

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales
Autor: Isabel Molina Villalba
ISBN: 978-81-9125-082-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40070>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, TOXICOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA
FÍSICA



**ANÁLISIS DE ARSÉNICO Y METALES PESADOS (CADMIO,
MANGANESO, MERCURIO Y PLOMO) EN ORINA Y
CABELLO DE POBLACIÓN INFANTIL RESIDENTE EN
HUELVA**

MEMORIA PRESENTADA POR

ISABEL MOLINA VILLALBA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

GRANADA, FEBRERO 2015

ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN, HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

I.1. JUSTIFICACIÓN

I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

II. INTRODUCCIÓN

II.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS Y METALOIDES EN LA POBLACIÓN INFANTIL

II.1.1. Ambiental

II.1.1.1. Aire

II.1.1.2. Suelo

II.1.1.3. Agua

II.1.1.4. Toxicocinética ambiental

II.1.1.4.a. Penetración de los contaminantes en el ecosistema

II.1.1.4.b. Dispersión y transporte de los contaminantes

II.1.1.4.c. Acumulación de los contaminantes en el medio y en los organismos

II.1.1.5. Transformaciones abióticas y bióticas

II.1.1.6. Biodisponibilidad

II.1.1.7. Toxicodinámica ambiental

II.1.2. Dieta

II.1.3. Industrial

II.2. PRINCIPALES EFECTOS TÓXICOS DEL ARSÉNICO, CADMIO, MANGANESO, MERCURIO Y PLOMO CON ESPECIAL ÉNFASIS EN LA POBLACIÓN INFANTIL

II.2.1. Arsénico (As)

II.2.2. Cadmio (Cd)

II.2.3. Manganeseo (Mn)

II.2.4. Mercurio (Hg)

II.2.5. Plomo (Pb)

II.3. LA BIOMONITORIZACIÓN EN TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

II.3.1. Indicadores biológicos o biomarcadores

II.4. LA ORINA Y EL CABELLO COMO MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES Y METALOIDES

II.5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS Y METALOIDES EN ORINA Y CABELLO

II.5.1. Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (Cd, Mn y Pb)

II.5.2. Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (As y Hg)

II.6. LA VALIDACIÓN ANALÍTICA EN LA ESTANDARIZACIÓN METODOLÓGICA

II.7. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO, CADMIO, MANGANESO, MERCURIO Y PLOMO EN ORINA Y CABELLO PROCEDENTE DE POBLACIÓN INFANTIL. ESTUDIOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

II.7.1. Introducción

II.7.2. Estudios nacionales e internacionales que evalúan la exposición a As, Cd, Mn, Hg y Pb en orina procedente de población infantil

II.7.2.1. Arsénico

II.7.2.2. Cadmio

II.7.2.3. Manganeso

II.7.2.4. Mercurio

II.7.2.5. Plomo

II.7.3. Estudios nacionales e internacionales que evalúan la exposición a As, Cd, Mn, Hg y Pb en cabello procedente de población infantil

II.7.3.1. Arsénico

II.7.3.2. Cadmio

II.7.3.3. Manganeso

II.7.3.4. Mercurio

II.7.3.5. Plomo

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. REACTIVOS

III.1.1. Determinación de arsénico (As) total

III.1.2. Determinación de mercurio (Hg) total

III.1.3. Resto de metales analizados: Cadmio (Cd), Manganeso (Mn) y Plomo (Pb)

III.1.3.a. Soluciones patrón

III.1.3.b. Diluyente

III.1.3.c. Modificadores de matriz

III.1.4. Digestión de las muestras

III.2. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

III.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

III.3.1. Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica

III.3.2. Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros

III.4. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS METÁLICOS EN CABELLO Y ORINA

III.4.1. Tratamiento previo de las muestras de cabello y orina

III.4.2. Metodología analítica para la determinación de arsénico por generación de hidruros (Fias-100)

III.4.3. Metodología analítica para la determinación de mercurio mediante generación de hidruros (MHS-10)

III.4.4. Metodología analítica para la determinación de metales por horno de grafito

III.4.4.1. Cadmio

III.4.4.2. Manganeso

III.4.4.3. Plomo

III.5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

III.6. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS, CHEQUEO DEL EQUIPO Y LIMPIEZA DE MATERIAL

III.6.1. Control de calidad de los ensayos

III.6.2. Chequeo del equipo

III.6.3. Materiales de referencia (CRMs)

III.6.4. Limpieza del material

III.7. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA EL MUESTREO

III.7.1. Diseño epidemiológico y población de estudio

III.7.2. Procedimiento de selección de la población de estudio

III.7.3. Muestreo y Tamaño muestral

III.7.4. Toma de muestras biológicas

III.7.5. Codificación

III.7.6. Transporte y almacenamiento

III.7.7. Obtención de información a través de cuestionario

III.7.7.a. Cuestionario autoaplicado

III.7.7.b. Cuestionario mediante entrevista telefónica

III.7.8. Medidas antropométricas

III.8. TRATAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS

III.8.1. Análisis estadístico de los datos

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. RESULTADOS

IV.2. DISCUSIÓN

IV.2.1. Concentraciones de metales en el cabello

IV.2.2. Concentraciones de metales en la orina

IV.2.3. Contribución de los distintos determinantes de la exposición

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el marco del proyecto de investigación financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía titulado “Exposición a metales pesados y arsénico y su asociación con el desarrollo neuroconductual y trastornos de la conducta en población infantil residente en Huelva” (Exp: PI0755/2010), cuya investigadora principal es la Dra. Marina Lacasaña Navarro.

Los resultados de esta investigación han sido publicados en la siguiente revista (se indica el impacto bibliométrico):

Molina-Villalba I, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Hernández AF, Gonzalez-Alzaga B, Aguilar-Garduño C, Gil F. Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. *Chemosphere*. 2014 Nov 27. pii: S0045-6535(14)01279-X. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.11.016.

Q1 (Factor de Impacto: 3.499) Campo de conocimiento: *Environmental Sciences*

I. JUSTIFICACIÓN, HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

I.1. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha aumentado considerablemente la preocupación por el riesgo para la salud que representa la exposición a metales pesados tales como el plomo, mercurio, cadmio y manganeso, y ciertos metaloides como el arsénico, ya que han demostrado tener efectos neurotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos, entre otros (Counter y Buchanan, 2004, Rodríguez-Barranco et al., 2013). La presencia de metales en el medio ambiente puede implicar un riesgo para la salud, especialmente en aquellos grupos de población más vulnerables entre los que se encuentran la población infantil, los ancianos y las gestantes (Licata et al., 2005). No obstante, para hablar de impregnación es necesario confirmar dichos elementos tóxicos en los fluidos y/o tejidos, cuantificándolos mediante el uso de biomarcadores; un ejemplo de ellos, lo constituyen los metales pesados, de gran relevancia por su carácter acumulativo en los órganos diana (Gil y Pla, 2001; Gil y Hernández, 2009; Hernández et al., 2014).

Actualmente, la exposición a bajas dosis de ciertos contaminantes en poblaciones no expuestas ocupacionalmente, especialmente mujeres y población infantil que residen en zonas industriales, constituye uno de los problemas más relevantes desde el punto de vista de la salud pública, ya que dicha exposición tiene lugar por vía respiratoria tras la inhalación de contaminantes procedentes de las inmisiones industriales, así como por vía digestiva a través del consumo de agua y alimentos contaminados (Counter y Buchanan, 2004).

La población infantil es especialmente susceptible a la exposición a tóxicos ambientales con respecto a los adultos, al poseer diferencias muy marcadas respecto de ellos. En primer lugar, los niños son más sensibles que los adultos a los efectos de dichos tóxicos debido a que presentan mecanismos de detoxificación más inmaduros. Otras características que aumentan la vulnerabilidad a este tipo de riesgos serían: físicas (elevada proporción superficie-volumen), de desarrollo (poseen determinadas

etapas críticas de crecimiento), alimentarias (beben más volumen de agua y consumen más alimentos por unidad de peso corporal que los adultos) así como conductuales (contacto directo con el suelo y otras superficies, facilidad para llevarse todo tipo de objetos a la boca, etc.). Es por ello, que la población infantil constituye un grupo de estudio preferente en lo que concierne a exposición a contaminantes ambientales (Au, 2002).

Por otro lado, en la Comunidad Autónoma andaluza, existen escasos estudios epidemiológicos que evalúen el potencial efecto nocivo de la exposición a metales pesados, y muy especialmente, el impacto sobre la salud de la población infantil. Los únicos datos que se conocen han descrito los niveles de arsénico y de algunos otros metales pesados como cadmio, cromo, cobre y níquel presentes en orina, en una muestra representativa de adultos (Gil et al., 2006; Aguilera et al., 2008) y de niños residentes en Huelva (Aguilera et al., 2010). Los resultados de estos estudios concluyen que la contaminación de la Ría de Huelva afecta a los niveles de arsénico en orina de la población residente en Huelva, siendo éstos más elevados que los detectados en la población de otras capitales andaluzas en las que no existe dicha contaminación.

La Ría de Huelva es una de las regiones fluviales más contaminadas del mundo debido a su importante actividad industrial que incluye, además de la actividad minera de la zona, plantas de fertilizantes, fundiciones, papeleras, fábricas de cemento, plantas termoeléctricas, petroquímicas y diferentes industrias químicas de síntesis (Aguilera et al., 2008). En esta región se ha cuantificado la presencia de cadmio, manganeso, mercurio, plomo y arsénico, y se ha descrito una correlación significativa entre los niveles de plomo y mercurio en los sedimentos y en las distintas especies de moluscos consumidas habitualmente por la población local. Asimismo, se ha encontrado la presencia en el aire de mayores niveles de partículas (PM10) que contienen arsénico y plomo en Huelva en comparación con otras ciudades de España (Aguilera et al., 2008). Sin embargo, a pesar de los planes elaborados por los gobiernos regionales y locales para mitigar los impactos ambientales derivados de la actividad minera e industrial de la zona, continúa la preocupación por parte de la población derivada de la posible exposición a niveles elevados de contaminantes ambientales, incluidos los metales pesados (Aguilera et al., 2010). La Ría de Huelva es considerada

una zona de gran interés y preocupación desde el punto de vista de la salud pública, máxime si tenemos en cuenta que se trata de la ciudad española con mayor prevalencia en la tasa de desarrollo de cáncer y una de las zonas con mayor riesgo de mortalidad por cáncer en España (Benach et al, 2004; López-Abente et al, 2006). Por este motivo, resulta pertinente realizar un profundo análisis de los niveles de exposición a estos contaminantes en un grupo especialmente susceptible como es la población infantil de dicha zona.

I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La **hipótesis** del presente estudio parte del escaso conocimiento que existe sobre los niveles de exposición a diversos metales y metaloides en la población infantil de la Ría de Huelva, teniendo en cuenta que se trata de una zona con una intensa actividad minera e industrial. Diferentes patrones de dieta, estilos de vida y exposiciones ambientales influyen en dichos niveles, pudiendo además existir diferencias entre niños y niñas no sólo en la exposición, sino también en los diversos factores determinantes.

Como **objetivo general**, se pretende valorar el nivel de contaminación por arsénico (As), cadmio (Cd), manganeso (Mn), mercurio (Hg) y plomo (Pb) en muestras de orina y cabello de población infantil residente en Huelva capital y en los municipios de la provincia colindantes a la Ría de Huelva (Aljaraque, Palos de la Frontera, Punta Umbría, San Juan del Puerto, Tharsis, Valdelamusa).

Desde la experiencia previa alcanzada por este grupo de trabajo, los **objetivos específicos** que tratan de abordarse son:

- 1.- Determinar las concentraciones de un metaloide (As) y cuatro metales pesados (Cd, Mn, Hg y Pb) en muestras de orina y cabello de población infantil residente en Huelva.
- 2.- Evaluar la correlación existente entre los niveles del metaloide (As) y de los metales pesados (Cd, Mn, Hg y Pb) en las muestras de orina y cabello.

3.- Comparar los datos obtenidos con los recogidos en la bibliografía especializada en estudios similares de otras zonas geográficas con objeto de valorar y/o controlar el nivel de impregnación y/o contaminación existente en la zona de estudio.

4.- Evaluar los determinantes ambientales y sociales de la exposición al metaloide (As) y los metales pesados (Cd, Mn, Hg y Pb) en la población objeto de estudio.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS Y METALOIDES EN LA POBLACIÓN INFANTIL

La cantidad y variedad de contaminantes químicos en el medio ambiente está creciendo constantemente de modo considerable. Entre los grupos de contaminantes químicos tóxicos y persistentes cuya presencia en el medio representa una amenaza para el hombre se hallan los metales pesados (Cd, Mn, Pb, Hg, etc.) (Moore y Luoma, 1990; Rybička 1996; Chopin y Alloway, 2007).

Aunque los metales pesados se encuentran de forma natural en la corteza terrestre, éstos pueden convertirse en contaminantes si su distribución en el medio ambiente se altera a consecuencia de actividades humanas (actividad antropogénica). En general, esto puede ocurrir durante la extracción y refinado de productos mineros, por la liberación al ambiente de efluentes industriales así como por las emisiones de los vehículos a motor. Además, el vertido incontrolado de residuos metálicos ha ocasionado la contaminación del suelo, el agua superficial y subterránea y los ambientes acuáticos en general (Zhang et al., 2012).

Si bien una fuente importante de exposición a los metales pesados es de carácter laboral u ocupacional (uso en actividades industriales y agrícolas), la gran dispersión de estos elementos hace que la población general esté expuesta a través de diferentes fuentes como pueden ser el agua, el aire, el suelo y/o muy especialmente los diferentes grupos de alimentos, siendo la ingesta alimentaria una de las principales vías de exposición para la población general (Olmedo et al., 2013).

Tanto las fuentes naturales como las antropogénicas pueden contribuir de forma notable a la emisión de elementos metálicos a la atmósfera. Cabe señalar que al comparar las emisiones globales, la liberación de elementos como selenio, mercurio y manganeso, entre otros, deriva en su mayoría de fuentes naturales; sin embargo, las fuentes antropogénicas contribuyen de manera considerable y estos metales se convierten así en contaminantes con capacidad de generar un gran impacto ambiental (Zhang et al., 2007).

II.1.1. Ambiental

La exposición ambiental a los metales sigue siendo un problema mundial de salud pública (EPA, 2007; Greenberg et al., 2003). Las formas de contaminación ambiental y sus fuentes son muy variadas y están compuestas por sustancias sólidas, líquidas y gaseosas. Además, existen otras formas de contaminación física y química que deben tenerse en consideración, tales como el ruido o el calor y los olores (Walker et al., 1996). En este sentido es importante destacar el papel que desempeñan los metales pesados y metaloides en la contribución de la misma, tanto del aire como del suelo y las aguas, la cual es generada, en gran medida, por la actividad humana, siendo la minería una fuente importante de contaminación (EPA, 2007; Greenberg et al., 2003).

II.1.1.1. Aire

La contaminación atmosférica puede proceder tanto de fuentes naturales como antropogénicas, siendo estas últimas las que exceden la capacidad de la atmósfera para procesarlas, dando lugar a su acumulación. Sin embargo, las fuentes de contaminación natural derivan fundamentalmente de las actividades volcánicas o los incendios forestales, capaces de emitir gases y partículas que quedan en suspensión, aunque éstas suelen ser, por lo general, depuradas en la propia atmósfera.

