± 58.29	26.35 ± 31.87	4.04 ± 14.73	17.64 ± 36.30
Alcohol	No	34.40 ± 48.30	11.29 ± 14.54	2.22 ± 3.70	8.79 ± 12.34
	Sí	45.51 ± 53.79	24.98 ± 32.13**	3.19 ± 11.94	28.07±56.48**
Residencia	Centro	48.91 ± 55.68	24.62 ± 33.58	2.60 ± 5.15	25.84 ± 56.07
	Periferia	29.04 ± 40.95*	16.03 ± 15.33	4.34 ± 19.70	20.78 ± 36.99

* p< 0.05; ** p< 0.01; ¹µg/l; ²µg/g creatinina; ³µg/g

Tabla 30. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Cd (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas con el consumo de alimentos

	Pollo	Cerdo	Ternera	Pescado fresco	Atún en lata	Otros alimentos enlatados
Sangre		0.171*			-0.165*	0.188*
Orina			0.167*			
Saliva		0.205*				
Vello axilar	0.223**			0.268**		

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística.

Tabla 31. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Cr (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas con el consumo de alimentos

	Pan	Huevos	Cerdo	Otros alimentos enlatados
Sangre			-0.161*	
Orina				0.161*
Saliva	0.161*	0.252**		-0.166*
Vello axilar				

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística.

Tabla 32. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Mn (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas con el consumo de alimentos

	Pan	Huevos	Pollo	Pescado fresco	Sardinias en lata
Sangre			0.163*		0.183*
Orina					
Saliva	0.170*	0.148*			
Vello axilar				0.162*	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística.

Tabla 33. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Pb (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas con el consumo de alimentos

	Leche	Cerdo	Atún en lata	Sardinias en lata	Otros alimentos enlatados
Sangre	- 0.220 *	0.164 *		0.175 *	
Orina		0.267 *			
Saliva	0.177 *		-0.338 *		-0.235 *
Vello axilar					

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística.

Tabla 34. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Cd (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas

	Sangre	Orina	Saliva	Vello axilar	Antigüedad Puesto
Sangre		0.210 **			- 0.365 **
Orina	0.210 **			0.404 **	
Saliva				0.201 **	
Vello axilar		0.404 **	0.201 **		

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística.

Tabla 35. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Cr (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas

	Sangre	Orina	Saliva	Vello axilar	Antigüedad Puesto
Sangre		0.272**			
Orina	0.272**		0.179*		
Saliva		0.179*			
Vello axilar					

* p< 0.05; ** p< 0.01. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística.

Tabla 36. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Mn (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas

	Sangre	Orina	Saliva	Vello axilar	Antigüedad Puesto
Sangre					
Orina					
Saliva					0.163*
Vello axilar					-0.360**

* p< 0.05; ** p< 0.01. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística

Tabla 37. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Ni (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas

	Sangre	Orina	Saliva	Vello axilar	Antigüedad Puesto
Sangre		0.299**			
Orina	0.299**				
Saliva				0.248**	0.276**
Vello axilar			0.248**		

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística

Tabla 38. Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de Pb (transformada logarítmicamente) en las diferentes muestras biológicas

	Sangre	Orina	Saliva	Vello axilar	Antigüedad Puesto
Sangre		0.343**	-0.218**	0.256**	0.220**
Orina	0.343**				
Saliva	-0.218**				
Vello axilar	0.256**				0.391*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las celdas en blanco indican ausencia de significación estadística

El hallazgo más importante de las tablas 34-38 es la correlación directa que se observó entre las concentraciones de Cd en sangre y en orina, así como entre los niveles de Cd en vello axilar y en saliva. Asimismo, el Cr en orina mostró una correlación positiva con el Cr en sangre y en saliva. El Ni en sangre mostró una correlación directa con el Ni en orina, mientras que el Ni en vello axilar también se correlacionó con las concentraciones de Ni en saliva. Por último, cabría resaltar que el Pb en sangre se asoció directamente al Pb en orina y en vello axilar, si bien se apreció una asociación inversa con los valores de Pb en saliva. No obstante, los niveles de Mn en las distintas muestras de sangre estudiadas no mostraron ninguna asociación entre sí.

En las tablas 39 a 43 se recogen los análisis de regresión lineal múltiple de las concentraciones transformadas logarítmicamente de cada uno de los metales en sangre total, orina, vello axilar y saliva ajustadas de acuerdo a varios factores como son la edad, el sexo, el hábito tabáquico y de consumo de alcohol, la exposición en el lugar de trabajo a lo largo de la vida (expresada en años), la zona de residencia y los hábitos alimenticios. Ésta última variable tan sólo se introdujo en los modelos cuando se detectó una asociación estadísticamente significativa en los análisis bivariantes indicados en las tablas 30-33. Los niveles de metales en las restantes muestras biológicas también se introdujeron en los modelos como variables.

Tabla 39. Análisis de regresión lineal múltiple de la concentración de Cd en las diferentes muestras biológicas estudiadas.

Muestra	ajR²	Predictor	B	Valor de p	Correlación parcial
Sangre	0.541	Edad	0.245	0.029	0.196
		Fumador	1.821	0.000	0.633
		Antigüedad	-0.442	0.000	-0.446
Orina	0.241	Edad	0.372	0.000	0.321
		Cd sangre	0.148	0.033	0.191
		Cd vello	0.509	0.000	0.321
Vello axilar	0.289	Edad	-0.277	0.001	-0.297
		Residencia	0.446	0.035	0.190
		Cd orina	0.355	0.000	0.443
		Pescado fresco	0.605	0.001	0.304
Saliva	0.081	Cd vello	0.213	0.024	0.202
		Cerdo	0.502	0.006	0.244

Las variables están codificadas de la siguiente forma: edad; género (0: masculino; 1: femenino); consumo de tabaco (1: si; 0: no); consumo de alcohol (0: no; 1: si); lugar de residencia (1: centro; 0: periferia); antigüedad en el puesto (años). Los hábitos alimentarios están codificados como variables cuantitativas.

Tabla 40. Análisis de regresión lineal múltiple de la concentración de Cr en las diferentes muestras biológicas estudiadas.

Muestra	ajR²	Predictor	B	Valor de p	Correlación parcial
Sangre	0.105	Antigüedad	0.142	0.022	0.177
		Cr orina	0.291	0.001	0.256
		Cerdo	-0.450	0.007	-0.206
Orina	0.110	Cr sangre	0.178	0.005	0.216
		Cr saliva	0.135	0.008	0.203
		Otras conservas	0.486	0.004	0.219
Vello axilar	0.046	Género	1.368	0.015	0.185
		Cr saliva	0.146	0.040	0.157
Saliva	0.131	Cr orina	0.296	0.007	0.209
		Cr vello	0.185	0.016	0.186
		Huevos	0.727	0.002	0.235
		Otras conservas	-0.641	0.009	-0.200

Las variables están codificadas de la siguiente forma: edad; género (0: masculino; 1: femenino); consumo de tabaco (1: si; 0: no); consumo de alcohol (0: no; 1; si); lugar de residencia (1: centro; 0: periferia); antigüedad en el puesto (años). Los hábitos alimentarios están codificados como variables cuantitativas.

Tabla 41. Análisis de regresión lineal múltiple de la concentración de Mn en las diferentes muestras biológicas estudiadas.

Muestra	ajR²	Predictor	B	Valor de p	Correlación parcial
Sangre	0.056	Residencia	0.305	0.010	0.199
		Pollo	0.249	0.029	0.168
Orina	N.S				
Vello axilar	0.168	Género	- 1.286	0.008	- 0.202
		Antigüedad	-0.313	0.000	-0.349
Saliva	0.053	Antigüedad	0.126	0.018	0.182
		Huevos	0.443	0.007	0.208

Las variables están codificadas de la siguiente forma: edad; género (0: masculino; 1: femenino); consumo de tabaco (1: si; 0: no); consumo de alcohol (0: no; 1: si); lugar de residencia (1: centro; 0: periferia); antigüedad en el puesto (años). Los hábitos alimentarios están codificados como variables cuantitativas.

Tabla 42. Análisis de regresión lineal múltiple de la concentración de Ni en las diferentes muestras biológicas estudiadas.

Muestra	ajR ²	Predictor	B	Valor de p	Correlación parcial
Sangre	0.109	Ni orina	0.313	0.000	0.338
Orina	0.127	Género	0.976	0.037	0.159
		Ni sangre	0.350	0.000	0.328
Vello axilar	0.105	Edad	- 0.227	0.015	- 0.185
		Ni saliva	0.245	0.000	0.314
Saliva	0.159	Alcohol	0.648	0.047	0.152
		Antigüedad	0.287	0.000	0.263
		Ni vello	0.366	0.000	0.300

Las variables están codificadas de la siguiente forma: edad; género (0: masculino; 1: femenino); consumo de tabaco (1: si; 0: no); consumo de alcohol (0: no; 1; si); lugar de residencia (1: centro; 0: periferia); antigüedad en el puesto (años). Los hábitos alimentarios están codificados como variables cuantitativas.