Las principales causas de la contaminación del aire están relacionadas con la combustión de carburantes fósiles, y se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a su procedencia:

a) *actividades industriales*, a través de los humos que expulsan las chimeneas industriales, las cuales liberan, entre otras sustancias, metales pesados como por ejemplo, humos de plomo (Peak et al., 1992).

b) *Incineración de residuos*: es una fuente muy importante de contaminación ambiental pues se emiten sustancias de elevada toxicidad a la atmósfera y generan cenizas tóxicas. Entre las sustancias tóxicas destacan principalmente los metales pesados y los óxidos de nitrógeno y azufre, todos ellos extremadamente tóxicos,

persistentes y acumulativos a lo largo de toda la cadena trófica. Son particularmente relevantes las emisiones de plomo o cadmio durante la combustión de plásticos siendo éstas influenciadas directamente por la temperatura y el tiempo de combustión. Así, por ejemplo, la combustión de plásticos a 600°C durante 5 minutos emite aproximadamente un 20% del plomo inicialmente presente, valor que puede aumentar hasta el 90% a 1000°C (Chen y Yang, 1998).

II.1.1.2. Suelo

El suelo es uno de los elementos fundamentales que componen el medio ambiente, y tampoco está exento del problema de la contaminación. Ésta puede ocurrir de manera voluntaria o accidental, y los productos químicos más comunes que suelen depositarse incluyen derivados del petróleo, disolventes, plaguicidas, y metales pesados, afectando de manera directa las características físico-químicas de éste y desencadenando innumerables efectos sobre el ecosistema. Este fenómeno está estrechamente relacionado con el grado de industrialización e intensidad del uso de productos químicos. En general, son una consecuencia de hábitos escasamente higiénicos, prácticas agrícolas anómalas y de una mala gestión en la eliminación de residuos tóxicos. Además, la presencia de contaminantes en el suelo supone la existencia de potenciales efectos nocivos para el hombre, y muy especialmente, para la población infantil así como para la fauna y la vegetación en general. Estos efectos tóxicos dependerán de las características toxicológicas de cada contaminante y de la concentración del mismo (Herawati et al., 2000).

En los países desarrollados la fuente de contaminación del suelo se asocia principalmente a:

a) *Actividades agrícolas*: empleo de agroquímicos como plaguicidas, abonos o fertilizantes y agentes reguladores del crecimiento, algunos de los cuales contienen metales en su molécula (Novotny, 1999).

b) *Actividades industriales*: vertido de cantidades importantes de desechos procedentes de explotaciones mineras y fundición de metales. Un estudio realizado en

Bangladesh, en el que se analizaron distintas muestras de suelo de terrenos cercanos a industrias, constató elevadas concentraciones de metales pesados como Pb, Cd, Mg, Ni, Cu y Zn. Así mismo, dichos metales estaban presentes en altas concentraciones en muestras de vegetación en general, como por ejemplo, el contenido de Pb (13-45 mg/Kg) en hierba (Kashem y Singh, 1999).

c) *Eliminación de residuos*: procedentes tanto de desechos domésticos como de elementos sólidos derivados del tratamiento de aguas residuales y desechos industriales (Ayuso et al., 1996).

Por consiguiente, el suelo se contamina cada vez más con sustancias químicas que pueden llegar hasta la cadena alimentaria, el agua superficial o subterránea, y por último, ser incorporadas por los organismos integrantes del ecosistema, originando así un riesgo para la salud de la población, que en algunos casos, ha desembocado en intoxicaciones por metales pesados (Walker et al., 1996).

II.1.1.3. Agua

El agua es un elemento fundamental y determinante en el ecosistema. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el agua está contaminada cuando su composición se haya alterado de modo que no reúna las condiciones necesarias para su consumo por parte del hombre y los animales.

Las fuentes de contaminación de origen natural del agua pueden ser determinadas sustancias como metales, minerales, etc., que se encuentran en el medio ambiente y constituyen componentes habituales, o bien partículas como pueden ser las cenizas procedentes de las erupciones volcánicas. Además, en función de la geología del terreno, se pueden encontrar mayor o menor proporción de contaminantes (Blanco et al., 1998).

Las fuentes de origen antropogénico se pueden clasificar en 2 grupos:

a) *Actividad industrial*: el agua procedente de la actividad industrial es vertida al sistema de aguas residuales o directamente a las aguas superficiales. Por tanto, ésta pudiera verse contaminada por:

- Subproductos originados en procesos industriales que no son adecuadamente controlados.
- El derrame accidental de productos químicos. Un ejemplo de ello fue la rotura de la balsa en la mina de Aznalcóllar en 1998 (Huelva), donde a través del agua se incorporaron algunos metales pesados como el Cd o el As a la cadena trófica (Meharg et al., 1999; Gil et al., 2006).
- Los gases emitidos por los vehículos a motor que hasta hace poco usaban combustibles con Pb como antidetonante, hoy prohibidos, los cuales contaminaban las aguas próximas a las zonas urbanas por depósito directo del Pb o bien por el efecto del arrastre de las lluvias (lixiviación). Estos hechos fueron constatados en zonas próximas a autopistas o carreteras muy transitadas (Thomas et al., 1999).
- Agentes tensoactivos (o formadores de espumas), los cuales contienen fosfatos que favorecen la proliferación de algas y otros organismos.

b) *Actividad agrícola-ganadera*: la utilización de productos químicos en agricultura, sobre todo plaguicidas, puede originar la contaminación del agua incluyendo las subterráneas. Algunos de estos productos químicos que contienen metales, pueden llegar a persistir durante bastante tiempo. Cobra especial relevancia la transferencia entre los distintos compartimentos y sobre todo entre el suelo y las aguas (Kimbrough et al., 1996).

II.1.1.4. Toxicocinética ambiental

Los metales pesados son probablemente los contaminantes más extendidos en el medio ambiente. En este apartado, se abordarán los rasgos generales de su

toxicocinética incluyendo, la penetración, el transporte, la dispersión, su acumulación y la posible transformación que sufran en el ecosistema.

II.1.1.4.a. Penetración de los contaminantes en el ecosistema

La fase toxicocinética ambiental comienza con la llegada del contaminante al ecosistema. La entrada de metales pesados en el ecosistema puede hacerse a través del:

a) Aire: en forma de vapores o aerosoles (partículas sólidas o líquidas).

b) Agua: por arrastre y/o disolución (percolación) en el agua de lluvia, de riego o a través de las aguas residuales.

c) Suelo: por difusión o retención entre sus constituyentes (silicatos, humus, etc.).

En el caso concreto de los metales pesados, éstos se encuentran sujetos de forma natural a ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los diferentes compartimentos ambientales (suelo, agua, aire y seres vivos). No obstante, la intervención humana puede modificar la concentración de metales en dichos compartimentos y facilitar su entrada en el ecosistema a partir de sus reservas minerales que se encuentran confinadas.

II.1.1.4.b. Dispersión y transporte de los contaminantes

Las sustancias al difundir en el aire, suelo y/o agua, se integran en los ciclos biogeoquímicos, que constituyen el conjunto de transformaciones que experimentan los elementos y compuestos químicos en el medio ambiente. Se denominan ciclos porque contemplan el paso de un producto desde el medio a los organismos vivos y de ahí, de nuevo al medio. Los ciclos de mayor interés toxicológico en el campo de los metales son los del arsénico, mercurio, cadmio, plomo y selenio (Mayer, 1999).

En la dispersión y transporte de los contaminantes metálicos hay que tener en cuenta la participación de:

a) *Fenómenos meteorológicos*: los más importantes son la dirección y velocidad del viento, el gradiente de temperatura en la atmósfera, la lluvia y la niebla.

- El transporte convectivo horizontal va a depender de la velocidad del viento, aunque éste puede verse afectado por la presencia de montañas, valles o edificios altos sobre los que incida el viento perpendicularmente y origine una acumulación de contaminantes (Baumbach y Vogt,1999).
- El transporte convectivo vertical depende de la temperatura de las capas de la atmósfera. Las mayores temperaturas se consiguen en las grandes zonas urbanas.

b) *Factores físicos* (movimiento del aire y agua) o *biológicos* (por ejemplo, migración de peces o aves) que pueden hacer que la exposición y descarga de contaminantes tenga lugar a distancia.

Los contaminantes presentes en el aire pueden entrar en las aguas superficiales como consecuencia de la precipitación de aerosoles de naturaleza sólida o líquida. Los contaminantes presentes en la superficie de la tierra, como por ejemplo los metales pesados, pueden ser arrastrados por procesos de lixiviación hacia los ríos u océanos en caso de lluvias torrenciales (Rivero, 1995).

c) *Características físico-químicas del contaminante*: solubilidad, coeficiente de partición, constante de disociación, formación de complejos, volatilidad, características de lavado, etc.

- *Hidrosolubilidad*: la solubilidad en agua y el calor latente de solubilidad son propiedades críticas que afectan a la distribución de un contaminante químico en el medio ambiente. Muchos contaminantes son hidrofóbicos y por tanto, de escasa solubilidad en agua. Asimismo, la solubilidad en agua puede ser modificada por el pH así como por la presencia de sales u otros compuestos inorgánicos, y por la temperatura (Arcand et al., 1995). Un

ejemplo lo encontramos en el cloruro de trifenil estaño, cuya hidrosolubilidad disminuye con el incremento de la salinidad (Inaba et al., 1995).

- Adsorción sobre el suelo: la adsorción a la materia particulada es un mecanismo importante para secuestrar productos químicos. La capacidad de hinchamiento, de intercambio iónico y la superficie específica son características que determinan el mayor o menor poder de adsorción de las partículas (Davis, 1993).
- Coeficiente de partición: las relaciones de distribución de un compuesto químico con los distintos componentes de un ecosistema (aire, suelo, agua, biomasa) pueden expresarse a través de una serie de coeficientes denominados: K_d (Coeficiente de adsorción al suelo), K_{oc} (Constante de adsorción al suelo), K_w (Razón agua/aire), K_{ow} (Coeficiente n-octanol/agua), etc. (Zhao y Lang, 1996).
- Vaporización: la vaporización a partir del suelo, del agua o de la superficie de las plantas es un proceso de transporte fundamental para muchos productos químicos. La volatilidad de un compuesto químico es función de su presión de vapor pero también depende de las condiciones ambientales como la temperatura (a temperaturas elevadas, aumenta de forma significativa la volatilización), el grado de absorción, las propiedades del suelo e incluso del viento sobre la superficie de evaporación, etc. (Lau et al., 1995).

II.1.1.4.c. Acumulación de los contaminantes en el medio y en los organismos

Un proceso en íntima relación con la dispersión y transporte es la acumulación de los xenobióticos tanto en el medio físico como en los organismos integrantes del ecosistema.

En el medio físico, la acumulación del contaminante está regida por su afinidad. Tras el proceso de transporte y distribución, se produce la retención de los

contaminantes en los sedimentos dependiendo de las condiciones ambientales, las características del contaminante y la naturaleza química de las partículas que los forman (Huber y Otto, 1994).

Aunque los contaminantes retenidos puedan liberarse, en general, la retención es beneficiosa porque así disminuye tanto la disponibilidad del contaminante como la absorción de éste por los seres vivos, término que se conoce como *biodisponibilidad*. Así mismo, la acumulación de contaminantes en los seres vivos tras su absorción desde el medio se denomina *bioacumulación* (Campfens y Mackay, 1997). Otros fenómenos relacionados con la bioacumulación son la biomagnificación y la bioconcentración.

La *biomagnificación* se produce cuando un ser vivo consume un alimento contaminado y éste a su vez es ingerido por otro organismo superior en la escala trófica. Un claro ejemplo de ello se produce en el caso del mercurio cuya concentración en las especies depredadoras, ubicadas en lo más alto de la cadena alimentaria, es máxima, muchas de las cuales pueden ser consumidas posteriormente por la población, incluida la infantil (Olmedo et al., 2013). La *bioconcentración* es el fenómeno por el cual la concentración de una sustancia en un organismo es mayor que en el medio ambiente que lo rodea. Para determinar empíricamente la tendencia de un contaminante a acumularse en los organismos se utiliza el factor de bioconcentración (BFC) que es el cociente entre la concentración en el organismo o tejido y la concentración en el medio. Otro término relacionado con el BFC es el llamado factor de bioacumulación (BFA); ambos son usados como criterios de bioacumulación con objeto de identificar y clasificar sustancias peligrosas para el medio ambiente y por tanto, sus posibles consecuencias a largo plazo sobre el ecosistema. Mcgeer et al. (2003) emplearon el cociente BFC/BFA para valorar el riesgo de acumulación de Zn, Cd, Cu, Hg, Pb, Ni y Ag en el medio acuático, aún cuando observaron una gran variabilidad en los datos, lo que lo invalidaría como criterio de clasificación e identificación del peligro.

II.1.1.5. Transformaciones abióticas y bióticas

A parte de su toxicidad, la persistencia de un contaminante en el medio ambiente es uno de los factores más importantes para determinar su peligrosidad. Así, una sustancia muy tóxica que se degrada fácilmente, puede ser menos peligrosa para el medio ambiente que otra menos tóxica pero más persistente. Las transformaciones que sufren los contaminantes son de gran importancia ya que estos procesos pueden ocasionar una pérdida de toxicidad del contaminante o por el contrario un incremento de la misma.

El sistema suelo-agua y los sistemas acuáticos son los que más activamente intervienen en la transformación y degradación de los contaminantes ambientales, además de los agentes físicos naturales como la energía lumínica, el calor, el oxígeno, la humedad, etc. En general podemos hablar de dos tipos de transformaciones, dependiendo del agente causante: abióticas y bióticas.

a) Abióticas:

Son las causadas por agentes físico-químicos (luz, temperatura, pH, etc.) y comprenden procesos como la hidrólisis, oxidación, isomerización y mineralización, entre otros (Svenson y Hinning, 1997).

b) Bióticas:

Se deben fundamentalmente a la acción de la microflora y microfauna. Bajo su acción, tanto los compuestos orgánicos como los inorgánicos, se degradan en fragmentos de bajo peso molecular, que pueden o no integrarse en los ciclos biogeoquímicos, o sufrir ligeras modificaciones pudiendo estar biodisponibles (Neilson, 1996).

La degradación microbiana de los xenobióticos es utilizada por muchos microorganismos como fuente de carbono u otros nutrientes y es crucial para la predicción de la persistencia de los contaminantes en el medio y para los efectos a largo plazo.

Tanto en las transformaciones abióticas como en las bióticas hay que distinguir dos tipos, según la toxicidad del producto resultante: “transformaciones tipo I” que disminuyen la toxicidad y las “transformaciones tipo II” que la aumentan. Un ejemplo de ello, referido a los metales pesados, sería aquella transformación en la que el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) pasa a metil-mercurio (MeHg) en el medio acuático, por la acción de microorganismos (por ejemplo, bacterias sulforeductoras y metanogénicas).

En último término, la transformación es un mecanismo de “degradación” cuyo resultado es usualmente la verdadera desaparición del contaminante en oposición al proceso de transporte que tan solo desplaza el contaminante de un sitio a otro.