Tabla 43. Análisis de regresión lineal múltiple de la concentración de Pb en las diferentes muestras biológicas estudiadas.

Muestra	ajR²	Predictor	B	Valor de p	Correlación parcial
Sangre	0.189	Residencia	0.940	0.026	0.192
		Pb orina	0.735	0.000	0.338
		Pb vello	0.255	0.016	0.207
Orina	0.203	Alcohol	0.486	0.021	0.199
		Pb sangre	0.145	0.000	0.346
		Cerdo	0.315	0.022	0.198
Vello axilar	0.198	Alcohol	0.829	0.018	0.204
		Antigüedad	0.349	0.000	0.331
		Pb sangre	0.145	0.016	0.207
Saliva	0.062	Edad	0.208	0.038	0.179
		Pb sangre	- 0.128	0.008	- 0.227
		Otras	-0.569	0.010	-0.222
		conservas			

Las variables están codificadas de la siguiente forma: edad; género (0: masculino; 1: femenino); consumo de tabaco (1: si; 0: no); consumo de alcohol (0: no; 1: si); lugar de residencia (1: centro; 0: periferia); antigüedad en el puesto (años). Los hábitos alimentarios están codificados como variables cuantitativas.

Entre los resultados merece destacar que, en general, las mujeres presentaron niveles más altos de Cr y Ni, y más bajos de Mn. Sin embargo, no se detectaron asociaciones significativas entre el sexo y los niveles de Pb y Cd en las distintas muestras biológicas analizadas.

Asimismo, se observó un incremento de los niveles de Cd en sangre y orina y de Pb en saliva asociados a la edad. Sorprendentemente la edad fue capaz de predecir de forma significativa niveles más bajos de Cd y Ni en muestras de vello axilar.

Por su parte, el hábito tabáquico sólo mostró una asociación directa con los niveles de Cd en sangre, como suele ser habitual. El consumo de alcohol actuó como factor predictivo de un mayor contenido de Ni en saliva y de un mayor contenido de Pb en orina y en vello axilar.

La experiencia en el puesto de trabajo a lo largo de la vida se asoció de forma significativa a un menor contenido de Cd en sangre y de Mn en vello axilar, así como a un mayor contenido de Cr en sangre, Mn y Ni en saliva y Pb en vello axilar. Por otra parte, vivir en zonas residenciales urbanas conlleva niveles más altos de Mn y Pb en sangre y de Cd en vello axilar.

Únicamente los niveles de Cd y Mn en sangre no mostraron asociación significativa con su concentración en el resto de las muestras biológicas analizadas. Por otra parte, de las cuatro muestras biológicas analizadas, el Mn fue el único metal que no mostró asociaciones significativas con el resto de metales, lo cual concuerda con los datos presentados en las tablas 34 a 38. El mayor número de asociaciones de niveles de metales pesados de todas las muestras biológicas analizadas se observó con el Cr, seguido del Pb, del Cd y por último del Ni.

Ningún producto alimenticio (tablas 30-33) mostró asociación con el Ni en las diversas muestras biológicas ensayadas. No obstante, la ingesta de pescado fresco estaba ligada a elevados niveles de Cd en vello axilar. El consumo de cerdo se asoció a altos niveles de Cd en saliva, Cr en sangre y Pb en orina. Igualmente, otros alimentos enlatados se asociaron significativamente con los niveles de Cr en orina y de Cr y Pb en saliva. La ingesta de huevos, por su parte, tan sólo mostró asociación con Cr y Mn en saliva, y finalmente, el consumo de pollo a Mn en sangre.

A pesar del hecho que en nuestra población de estudio los niveles de metales detectados en todos los materiales biológicos presentaron grandes variaciones (véanse las tablas 20-24), la concentración media general en el caso de los cinco metales analizados pareció corresponder a una población no expuesta a actividades industriales salvo en el caso del Pb en el vello axilar, debido a que se encontraban dentro del mismo rango o incluso en un rango inferior a los niveles recogidos en otros estudios realizados en poblaciones diferentes (Chlopicka et al, 1998; Bader et al, 1999; Afridi et al, 2006).

Dada la marcada disminución de contaminación por metales pesados observada en la mayoría de los países industrializados en los últimos años, acorde sin duda a las exigencias y recomendaciones en cuanto a prevención de riesgos medioambientales e industriales, cabe esperar una importante reducción de la dosis interna en la población trabajadora. El presente estudio proporciona base empírica que respalda de forma contundente esta hipótesis. Por tanto, los niveles de Cd, Cr, Mn, Ni y Pb se hallaron por debajo de los valores de referencia recomendados para salud ocupacional (Índices de Exposición Biológica o *BEIs*) y que han sido estimados en 5, 30, 3, 30 y 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina en orina, y 5, 5, 10, 5 y 400 $\mu\text{g l}^{-1}$ en sangre total, respectivamente (Lauwerys y Hoet, 1993), lo que de algún modo sugiere y refrenda el correcto cumplimiento de las prácticas de prevención de riesgos laborales en general, y más concretamente de higiene industrial, que se están aplicando.

A pesar de que tradicionalmente la evaluación de los niveles de metales pesados en el organismo se ha realizado sobre muestras de sangre y orina, cada vez son más los estudios que se efectúan en cabello debido a que éste es un importante sistema excretor no solo de metales sino también de otros muchos xenobióticos, como por ejemplo drogas de abuso. Así, el pelo es una matriz interesante desde el punto de vista del análisis toxicológico ya que las concentraciones que alcanzan en él pueden llegar a ser hasta diez veces superiores a los niveles detectados en muestras de sangre y orina (Cespon-Romero et al, 2007). Por ello, el pelo es considerado como uno de los materiales biológicos más interesantes en el campo de la biomonitorización medioambiental y ocupacional a metales pesados y de hecho, es utilizado por organismos internacionales como por ejemplo el Organismo Internacional de la Energía Atómica (IAEA) para monitorizar metales (Druyan et al, 1998). Este organismo incluso posee esta matriz como material certificado de referencia para la determinación de metales pesados y ha sido empleado en la validación metodológica de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Según las concentraciones promedio recogidas en las tablas 20-24, los niveles de metales en vello axilar son superiores a los detectados en sangre siguiendo la secuencia Ni > Pb > Cr; sin embargo, son inferiores a los de Cd y Mn. El vello de este modo se consideraría un índice fiable de exposición crónica a elementos tóxicos ambientales (Chatt *et al.*, 1980). Como la exposición ambiental a metales pesados es infrecuente y en cualquier caso, altamente variable, el contenido de metales en cabello/vello pueden proporcionar una estimación más correcta del nivel de riesgo a largo plazo en la población general en comparación con los niveles reflejados en sangre (Foo et al, 1993). Además, los datos obtenidos del análisis en pelo pueden servir de base para la identificación de grupos especiales de riesgo (por ejemplo, población trabajadora) o de sujetos que vivan en zonas excesivamente contaminadas (Bencko, 1995).

A diferencia de las muestras de sangre y orina, el pelo presenta un mayor potencial de contaminación externa, por lo que es obligatorio incluir una fase de limpieza antes de la ejecución del análisis de elementos traza (Bencko, 1995). Además de ello, el tratamiento artificial del pelo (tintes, champús, permanentes o, en nuestro caso especial, desodorantes) así como el lavado de las muestras de pelo puede afectar a los resultados e incrementar la presencia de metales como por ejemplo el Mn (Foo et al, 1993).

De este modo, hemos considerado pertinente analizar la presencia de compuestos metálicos en el vello axilar en lugar de otro tipo más común que es el cabello de la región occipital debido a que las axilas son mucho menos propensas a la contaminación externa por parte de estos compuestos (Bader et al, 1999).

Asimismo, diversos estudios recogen metodologías validadas que incluyen un procedimiento de lavado con detergente. Este paso previo resulta absolutamente necesario para eliminar cualquier traza de contaminación externa que afecte al contenido de metales pesados incorporado a través del pelo (Olmedo et al, 2010).

En las tablas 44 a 46 se muestran los diferentes estudios en pelo recogidos en la literatura científica especializada sobre el contenido de los cinco metales pesados seleccionados en la presente Memoria de Tesis. Los resultados del Cd son muy similares a los indicados por Gouille y colaboradores (2005) y Moreda-Pineiro y colaboradores (2007) llevados a cabo en cabello de población no expuesta.

Tabla 44. Comparación de los niveles de metales en cabello/vello obtenidos en el presente estudio con los publicados en la literatura científica especializada entre 1980-1990.

Referencia - Muestra biológica	n	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb	Notas
Memoria Tesis Doctoral - Vello axilar (µg/g)	178	0.02	0.99	1.19	0.71	7.22	Valores medios trabajadores
<i>Moon et al (1986)</i> - Cabello (µg/ml)	8 7 12	2.98 ± 5.28 0.22 ± 0.18 0.35 ± 0.43	0.33 ± 0.19 0.44 ± 0.19 0.32 ± 0.17	1.9 ± 2.1 2.7 ± 3.2 1.1 ± 0.8	2.64 ± 6.11 0.28 ± 0.21 0.33 ± 0.29	12.0 ± 15.0 3.4 ± 2.2 5.3 ± 7.1	Fuerte McKay Garden River Fuerte Chipewyan
<i>Husain et al (1986)</i> - Cabello (µg/g)	102		2.45±1.3		1.25±0.72	4.18±2.37	Control (hombres)
<i>Stauber et al (1989)</i> - Cabello (µg/ml) - Vello púbico (µg/ml) - Cabello (µg/ml) - Vello púbico (µg/ml)				2.2 ± 0.8 3.0 ± 0.4 0.5 ± 0.2 1.3 ± 0.5			Controles Trabajadores Sydney
<i>Shrestha et al (1989)</i> - Cabello (µg/g)	20 27	0.5 ± 0.2 0.7 ± 0.7		0.35 ± 0.3 8.1 ± 6.9		6.3 ± 8.1 8.5 ± 5.6	Comunidad india San Diego
<i>Leotsinidis et al (1990)</i> - Cabello (µg/g)	75	0.30 / 0.19	0.61 / 0.56		0.82 / 1.16	4.26 / 3.78	Control hombre/ mujer
<i>Kono et al (1990)</i> - Cabello (µg/g)	237 142				0.52 ± 0.28 0.66 ± 0.27		Control Expuestos a HF
<i>Gammelgaard et al (1990)</i> - Cabello (µg/g)	16 64				0.149 0.340		No expuestos Hipertensos (medias)

Tabla 45. Comparación de los niveles de metales en cabello/vello obtenidos en el presente estudio con los publicados en la literatura científica especializada entre 1991-2000.

Referencia - Muestra biológica	n	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb	Notas
Memoria Tesis Doctoral - Vello axilar (µg/g)	178	0.02	0.99	1.19	0.71	7.22	Valores medios trabajadores
<i>Sukumar et al. (1992)</i> - Cabello (µg/ml)	16	0.3	3.9	12.8	0.7	7.9	Trabajadores sanos (varones)
<i>Foo et al (1993)</i> - Cabello (µg/g)	209			2.66		641	Trabajadores (media geométrica)
<i>Bencko (1995)</i> - Cabello (µg/g)	62/1 02 12		0.124 1.468		0.286 2.385		Control Soldadores (medias)
<i>Leung et al (1997)</i> - Cabello (µg/ml)	12- 17		0.08 ± 0.11	2.34 ± 2.30	0.61 ± 0.26	3.07 ± 1.79	Población sana (30-50 años)

<i>Bermejo-Barrera et al (1998)</i> - Cabello ($\mu\text{g/g}$)	25			0.03-1.20			Población sana (rango)
<i>Chłopicka et al (1998)</i> - Cabello ($\mu\text{g/g}$)	158	0.91 ± 0.61				8.21 ± 5.59	Niños
<i>Bader et al (1999)</i> - Vello axilar ($\mu\text{g/g}$) - Vello axilar ($\mu\text{g/g}$)	17 39			2.2 ± 1.8 4.6 ± 5.8			Trabajadores (White Area)
<i>Luse et al (2000)</i> - Cabello ($\mu\text{g/g}$)	46			5.78 ± 1.60 1.83 ± 0.18			Soldadores Controles

Tabla 46. Comparación de los niveles de metales en cabello/vello obtenidos en el presente estudio con los publicados en la literatura científica especializada entre 2001-2011.

Referencia - Muestra biológica	n	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb	Notas
Memoria Tesis Doctoral - Vello axilar (µg/g)	178	0.02	0.99	1.19	0.71	7.22	Valores medios trabajadores
<i>Shamberger (2003)</i> - Cabello (µg/ml)	50	0.04 ± 0.07	0.06 ± 0.17	0.62 ± 1.70	0.47 ± 0.31	0.74 ± 1.10	Controles
<i>Goullé et al. (2005)</i> - Cabello (µg/g)	45	0.011	0.20	0.067	0.23	0.41	Voluntarios sanos (medias)
<i>Afridi et al (2006)</i> - Cabello (µg/g)	75 56	1.48 ± 0.62 3.43 ± 1.16	3.82 ± 0.67 5.66 ± 2.21		5.25 ± 1.46 3.43 ± 1.16	6.84 ± 1.55 16.21 ± 7.99	No expuestos Trabajadores del metal
<i>Cespón-Romero et al (2007)</i> - Cabello (µg/g)	7	0.5 - 4.9				10.6 - 96.2	Soldadores (rango)
<i>Moreda-Piñeiro et al (2007)</i> - Cabello (µg/g)	10	0.06 ± 0.04			5.95 ± 4.30		No expuestos
<i>Rodrigues et al (2008)</i> - Cabello (µg/g)	280			1.3 ± 2.4 (0.05 - 6.7)		2.5 ± 3.7 (0.02 - 31)	Adultos sanos brasileños (rango)

Los valores de Cr del presente estudio son muy similares a los hallados por Leotsinidis et al (1990) en sujetos control (población masculina no expuesta) y por Bencko (1995) en cabello de soldados. En cambio, fueron muy superiores a los valores obtenidos por Afridi y colaboradores (2006) sobre una población no expuesta. No obstante, los niveles detectados en nuestra población de estudio no sobrepasaron los niveles de exposición ocupacional y, por tanto, no pueden ser considerados nocivos en términos de riesgo para la salud de los trabajadores, circunstancia que resulta de especial trascendencia a efectos de prevención de riesgos laborales.

Los valores de Mn del presente estudio son muy similares a los obtenidos por Moon y colaboradores (1986) en una comunidad india expuesta (Fort Chipewyan, Canadá) y por Stauber et al (1989) en este caso efectuados en vello púbico de sujetos control residentes en Sidney. También son muy similares a los obtenidos en sujetos sanos por otros autores (Bermejo-Barrera et al, 1998; Luse et al, 2000; Schamberger, 2003). Por el contrario, los niveles encontrados por Bader et al (1999), tanto sobre poblaciones no expuestas como en trabajadores, y sobre una muestra de vello axilar, fueron superiores a los presentados aquí (véanse las tablas 44 a 46). Aunque la presencia de polvo procedente de la carretera (que contiene un 4% de Mn) y de la evaporación del sudor en el pelo podría provocar una mayor incorporación de Mn en el pelo a través de fuentes exógenas, esta contaminación desaparece gracias al procedimiento de limpieza. El estilo de vida y la dieta también pueden contribuir al aumento del contenido de Mn en el pelo (Stauber y Florence, 1989), habiendo comprobado que existe una asociación con la ingesta de pollo y huevos en el caso de la sangre y la saliva, respectivamente.

Las concentraciones de Ni en pelo son varios órdenes de magnitud superiores a los niveles hallados en sangre y orina (Gammelgaard y Veien, 1990). Así, los niveles medios de Ni en pelo fueron 6 veces superiores a los detectados en sangre total, lo cual apoya la hipótesis anterior. Sin embargo, tales concentraciones son del mismo orden de magnitud que las obtenidas por la mayoría de los estudios previos (véanse las tablas 44 a 46) con la

excepción de Afridi y colaboradores (2006) en poblaciones no expuestas, en donde fueron aproximadamente 7 veces superiores a las presentadas aquí.

En lo que respecta al Pb, el promedio en pelo fue aproximadamente 3 veces superior a los niveles medios en sangre, lo que refleja claramente una tendencia a la acumulación. En el presente estudio, los niveles de Pb en sangre se correlacionaron con los de Pb en vello axilar. La concentración de Pb en vello axilar fue superior a la de estudios previos, aunque con un tamaño de muestra mayor. A su vez, nuestros valores fueron 9 veces inferiores a los descritos por Foo et al (1993) en una población trabajadora de similar tamaño muestral (tablas 44-46).

Hasta ahora no se ha estudiado en profundidad con fines de biomonitorización la correlación entre el contenido de metales en vello axilar y los hallados en otros materiales biológicos, como por ejemplo la sangre o la orina más comúnmente empleados en evaluaciones ocupacionales y medioambientales. Los metales que circulan por la sangre se incorporan a la queratina durante el corto periodo de formación del pelo, por lo que en teoría debería existir una correlación con los niveles en sangre (y quizás, con los depósitos corporales) durante la fase de formación del pelo (Leotsinidis y Kondakis, 1990). No obstante, para la mayoría de los metales estudiados los niveles en sangre reflejan una exposición reciente mientras que el contenido en pelo estaría ligado a exposiciones pasadas, lo cual reduce la probabilidad de cualquier correlación potencial significativa.