II.1.1.6. Biodisponibilidad

Se denomina así a la fracción de tóxico (contaminante) que finalmente va a estar disponible para interactuar con los integrantes del ecosistema y desencadenar efectos ecotóxicos. La fracción biodisponible de una sustancia es aquella parte de la concentración total que realmente puede ser absorbida por un organismo.

En el caso de los metales pesados es importante la distribución entre las diferentes especies químicas (especiación) como por ejemplo carbonatos, hidróxidos, cloruros, etc. La unión de metales pesados al suelo se incrementa en el orden $Cd < Ni < Cu < Zn < Pb$, siendo por lo tanto el Cd el elemento más ubícuo y por ello, el que podría penetrar con mayor facilidad en los tejidos biológicos (Olajire et al., 2003). La facilidad de extracción de los metales del suelo disminuye a medida que aumenta el contenido de arcilla o materia orgánica (humus). El efecto de estas uniones en el caso de la arcilla, se explica por el hecho que los cationes divalentes del metal se unen a los restos negativos de los cristales de aluminio-sílice que ésta posee. En el caso de las sustancias húmicas (ácido húmico y ácido fúlvico), se debe a la presencia de numerosos grupos hidroxilo y carbonilo sobre la estructura aromática de dichas moléculas que favorecen la unión con el metal (Pandey et al., 2000). Un suelo con un pH ácido (< 4.5) va a favorecer la movilidad del metal al romperse su unión con las partículas de arcilla y de materia orgánica, con el consiguiente incremento de la

concentración en el compartimento acuoso (Kalbitz y Wennrich, 1998). Igualmente, la materia orgánica disuelta tiene un efecto directo sobre la movilidad de diversos elementos entre los que se encuentra el As.

En lo que concierne a los metales pesados en el medio acuático, la parte disponible será fundamentalmente la que no se encuentra unida a partículas ya sean en suspensión o en los sedimentos; un ejemplo sería el cambio de la biodisponibilidad del Cd debido a la salinidad del agua. El Cd, unido a formas complejas, no es biodisponible y por tanto, no es tóxico. Por el contrario, los iones libres y disueltos de Cd^{2+} son aquellos que están biodisponibles y por lo tanto los más nocivos para el ecosistema. Debido a que una gran cantidad del Cd presente en el agua del mar forma complejos con el cloro, el Cd en el agua dulce será mucho más tóxico ya que se encontrará en su forma iónica libre (Cullen y Maldonado, 2013).

En definitiva, el balance entre la fracción disponible y la retenida puede desplazarse a un lado u otro en función de determinados cambios en las condiciones ambientales.

II.1.1.7. Toxicodinámica ambiental

La interacción de los contaminantes con los organismos vivos constituye la "Toxicodinámica ambiental". En Ecotoxicología, la fase toxicodinámica incluye un amplio rango de efectos sobre los organismos a diferentes niveles de organización (molecular, celular, individual, poblacional, etc.).

En esta fase podemos distinguir:

a) *Efectos bioquímicos*: son consecuencia directa de la interacción con los sitios de acción específicos y pueden estudiarse a través de la determinación de ciertos parámetros tales como proteínas, metabolitos, actividades enzimáticas, etc. Constituyen, en definitiva, biomarcadores de exposición, respuesta o efecto y susceptibilidad (Gil y Pla, 2001; Gil y Hernández, 2009).

- b) *Efectos fisiológicos y sobre el comportamiento*: son manifestaciones que se observan como consecuencia de la interacción del tóxico con sus receptores específicos (dianas) y se utilizan para establecer el estado de salud de una población tras el impacto de un contaminante. Fundamentalmente se refieren a alteraciones en la reproducción y en la adquisición y captación de nutrientes.
- c) *Efectos sobre las poblaciones*: como parámetros de estrés en una población se han utilizado:
- El número de individuos o la densidad de población.
 - La tasa de crecimiento.
 - El desplazamiento de la curva de edad.
 - Las alteraciones de la capacidad competitiva de los organismos.
- d) *Efectos sobre las comunidades*: uno de los indicadores más usados para determinar la estructura de una comunidad es la diversidad de especies. Una disminución de ésta se suele interpretar como indicativo del estrés o del impacto sobre la comunidad.
- e) *Efectos sobre el ecosistema*: los efectos más dramáticos son las alteraciones en la composición de las especies y en el metabolismo del ecosistema. Así por ejemplo, se ha visto que la lluvia ácida causa alteraciones drásticas en los ecosistemas acuáticos y terrestres o que la introducción de nutrientes aumenta la tasa de eutrofización.

A medida que los efectos tóxicos ascienden de nivel, la importancia del efecto es mayor. Todo lo anteriormente descrito hace que el medio ambiente contribuya a la exposición a metales pesados de aquellas poblaciones que integran el ecosistema, incluida la humana y muy especialmente la infantil.

Como ya se ha comentado, uno de los mayores problemas que pueden presentar los metales pesados es el potencial de bioacumulación y biomagnificación en el ecosistema. Por lo tanto, la peligrosidad de éstos resulta aún mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años, contaminando el suelo y acumulándose en las

plantas y los tejidos de numerosos organismos. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a lo largo de la cadena alimentaria.

Algunos metales como el Cd, Mn, Pb, Hg y metaloides como el As, etc., se encuentran dispersos en el entorno, presentan características bioacumulativas y, por lo tanto, son de gran interés para valorar la posible exposición en la población infantil.

De este modo, y a pesar de la importancia de los recursos minerales para el progreso humano, la extracción de minerales ha provocado graves problemas medioambientales, derivados especialmente de la contaminación por metales pesados (Moore y Luoma, 1990; Rybička, 1996; Chopin y Alloway, 2007). Así, en zonas con gran actividad minera y, por ello sometidas a un alto grado de contaminación, los metales pesados pueden entrar en el organismo a través del aire, los alimentos y el agua pudiendo causar efectos nocivos a largo plazo para la salud (efectos crónicos). Por ello, es fácil asumir que los niños y las gestantes son los grupos de mayor riesgo en dichas zonas expuestas. Para la población infantil, la contaminación del suelo es una importante vía de exposición de forma directa y sobre todo indirecta (a través de alimentos contaminados), por lo que la biodisponibilidad de metales en el suelo es un factor que merece especial atención (Carrizales et al., 2006).

El Cd es un metal pesado que se encuentra en la corteza terrestre y se difunde en el medio ambiente, tanto por procesos naturales como por actividades humanas, entre las que destacan la quema de combustibles fósiles, la incineración de residuos, los procedimientos de fundición y el uso de fertilizantes fosfatados, entre otros (ATSDR, 2008). La absorción de Cd presente en el medio ambiente por las plantas y los animales, da lugar a la exposición humana a través de los alimentos (Ciesielski et al., 2012). Por lo tanto, la exposición ambiental al Cd puede venir dada por la contaminación del aire, el agua y el suelo, la cual puede ser importante en áreas que rodean fundiciones de Zn y Pb, incineradoras de residuos u otros tipos de industrias capaces de emitir Cd a la atmósfera (ATSDR, 2000). La mayor parte de terrenos y rocas, incluidos minerales de carbón y abonos minerales, contienen Cd, tratándose por tanto de un elemento enormemente ubicuo. Al aumentar el contenido de Cd del suelo,

aumenta la absorción del metal por las plantas y la especie humana puede verse sometida a una mayor ingesta a partir de las cosechas contaminadas. Dado que la absorción de las plantas desde el suelo es mayor a medida que disminuye el pH, los procesos que acidifican el suelo (por ejemplo, las lluvias ácidas) pueden aumentar las concentraciones medias de Cd en los alimentos (Elinder, 1992).

Otra fuente de exposición crónica al Cd en el hombre es el tabaco, encontrándose también expuestos a él los niños que conviven en un ambiente de fumadores, de manera que al respirar el humo procedente de cigarrillos se puede duplicar la ingesta diaria de Cd (Roggi et al., 1996; Gil y Gisbert-Calabuig, 2004).

En lo referente al Mn, 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-Calabuig, 2004), el cual se utiliza como sustituto del Pb en la gasolina para incrementar su octanaje. Su combustión libera a la atmósfera compuestos inorgánicos de Mn, sulfatos y fosfatos, contaminando el aire, la tierra y el agua. La toxicidad de los distintos compuestos parece depender del tipo de ion Mn y de su estado de oxidación. Cuanto menos oxidado esté el compuesto, mayor será su toxicidad. En los adultos se absorbe aproximadamente del 3-5% (100 µg) del Mn ingerido. Posteriormente, se excreta en la bilis y sólo se retienen 30 µg al día. Por el contrario, la población infantil absorbe casi el 70% y elimina bastante menos que la población adulta. Por lo tanto, la exposición de los niños al Mn a través del aire, puede ser proporcionalmente mayor que la de los adultos. Además, se puede producir un riesgo adicional en la población infantil debido al contacto directo con el suelo contaminado resultante de la típica acción mano-boca de los niños (Aschner et al., 2007).

En cuanto al Pb, también puede existir exposición ambiental debido a que es uno de los metales tóxicos más omnipresentes (Bergkvist et al., 2010) merced a su uso en numerosas actividades antropogénicas como son las fundiciones, la quema de

combustibles fósiles, los vehículos de motor, los procesos metalúrgicos, la producción de artículos de cerámica, pilas, plásticos, pintura y soldadura, de manera que se produce la contaminación del aire y el suelo, la cual puede pasar al organismo de la población, particularmente la infantil, mediante el polvo, la tierra u otros materiales que contengan dicho metal (Sanna et al., 2008).

El Centro de Estados Unidos para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecen la cifra de 10 mg/dl (0,48 mmol/L) de Pb en sangre como el umbral de preocupación en los niños. Sin embargo, algunos estudios han informado de la posibilidad de efectos adversos para la salud, entre ellos el deterioro intelectual en niños pequeños con niveles de Pb en sangre inferiores a 10 mg/dl, lo que sugiere que no existe un nivel seguro de exposición. En las últimas dos décadas, las concentraciones atmosféricas de Pb se han reducido significativamente en todo el mundo a medida que cada vez más naciones han optado por eliminar el tetraetilato de plomo como antidetonante de la gasolina. Sin embargo, la especie humana también puede estar expuesta al Pb a través de los alimentos contaminados, el agua y el polvo de la casa y a través de ciertas actividades industriales, como el reciclaje del metal y la industria de las baterías o acumuladores (Thomas et al., 1999).

Pese a los considerables esfuerzos para identificar y eliminar las fuentes de exposición al Pb, este metal sigue siendo un importante problema de salud pública (Banks et al., 1997; Grigg, 2004; Juberg et al., 1997), y muy especialmente para los niños. No obstante, la gran mayoría de directrices sobre los potenciales efectos para la salud están directamente relacionados con los niveles de Pb en sangre (Jakubowski et al., 2005).

Resulta de especial interés la exposición al Pb en niños de numerosos países en vías de desarrollo donde se ha observado que los niveles solían ser muy superiores a las directrices recomendadas para este colectivo, de modo que la exposición a Pb ha sido siempre un problema importante de salud pública (Blaha et al., 1996; Cikrt et al., 1997; Manay et al., 1999; Romieu et al., 1997). En este contexto, es razonable pensar que cualquier reducción adicional a la existente de los niveles de acción de Pb en

sangre, aumentará considerablemente el número de niños en el nivel de intervención o por encima del mismo.

El As es un metaloide presente en el ambiente de forma natural, por lo que siempre se va a encontrar en pequeñas concentraciones en el suelo, aire y agua (Saoudi et al., 2012). Se ha estimado que alrededor de un tercio del flujo atmosférico de As es de origen natural. La actividad volcánica es la fuente natural más importante, seguida de la volatilización a bajas temperaturas (Signorelli, 1997). Los niveles normales son aproximadamente de 5.000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en el suelo, 0,02- 0,10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la atmósfera y 2 $\mu\text{g}/\text{l}$ en el agua. El As elemental es insoluble en agua y la solubilidad de las sales arsenicales varía en función del pH y de las condiciones iónicas. El metabolismo y la toxicidad de las especies de As son diferentes; así, las formas inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas, siendo el compuesto arsenical más tóxico el anhídrido arsenioso, comúnmente llamado arsénico (Batista et al., 2011).

Una fuente importante de contaminación ambiental es la agricultura, ya que el arseniato de plomo y el arseniato tricálcico son base del tratamiento específico de diversas parasitosis de las viñas y de la patata. Además el anhídrido arsenioso y el arseniato sódico forman parte de herbicidas y xiloprotectores. Otra de las principales fuentes de exposición al As es la dieta, donde la fuente predominante de este metal son los mariscos. No obstante, en el marisco se encuentra formando arsenobetaína que es atóxica (Gil, 2012; Olmedo et al, 2013).

La EPA ha establecido límites para la emisión de As al medio ambiente por fuentes industriales y ha restringido o prohibido numerosos usos de As en formulaciones para plaguicidas (EPA, 2007). El límite ambiental propuesto en España por el INSHT es de 0.1 mg/m^3 para el As elemental y compuestos inorgánicos, y de 0.16 mg/m^3 para la arsenamina (Bartual et al., 2001). Por otro lado, se calcula que la ingesta diaria total de As en la población de EEUU es de 50 $\mu\text{g}/\text{día}$ (ATSDR, 2000).

Las fuentes de contaminación de Hg al medio ambiente pueden ser igualmente naturales o antropogénicas. Las fuentes naturales incluyen las emisiones volcánicas, el polvo arrastrado por el viento de las zonas continentales y la emisión de Hg gaseoso procedente de los suelos, la vegetación y los océanos. Así, la contaminación por Hg se

ha generalizado en los diferentes compartimentos ecológicos como la atmósfera, el suelo y el agua. Hay pruebas que demuestran la bioacumulación y biomagnificación del Hg en la cadena alimentaria acuática, con mayores concentraciones en los peces carnívoros. En cuanto a los humanos, aunque la principal vía de exposición es la alimentación mediante el consumo de pescado, y muy especialmente para residentes en ciudades costeras y niños (Marques et al., 2007), la inhalación también puede ser otra vía importante de absorción, afectando a la salud de aquellos que residen en zonas con graves problemas de contaminación atmosférica por Hg. Por este motivo, desde hace algunos años parece que hay una necesidad urgente de identificar las fuentes de contaminación por Hg, la especialización y la concentración en los diferentes compartimentos ecológicos, habida cuenta que la exposición a largo plazo puede conducir a altos niveles de impregnación, siendo especialmente vulnerable la población infantil (Zhang y Wong, 2007).

Por otro lado, las fuentes antropogénicas más importantes de contaminación de Hg en el medio ambiente son los vertidos urbanos, los materiales agrícolas, la minería y la combustión. Se estima que la cantidad de Hg en la atmósfera ha aumentado diez veces desde el comienzo de la revolución industrial (EPA, 2003). Los incendios forestales también suponen una fuente importante de contaminación por Hg, así como la combustión de biomasa (Streets et al., 2005).

El tiempo medio de persistencia del Hg elemental en la atmósfera es de 0,5 a 2 años, lo que permite que pueda ser transportado a largas distancias. Además, éste se puede depositar en el ecosistema terrestre y acuoso mediante la precipitación seca y húmeda (Zhang y Wong, 2007).

En lo referente al suelo, un elevado número de estudios han corroborado el papel de la deforestación y la erosión del suelo como una fuente importante de liberación de Hg en los cursos de agua, y por lo tanto a los recursos pesqueros y comunidades de peces que son finalmente consumidas por la especie humana (Passos et al., 2008).