Por el contrario, los niveles de los metales pesados estudiados en orina reflejan una exposición muy reciente en todos los casos a excepción del Cd, metal que presenta una vida de eliminación muy lenta. Esta diferencia toxicocinética podría explicar la falta de correlación observada en la concentración de los metales estudiados entre el vello axilar y la orina o la sangre, a excepción del Cd.

No obstante, se hallaron correlaciones positivas significativas entre los niveles de Cd en vello axilar y en orina y saliva así como entre los niveles de Cr en orina y los de sangre y saliva (véanse las tablas 39 a 43). En vista de estas observaciones, cabe deducir que el vello axilar no parece constituir una matriz excesivamente útil para la biomonitorización de metales pesados. Foo y colaboradores (1993) observaron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los niveles de ciertos metales en cabello y sus concentraciones en sangre y orina. Por su parte, Freedman y colaboradores (1980) también hallaron una fuerte correlación positiva ($r=0,85$) entre la concentración de Pb en sangre con la del cabello.

La disminución de la exposición a metales pesados en los países occidentales pudiera ser en parte responsable de la gran dispersión de los datos hallados y que a su vez concuerdan con los recogidos en la literatura científica, dado que los niveles en orina indican exposición reciente (días o semanas) mientras que los de cabello representan exposición durante el mes anterior (Foo et al, 1993). En el caso de esos metales pesados en donde aparecen niveles medios más altos en sangre que en vello axilar (concretamente, 12 veces mayores en el caso del Cd y 6 veces mayores en el caso del Mn; ver tablas 20-24), indicativos de una menor incorporación al vello desde la sangre, los años de exposición laboral mostró una correlación inversa con los niveles presentes en el vello (ver tablas 39 a 43). Por el contrario, el nivel medio de Pb en vello axilar fue 3 veces superior al de sangre y, en este caso, los años de exposición laboral predecían niveles superiores de Pb en vello. Estos resultados sugieren que el vello axilar podría constituir un material biológico útil con fines de biomonitorización en el caso de aquellos metales pesados que se incorporan y acumulan en dicha matriz biológica a lo largo del tiempo, es decir, que poseen un claro efecto acumulativo, característica que en mayor o menor medida cumplen una gran mayoría de ellos.

El Mn fue el único metal pesado que no mostró ninguna correlación significativa en las cuatro muestras biológicas estudiadas una vez ajustado por varios factores de confusión (tabla 41). La falta de una correlación significativa entre el contenido de Mn en sangre y

vello pudiera deberse a la diferente y compleja cinética de incorporación de los metales al pelo, aspecto que aún no ha sido estudiado en profundidad (Wilhelm e Idel, 1996). Rodrigues y colaboradores (2008) tampoco hallaron ninguna correlación significativa entre los niveles de Mn en pelo y en sangre, encontrando únicamente una correlación estadísticamente significativa, aunque débil, entre los niveles de Pb en sangre y pelo ($r=0,22$, $p<0,001$).

Asimismo, el contenido de metales en pelo tiende a variar de una región geográfica a otra, dependiendo de las condiciones naturales del entorno, incluida la composición del suelo, la concentración de elementos en el agua y los hábitos alimenticios y dietéticos de la región (Bencko, 1995). Por este motivo, el presente estudio ha tenido en cuenta varios factores potenciales de confusión. Los niveles de Mn y Pb en sangre aumentaron significativamente en sujetos que vivían en zonas urbanas. No obstante, los trabajadores no realizaban la misma tarea todos los días, sino que la mayoría variaba sus funciones dos o tres veces a la semana o incluso dentro del mismo turno, siendo a veces dicho trabajo, al aire libre, lo que influye directamente en la impregnación de dichos xenobióticos.

El contenido de metales en vello axilar también varía según el sexo y la edad (Leung et al, 1997). Hemos comprobado que las mujeres presentaban niveles más altos de Cr en vello pero más bajos de Mn que los hombres después de controlar distintos factores de confusión (tablas 40 y 41). Del mismo modo, Moon y colaboradores (1986) y Leotsinidis y colaboradores (1990) también observaron que el sexo era una variable que afecta al contenido de elementos traza en el cabello humano, por lo que las mujeres mostraban niveles más altos de Ni y Mn que los hombres. Wolfspurger et al (1994) también encontraron una concentración más elevada de Cd, Pb y Ni en pelo de mujeres, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el caso del Cd y del Pb. Por el contrario, Chlopicka et al (1998) observaron que el pelo y la sangre de los niños acumulaban más Pb y Cd que el de las niñas. No obstante, el motivo exacto de esta diferencia parece poco claro, si bien es posible que las diferencias metabólicas pudieran jugar un papel digno de consideración (Schrestha y Schrauzer, 1989).

El estado nutricional también puede afectar al contenido de metales en pelo (Foo et al, 1993). El presente estudio detectó asociaciones significativas entre la ingesta de ciertos alimentos enlatados y los niveles de Cr en orina y en saliva y de Pb en saliva, así como entre la ingesta de cerdo y Cd en saliva, Cr en sangre y Pb en orina. La ingesta de huevos se asoció a niveles más altos de Cr y Mn en saliva y la de pollo a niveles más altos de Mn en sangre (ver tablas 39 a 43). En cualquier caso, muchas de estas asociaciones son difíciles de explicar.

El pelo ha sido considerado un indicador fiable en sujetos con mayor exposición ambiental a Cd y en fumadores activos (Schamberger, 2002). Los fumadores absorben 1-2 μg de Cd por cada paquete de cigarrillos, aproximadamente el doble de la exposición media de un individuo considerado como no fumador. En el presente estudio, el hábito tabáquico sólo se asoció a niveles más elevados de Cd en sangre, pero no afectó al contenido de Cd y Pb en vello axilar, lo cual concuerda con otros estudios previos (Moon et al, 1986; Wilhelm et al, 1996).

El otro material biológico en el que centramos nuestra atención, por su hipotética relevancia y novedad, fue la saliva. Debido a que este fluido permite una técnica de muestreo directa y no invasiva, la saliva podría servir como matriz biológica ideal alternativa o complementaria a las muestras de sangre u orina en la biomonitorización de sustancias tóxicas a gran escala en la población general (Wang et al, 2008) y en particular en la población trabajadora.

En la saliva se han detectado un cierto número de metales y elementos traza (Zn, Pb, Fe, Mo, Cu, Al, Mn, Sr, Ba, K, Mg y, sobre todo, Ni y Cr). Un aspecto interesante es que los metales no se transmiten de modo pasivo desde las glándulas a la saliva, sino que más bien lo hacen mediante un proceso de secreción activa, lo cual pudiera explicar la falta de correlación observada entre los niveles de metales en la sangre y la saliva, excepción hecha del Pb en el que se detectó una asociación negativa. Por el contrario, se detectaron

correlaciones positivas y significativas entre el pelo y la saliva en el caso del Cd, Cr y Ni (tablas 39-43).

La mayoría de los estudios que recogen niveles de metales en saliva han detectado valores muy bajos, si bien muchos de ellos estaban basados en estimaciones sobre un número muy reducido de muestras (Duggal et al, 1991). Por el contrario, nuestra población de estudio fue lo suficientemente grande (178 adultos) como para obtener una estimación razonable de niveles de metales en saliva. Los niveles medios de todos los metales estudiados fueron inferiores a los encontrados en sangre, salvo en el caso del Ni, donde la concentración media fue 14 veces más alta (tablas 20-24).

En las tablas 47 y 48 se comparan nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios realizados también en saliva. Una de las razones de la escasez de estudios en esta matriz podría estar relacionada con el hecho de que la saliva es fisiológica y bioquímicamente un fluido heterogéneo cuya composición refleja la de fluidos extracelulares típicos (Wang et al, 2008). La saliva total (mezclada), tal y como se ha empleado en este estudio, salva algunos de los problemas ocasionados por la variabilidad de su composición, dependiendo de la glándula de la que proceda. Además, la saliva completa o total también tiene la ventaja de que refleja eventos biológicos que tienen lugar en la boca durante gran parte del día (Duggal et al, 1991). No obstante, hay que tener en cuenta que la composición de la saliva completa varía de un individuo a otro y dentro del mismo individuo, e incluso a lo largo del día. Las propiedades físicas, cantidad y composición de la saliva acusan los efectos de factores como la dieta, la hora del día y la condición física, y todos estos factores pueden explicar la variabilidad en la composición salivar (Kocadereli et al, 2000). Estas fluctuaciones, combinadas con la composición iónica de la saliva, también pueden afectar al comportamiento de elementos traza en la boca.

Tabla 47. Niveles de metales en saliva observados en el presente estudio y los encontrados en la literatura científica especializada entre 1990-2000.

Referencia - Muestra biológica	n	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb	Notes
Memoria Tesis Doctoral - Saliva (µg/l)	144-178	0.06	0.64	3.68	1.72	0.42	Trabajadores (medias)
<i>Gjerdet et al (1991)</i> - Saliva (µg/l)	34				8.2 (0-200)		No expuestos
<i>Burguera et al (1998)</i> - Saliva (µg/l)	30				0.5-2.0		No expuestos
<i>Kocadereli et al (2000)</i> - Saliva (µg/ml)	45		2.2 ± 1.3		1.16 ± 0.28		No expuestos
<i>Catalanatto et al (2000)</i> - Saliva (µg/l)	32				2.0 ± 1.1		No expuestos

Tabla 48. Niveles de metales en saliva observados en el presente estudio y los encontrados en la literatura científica especializada entre 2001-2011.

Referencia - Muestra biológica	n	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb	Notas
Memoria Tesis Doctoral - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	144-178	0.06	0.64	3.68	1.72	0.42	Trabajadores (medias)
<i>Menegário et al (2001)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)		0.5 - 1.1				0.8-18.8	
<i>Agaoglu et al (2001)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	100		0.76 ± 1.43		4.45 ± 2.87		Noexpuestos
<i>Eliades et al (2003)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	17		20 ± 11		18 ± 11		No expuestos
<i>Barbosa Jr et al (2006)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	88					0.05- 4.40 0.05- 3.90	Hombres Mujeres Vivienda próxima a zonas contaminadas
<i>Wang et al (2008)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	33 49	0.43 ± 0.43 0.36 ± 0.24		3.04 ± 1.40 4.45 ± 2.17		25.5 ± 14.4 24.9 ± 11.8	No expuestos Soldadores

<i>Costa de Almeida et al (2009)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	247					0.09 - 9.10	Niños Área no contaminada
	26					0.91- 36.19	Área contaminada
<i>Talio et al (2010)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	7	0.45- 28.32					Fumadores
<i>Costa de Almeida et al (2010)</i> - Saliva ($\mu\text{g/l}$)	444					0.10.17.2	Niños

Sin lugar a dudas, el Ni y el Cr son probablemente los compuestos metálicos más ampliamente estudiados en la saliva, existiendo una amplia variabilidad en los valores encontrados. Las concentraciones medias oscilan entre 1 y 61 $\mu\text{g l}^{-1}$ y 1 y 55 $\mu\text{g l}^{-1}$ en el caso del Cr y Ni, respectivamente (Berme et al, 1982; Gjerdet et al, 1991; Kerosuo et al, 1997). Los resultados del presente estudio se encuentran dentro de dichos rangos, si bien se acercan más a los descritos por Agaoglu y colaboradores (2001) para Cr y por Burguera y colaboradores (1998) para Ni en poblaciones no expuestas.

En pacientes de ortodoncia se han detectado grandes variaciones en el contenido de Ni en saliva (Kerosuo et al, 1997; Kocadereli et al, 2000), aunque la influencia de aparatos de ortodoncia, en su mayor parte metálicos, sobre los niveles de ciertos metales en saliva (especialmente Cr y Ni) sigue siendo poco clarificadora (Fors y Persson, 2006). No obstante, en nuestro estudio la presencia de dichos aparatos fue un criterio de exclusión, por lo que cabe descartar cualquier interferencia potencial.

La concentración de Ni en saliva también puede verse influenciada por la dieta, especialmente cuando las principales fuentes alimenticias son verduras, granos y cereales (Kocadereli et al, 2000), si bien en nuestro estudio no se ha encontrado ninguna relación con los elementos alimenticios de la dieta (véase la tabla 42).

En lo que respecta a la presencia de otros metales en la saliva, en el presente estudio se han observado niveles relativamente más bajos de Cd y Pb que los encontrados por Menegario y colaboradores (2001); sin embargo, la concentración de Mn estaba en consonancia con la de trabajos previos (Wang et al, 2008). Resulta interesante, por la lógica que ello implica, que cuanto mayor sea la experiencia laboral en entornos industriales, más elevadas son las concentraciones de Mn y Ni en saliva (véanse las tablas 41 y 42). Este hallazgo es consistente con la mayor concentración de Mn en saliva detectada en los soldadores con 5-10 años de permanencia en el puesto de trabajo, en comparación con los que llevaban menos de 5 años (Wang et al, 2008).

En resumen, el conjunto de todos estos datos indica que es posible utilizar muestras de vello axilar y saliva como complemento y/o alternativa a las muestras de sangre u orina, sobre todo en la biomonitorización de Pb y Mn en pelo y de Ni en saliva en sujetos con exposición ocupacional a dichos compuestos metálicos. Dadas las reducidas cantidades de Cd incorporado al pelo, su determinación en vello axilar resulta menos útil. No obstante, sería pertinente seguir investigando para verificar si estas matrices ofrecen o no ventajas definitivas con respecto a los fluidos biológicos tradicionales, como son la sangre y la orina.

V. CONCLUSIONES

Primera. Se han validado satisfactoriamente métodos de análisis para la determinación de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en sangre total, orina, saliva y vello axilar mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) con horno de grafito incluyendo todos los parámetros recomendados por las Directivas Europeas así como por la norma ISO/IEC 17025:2005 que son: límite de detección y cuantificación, rango de linealidad, precisión (mínima, intermedia y reproducibilidad), exactitud, recuperación (en el caso de la saliva), masa característica e incertidumbre.

Segunda. Se han determinado los niveles de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo en sangre total, orina, saliva y vello axilar de trabajadores del sector siderometalúrgico. El análisis descriptivo de las muestras novedosas (vello axilar y saliva) ha mostrado unas medianas para Cd, Cr, Mn, Ni y Pb de 0.01, 0.99, 1.19, 0.71 y 7.22 µg/g respectivamente en vello axilar y de 0.06, 0.64, 3.68, 1.72 y 0.42 µg/l respectivamente, en saliva.

Tercera. Se han comparado los niveles de cadmio, cromo, manganeso, níquel y plomo con sus respectivos valores de referencia en sangre y orina, hallándose siempre por debajo de los mismos. Con respecto a las muestras alternativas (vello axilar y saliva), la comparación se ha llevado a cabo con los datos existentes en la literatura científica, mostrando en líneas generales, valores del mismo orden o incluso inferiores.

Cuarta. De acuerdo con el nivel de impregnación detectado, se concluye que existe un adecuado cumplimiento de las normas de prevención y de las condiciones higiénicas en los lugares de trabajo.

Quinta. El análisis estadístico de los datos indica que es posible utilizar muestras de vello axilar y saliva como complemento y/o alternativa a las muestras de sangre u orina, sobre todo en la biomonitorización de Pb y Mn en vello y de Ni en saliva en sujetos con exposición ocupacional a dichos compuestos metálicos. Dadas las reducidas cantidades de Cd incorporado al vello axilar, su determinación en esta matriz resulta menos útil.

Sexta. En cuanto a la asociación de los niveles de elementos metálicos estudiados con los estilos de vida y otros posibles factores de confusión, el análisis multivariante ha

encontrado asociaciones positivas en los siguientes casos: Cd en orina con el Cd en vello axilar y la edad y Cd en sangre con el hábito tabáquico. Los niveles de Cr en sangre se asociaron con los de orina y con la antigüedad en el puesto de trabajo. El Cr en orina se asoció con el Cr en sangre y en saliva, influenciándose además por el consumo de conservas. Se observó igualmente asociación entre los niveles de Cr en vello axilar y saliva. Por su parte, el Mn en sangre se asoció con la residencia en el centro de las ciudades. Los niveles de Ni en sangre y orina se correlacionaron entre sí así como los de Ni en saliva y vello axilar. El Ni en saliva mostró asociación con el hábito alcohólico y la antigüedad en el puesto de trabajo. Finalmente se observó asociación entre los niveles de Pb en sangre y los de orina y vello axilar así como entre los niveles de Pb en orina y vello axilar con el hábito alcohólico.

VI. BIBLIOGRAFÍA

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienist): TLV's Threshold Limit Values and Biological Exposure Index, 2003.

Afridi HI, Kazi TG, Jamali MK, Kazi GH, Arain MB, Jalbani N, Shar GQ, Sarfaraz RA. Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Toxicol Ind Health* 2006; 22: 381-393.

Agaoglu G, Arun T, Izgü B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2001; 375-379.

Akesson A, Berglund M, Schütz A, Bjellerup P, Bremme K, Vahter M. Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *Am J Public Health* 2002; 92(2): 284-287.

Almendro JME, Ojeda CB y De Torres AG. Determination of cadmium in biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after extraction with 1,5-Bis(di-2-pyridylmethylene) thiocarbonohydrazide. *Anal* 1992; 117:1749-1751.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for chromium. 1998. US Public Health Service, US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

Bader M, Dietz MC, Ihrig A, Triebig G. Biomonitoring of manganese in blood, urine and axillary hair following low-dose exposure during the manufacture of dry cell batteries. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 521-527.

Barbosa Jr F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations and future needs. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1669-74.

Barceloux DG. Chromium. *Clin Toxicol* 1999; 37: 173-194.