En el caso de las aguas, tanto de ríos como del mar, pueden verse contaminadas por Hg debido a que, en ocasiones, son receptoras de vertidos

residuales procedentes de plantas industriales, originando un problema ambiental y de salud en la población. Además, el MeHg es muy biodisponible y se acumula en los peces (sobre todo de la familia de los túnidos), lo que puede producir elevados niveles de contaminación por Hg en el pescado, pudiendo llegar finalmente a la población infantil (Da Silva et al., 2005).

Debido a las múltiples fuentes y a la continua degradación del medio ambiente que conducen al aumento de Hg en el mismo, la exposición humana al Hg es relativamente frecuente (Passos et al., 2008).

II.1.2. Dieta

El gran interés que tiene para la salud pública la presencia de metales pesados en los alimentos, procede del hecho que el margen de seguridad entre los niveles presentes en alimentos de origen animal (carnes y pescados), vegetal e incluso en el agua de bebida, y los que dan lugar a efectos tóxicos es muy estrecho. El estudio a nivel internacional de la exposición de diversas poblaciones humanas a metales pesados por vía digestiva es muy amplio.

Desde 1964, la *Food and Drug Administration* (FDA) está llevando a cabo estudios de dieta total para determinar la ingesta alimentaria de determinados tóxicos, incluyendo los elementos metálicos. Estos estudios comprenden los alimentos de consumo más representativos de las dietas de la población infantil y adulta (AECOSAN, 2014). Esto ha motivado que en los últimos años, el número de países que han establecido en sus legislaciones alimentarias límites de tolerancia para el contenido en metales pesados de los alimentos haya ido en aumento, gracias a la puesta en marcha de programas nacionales e incluso internacionales auspiciados por el Comité Mixto de la FAO-OMS.

Para la población general no fumadora y, especialmente la población infantil, la principal exposición a Cd, un metal tóxico y reconocido cancerígeno, tiene lugar a través de la alimentación (cereales, legumbres,...) (EFSA, 2009) y de las aguas contaminadas, debido a que muchos alimentos tienden a absorberlo y retenerlo,

encontrándose los niveles más altos en mariscos, bivalvos, hígado y riñones. Así, por ejemplo, las plantas toman el Cd del suelo, los peces del agua, etc. Es por ello que la exposición suele estar presente durante toda la vida. La exposición crónica a este metal, incluso a dosis muy bajas, se ha demostrado que causa problemas de salud en adultos (Satarug et al., 2010), siendo relativamente limitados los estudios llevados a cabo en niños (Schoeters et al., 2006).

En cuanto al Mn, la mayor parte de la exposición de la población infantil también proviene de los alimentos (sobre todo, los vegetales, como cereales, legumbres,...) (Sanna et al., 2008). Los contenidos de Mn en los alimentos varían mayoritariamente en función de su origen, prácticas de cultivo, recolección, producción y posterior manipulación.

En lo referente al As, los compuestos orgánicos, como por ejemplo la arsenobetaina, la arsenocolina, las sales de tetrametilarsénico y diversos arsenoazúcares (Brown et al., 1990; Simon et al., 2004), se encuentran fundamentalmente en organismos marinos, destacando entre todos ellos la presencia de la arsenobetaina. Esto determina que la ingesta de dichos organismos marinos (sobre todo, crustáceos, etc...) incorpore al organismo gran cantidad de As en su forma orgánica (Olmedo et al., 2013). De aquí la importancia de la especiación analítica de arsénico así como de controlar la ingesta de estos organismos por medio de una encuesta alimentaria para descartar unos niveles de arsénico total por encima de la media que pudieran proceder de la dieta, ya que es sin duda una de las principales fuentes de exposición a As (Chiang et al., 2008). Los niveles normales en los alimentos son aproximadamente de 20-140 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Además, en el agua freática, utilizada como agua de bebida en diversas partes del mundo, como por ejemplo en Bangladesh, hay As inorgánico de origen geológico (Dhar et al., 1997; Biswas et al., 1998), lo que determina que la exposición a este metaloide por parte de esta población sea importante, encontrándose en ellos niveles elevados. Así, Dhar y colaboradores (1997) refieren niveles de As en agua por encima de 0.05 mg/l, siendo el límite establecido por la EPA para As en agua potable de 0.01 ppm.

En cuanto al Hg, éste se acumula en los tejidos animales produciendo un aumento de la concentración a través de la cadena alimentaria. El consumo de pescado es en la actualidad, la principal vía de exposición de poblaciones no expuestas ocupacionalmente, especialmente costeras, que consumen una mayor cantidad de pescado y marisco, siendo los grupos más vulnerables las mujeres embarazadas y los niños (Trasande et al., 2005). La mayor parte del Hg contenido en el pescado se encuentra en forma de MeHg, el cual es altamente absorbible y cuyo porcentaje con respecto al Hg total es de más del 99% en los peces (Olmedo et al., 2013). Esto puede suponer una amenaza para la salud de las poblaciones que consumen una gran cantidad de pescado. Una indicación clara de bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica acuática se corroboró en un estudio realizado en China en el que se observó una correlación significativa entre los niveles de Hg en el cabello y la sangre de la población infantil, de manera que aquellos niños que consumían pescado más de tres veces a la semana tenían en el cabello y la sangre niveles de Hg el doble que aquellos que lo consumían de una a tres veces por semana y el triple de aquellos que nunca lo consumieron (Zhou y Wong, 2000; Ip et al., 2004). En otro estudio realizado en finlandeses que consumían más de 30 g de pescado al día, se concluyó que tenían niveles de Hg en el cabello considerablemente más altos que aquellos que consumían menos de 30 g/día (Salonen et al., 1995).

El Pb es un metal pesado ampliamente utilizado y cuando se ingiere o se inhala, es altamente tóxico para los seres humanos. La población puede estar expuesta a través del suelo, el polvo, el agua, los alimentos, el aire, las medicinas tradicionales, cosméticos, cerámica, etc. (Furman y Laleli, 2000). La ingestión de Pb a través de los alimentos es una vía de absorción importante tanto para los niños como para los adultos (Finster et al., 2004). En el caso de la población adulta, Watanabe y colaboradores (2000) recogieron en sus estudios que el 59% y el 81% del consumo total de Pb podría ser atribuible a la dieta en las zonas urbanas y rurales, respectivamente.

II.1.3. Industrial

Los metales pesados se encuentran en la naturaleza, pero son la actividad humana, y más concretamente los procesos industriales, la mayor fuente de contaminación por dichos tóxicos, cobrando importancia en la actualidad la procedencia de éstos a través de la incineración de basuras (Barman et al., 2010).

En cuanto a las intoxicaciones industriales por el Cd, éstas resultan de la exposición excesiva a los polvos y los humos que se desprenden en la producción del metal y sus sales, siendo sus principales aplicaciones industriales (Gil, 2012):

- La industria del zinc y la extracción del cadmio a partir de sus residuos.
- Cadmiado de metales (hierro, acero y cobre).
- Sustituyente del estaño en las aleaciones para soldadura.
- Fabricación de acumuladores eléctricos al cadmio-níquel.
- Fabricación de colorantes.

La exposición al Cd a nivel industrial suele acontecer con frecuencia de manera conjunta con el As. La Administración para la Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) limitó la cantidad de Cd en el aire industrial a $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en forma de vapor y a $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el caso de la materia particulada (ATSDR, 1999).

Entre las fuentes de contaminación industrial por Mn cabe destacar las actividades en minas de Mn, refinерías y fundiciones, siendo la inhalación la principal vía de absorción. Por este motivo, y como se comentará en el apartado correspondiente, los síntomas suelen ser respiratorios pudiendo también ocasionar efectos neurológicos (“manganismo”). Los signos precoces de neurotoxicidad en adultos, además de leves trastornos motores, consisten en alteraciones cognitivas, conductuales y emocionales (Gil, 2012). En la población infantil se ha puesto en evidencia una relación entre la concentración de Mn en el cabello y alteraciones como hiperactividad y trastornos del aprendizaje (Rodríguez-Barranco et al., 2013). España es un importante productor y exportador de este metal y muy especialmente las minas de Huelva, zona objeto de estudio de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Por otro lado, las principales vías de exposición industrial al Pb son la minería (minerales de carbonato y sulfato), la manufactura de baterías de Pb, la fabricación y aplicación de pinturas, lacas, barnices o tintas a base de compuestos de Pb, actividades en plantas con municiones, artículos pirotécnicos y campos de tiro, fabricación de vidrio, trabajos de fontanería, fabricación, soldadura, rebabado y pulido de objetos de Pb o sus aleaciones, trabajos con cerámicas, el uso de combustibles con aditivos antidetonantes, etc. (Villanueva, 2004b; Gil, 2012).

El Pb no es un elemento esencial para el cuerpo humano y la ingesta excesiva puede dañar los sistemas nervioso, óseo, circulatorio, endocrino e inmunológico. Los niños, las mujeres embarazadas y los ancianos son especialmente sensibles a la exposición al Pb, teniendo también efectos importantes sobre el cociente intelectual y el desarrollo físico en los niños (Rodríguez-Barranco et al., 2013). Algunas de las fuentes bien conocidas de la exposición al Pb en la población general son el uso de combustibles, las emisiones industriales y el uso de pinturas. Por otro lado, debido a la tendencia de los niños a llevarse las manos a la boca, la ingestión de polvo doméstico se considera una vía fundamental de exposición (Chiang et al., 2008). Desde la década de 1980, cuando Estados Unidos y otros países desarrollados comenzaron la prohibición del uso del Pb en la gasolina, la soldadura, la electrónica y en otros productos, la media de los niveles de plomo en sangre ha ido disminuyendo drásticamente (Chillrud et al., 1999; Pirkle et al., 1994, 1998; Storch et al., 2004; Jones et al., 2009), aunque existen ciertos países como por ejemplo China donde los problemas de salud relacionados con el Pb siguen siendo graves (Bian, 2008; Zhong y Zhang, 2008).

Las industrias relacionadas con la minería son también algunas de las mayores fuentes de contaminación ambiental por metales pesados (Horvath y Gruiz, 1996; Yang et al., 2003; Li et al., 2007). China es uno de los mayores productores de Pb y Zn en el mundo. Una gran cantidad de Pb, Zn y elementos relacionados, como el Cd, han sido liberados al medio ambiente debido a las actividades de procesamiento de minerales y han afectado los recursos hídricos, suelos, vegetales y cultivos en general. En algunas áreas, esta contaminación es peligrosa para el hombre, de manera que, en ocasiones, conduce a altos niveles de Pb en sangre en los niños, así como daños sobre el riñón e

incluso a la aparición de tumores relativamente complejos que pudieran estar asociados a dicha exposición (Zhang et al., 2012).

En lo referente a las fuentes de contaminación por As es conveniente resaltar que los principales procesos industriales que contribuyen a la misma son la extracción y fundición de metales no ferrosos y la utilización de combustibles fósiles. No obstante, también hay otros empleos en la industria del As y sus derivados como son la conservación de pieles y taxidermismo, fabricación de vidrios coloreados y esmaltes, fabricación y empleo de colorantes, fabricación de perdigones, industria química de obtención de derivados arsenicales y fabricación de fuegos artificiales y gases bélicos (Gil, 2012). También el uso del As en la conservación de la madera ha contribuido a la contaminación del medio ambiente (Jensen y Olsen, 1995). Se ha estimado que el 70% de la producción mundial de As se ha utilizado en el tratamiento de la madera en forma de arseniato de cobre y cromo, el 22% en productos químicos de uso agrícola (usualmente, parasiticidas) y el resto, en la obtención de vidrio, y aleaciones no ferrosas.

Algunas de las principales fuentes de contaminación de Hg en el medio ambiente son la fundición de metales (especialmente de Zn) y la combustión del carbón (especialmente plantas de energía industrial), de manera que los residentes que viven cerca de las plantas de energía pueden desarrollar problemas de salud adversos debido a la exposición al Hg por vía respiratoria.

Existen trazas de Hg en el carbón, que se emiten al ambiente cuando los combustibles se queman a temperaturas superiores a 150°C (Finkelman, 1981). Una gran parte del Hg emitido, procede de las centrales eléctricas que queman carbón, responsables de aproximadamente un tercio de las emisiones antropogénicas (Jensen et al., 2004), siendo China la mayor productora y consumidora de carbón en el mundo y superando a los EE.UU. (Jiang et al., 2005). También destacan otras fuentes como la producción de lámparas fluorescentes y pilas, la producción de cemento, la minería del Hg, la quema de biocombustibles y la industria de cosméticos (Counter y Buchanan, 2004; Zhang y Wong, 2007).

II.2. PRINCIPALES EFECTOS TÓXICOS DEL ARSÉNICO, CADMIO, MANGANESO, MERCURIO Y PLOMO, CON ESPECIAL ÉNFASIS EN LA POBLACIÓN INFANTIL

Los estudios más recientes se centran principalmente en la exposición a metales pesados en la etapa prenatal y postnatal, así como durante los primeros años de la infancia, debido a que el potencial efecto tóxico de los metales pesados resulta más grave para el sistema nervioso central en los primeros estadios del desarrollo. Por este motivo, en este apartado se hará una breve referencia a las características tóxicas de los elementos elegidos en el presente estudio, haciendo especial hincapié en los efectos tóxicos crónicos por ser los que más frecuentemente cabría esperar que se produjeran y no los agudos, más característicos de otro tipo de exposiciones, aun cuando en teoría también pudieran acontecer.

II.2.1. Arsénico (As)

El arsénico se clasifica como un metaloide, aunque en el contexto de la toxicología suele agruparse y estudiarse junto a los metales pesados. Es un elemento que, a pesar de encontrarse a bajas concentraciones en el medio ambiente de modo natural, salvo en zonas con actividad volcánica o depósitos geológicos de minerales de sulfuro (arsenopiritas) en los que las concentraciones son algo más elevadas, deriva fundamentalmente de actividades industriales tales como la minería, la fundición, el uso de plaguicidas y xiloprotectores, la combustión del carbón o la incineración de residuos que determinan que la liberación de As de origen antropogénico sea muy importante (Orloff et al., 2009; Gil, 2012).

El As es la primera de las sustancias tóxicas enumerada en la lista de la ATSDR, lo que de algún modo refleja su potencial peligrosidad. Al contrario de lo que ocurre con el Hg, el As inorgánico es mucho más tóxico que el orgánico. El As trivalente inhibe el complejo piruvato-deshidrogenasa y reduce la conversión de piruvato a acetil coenzima A, disminuyendo la actividad del ciclo de Krebs y la producción celular de ATP (Bergquist et al., 2009). Además de este complejo, el As trivalente inhibe otras

muchas enzimas celulares a través de la unión a los grupos sulfhidrilo. Todo ello provoca la inhibición de la captación de glucosa por las células, la glucogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la producción de glutatión que protege a las células frente al estrés oxidativo. La toxicidad del As pentavalente se debe en parte a su conversión en trivalente. Desde un punto de vista más específico, el As pentavalente mimetiza al fosfato inorgánico y lo reemplaza en vías metabólicas glucolíticas y oxidativas. El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa ocurre porque los enlaces de fosfato de alta energía no se forman ya que en presencia de As pentavalente, éste se une a la adenosina difosfato en lugar de unirse al fosfato (Hughes, 2002).