Bartual Sánchez J, Cuenca Sánchez de Castro C, Eransus Izquierdo FJ, García-Gutiérrez Muñoz M. Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2001-2002. Valencia: Generalitat Valenciana, Conselleria D'Economia Hisenda i Ocupació, 2001.

- Baruthio F, Guillard O, Arnaud J, Pierre F, Zawislak R. Determination of manganese in biological materials by electrothermal atomic absorption spectrometry: a review. *Clin Chem* 1988; 34: 227-234.
- Benedetti JL, Dewailly E, Turcotte F, Lefebvre M. Unusually high blood cadmium associated with cigarette smoking among three subgroups of the general population, Quebec, Canada. *Sci Total Environ*. 1994; 152 (2):161-7.
- Bérglund M, Lind B, Lannerö E, Vahter M. A pilot study of lead and cadmium exposure in young children in Stockholm, Sweden: methodological considerations using capillary blood microsampling. *Arch Environ Contam Toxicol* 1994; 27(2):281-287.
- Berne M, Gjerdet NR, Erichsen ES. Corrosion of silver soldered orthodontic wires. *Acta Odontol Scand* 1982; 40:75-79.
- Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A, Moreda-Piñeiro J, Bermejo-Barrera A. Determination of aluminium and manganese in human scalp hair by electrothermal atomic absorption spectrometry using slurry sampling. *Talanta* 1998; 45: 1147-1154.
- Bermejo-Barrera P, Muñiz-Naveiro O, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A. Experimental designs in the optimisation of ultrasonic bath-acid-leaching procedures for the determination of trace elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry. *Forensic Sci Int* 2000; 107(1-3): 105-120.
- Bernal Domínguez F, Castejón Vilella E, Cavallé Oller N y Hernández Calleja A. *Higiene Industrial*. Madrid: INSHT, 2002, 175-221.
- Bencko V. Use of human hair as a biomarker in the assessment of exposure to pollutants in occupational and environmental settings. *Toxicology* 1995; 101: 29-39.
- Billings CG, Howard P. Occupational siderosis and welders' lung. A review. *Arc Chest Dis* 1993; 48: 304.
- Blanc PD, Boushey HA, Wong H, Wintermeyer SF, Bernstein MS. Cytokines in metal fume fever. *Am Rev Resp Dis* 1993; 147-134.

- Burguera E, Sánchez de Briceño A, Rondon CE, Burguera JL, Burguera M, Carrero P. Determination of nickel in saliva by electrothermal atomic absorption spectrometry using various chemical modifiers with Zeeman-effect background correction. *J Trace Elem Med Biol* 1998; 12: 115-120.
- Bruhn CG, Neira JY, Valenzuela GD, Nóbrega JA. Determination of cadmium in hair and blood by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry with chemical modifiers *Talanta* 1999; 48(3):537-549.
- Catalanatto FA, Sunderman FW. Nickel concentration in human parotid saliva. *Ann Clin Lab Sci* 1977; 7: 146- 151.
- Chang PP y Robinson JW. Development of thermospray interfaced HPLC-FAAS system for studies on cadmium speciation in human body fluid. *Spectrosc Lett* 1993; 26(10): 2017-2035.
- Chatt A, Secord CA, Tiefenbach B, Jervis RE. Scalp hair as a monitor of community exposure to environmental pollutants, 1980. In: Brown AC, Crouse RG (eds) *Hair trace elements, and human illness*. Praeger, New York, 46-73.
- Chłopicka J, Zachwieja Z, Zagrodzki P, Frydrych J, Słota P, Krośniak M. Lead and cadmium in the hair and blood of children from a highly industrial area in Poland. *Biol Trace Elem Res* 1998; 62:229-34.
- Cordero MTS, de Torres AG y Pavón JMC Solvent extraction of cadmium as a previous step for its determination in biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal Lett* 1994; 27(9):1689-1701.
- Crespón-Romero RM, Yebra-Biurrun MC. Flow injection determination of lead and cadmium in hair samples from workers exposed to welding fumes. *Anal Chim Acta* 2007; 600: 221-225.
- Desoille H, Marti-Mercadal JA, Scherrer J, Truhaut R. *Medicina del Trabajo*. Masson SA. Barcelona, 1986. 883 páginas.

Dennis JH, Mortazavi SB, French MJ, Hewitt PJ, Redding CR. The effects of welding parameters on ultra-violet light emissions, ozone and CrVI formation in MIG welding. *Ann Occup Hyg* 1997; 41(1): 95-104.

Dietrich CF. *Uncertainty, Calibration and Probability. The statistic of Scientific and Industrial Measurement*, 2nd Ed. Adam Hielger, Bristol, 1991.

D'Illio S, Petrucci F, D'Amato M, Di Gregorio M, Senofonte O, Violante N. Method validation for determination of arsenic, cadmium, chromium and lead in milk by means of dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2008; 624(1): 59-67.

Druyan ME, Bass D, Puchyr R, Urek K, Quig D, Harmon E, Marquardt W. Determination of reference ranges for elements in human scalp hair. *Biol Trace Elem Res* 1998; 62: 183-197.

Dube P. Determination of chromium in human urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction. *Analyst* 1988; 113(6): 917-921.

Duggal MS, Chawla HS, Curzon MEJ. A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. *Archs Oral Biol* 1991; 881-884.

Eliades T, Trapalis C, Eliades G, Katsavrias E. Salivary metal levels of orthodontic patients: a novel methodological and analytical approach. *Eur J Ortho* 2003; 25: 103-106.

Elinder CG, Kjellstrom T and Lind B. Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ Res* 1983; 32: 220-227.

EURACHEM. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, EURACHEM Secretariat, Teddington, 1995.

Falagán Rojo MJ. *Higiene Industrial aplicada ampliada*. Oviedo: Fundación Luis Fernández Velasco, 2005, 1-1336.

Foo SC, Khoo NY, Heng A, Chua LH, Chia SE, Ong CN, Ngim CH, Jeyaratnam J. Metals in hair as biological indices for exposure. *Arch Occup Environ Health* 1993; 65:S83-S86.

- Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. *Eur J Orthod* 2006; 292-297.
- Freedman ML, Cunningham PM, Schindler JE, Zimmerman MJ. Effect of lead speciation on Toxicity. *Bull Environ Contamin Toxicol* 1980; 25: 389-393.
- Fuentes F, García J, Gavilán J, Gavilán-Guirao J, Gil F, Hernández AF, Jiménez J, Pérez P, Pla A, Ramos J. Técnico Superior en prevención de riesgos laborales. 6 tomos Temario común I, II y III, Higiene Industrial, Seguridad en el Trabajo y Ergonomía y Psicología aplicada. Aula consultora y Formación. 1999. Págs. 1-1096.
- Fukui Y, Miki M, Ukai H, Okamoto S, Takada S, Higashikawa K, Ikeda M. Urinary lead as a possible surrogate of blood lead among workers occupationally exposed to lead. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72(8): 516-20.
- Gao M, Levy LS, Faux SP, Aw TC, Braithwaite RA, Brown SS. Use of molecular epidemiological techniques in a pilot study on workers exposed to chromium. *Occup Environ Med* 1994; 51(10): 663-668.
- Gammelgaard B, Veien NK. Nickel in nails, hair and plasma from nickel-hypersensitive women. *Acta Derm Venereol* 1990; 70: 417-420.
- Gervais L, Lacasse Y, Brodeur J, P'an A. Presence of cadmium in the saliva of adult male workers. *Toxicol Lett*. 1981; 8(1-2):63-66.
- Gjerdet NR, Erishen ES, Remlo HE, Evjen G. Nickel and iron in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *Acta Odontol Scand* 1991; 49: 73-78.
- Gil F, Pla A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. (Review Article) *J Appl Toxicol* 2001; 21:245-55.
- Gil F y Gisbert JA. Intoxicación por otros metales. En: Gisbert-Calabuig. *Medicina Legal y Toxicología*, Villanueva-Cañadas E, ed. Masson, Barcelona, 2004 (6ªed), 964-980.
- Gil F, Hernández AF. Significance of biochemical markers in applied toxicology. pp. 847-858. In: *General and Applied Toxicology*, Ballantyne B, Marrs TC and Syversen T, editors. Volume 2 (2009), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.