Las principales vías de exposición a As son el agua de bebida, los alimentos (principalmente, marisco y pescado), así como la inhalación de aire y polvo contaminados (Orloff et al., 2009). Los efectos de una exposición crónica a As inorgánico producen alteración vascular, hipertensión y enfermedad cardiovascular. También provoca neuropatías periféricas y alteraciones gastrointestinales. Ciertos productos intermedios en su proceso de detoxificación pueden llegar a ser especialmente reactivos provocando procesos carcinogénicos (Hernández y Gisbert-Calabuig, 2004; Jomova et al., 2011). Otros efectos que puede ocasionar son respiratorios, renales y dérmicos, además de originar alteraciones sobre el sistema nervioso central (Rosado et al., 2007).

II.2.2. Cadmio (Cd)

Este metal pesado, al igual que el plomo, tiene una vida media muy alta (20-35 años), lo cual hace que su capacidad acumulativa sea muy importante, uniéndose a diferentes proteínas, especialmente a nivel hepático y, sobre todo, renal. Se ha identificado como una de las causas más probables de enfermedades relacionadas con la exposición a metales pesados (Hu, 2000), de ahí que la agencia norteamericana para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades (ATSDR) sitúe a este metal entre las siete primeras de las 275 sustancias más peligrosas presentes en el medio ambiente (ATSDR, 1999). Su acción más característica es la alteración de la función renal a nivel del túbulo proximal (Ruiz et al., 2010). La exposición crónica se traduce en la reducción

de la reabsorción tubular de nutrientes; de hecho, la excreción anormal de proteínas de bajo peso molecular (por ejemplo, la β 2-microglobulina o la proteína de unión al retinol) y calcio o fosfato, entre otros, hacen que se llegue a una pérdida progresiva de masa ósea pudiéndose originar debilidad, dolor y lesiones óseas (cuadro típico de osteomalacia). Además, la pérdida de glucosa acentúa los síntomas diabéticos. Otro de los efectos característicos de la exposición crónica a Cd es una elevación de la presión arterial unida a daños en los vasos sanguíneos que pueden generar una enfermedad arterial periférica. El Cd es también un reconocido carcinógeno sobre todo a nivel pulmonar cuando la absorción es por vía inhalatoria, aunque también existe evidencia que está relacionado con otros tipos de cáncer como el de mama. Otros efectos incluyen alteraciones del sistema inmune, hígado y testículos, además de resultar neurotóxico (Gil y Gisbert-Calabuig, 2004; Cao et al., 2009; Satarug et al., 2010). La exposición a este metal puede ocurrir desde edades muy tempranas, siendo las principales fuentes de exposición para la población infantil la comida, el humo del tabaco (fumadores pasivos) y el polvo doméstico.

II.2.3. Manganeso (Mn)

El Mn es el quinto metal más abundante y el duodécimo elemento más abundante de la tierra. En la industria es enormemente empleado en la producción de hierro y acero y en los procesos de fundición (ferromangánica). El óxido de Mn es ampliamente empleado como fertilizante y en la industria de la cerámica. La mayor parte del Mn en sangre se une a los eritrocitos (Gil y Gisbert-Calabuig, 2004; Gil, 2012). Es un elemento esencial para el organismo e interviene en la formación de tejidos y de hueso. Presenta gran actividad bioquímica en el metabolismo de glúcidos, ácidos grasos y como cofactor de diversas enzimas entre las que se encuentra la superóxido-dismutasa. De hecho, su déficit dietético en humanos se ha asociado a la aparición de dermatitis, al aumento de las concentraciones séricas de calcio y fósforo, y a una mayor actividad de la fosfatasa alcalina lo que sugiere una reabsorción ósea. Incluso se han observado bajos niveles cerebrales de Mn en epilépticos (Lee, 2000). Está implicado en el sistema inmune habiéndose relacionado con la prevención del cáncer.

Sin embargo, dependiendo de la ruta y la dosis de exposición, se acumula en el organismo y especialmente en el cerebro ocasionando daños neurológicos (Menezes-Filho et al., 2009; 2011), especialmente tras la exposición crónica, siendo los niños y recién nacidos particularmente susceptibles a los efectos neurotóxicos del Mn, debido al desarrollo del cerebro y del sistema nervioso central, y a la capacidad del Mn ambiental para atravesar la barrera hemato-encefálica y acumularse en el cerebro (Aschner, 2006; Elder et al., 2006). El manganismo origina un cuadro neurológico similar a la enfermedad de Parkinson (seudoparkinsonismo) con idénticos síntomas (temblor intencional de grandes oscilaciones, rigidez muscular, ataxia, etc.), aunque las lesiones neurológicas se producen en zonas diferentes a las afectadas en el Parkinson clásico. Otros efectos tóxicos relacionados con la exposición crónica a Mn son la disminución en la fertilidad, las alteraciones en el desarrollo fetal, el hipertiroidismo, la fiebre y posibles efectos a nivel cardiovascular (Gil y Gisbert-Calabuig, 2004; Crossgrove y Zheng, 2004).

II.2.4. Mercurio (Hg)

El Hg se encuentra de forma natural en la corteza terrestre, sin embargo, un porcentaje considerable de este metal (aproximadamente el 70%) tiene un origen antropogénico (Davidson et al., 2004; Marques et al., 2007). Es un metal pesado tóxico y su biomagnificación en las cadenas alimentarias acuáticas se ha convertido en un problema global (Mergler et al., 2007; NRC-*National Research Council*, 2000) como resultado de su capacidad para ser transportado a través de la atmósfera y ser depositado lejos de su fuente inicial de emisión, su metilación microbiana a metilmercurio (MeHg) en el sedimento acuático (Benoit et al., 2003) y la bioacumulación y biomagnificación posterior del mismo en las redes alimentarias acuáticas. Esta combinación ha dado como resultado concentraciones elevadas de Hg en el pescado incluso en áreas remotas, lejos de las fuentes principales de liberación del contaminante y en regiones con bajos niveles de dicho metal en las aguas superficiales y sedimentos acuáticos (Evans et al., 2005). La exposición a este metal puede producirse a través de amalgamas dentales, termómetros, conservantes de

vacunas y productos cosméticos, entre otros, además del procedente de la emisión de combustibles fósiles. No obstante, la principal fuente de exposición de la población al Hg es el consumo de pescado contaminado con metil-mercurio (su forma química mayoritaria) (EPA, 2003), procedente sobre todo de aquellas especies grandes de pescado azul (Ramón et al., 2008; 2009; Olmedo et al, 2013). Esta forma orgánica tiene una gran afinidad por los grupos sulfhidrilo lo que induce interferencias con las funciones de numerosas estructuras celulares y subcelulares. Por otro lado, el Hg aumenta la susceptibilidad al daño sobre el sistema nervioso a bajas dosis (Jensen et al., 2005). Sus principales efectos crónicos conllevan daños en el sistema nervioso central (SNC), especialmente en el caso de fetos, recién nacidos y niños, debido a la vulnerabilidad de su sistema nervioso en desarrollo y que incluyen, entre otros, un posible déficit en la función motora en los niños hasta los 14 años, así como deterioro pulmonar y renal (Counter y Buchanan, 2004; Murata et al., 2004). El Hg interfiere en la transcripción del ADN y en la síntesis de proteínas, incluidas aquellas que participan en procesos de desarrollo neuronal, con destrucción del retículo endoplasmático, ocasionando la desaparición de ribosomas (Berlin et al., 2007). Asimismo se ha observado la alteración de numerosos elementos subcelulares del SNC y de otros órganos. Se incluyen de este modo efectos adversos sobre la integridad de las membranas, generación de radicales libres, perturbaciones en los neurotransmisores, etc. Todo ello provoca daños no solo en el sistema nervioso central, sino también del sistema nervioso periférico. Aparte de los efectos neurológicos, el metil-mercurio (MeHg) causa alteraciones del sistema inmune al reducir la actividad de las células Natural Killers así como desequilibrios en los balances de células Th1 y Th2 favoreciéndose la autoinmunidad (De Vos et al., 2007). Otros efectos incluyen trastornos en el proceso de reparación del ADN así como su posible efecto destructor de la membrana mitocondrial (Villanueva, 2004a; Bernhoft, 2012).

II.2.5. Plomo (Pb)

El Pb es uno de los metales pesados más estudiados y del cual se han divulgado más sus efectos tóxicos debido a que se considera uno de los más perjudiciales para la

población infantil. Aunque el resto de metales pesados anteriormente mencionados podrían ser al menos igual de tóxicos, sus efectos han sido menos descritos (Counter y Buchanan, 2004). Actualmente su principal forma tóxica es la inorgánica ya que la orgánica, tradicionalmente más frecuente, es decir el tetraetilato de plomo, y que fue ampliamente usada como antidetonante en gasolinas, está actualmente prohibida por su enorme impacto nocivo a nivel medioambiental, como ya se ha descrito. El Pb tiene como principales dianas de actuación las enzimas que participan en la síntesis del grupo hemo, inhibiendo su formación y provocando una anemia muy característica (Piomelli, 2002; Villanueva, 2004b). La exposición crónica interfiere con las enzimas dependientes de calcio, incorporándose este metal pesado al tejido óseo a nivel de las epífisis de los huesos largos (unión selectiva por afinidad química). Este hecho, unido a su lenta excreción, acentúa su carácter acumulativo cuya vida media es aproximadamente de 10 años (Philip y Gerson, 1994). Desde el punto de vista tóxico, causa la degeneración de los axones motores y la desmielinización de las neuronas traduciéndose esto en encefalopatías crónicas y neuropatías periféricas. En niños, los daños neuropáticos se traducen en una disminución de su capacidad intelectual, baja capacidad de concentración y torpeza en ciertas habilidades manuales (a la hora de jugar, etc.) (Papanikolaou et al., 2005). La exposición crónica a Pb puede causar nefropatías que cursan con fibrosis del tejido intersticial, reducción del filtrado glomerular y azoemia, llegando a ser estos daños en determinadas ocasiones irreversibles. Otros efectos del Pb incluyen el aumento de la presión sanguínea, alteraciones gastrointestinales y reducción en la cantidad (oligospermia-azoospermia) y movilidad (astenospermia) de los espermatozoides (Villanueva, 2004b; Rosin, 2009).

El contacto de los niños con estos metales, en la mayoría de los casos, se produce desde el periodo fetal, por la propia exposición de la madre durante el embarazo, así como por la movilización de los distintos compuestos tóxicos que ocurre desde los tejidos maternos (esencialmente, hueso y tejido adiposo) durante el embarazo y en etapas posteriores, como la lactancia. En la actualidad, se considera que la exposición de la población infantil al Pb tiene lugar principalmente a través de la comida y las especias (mayoritariamente importadas), juguetes de baja calidad cuya pintura pudiera contener compuestos de Pb o a través de ciertas hierbas empleadas en

medicina alternativa (Bellinger, 2008). Sin embargo, y aunque durante bastante tiempo, las principales fuentes de exposición al Pb fueron la combustión de la gasolina, las tuberías de Pb y la pintura de uso doméstico, actualmente todas ellas se han eliminado lo que ha supuesto una reducción sustancial de la exposición en la población durante los últimos años, incluida la infantil (Bridbord y Hanson, 2009).

II.3. LA BIOMONITORIZACIÓN EN TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Los seres humanos están expuestos a una gran variedad de productos químicos que se liberan al medio ambiente como consecuencia de actividades antropogénicas. En las últimas décadas, la biomonitorización humana (*Human Biomonitoring* o HBM) se ha utilizado cada vez más para reflejar la relación entre la exposición al medio ambiente, la carga corporal de determinados xenobióticos y los posibles efectos adversos de éstos para la salud (Černá et al., 2012). La población general y concretamente la infantil, se encuentra expuesta tanto a fenómenos naturales como a aquellos provocados por el hombre como ya se ha indicado con anterioridad, de manera que puede verse afectada por las sustancias químicas contenidas en el aire, en los alimentos, en el agua, etc. La biomonitorización es una forma efectiva de proporcionar información básica sobre los niveles de exposición a contaminantes químicos ambientales ya que permite la medida directa de las sustancias químicas o de sus metabolitos en fluidos o tejidos biológicos tales como el cabello, la orina, la sangre, etc. Además constituye un método válido para la evaluación del riesgo y la salud, siendo del máximo interés para aquellas poblaciones más vulnerables, como lo es la población infantil (Angerer et al., 2007). Por otro lado, los niños y adolescentes son grupos poblacionales especialmente interesantes para llevar a cabo en ellos los programas de biomonitorización destinados a medir la evolución temporal de la exposición ambiental, debido a que no están expuestos ocupacionalmente (Link et al., 2007).

Esta evaluación permite realizar una adecuada vigilancia de la salud así como conocer si un determinado colectivo, en nuestro caso, la población infantil, sufrirá las

consecuencias nocivas derivadas de la exposición a dichos contaminantes, y en nuestro caso particular, a metales pesados.

II.3.1. Indicadores biológicos o biomarcadores

Un biomarcador sería un parámetro que se cuantifica en un medio biológico procedente del niño (cabello, 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 en el que se encuentre. La medida puede indicar una exposición reciente o la cantidad total del agente acumulada en el organismo, denominada carga corporal total.

En un amplio sentido del término, el concepto de biomarcador incluye la presencia de un contaminante en un medio biológico, en nuestro caso, del niño 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) (Gil y Hernández, 2009; Hernández et al., 2014). En nuestro trabajo, cobra especial relevancia la exposición a largo plazo.

Según Silbergeld y Davis (1994) un biomarcador representa 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.

Sin embargo, la biomonitorización también presenta sus limitaciones. Por un lado, 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, o el biomarcador en cuestión es susceptible de alterarse por exposición a múltiples contaminantes como puede ocurrir, por ejemplo, con la afectación de enzimas de estrés oxidativo.

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, y 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.4. LA ORINA Y EL CABELLO COMO MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES Y METALOIDES

La inmensa mayoría de los biomarcadores de exposición frente a metales pesados se determinan en sangre o en orina. La orina es una muestra bien aceptada y relativamente fácil de obtener en la población infantil, aunque hay que tener en cuenta que los niveles de creatinina y de densidad se encuentren dentro de la normalidad (Horng et al., 2002). Sin embargo, no ocurre igual con la sangre donde las extracciones suponen un método cruento, no bien aceptado. En niños la corrección de los niveles de metales en orina por creatinina suele plantear algún problema y muchos autores recomiendan el uso de la densidad en lugar de normalizar los valores empleando la creatinina (Barr et al., 2005).

Por ello, consideramos de utilidad la búsqueda de nuevos fluidos, medios biológicos o muestras adicionales o alternativas donde valorar la exposición a metales pesados, constituyendo una alternativa el cabello (Ashraf y Jaffar, 1997).

La determinación del nivel de elementos traza en el cabello se ha usado para evaluar la exposición ambiental y ocupacional a ciertos tóxicos durante más de 50 años (Pereira et al., 2004). 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 exposiciones ambientales) 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 las muestras de sangre y orina. Otras ventajas adicionales del pelo son el hecho de ser 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 o especializado para su recolección (Bermejo-Barrera et al., 2000; Chojnacka et al., 2006; Evrenoglou et al., 2013; Wolowiec et al., 2013). Por lo tanto, se pueden lograr adecuadas tasas de respuesta en subgrupos de población en los cuales es difícil obtener muestras de sangre, como pueden ser los niños (McDowell et al., 2004).

Otros autores han propuesto el uso del cabello 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 cabello es indicativo de exposición crónica (Bencko, 1995; Chojnacka et al., 2006). Ello permite evaluar la exposición pasada y presente derivada de la exposición a altos niveles de metales (Sera et al., 2002; Gellein et al., 2008). Una ventaja adicional es la posibilidad de almacenar alícuotas de cabello fácilmente y que podrían servir para posibles comprobaciones futuras de enorme interés en Toxicología forense.

Además, el cabello es una muestra biológica de fácil obtención, con un mínimo coste y de fácil transporte y conservación en el laboratorio (Chojnacka et al., 2006; Esteban y Castano, 2009).

Todas estas ventajas hacen que este tipo de muestra sea enormemente atractiva para el estudio de metales pesados en la población infantil, empleándose en ocasiones como una muestra útil para investigaciones preliminares de niños en edad escolar (Sanna et al., 2003).

Sin embargo, también existen limitaciones en uso del cabello en la biomonitorización de metales, que residen esencialmente en la capacidad para distinguir entre la deposición endógena y exógena (Chojnacka et al., 2005), es decir, qué parte de los niveles del metal tendrían un origen endógeno (absorbido a través de la sangre e incorporado a la matriz del pelo) y qué otra correspondería a una posible contaminación exógena secundaria por ejemplo, a tratamientos capilares, etc..., de manera que esta última pudiera contribuir al incremento de la concentración total de metales (ATSDR, 2001). Teóricamente esta limitación es superada en el proceso de lavado de la muestra si éste es realizado de acuerdo a procedimientos validados (Olmedo et al., 2010). Por otra parte, la alteración de la estructura de la vaina de queratina facilita la penetración de los factores endógenos en el interior del cabello produciendo falsos positivos.

Los principales determinantes de la concentración de metales en el cabello suelen ser, además de la exposición ambiental, la edad, el sexo, el color, el hecho de ser fumador activo, o en nuestro caso (población infantil) pasivo, la dieta, los hábitos de vida y las variaciones estacionales, entre otros (Teresa et al., 1997). También es importante tener en cuenta la región en la toma de muestra (usualmente de la zona occipital) y podría considerarse el análisis segmentario del cabello ya que se han descrito variaciones importantes entre la concentración de metales en la región proximal y distal, permitiendo así valorar la exposición a corto y largo plazo (Renshaw et al., 1976; Wolowiec et al., 2013).

Así mismo, la investigación de los elementos traza en cabello se ha relacionado con el diagnóstico de diversas enfermedades, entre ellas, el cáncer. La investigación médica utiliza el cabello para diagnosticar las condiciones de la enfermedad y para definir las relaciones entre las concentraciones de metales y diversas enfermedades (Khalique et al., 2006; Unkiewicz-Winiarczyk et al., 2009). Así, en Toxicología forense

examinan el cabello para descubrir formas de intoxicación debido a la ingesta de dosis anormales de metales (Kintz et al., 2002; Lugli et al., 2011), ambientalistas tratan de identificar las áreas contaminadas que requieren mayor atención debido a la posible exposición de la población residente a ciertos metales, e higienistas laborales tratan de determinar la exposición ocupacional a nivel industrial (Sanna et al., 2008; Chojnacka et al., 2010; De Prisco et al., 2010). Según la Agencia de Protección Medioambiental americana (EPA), el cabello es uno de los materiales biológicos más importantes para llevar a cabo la vigilancia del medio ambiente (Morton et al., 2000). Es una muestra biológica fiable, conveniente y permite estudiar la exposición ambiental y laboral, e incluso evaluar el estado nutricional y corporal de elementos esenciales (Ca, Mg, Mn, Zn, etc.) y tóxicos (Cd, Pb,...) (Bermejo-Barrera et al., 2002).

Por todo lo anteriormente descrito, la orina y el cabello son algunos de los materiales biológicos más frecuentemente analizados para determinar los niveles de numerosos metales (Barbosa et al., 2005).

Respecto a la determinación de metales en cabello y orina, existen numerosos estudios que determinan los metales objeto de estudio en la presente memoria de Tesis Doctoral y que incluye As, Cd, Hg, Mn y Pb en la población infantil.

El As absorbido se excreta principalmente a través de la orina, con una vida media de aproximadamente 4 días (WHO, 2001), mientras que el cabello puede recoger la exposición que tuvo lugar varios meses antes de la recolección. La exposición excesiva a través del agua potable o los alimentos puede conducir a niveles elevados de As en la orina (Hughes, 2006; Uchino et al., 2006).

Los niveles de Cd en sangre y en orina han sido y son los bioindicadores más utilizados en la actualidad. El Cd en sangre, considerado como el mejor biomarcador, puede ser empleado para conocer la exposición reciente a este metal tanto a nivel laboral como ambiental (Lauwerys et al., 1994). Sin embargo, dicha concentración 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 Cd (Svartengren et al., 1986). La orina constituye, junto con la sangre, la mejor muestra para determinar la

exposición al Cd y permite además tener información de exposición crónica (carga corporal) (Järup, 2003). Numerosos estudios han encontrado una elevada correlación entre los niveles de Cd en sangre y en orina (Bérghlund et al., 1994; Akesson et al., 2002; Vahter et al., 2007; Kippler et al., 2007).

En el caso del Hg, el MeHg se distribuye en todos los tejidos del organismo y se acumula en el cabello. Por otro lado, y a diferencia de la sangre que aporta una estimación de la exposición a corto plazo, el cabello refleja la exposición media a dicho metal durante el período de crecimiento del mismo. De este modo, la concentración de Hg en el cabello se utiliza con frecuencia como un biomarcador para la evaluación fiable de la exposición a MeHg. Así, la relación sangre-cabello ha sido estimada en aproximadamente 250:1 (EPA, 2001). Una vez incorporado en el cabello, el Hg es estable y puede proporcionar un historial de exposición (IPCS, 1990). El cabello crece a una tasa aproximada de 1 cm al mes. Debido a que la vida media de MeHg en el organismo es de aproximadamente 1,5-2 meses (Smith y Farris, 1996), el pelo más cercano al cuero cabelludo refleja las exposiciones recientes, que también contribuyen a la concentración en sangre (Grandjean et al., 2003). De ahí que el análisis de Hg en el cabello sea el biomarcador preferido para la evaluación de la exposición a este metal durante largos períodos de tiempo (Bencko, 1995). Por ello, los niveles de Hg en el cabello han resultado ser indicadores adecuados de la exposición procedente de la dieta, del medio ambiente y a nivel ocupacional.

A pesar de la controversia derivada por el uso del cabello en la evaluación de la exposición a Mn debido a la posible contaminación de origen exógeno (por ejemplo, en la industria de la soldadura, etc...) durante el análisis del cabello y la falta de valores de referencia (ATSDR, 2000; Gil et al., 2011), el cabello se considera útil para evaluar la exposición crónica al Mn, debido a que dicho metal se une a los componentes del mismo y, por lo tanto, puede ser retenido y acumulado en los casos de exposición prolongada (Bouchard et al., 2007).

La concentración de Pb en sangre es el biomarcador más extendido para determinar la exposición reciente a dicho metal (Barbosa et al., 2005). No obstante, es relevante encontrar nuevas muestras adicionales o alternativas de biomonitorización

para la población expuesta, como el cabello, que permitan la evaluación de la exposición a largo plazo (intoxicación crónica). Además, la recolección de muestras de cabello es un método no invasivo que se puede repetir después de períodos razonablemente cortos sin riesgo de rechazo por los sujetos. Esto hace que dicha muestra sea más aceptable como método de muestreo, especialmente en los estudios que afectan a niños, donde las muestras invasivas usualmente conducen a una menor tasa de participación (Sanna et al., 2003).

II.5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS (Cd, Mn, Hg y Pb) Y METALOIDES (As) EN ORINA Y CABELLO

Los procedimientos analíticos más comunes para medir concentraciones de arsénico, cadmio, manganeso, mercurio y plomo en muestras biológicas son la espectrofotometría de absorción atómica (EAA). En la EAA la muestra se calienta por medio de una llama, se transporta a una célula de cuarzo (en el caso de la generación de hidruros, con o sin precalentamiento de la misma en el caso del arsénico o el mercurio, respectivamente) 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.

II.5.1. Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (Cd, Mn y Pb)

Este es el método más usado en la actualidad para la determinación de metales que incluyen el Cd, Mn y Pb, al ser relativamente simple y rápido, y poseer un límite de detección suficiente para la mayoría de las muestras biológicas y medioambientales. Su límite de detección (LOD) es muy superior al de la llama, por lo que para muestras con concentraciones de metales más bajas, será necesaria su utilización. 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 ha sido necesaria la digestión previa en horno microondas en el caso del cabello.

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 alterada 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 Cd (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 de diversos metales, y muy especialmente, del Cd, Mn y Pb, 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, máxime 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 y tejidos 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 actualmente límites de detección del orden de $\mu\text{g/l}$ (Olmedo et al., 2010).

II.5.2. Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (As y Hg)

Es sin duda el método más usado para la determinación de As y Hg en distintas matrices y muy especialmente en muestras biológicas. A su vez, se puede acoplar a un análisis por inyección en flujo (FIAS), obteniendo así mayor rapidez e inferiores límites de detección (Samanta y Dhakraborti, 1997). En ambos casos se emplea borohidruro sódico que será el encargado de formar el hidruro correspondiente. Para la formación de las arsinas, se requiere además del calentamiento de la célula de cuarzo a 800°C aproximadamente, que el As esté en su valencia más baja, por lo tanto, para la pre-

reducción de As(V) a As(III) se pueden utilizar diferentes reactivos entre los que destaca la mezcla ioduro potásico/ácido ascórbico (Guo et al., 1997).

II.6. 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 idóneo 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 UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 (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 para la determinación de As, Cd, Mn, Hg y Pb en los dos tipos de muestras a emplear en el presente estudio (orina y cabello), ha sido 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. Dicha validación fue llevada a cabo en estudios previos (Gil et al., 2006; Olmedo et al., 2010).

II.7. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO, CADMIO, MANGANESO, MERCURIO Y PLOMO EN ORINA Y CABELLO PROCEDENTE DE POBLACIÓN INFANTIL. ESTUDIOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

II.7.1. Introducción

Desde la década de 1990 han sido reconocidos y estudiados por varias organizaciones nacionales e internacionales algunos de los problemas de salud probablemente relacionados con el medio ambiente que rodea a la población infantil. Una revisión realizada por Woodruff y colaboradores (2004) destacó el papel de los factores ambientales en tres grupos de patologías de especial trascendencia en la infancia: el cáncer, las enfermedades respiratorias y los trastornos del neurodesarrollo.

La contaminación por metales pesados está considerada como un grave problema de salud pública, de manera que el aumento de los niveles de dichos tóxicos puede producir tanto efectos directos (intoxicaciones) como indirectos sobre la población (Grabeklis et al., 2011). Ciertos metales como Cd, Hg, Mn y Pb y algunos metaloides como el As, tienen la capacidad de bioacumularse pudiendo originar una amplia variedad de alteraciones que dependerán de la concentración que alcancen y de la duración de la exposición. Como ya se indicó, las vías de absorción más frecuentes suelen ser la respiratoria, la cutánea y la digestiva, ésta última de notoria importancia en el caso de los niños. A partir de cualquiera de estas vías, los tóxicos se distribuyen en el organismo a través de la sangre y podrán ser excretados a través del sudor, el cabello, la orina o las heces (Apostoli, 2002; Lee et al., 2000).

La población infantil es un colectivo prioritario en materia de salud pública ya que se trata de un grupo de población sensible respecto de patologías provocadas por metales pesados (por ejemplo, Pb y Hg) entre las que se incluyen alteraciones neurotóxicas, muchas de las cuales son enormemente sutiles (deterioro intelectual, cambios en el comportamiento, trastornos de hiperactividad por déficit de atención, alteraciones en la coordinación psicomotora, déficits sensoriales, déficit en el lenguaje y la atención, retraso mental, desestructuración temporo-espacial, etc...), renales, sexuales, etc... (Barbosa et al., 2005; Pinheiro et al., 2007; Callan et al., 2012; Rodríguez-Barranco et al., 2013).

Los niños, en relación a los adultos, muestran un patrón de respuesta diferente respecto al riesgo ambiental derivado de la exposición a contaminantes siendo especialmente vulnerables a sufrir patologías relacionadas con dichos tóxicos de modo que la prevención de la contaminación es un tema prioritario para evitar el desarrollo de patologías en los niños. Además, la exposición relativa a tóxicos en niños es mayor que en los adultos en función del peso corporal, por lo que algunos estudios están especialmente centrados en dicha población diana (Schulz et al., 2009). Asimismo, los niños son más vulnerables a los efectos tóxicos de los metales pues presentan un menor desarrollo de la barrera hemato-encefálica, lo que puede determinar una mayor facilidad de los tóxicos para alcanzar el sistema nervioso (Jarup, 2003; Gil, 2012). Por otra parte, los niños presentan tendencias concretas de comportamiento, como una mayor actividad mano-boca, capaz de incrementar su nivel de exposición, haciendo especialmente relevante la absorción por vía digestiva (Moya et al., 2004). En muchos casos, son más sensibles a la exposición a metales (por ejemplo, al Pb) puesto que el porcentaje absorbido por vía digestiva (tracto gastro-intestinal) de éstos suele ser mayor que en los adultos. Además, se ha estimado que los niños inhalan 2-3 veces más Pb por unidad de peso que la población adulta a consecuencia de un mayor índice metabólico acompañado usualmente de una mayor actividad física (Sanna et al., 2003).

Dada la preocupación existente por valorar la contaminación ambiental y los efectos de la misma sobre la población, incluida la infantil, se han llevado a cabo estudios entre los que destaca el NHANES (Encuesta Nacional sobre Nutrición y Salud) realizado en Estados Unidos con el propósito de obtener datos relevantes (incluyendo valores de referencia) sobre aspectos nutricionales y de salud y donde se han recogido diversas muestras biológicas de cara a valorar la posible exposición a contaminantes ambientales, incluyendo los metales pesados (Calafat, 2012).

La biomonitorización en niños, por tanto, constituye una herramienta útil en la formulación de políticas de salud ambiental, siendo un método enormemente válido para identificar contaminantes críticos en poblaciones especialmente susceptibles, como lo es la infantil (Needham et al., 2005). Resulta de especial interés establecer valores de referencia máximos en población infantil frente a contaminantes

ambientales, hecho que ha sido objeto de estudio en la IV Encuesta Ambiental Alemana (GerES IV) (Schulz et al., 2009) como se comentará posteriormente, aún cuando la información sobre la exposición a agentes químicos en niños es relativamente limitada en algunas muestras biológicas como, por el ejemplo, el pelo.

En este sentido, hay cuatro programas particularmente relevantes: dos estudios alemanes, uno llevado a cabo en el Estado Federal de Baden-Wuerttemberg, en el suroeste de Alemania (Gabrio et al., 2005; Link et al., 2005; 2007) y otro en el de Renania del norte-Westfalia (Wilhelm et al., 2007), así como otros dos realizados en Estados Unidos; por un lado, la Exposición Humana a Químicos Ambientales (NHANES III) y por otro, uno realizado en Minneapolis que evaluó 50 tóxicos ambientales en niños (Sexton et al., 2006).