- Gil F, Hernández AF, Pla A. Toxicología de los alimentos. Capítulo 2.26 (Tomo II). En: Tratado de Nutrición. 2ª ed. A. Gil (editor). Panamericana, Madrid. 2010, 697-724.
- Gil F, Rodrigo L. Contaminantes químicos. Conceptos básicos en Toxicología Industrial. Criterios de toxicidad. Protección individual frente a contaminantes químicos. Capítulo 24. En: Tratado de Medicina del trabajo. 2ª ed. Volumen 1. F. Gil (editor). Elsevier, Barcelona. 2012, 333-350.
- Gil F. Toxicología Industrial (III). Toxicidad de los metales pesados. Capítulo 48. En: Tratado de Medicina del trabajo. 2ª ed. Volumen 2. F. Gil (editor). Elsevier, Barcelona. 2012a, 767-783.
- Gil F. Biomonitorización en el medio laboral. Capítulo 55. En: Tratado de Medicina del trabajo. 2ª ed. Volumen 2. F. Gil (editor). Elsevier, Barcelona. 2012b, 875-886.
- Gómez J, García A, García L. Las principales fuentes nutritivas en la Comunidad Andaluza. En: Perspectivas de la alimentación actual. Servicio Andaluz de Salud, Pozoblanco, 1991.
- Gómez J, Montellano MA, García L. Manual de fotografías para encuestas de alimentación. Escuela de Nutrición, Universidad de Granada, 1992.
- Goullé J-P, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix C. Metal and metalloid multielementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urina and hair Reference values. Forensic Sci Int 2005; 153: 39-44.
- Goyer RA. Toxic effects of metals. En: Klaasen CD ed. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw Hill, 1996, 691-736.
- Hernández A. Del case report a la evidencia epidemiológica de causalidad en investigación biomédica. Arbor 2002, 675: 589-608.
- Hirata M, Yoshida T, Miyajima K, Kosaka H, Tabuchi T. Correlation between lead in plasma and other indicators of lead exposure among lead-exposed workers. Int Arch Occup Environ Health 1995; 68(1): 58-63.

- Horng CJ, Tsai JL, Horng PH, Lin SC, Lin SR, Tzeng CC. Determination of urinary lead, cadmium and nickel in steel production workers. *Talanta* 2002; 56(6): 1109-1115.
- Husain M, Khaliguzzaman M, Abdullah M, Ahmed I, Khan A. Trace element concentration in hair of the Bangladeshi population. *Int J Appl Radiat Iso* 1980; 31:527-533.
- ISO. Guide to the expresión of Uncertainty in Measurement, ISO, Genova, 1993.
- ISO/IEC 17025. Requisitos generales relativos a las competencias de los laboratorios de ensayo y calibración. AENOR, Madrid, 2005.
- Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure-a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24:1-51.
- Järup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238(3): 201-208. Review.
- Kerosuo H, Moe G, Hensten-Pettersen A. Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. *Orthod Dentofac Orthop* 1997; 111: 595-598.
- Kippler M, Ekström EC, Lönnerdal B, Goessler W, Akesson A, El Arifeen S, Persson LA, Vahter M. Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 222(2): 221-6.
- Kristiansen J, Molin Christensen J, Iversen BS, Sabbioni E. Toxic trace element reference levels in blood and urine: influence of gender and lifestyle factors. *Sci Total Environ* 1997; 204:147-160.
- Kocadereli I, Ataç A, Kale S Özer D. Salivary nickel and chromium in patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2000; 70: 431-434.
- Kono K, Yoshida Y, Watanabe M, Watanabe H, Inoue S, Murao M, Doi K. Elemental analysis of hair among hydrofluoric acid exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 85-88.

Kucera J, Bencko V, Pápayová A, Saligova D, Tejral J, Borska L. Monitoring of occupational exposure in manufacturing of stainless steel constructions. Part I: chromium, iron, manganese, molybdenum, nickel and vanadium in the workplace air of stainless steel welders. *Cent Eur J Publ Health* 2001; 9: 171-175.

Kummrow F, Silva FF, Kuno R, Souza AL, Oliveira PV. Biomonitoring method for the simultaneous determination of cadmium and lead in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry for assessment of environmental exposure. *Talanta* 2008; 75(1): 246-252.

LaBar C y Lamberts L. Determination of metals in animal tissue by potentiometric stripping analysis without chemical destruction of organic matter. *Electrochim Acta* 1994; 39(3):317-325.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep* 2000; 115(6): 521-529.

Lauwerys RR and Hoet P. *Industrial Chemical Exposure. Guidelines for biological monitoring*, Lewis Publishers, 2nd ed, 1993, 318 pp.

Lauwerys RR. *Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales*. Barcelona: Masson S.A., 1994.

Lelis KL, Magalhães CG, Rocha CA, Silva JB. Direct determination of Cr and Cu in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using ruthenium as permanent modifier (R1). *Anal Bioanal Chem*. 2002; 374(7-8): 1301-1305.

Leotsinidis M, Kondakis X. Trace metals in scalp hair of Greek Agricultural workers. *Sci Tot Environ* 1990; 95: 149-156.

Leung PL, Huang HM. Analysis of trace elements in the hair of volunteers suffering from Naso-Pharyngeal Cancer. *Biol Trace Elem Res* 1997; 57: 19-25.

Lewis R. Metales. Peligros para la soldadura. Capítulo 27. En: *Medicina Laboral y Ambiental*, 2^a ed. J LaDou (editor). Manual Moderno, México. 1999, 479-481.

- Luse I, Bake MA, Bergmanis G, Podniece Z. Risk assessment of manganese. *Cent Eur J Public Health* 2000; 8: 51.
- Martín Andrés A y Luna del Castillo JD. *Bioestadística para las ciencias de la salud*, 4ª ed. Norma, Madrid, 1993.
- Mataix J, Gil F. *Toxicología Alimentaria*. Capítulo 25. En: *Nutrición y alimentación humana*, 2 volúmenes, 2ª ed. J. Mataix (editor). Ergon, Madrid. 2009, 627-652.
- Menegário AA, Packer AP, Giné MF. Determination of Ba, Cu, Pb and Zn in saliva by isotope dilution direct injection inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 2001; 126: 1363-1366.
- Moon J, Smith TJ, Tamaro S, Enarson D, Fadl S, Davison AJ, Weldon L. Trace metals in scalp hair of children and adults in three Alberta Indian Villages. *Sci Tot Environ* 1986; 54: 107-125.
- Moon CS, Zhang ZW, Shimbo S, Watanabe T, Lee CU, Ahn KD, Lee SH, Ikeda M. Evaluation of urinary cadmium and lead as markers of background exposure of middle-aged women in Korea: dietary intake as an influential factor. *Toxicol Lett* 1999; 108: 173-178.
- Moreda-Piñeiro J, Alonso-Rodríguez E, López Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P. Determination of major and trace elements in human scalp hair by pressurized-liquid extraction with acetic acid and inductively coupled plasma-optical-emission spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388: 441-449.
- Moreira MF, Curtius AJ y de Campos RC. Determination of cadmium in whole blood and urine electrothermal atomic absorption spectrometry using palladium-based modifiers and in situ decontamination. *Analyst* 1995; 120(3): 947-950.
- Moreiras O y Cuadrado C. Ingesta de contaminantes (metales pesados) vía dieta total del Conjunto Nacional y Comunidades Autónomas: nuevo enfoque. *Rev Clin Esp* 1993; 193: 76-81.

Olmedo P, Pla A, Hernández A.F., López-Guarnido O, Rodrigo L, Gil F. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 2010; 659:60-67.

Omokhodiom FO, Cockford GW. Lead in sweat and its relationship to salivary and urinary levels in normal health subjects. *Sci Total Environ* 1991; 103: 113–22.

Ostapczuk P. Present potentials and limitations in the determination of trace elements by potentiometric stripping analysis. *Anal Chim Acta* 1993; 273:35-40.

Ozdemir O. Numanoglu N, Gönüllü, Savas I, Alper D, Gürses H. Chronic effects of welding exposure on pulmonary function test and respiratory symptoms. *Occup Environ Med* 1995; 52 (12): 800.

Paschal DC, Ting BG, Morrow JC, Pirkle JL, Jackson RJ, Sampson EJ, Miller DT, Caldwell KL. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. *Environmental Research, Section A* 1998; 76: 53-59.

Petersen R, Thomsen JF, Jorgensen NK, Mikkelsen S. Half life of chromium in serum and urine in a former plasma cutter of stainless steel. *Occup Environ Med* 2000; 57:140-142.

Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. BOE nº 104, de 1 de mayo.

Real Decreto 1299/2006, de 10 de noviembre, por el que se aprueba el cuadro de enfermedades profesionales en el sistema de la Seguridad Social y se establecen criterios para su notificación y registro. BOE nº 302, de 19 de diciembre.

Renshaw GD. The distribution of trace elements in human hair and its possible effect on reported elemental concentration levels. *Med Sci Law* 1976;16 (1): 37-39.

- Rodrigues JL, Batista BL, Nunes JA, Passos CJS, Barbosa Jr F. Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. *Sci Total Environ* 2008; 405: 370-376.
- Rojas JM. El soldador y los humos de soldadura. OSALAN, Instituto Vasco de Seguridad y Salud laboral. Departamento de empleo y asuntos sociales. 2009.
- Sakai T. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health* 2000; 38(2):127-42. Review.
- Saner G, Yüzbaşıyan V, Cigdem S. Hair chromium concentration and chromium excretion in tannery workers. *Br J Ind Med* 1984; 41(2): 263-266.
- Satcher DS. The Surgeon General on the continuing tragedy of childhood lead poisoning. *Public Health Rep* 2000; 115 (6): 579-580.
- Schamberger RJ. Validity of hair mineral testing. *Biol Trace Elem Res* 2002; 87: 1- 28.
- Schamberger RJ. Calcium, magnesium, and other elements in the red blood cells and hair of normal and patients with premenstrual syndrome. *Biol Trace Elem Res* 2003; 94: 123-129.
- Schuhmacher M, Domingo JL, Agramunt MC, Bocio A, Müller L. Biological monitoring of metals and organic substances in hazardous-waste incineration workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75: 500-506.
- Shrestha K, Schrauzer GN. Trace elements in hair: a study of residents in Darjeeling (India) and San Diego, California (USA). *Sci Tot Environ* 1989; 79: 171-177.
- Silbergeld EK. New approaches to monitoring environmental neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 20; 694: 62-71.
- Silbergeld EK, Davis DL. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem* 1994; 40 (7): 1363-1367.
- Sjögren B, Hansen KS, Kjuus H, Persson PG. Exposure to stainless steel welding fumes and lung cancer: a meta-analysis. *Occup Environ Med* 1994; 51:535.

- Stroh A. Determination of Pb and Cd in whole blood using isotope dilution ICP-MS. *Atom Spectrosc* 1993; 14(5):141-143.
- Strübel G, Rzepka-Glinder V. Determination of chromium in saliva. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27(4): 243-244.
- Sukumar A, Subramaniam R. Trace elements in scalp hair of manufacturers of fireworks from Sivakasi, Tamil Nadu. *Sci Tot Environ* 1992; 114: 161-168.
- Stauber JL, Florence TM, Webster WS. The use of scalp hair to monitor manganese in aborigines from Groote Eylandt. *Neurotoxicology*. 1987; 8(3): 431-435.
- Stauber JL, Florence TM. Manganese in scalp hair: problems of exogenous manganese and implications fro manganese monitoring in Groote Eylandt aborigines. *Sci Total Environ* 1989; 83:85-98.
- Svartengren M, Elinder CG, Friberg L, Lind B. Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res* 1986; 39(1): 1-7.
- Tandon L, Ni BF y Ding XX. RNAA for arsenic, cadmium, copper, and molybdenum in CNS tissues from subjects with age related neurodegenerative disease. *J Radionanal Nuclear Chem* 1994; 179(2): 331-339.
- Tielemans E, Heederik D, Burdorf A, Vermeulen R, Veulemans H, Kromhout H, Hartog K. Assessment of occupational exposures in a general population: comparison of different methods. *Occup Environ Med* 1999; 56: 145-151.
- Tola S, Kilpiö J, Virtamo M, Haapa K. Urinary chromium as an indicator of the exposure of welders to chromium. *Scand J Work Environ Health* 1977; 3(4):192-202.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025, 2005.
- Vahter M, Akesson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ Res*. 2007; 104(1): 85-95. Review.
- Van Sittert NJ, Ribbens PH, Huisman B, Lugtenburg D. A nine year follow up study of renal effects in workers exposed to cadmium in a zinc ore refinery. *Br J Ind Med*. 1993 50 (7): 603-12.

- Vilar-Fariñas M, Barciela J, García-Martín S, Peña R, Herrero C. Direct determination of cadmium in Orujo spirit samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: comparative study of different chemical modifiers. *Anal Chim Acta* 2007; 591(2): 231-238.
- Villanueva Cañadas E. Plomo. En: Villanueva Cañadas E, editor. 6ª ed. Gisbert Calabuig Medicina Legal y Toxicología. Barcelona: Masson, S.A., 2004, 947-963.
- Viitak A, Volynsky AB. Simple procedure for the determination of Cd, Pb, As and Se in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using colloidal Pd modifier. *Talanta* 2006; 70(4): 890-895.
- Wang D, Du X, Zheng W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicol Lett* 2008; 176: 40-47.
- Welz B. The techniques of atomic absorption spectrometry. En: Welz B, ed. *Atomic Absorption Spectrometry*, Deerfield, Florida, VCH Publishers 1985, 165-250.
- WHO: IPCS environmental health criteria, lead. 1995. World Health Organization.
- WHO: IPCS environmental health criteria, chromium. 1998. World Health Organization.
- Wilhelm M, Idel H. Hair analysis in environmental medicine. *Zbl Hyg* 1996; 198: 485-501.
- Wolfsperger M, Hauser G, Göbler W, Schlagenhafen C. Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy: influence of sex and smoking habits. *Sci Total Environ* 1994; 156: 235-242.
- Zhang ZQ, Chen SZ y Lin HM. Simultaneous determination of copper, nickel, lead, cobalt and cadmium by adsorptive voltammetry. *Anal Chim Acta* 1993; 272: 227-232.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

Consentimiento informado

“ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y EFECTO EN POBLACIÓN LABORAL DEL SECTOR SOLDADURA y MECÁNICA”

El área de Toxicología integrada en el Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la Universidad de Granada en colaboración con ciertas empresas están realizando un estudio cuyo objetivo prioritario y fundamental es la validación de nuevas muestras (saliva y vello axilar) en la valoración de biomarcadores de exposición y efecto en trabajadores que emplean soldadura, etc... y que están expuestos a Cd, Cr, Mn, Ni y Pb y su comparación con fluidos clásicos (sangre y orina). Se estima que en este estudio participarán en torno a 200 trabajadores de sectores relacionados con dicha exposición (soldadores, etc...).

Usted ha sido elegido para colaborar en el estudio. Su participación será completamente **anónima y voluntaria, anonimato que se guardará en todo momento**. El equipo investigador se compromete a usar la información exclusivamente para el objeto del estudio y siempre de acuerdo a la legislación vigente.

Si decide participar, se le realizará una entrevista en la que se le preguntará por diversas variables que pueden influir sobre los niveles de metales y que incluyen de forma general la edad, el hábito tabáquico y el consumo de alcohol, la ingesta dietética su antigüedad en el puesto de trabajo y si usa equipos de protección individual –EPIs-. Además se le recogerá saliva y vello axilar junto a muestras de sangre y orina.

La información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y será codificada e informatizada de tal forma que **en ningún momento sea posible identificar directamente a los participantes en el estudio a partir de la información disponible**.

Su participación es totalmente voluntaria y se podrá retirar del estudio cuando lo desee, sin que esto repercuta negativamente sobre usted.

A Fernando Gil Hernández, Investigador principal del Proyecto, le podrá pedir toda la información que desee o necesite y contestará a sus dudas y preguntas bien por correo electrónico (fgil@ugr.es) o por teléfono (958-243546). Si Vd. acepta participar en el estudio le ruego firme el “Consentimiento por escrito” que se adjunta seguidamente:

Yo _____, declaro bajo mi responsabilidad que:

- he leído la hoja de información que se me ha facilitado
- he podido hacer preguntas sobre el estudio
- he recibido la suficiente información acerca del estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mi trabajo en modo alguno

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha: _____ Firma del Sujeto

Fecha: _____ Firma del Investigador Principal

¿Trabajó antes en otra empresa del sector del metal?

SI	NO	OTROS: [3]
[1]	[2]	Escribir Comentario:

¿Fuma?

NO	[0]
SI	[1]

Tabaco (número de cigarrillos/paquetes al día)

No fuma	< 5 cigarrillos	6-10 cigarrillos	11-15 cigarrillos	1 paquete	1,5 paquetes	2 paquetes
[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]

¿Bebe?

NO	[0]
SI	[1]

Alcohol (tipo de bebedor)

No bebedor	Bebedor ocasional	Bebedor moderado	Bebedor importante
[1]	[2]	[3]	[4]

Hábitos Nutricionales: (marque con una X lo que se ajuste más a su situación)

<i>Leche /día</i>	No consume	[1]
	1-2 vasos	[2]
	3-4 vasos	[3]

<i>Huevos:</i>	No consume	[1]	
	1-2 por semana	[2]	
	3-4 por semana	[3]	
<i>Azúcar:</i>	No consume	[1]	
	1-2 cucharadas /día	[2]	
	3-4 cucharadas /día	[3]	
<i>Pan / día</i>	No consume pan	[1]	
	Media barra /día	[2]	
	1 barra / día	[3]	
	2 barras / día	[4]	
<i>Carne:</i>	Pollo:	No consume	[1]
		1-2 veces por semana	[2]
		3-4 veces por semana	[3]
	Cerdo:	No consume	[1]
		1-2 veces por semana	[2]
		3-4 veces por semana	[3]
	Ternera:	No consume	[1]
		1-2 veces por semana	[2]
		3-4 veces por semana	[3]
<i>Pescado (Merluza / Pez espada/ Boquerones/ Sardinas/ Gambas/):</i>			
	No consume	[1]	
	1-2 veces por semana	[2]	
	3-4 veces por semana	[3]	
<i>Latas de conserva:</i>	Atún:	No consume	[1]
		1-2 veces por semana	[2]
		3-4 veces por semana	[3]