Otros trabajos interesantes realizados en Europa son el estudio de impacto ambiental de la contaminación realizado en la República Checa (Kliment et al., 1997), el estudio de exposición a contaminantes ambientales en Europa EXPOLIS (Jantunen et al., 1998) y el estudio de Biomonitorización Humana realizado en Bélgica (Schoeters et al., 2006; 2011).

Los niños presentan especial interés de cara a realizar programas de monitorización debido a que usualmente no están expuestos directamente a tóxicos ocupacionales; por ello, son capaces de reflejar los patrones de contaminación del medio ambiente con mayor precisión que la población adulta, aun cuando los niños presentan un mayor riesgo potencial frente a los posibles efectos adversos de los tóxicos, de ahí que actualmente se estén desarrollando más estudios sobre este colectivo poblacional (Trejo-Acevedo et al., 2009).

No hay que olvidar que el *screening* o cribado de metales en el contexto de los programas de biomonitorización persigue tres objetivos esenciales: a) identificar poblaciones de alto riesgo; b) vigilar la población general de cara a prevenir un incremento de la exposición basal; y por último, c) evaluar los programas de intervención desarrollados para reducir la exposición. Sin duda, la biomonitorización de tóxicos a gran escala, constituye la primera etapa en la prevención de patologías

secundarias a exposición a contaminantes químicos en población especialmente susceptible (Trejo-Acevedo et al., 2009).

Asimismo, la toxicidad crónica de diversos carcinógenos, entre los que se hallan el As y el Cd, son del máximo interés en la población infantil. La exposición crónica a Cd, como ya se indicó en otro apartado de la introducción, causa una amplia diversidad de problemas de salud en adultos, incluidos los efectos renales, óseos, endocrinos y el cáncer (Järup y Åkesson, 2009; Satarug et al., 2010), siendo muy limitados los estudios que incluyen a la población infantil (Schoeters et al., 2006). El Cd en orina es reconocido como un biomarcador de exposición crónica y se relaciona con su acumulación en el riñón, con una vida media de 10 a 30 años (Järup y Åkesson, 2009). Altas concentraciones de Cd en niños de edades comprendidas entre los 5 y los 14 años se han asociado a inmunodepresión (Ritz et al., 1998). Asimismo estudios experimentales han puesto de manifiesto un aumento en la susceptibilidad a efectos tóxicos sobre el sistema inmune especialmente durante estadios precoces del desarrollo (Pillet et al., 2005).

Ciertos autores han demostrado un incremento en el daño al ADN de niños expuestos a As así como efectos sobre el desarrollo neuroconductual en adolescentes (Tsai et al., 2003).

Por otra parte, no habría que olvidar que el suelo es una de las fuentes de exposición a metales más importantes a consecuencia de actividades mineras, emisiones procedentes de fundiciones, etc... Esto determina, en gran cantidad de ocasiones, que la concentración de metales en áreas urbanas ubicadas en vecindad de dichas actividades, muestren niveles más elevados de contaminación. Teniendo en cuenta que una de las principales vías de exposición la constituyen el suelo y el aire y considerando aspectos toxicocinéticos de los contaminantes en general, es fácil asumir que tanto los niños como las gestantes constituyen grupos de especial riesgo frente a dichos contaminantes (Carrizales et al., 2006).

II.7.2. Estudios nacionales e internacionales que evalúan la exposición a As, Cd, Mn, Hg y Pb en orina procedente de población infantil

II.7.2.1. Arsénico

El arsénico (As) es un elemento que se encuentra presente en la naturaleza aunque frecuentemente es liberado al ambiente a través de procesos industriales, entre ellos, la fundición de cobre. Es un conocido carcinógeno humano, siendo especialmente susceptible la población infantil (ATSDR, 1993; Beyersmann y Hartwig, 2008). Existe una creciente evidencia de los efectos nocivos del As sobre la función intelectual de los niños (Rosado et al., 2007; Rodríguez-Barranco et al., 2013), de manera que algunos estudios han demostrado una relación inversa entre la exposición crónica a As y el coeficiente intelectual verbal, el desarrollo del lenguaje, la comprensión verbal y la memoria a largo plazo, entre otros, de los niños (Calderón et al., 2001).

La mayoría de los estudios que han valorado la exposición a As en la población han sido realizados en ambientes contaminados y con una exposición relativamente alta, sin embargo, han sido escasos los análisis que han abordado los factores que influyen en la exposición crónica y por tanto, en la exposición a dosis relativamente bajas durante un largo periodo de tiempo (Saoudi et al., 2012).

Erdinger et al. (2004) en Kazajstán llevaron a cabo una investigación en la cual midieron los niveles de As en la orina de la población infantil residente en dos lugares distintos (Aralsk, n=27 y Akchi, n=27), con el fin de analizar la contaminación a la que estaban sometidos los niños. Se obtuvieron medias aritméticas (MA) y medianas (ME) de As de 6,44 y 5,55 µg/l en Aralsk y de 9,56 y 9,40 µg/l en Akchi, respectivamente.

En otro estudio realizado en San Luis Potosí (México), se analizaron los niveles de As total en orina de niños (3-11 años) que residieron al menos dos años en un radio de 1,5 km respecto a las fundiciones (especialmente, metalúrgicas de cobre-arsénico), observándose una relación inversa entre los niveles de As y la distancia a las mismas (Carrizales et al., 2006). Las medias geométricas (MG) en los grupos de edad considerados (3-6; 6-7; 8-9 y >9) fueron de 44, 51, 80 y 46 µg/g de creatinina,

respectivamente. No obstante, ningún grupo superó el nivel de acción propuesto por la OMS, cifrado en 100 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, y salvo el grupo de 8-9 años de forma notoria, tampoco el resto presentaron niveles por encima del nivel de acción propuesto por el CDC (Centro para el Control de Enfermedades Americano) (CDC, 2005).

Rocha-Amador y colaboradores (2007), midieron los niveles de As en orina en 132 niños de 6 a 10 años de edad, residentes en tres comunidades rurales de México (Moctezuma, Salitral y 5 de Febrero), obteniendo una MG de 12,6, 116 y 52,5 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente. Dichos resultados mostraron una asociación inversa con el coeficiente intelectual, lo que denota claramente el papel neurotóxico del As.

Rosado et al. (2007) analizaron As en la orina de 602 niños (entre 6 y 8 años), que asistían a escuelas situadas a 3,5 km de un complejo de fundición metalúrgica en la ciudad de Torreón (México). La MA obtenida fue de 58,1 $\mu\text{g/l}$. El 52% de la población infantil mostraron niveles $> 50 \mu\text{g/l}$ y el 10% estuvieron por encima de 100 $\mu\text{g/l}$. Se observaron diferencias significativas en cuanto al género y la edad, siendo superiores en niños (63,5 $\mu\text{g/l}$ vs 51,7 $\mu\text{g/l}$) y en aquellos más pequeños (6 años) en relación con los de 7-8 años (61,7 $\mu\text{g/l}$ vs 54,3 $\mu\text{g/l}$).

En el estado federal de Baden-Wuerttemberg, en el sur de Alemania, se evaluaron los niveles de As en orina en un total de 5.470 niños con edades comprendidas entre 9 y 11 años. Se consideraron como factores determinantes más relevantes el lugar de residencia (dos ciudades importantes, una ciudad pequeña y un área rural), la presencia de amalgamas dentales y el consumo de pescado. La mediana (ME) fue 4,6 $\mu\text{g/l}$ y la MA de 6,7 $\mu\text{g/l}$, observando una clara influencia del consumo de pescado durante las últimas 48 h (Link et al., 2007).

Algunos estudios han permitido establecer valores de referencia poblacional como por ejemplo la IV Encuesta Ambiental Alemana (GerES IV) realizada sobre 1.734 niños (3-14 años) residentes en 150 localizaciones diferentes y que fue llevada a cabo durante los años 2003 al 2006. En ésta se obtuvo un valor de referencia máximo de 15 $\mu\text{g/l}$ para As en orina. Se hizo la distinción entre aquellos niños que no consumieron pescado en las 48 h anteriores a la toma de la muestra (1.487) y los que lo

consumieron (231), obteniendo una ME de 4.3 y 6.2 $\mu\text{g/l}$, respectivamente, lo que puso claramente de manifiesto la relación directa con dicho consumo (Schulz et al., 2009). No obstante, estas cifras fueron inferiores a las obtenidas en estudios previos (Schulz et al., 2007) lo que hablaría a favor, sobre todo, de la reducción generalizada de la exposición a contaminantes ambientales en los últimos años.

Wasserman et al. (2006 y 2007) midieron los niveles de As en la orina de la población infantil (10 años) residente en Araihasar (Bangladesh) con el fin de evaluar la posible relación de éstos con las concentraciones obtenidas en el agua de consumo y la función intelectual de los niños. La concentración media (MA) de As en la orina fue de 57,5 $\mu\text{g/l}$ (133,0 $\mu\text{g/g}$ de creatinina).

Méndez-Gómez y colaboradores (2008) midieron los valores de As en la orina de 65 niños (6-11 años), que asistían a tres colegios distintos en la Región Lagunera (México). Se obtuvieron concentraciones (ME) de 143,0, 100,0 y 115,0 $\mu\text{g/l}$ siendo claramente superiores en aquellos que asistían al colegio más cercano a una fundición. Igualmente, los resultados mostraron una asociación inversa con la respuesta en la capacidad reparadora del ADN, siendo más lenta en aquellos niños que presentaron niveles de As más elevados.

En Taiwan, Chiang y colaboradores (2008) biomonitorizaron los niveles de As en la orina de población infantil (n=157) residente en tres ciudades del condado de Taichung. Los valores de As obtenidos fueron más elevados en los niños de las zonas sometidas a contaminación, y muy especialmente en una de ellas, en comparación con los obtenidos en la zona control. La MG obtenida para los niños fue ligeramente inferior a la de las niñas (4,01 vs 4,91 $\mu\text{g/g}$ de creatinina), no observándose diferencias significativas atribuibles al género. Sin embargo, y a pesar de la cercanía de una de las ciudades (Longgang) a una central térmica, el As en la orina de los niños no fue excesivamente elevado (7,66 $\mu\text{g/g}$ de creatinina), aunque si el doble del obtenido tanto en Shalach (3,76 $\mu\text{g/g}$ de creatinina) como en la zona que actuó como control - Shuntain- (3,17 $\mu\text{g/g}$ de creatinina).

Banza y cols. (2009) analizaron As en 351 muestras de orina en la población de Katanga (Congo), observando valores más elevados en los sujetos más cercanos a las

zonas mineras. Las MG de As fueron de 3,15, 10,8 y 17,8 $\mu\text{g/g}$ de creatinina para las zonas control, un área situada entre 3 y 10 Km respecto de la zona minera y en aquellas zonas a menos de 3 Km de dicha actividad industrial, respectivamente, siendo estas últimas significativamente más elevadas. No obstante, los resultados obtenidos se encontraron incluidos entre los valores de referencia para la población general americana propuestos por el CDC (CDC, 2005; Paschal et al., 1998).

Por otra parte, Trejo-Acevedo y colaboradores (2009) realizaron una investigación en niños mejicanos. Estos autores refieren una media aritmética (MA) de As en orina para la población infantil (n=229) de 6 a 12 años de 22,35 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, mostrando alrededor del 15% de los niños valores cercanos a 50,0 $\mu\text{g/g}$ de creatinina.

Aguilera y colaboradores (2010), monitorizaron los niveles de As en orina de una población infantil (n=227), con edades entre 5 y 17 años, que residieron durante al menos un año en la Ría de Huelva (suroeste de España), área sometida a polución como consecuencia de la minería y las actividades industriales de la zona, y probablemente una de las zonas más contaminadas de España. Este estudio cobra especial relevancia dado que se trata de la misma zona que se considera en la presente memoria de Tesis Doctoral. Se tomó como referencia un colectivo de 196 niños que vivían en otras ciudades menos industrializadas de Andalucía (Almería, Cádiz, Córdoba, Granada, Jaén, Málaga y Sevilla), no encontrando diferencias significativas entre las concentraciones de As en ambos grupos de población. La MG obtenida fue de 1,36 $\mu\text{g/l}$ (1,60 $\mu\text{g/g}$ de creatinina), siendo similar a la del área control (1,33 $\mu\text{g/l}$; 1,41 $\mu\text{g/g}$ de creatinina), considerándose en ambos casos unos niveles muy bajos respecto de los obtenidos en otros estudios. Los factores determinantes fueron la edad y la frecuencia de ingesta de ciertos alimentos, principalmente pescado y marisco, de manera que las concentraciones de As en orina disminuyeron con la edad. El consumo de ambos grupos de alimentos durante la semana previa a la recogida de las muestras, se asoció significativamente con los niveles elevados de dicho metaloide en orina.

Sakuma et al. (2010) analizaron los niveles de As en la orina de niños entre 7 y 14 años (n=398) residentes en varias localidades brasileñas (Cerro Azul que actuó

como grupo control, áreas urbanas de Ribeira y Adrianópolis, Vila Mota y Serra), obteniendo valores (ME) de 3,60, 6,30, 6,40 y 8,94 $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

En un estudio realizado por Liu y cols. (2010) en las proximidades de una mina abandonada en la ciudad de Shantou, al sur de China, se analizaron las concentraciones de As en 61 muestras de orina en residentes (3-76 años) de siete pueblos diferentes. La MA y ME obtenidas en la población inferior a 20 años, grupo etario más próximo a nuestra población de estudio, fueron de 26,1/28,0 $\mu\text{g/l}$ en varones y 14,8/16,2 $\mu\text{g/l}$ en mujeres, respectivamente. Los resultados indicaron una notable exposición, muy posiblemente debida al consumo de determinados alimentos y a la propia contaminación ambiental de la zona.

En el distrito minero de Taxco (México), Moreno y colaboradores (2010) midieron los niveles de As en orina de 50 niños (6-11 años) residentes en la zona durante al menos cuatro años, obteniendo una MA de 16,5 $\mu\text{g/l}$.

Roy et al. (2011) evaluaron el As en la orina de 526 niños de 6 a 7 años, residentes en áreas cercanas a una fundición en Torreón (México). La ME hallada fue de 55,2 $\mu\text{g/l}$ (7,7-215,9 $\mu\text{g/l}$). El 54% de los niños mostraron niveles inferiores a 50 $\mu\text{g/l}$ y los varones presentaron concentraciones (ME) más elevadas que las niñas (59,4 vs 49,0 $\mu\text{g/l}$). Los resultados se asociaron moderadamente con problemas cognitivos, de comportamiento, trastornos de déficit de atención e hiperactividad, etc.

En Bangladesh se estudiaron las concentraciones de As en la orina de 303 niños (entre 8 y 11 años), que habían consumido agua del mismo pozo durante al menos un año. El valor medio (MA) hallado fue de 78,0 $\mu\text{g/l}$ (246,5 $\mu\text{g/g}$ de creatinina). Los resultados mostraron niveles significativamente más elevados en aquellos niños expuestos a concentraciones de As en el agua superiores a 10 $\mu\text{g/l}$ frente a los expuestos a concentraciones ≤ 10 $\mu\text{g/l}$ (106,6 vs 49,4 $\mu\text{g/l}$). Asimismo, se observó una asociación entre la exposición a concentraciones relativamente bajas de As en el agua de bebida y el desarrollo de alteraciones en la función motora de los niños (Parvez et al., 2011).

Jasso-Pineda et al. (2012) estudiaron un colectivo de 43 niñas y 42 niños, de 4 a 11 años, residentes en San Luis Potosí (México), con el fin de analizar los niveles de As en orina. Distinguieron tres comunidades: una zona minera (n=48), una población urbana cercana a la anterior con una fundición de cobre (n=12) y una superficie agrícola a 200 km de la primera comunidad, sin aparentes fuentes de exposición a metales y que actuaría como control (n=25). Las MG halladas fueron 44,5 µg/g, 16,8 y 12,8 µg/g de creatinina, respectivamente. Se apreció que aquellos niños con mayor exposición (mayor carga corporal), presentaban un mayor daño en el ADN, en comparación con los que tuvieron niveles más bajos de As en orina, lo que indudablemente apoya el papel del As en la alteración de ciertos procesos de reparación del ADN (Méndez-Gómez et al., 2008; Nollen et al., 2009).

Recientemente Gamiño-Gutiérrez y colaboradores (2013) han determinado las concentraciones de As en orina de niños, entre 4 y 10 años, de Villa de la Paz (México) (n=98) y de un área control (n=42), obteniendo una MA y ME de 40,3 y 27,9 µg/g de creatinina en Villa de la Paz, lo que indudablemente contrasta con las concentraciones halladas en el área de referencia (16,3 y 13,1 µg/g de creatinina).

II.7.2.2. Cadmio

El Cd es un metal tóxico, no esencial, ampliamente distribuido en el medio ambiente y cuya exposición, a nivel infantil, tiene lugar, predominantemente, a través de la dieta. La exposición crónica al Cd puede considerarse un problema de salud pública debido a que dicho metal es un conocido carcinógeno, con una larga vida media, el cual se acumula en el organismo causando daños especialmente sobre los riñones (EFSA, 2009; Ruiz et al., 2010). Los estudios de exposición al Cd en niños son relativamente escasos.

Moon et al. (2003) examinaron las concentraciones de Cd en orina de 38 niños coreanos de 4 a 10 años, hallando niveles medios (MG) de 1,69 µg/g de creatinina.

En un estudio realizado en Renania del Norte-Westfalia (Alemania), se evaluó la exposición a Cd en 238 niños, entre 5 y 8 años, que vivían en una ciudad altamente

industrializada (Duisburg) respecto a otra rural (Borken). La MG en ambas áreas fue idéntica (0,09 µg/l). Los valores máximos hallados en la zona rural (0,31 µg/l; 0,22 µg/g de creatinina) fueron aproximadamente tres veces inferiores a los del área industrializada (0,94 µg/l; 0,60 µg/g de creatinina), aunque en ningún caso excedieron el límite de referencia para menores de 25 años, establecido en 1,0 µg/g de creatinina (Wilhelm et al., 2005).

Wilhelm y colaboradores (2007) analizaron el Cd en la orina de 163 niños en edad escolar residentes en Renania del Norte-Westfalia. Se tuvo en cuenta la población infantil que vivía en las inmediaciones de fuentes industriales en tres áreas diferentes (Duisburg Norte, n=271; Duisburg Sur, n=253; y Dortmund Hörde, n=220) así como en una zona rural (Borken, n=204). La edad media fue de 6,3 años (4,8-9,1). La ME obtenida tanto en Duisburg Sur como en el área rural de Borken, fue de 0,1 µg/l. Se demostró que, a pesar de que los resultados obtenidos indicaron una menor exposición infantil respecto de estudios previos, lo que indudablemente indicaba una mejoría en la calidad del aire, aún persistía la emisión de contaminantes, incluyendo el Cd.

Banza et al. (2009) midieron Cd en 351 muestras de orina en una región del Congo (Katanga). Las concentraciones medias (MA) fueron de 0,18, 0,70 y 0,75 µg/g de creatinina para las zonas control, áreas residenciales situadas entre 3 y 10 Km de las industrias mineras y aquellas que estaban a menos de 3 Km, respectivamente. La concentración de Cd se asoció de forma positiva con la edad.

Una investigación llevada a cabo en una zona rural de Bangladesh por Kippler y colaboradores (2010), encontró una elevada exposición a Cd en los primeros años de vida, al parecer causada por las altas concentraciones en la dieta basada principalmente en el consumo de arroz (0,47 µg Cd/Kg, una concentración algo más del doble que la obtenida en Europa y en numerosos países asiáticos) y por la mayor absorción gastrointestinal de tóxicos durante la infancia (Rivai et al., 1990; EFSA, 2009). Los resultados arrojaron altas concentraciones de Cd en la orina de 332 niños entre 1,5 y 5 años, residentes en la zona y se observó un aumento de éstas con la edad, lo que hablaría en favor del potencial acumulativo de dicho metal a nivel renal y

muy especialmente, en las primeras etapas de la vida. La MA y ME a los 5 años fue de 0,37 y 0,31 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. Concentraciones (ME) de 0.13 $\mu\text{g/l}$ en niños de 6-12 años fueron publicadas en la encuesta NHANES realizada entre 1988-1994 (Arora et al., 2008) y de 0.08 $\mu\text{g/l}$ durante 1999-2004 (Richter et al., 2009), siendo el valor de referencia alemán para Cd en orina (percentil 95), obtenido a partir de 1700 niños entre 3-14 años, de 0,2 $\mu\text{g/l}$ (Schulz et al., 2009).

Tang et al. (2009) evaluaron las concentraciones de Cd en orina de residentes de la región de las Tres Gargantas, al suroeste de China, obteniendo en la población infantil valores medios (MA) de 3,0 $\mu\text{g/l}$ (MG de 3,4 $\mu\text{g/l}$), que muy posiblemente se deberían a la ingesta de ciertos alimentos (cereales) y a la inhalación de emisiones procedentes de la combustión del carbón en las viviendas.

Aguilera y colaboradores (2010), también analizaron Cd en orina de 227 niños (5-17 años). La MG obtenida en la población infantil de la Ría de Huelva fue de 0,35 $\mu\text{g/l}$ (0,41 $\mu\text{g/g}$ de creatinina), siendo ligeramente inferior a la del resto de ciudades andaluzas (0,49 $\mu\text{g/l}$; 0,53 $\mu\text{g/g}$ de creatinina). El 82% de los menores de 14 años presentaron niveles de Cd superiores a 0,2 $\mu\text{g/l}$, valor de referencia establecido por Schulz y colaboradores (2009) en Alemania para niños de 3 a 14 años.

Moreno et al. (2010) analizaron Cd en 35 muestras de orina de población infantil (6-11 años), residentes en Taxco (México). La MA obtenida fue de 4,7 $\mu\text{g/l}$ y se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de Cd-As y Cd-Mn. Se corroboró que los niños residentes en las proximidades de áreas mineras tenían una elevada carga corporal de metales. Esto confirmaría lo descrito por varios autores, entre ellos, Hu y cols. (2007), en cuanto a que la cercanía del lugar de residencia a los residuos procedentes de la minería constituye, sin género de duda, un factor de riesgo muy importante en la exposición al Cd en los niños.

Otro aspecto interesante es la relación entre el Cd y la exposición indirecta al tabaco. Tanto Conrad et al. (2010) como Callan et al. (2012), mostraron un aumento de las concentraciones de Cd en orina de niños etiquetados de fumadores pasivos, lo que es evidente habida cuenta de la ya conocida influencia del hábito tabáquico en los niveles de dicho metal.

En un trabajo llevado a cabo en Lahore (Pakistán), Sughis et al. (2011) analizaron los niveles de Cd en la orina de 155 niños (8-12 años), obteniendo una concentración media (MA) de 0,50 $\mu\text{g/g}$ de creatinina.

Finalmente, Ciesielski et al. (2012) midieron los niveles de Cd en un colectivo infantil (6-15 años), con el fin de evaluar las asociaciones entre dichas concentraciones y el desarrollo neurológico. Se obtuvo una ME de 0,11 $\mu\text{g/l}$ y los valores estratificados por edad fueron: 0,078 $\mu\text{g/l}$, de 6-7 años; 0,093 $\mu\text{g/l}$, de 8-9 años; 0,107 $\mu\text{g/l}$, de 10-11 años; 0,120 $\mu\text{g/l}$, de 12-13 años y 0,146 $\mu\text{g/l}$, de 14-15 años, observándose un claro aumento de las concentraciones con la edad (efecto acumulativo), no apreciándose diferencias respecto al género.

II.7.2.3. Manganeso

Aún cuando el manganeso (Mn) es un elemento esencial para el organismo, elevadas concentraciones del mismo son capaces de producir efectos adversos para la salud, especialmente de la población infantil, dada su mayor vulnerabilidad a los efectos adversos derivados de los contaminantes.

En un estudio realizado por Banza y cols. (2009) en el Congo, se midieron los niveles de Mn en 351 muestras de orina. Se obtuvieron MG de 0,07, 0,40 y 0,32 $\mu\text{g/g}$ de creatinina para las zonas control, áreas residenciales que se encontraban entre 3 y 10 Km de distancia a las minas y zonas a menos de 3 Km, respectivamente.

En Taxco, estado de Guerrero (México), se analizaron 35 muestras de orina de niños (6-11 años). Los resultados mostraron una MA de 5,2 $\mu\text{g/l}$. Tomando como referencia el nivel recomendado por la ATSDR (2000) para las concentraciones de Mn en orina (0,97-1,07 $\mu\text{g/l}$), la totalidad de la población infantil analizada mostró resultados por encima del mismo (Moreno et al., 2010).

II.7.2.4. Mercurio

El mercurio (Hg), como ya se indicó en el apartado correspondiente, es un metal neurotóxico, ampliamente difundido en el medio ambiente (atmósfera, suelo y agua), capaz de producir retraso mental, alteraciones motoras, ataxia y ausencias en niños procedentes de madres que han estado expuestas a pescado contaminado en forma de metil-mercurio (MeHg) durante el embarazo (ATSDR, 2008; Olmedo et al., 2013). La metilación del Hg inorgánico liberado a través de actividades mineras conduce a la contaminación del pescado (túnidos), fuente primaria de proteína en un gran número de poblaciones, sobre todo en zonas costeras. El Hg causa daños irreversibles no sólo al medio ambiente, sino en muchos casos a la población que habita en zonas mineras, muchas de las cuales se encuentran en vecindad de ríos y ligadas por tanto a una dieta donde el pescado constituye su base esencial.

El Hg es capaz de alterar el riñón al ser éste el principal órgano diana. El Hg en orina puede ser empleado como bioindicador de exposición al ser relativamente constante y permitir valorar la exposición a largo plazo así como el posible riesgo nefrotóxico derivado de la exposición a Hg inorgánico.

Ozuah et al. (2003) estudiaron los niveles de Hg en orina en población infantil (n=100) de 1 a 18 años de edad residente en Nueva York, obteniendo una concentración media (MA) de 1,08 µg/l.

En una investigación llevada a cabo por Levy y cols. (2004) en Montreal (Canadá), se analizaron las concentraciones de Hg en muestras de orina de 60 niños (34 varones y 26 chicas) con edades entre 4 y 8 años, con el fin de evaluar la asociación entre estos niveles y la frecuencia de consumo de pescado, mostrándose una clara correlación positiva entre ambos; aquellos que consumían pescado todos los días o dos veces por semana presentaron valores más elevados que aquellos en los que el consumo fue poco frecuente (MG de 2,04 vs 1,23 µg/g de creatinina).

Rojas et al. (2006) hallaron una MG de 2,73 µg/g creatinina en 65 niños del Estado de Carabobo, principal zona industrial de Venezuela, con edades entre 0,5 y 12 años, aun cuando más de la mitad se encontraban en el rango entre 6 y 12 años,

siendo éste el grupo que mayor nivel de Hg presentó (2,77 $\mu\text{g/g}$ creatinina), no encontrando diferencias atribuibles al género.

Batárióv y col. (2006) refieren niveles de Hg en orina de 0,37 y 0,45 $\mu\text{g/g}$ creatinina (ME y MG, respectivamente) en niños de edades entre 8 y 10 años, residentes en poblaciones de la República Checa durante un periodo no inferior a dos años en zonas urbanas, algunas de las cuales eran altamente industrializadas. No hallaron diferencias significativas en relación al sexo, aunque si se apreció un aumento significativo con la edad por efecto acumulativo.

Counter y cols. (2006) obtuvieron niveles medios de 13,3 $\mu\text{g/l}$ de Hg en muestras de orina procedentes de 73 niños andinos con edades de 5 a 11 años que residían en las zonas mineras de oro en Nambija y Portovelo (Ecuador). Los resultados reflejaron una asociación directa entre las concentraciones obtenidas y el déficit neurocognitivo apreciado en los niños.

Link y colaboradores (2007) valoraron la presencia de Hg en orina en relación a la existencia de amalgamas. Del total de muestras analizadas, aproximadamente el 65% mostraron concentraciones por debajo de 0,2 $\mu\text{g/l}$, valor del límite de cuantificación (LOQ), siendo el valor medio de 0,31 $\mu\text{g/l}$. Sin embargo, la distribución fue anómala debido a la alta presencia de analito en aquellas muestras de niños que poseían más de tres amalgamas.

En un estudio llevado a cabo sobre un colectivo de 59 niños que residían en las áreas cercanas a una mina de oro en la provincia de Phichit (Tailandia), se analizaron muestras de orina con el fin de evaluar la exposición a Hg en población infantil, debido a los elevados niveles de este metal encontrados previamente en el suelo, el agua y el aire de la zona. Se diferenciaron dos grupos: el primero, formado por aquellos niños vinculados de algún modo a actividades mineras (proximidad, etc...) y el segundo, constituido por aquellos que no tenían ningún tipo de relación con la mina (grupo control). Los resultados registraron un nivel medio (MA) global de 13,93 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, aunque existieron diferencias en las concentraciones medias obtenidas según el grupo al que pertenecían (15,82 y 9,95 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente).

Se apreció una correlación significativa con el género y la higiene personal, siendo las concentraciones mayores en niños que en niñas (Umbangtalad et al., 2007).

Bose-O'Reilly y colaboradores (2008) analizaron Hg en muestras de orina de 166 niños (9-17 años) residentes en Indonesia y Zimbabwe. Del colectivo total, 36 vivían en zonas expuestas a vapor de Hg, 80 trabajaban desde edades tempranas con Hg líquido o en fundiciones de amalgama y 50, fueron tomados como grupo control por vivir en regiones con ausencia de actividades mineras. Los resultados mostraron que en la población expuesta, algunos niños presentaban síntomas típicos de intoxicación por este metal, tales como ataxia. La MA y la ME de Hg en las muestras de orina del grupo control fueron de 0,58 µg/l (0,35 µg/g de creatinina) y 0,40 µg/l (0,32 µg/g de creatinina), respectivamente; sin embargo, en la población expuesta que residía en las áreas contaminadas, fueron de 10,20 µg/l (9,16 µg/g de creatinina) y 6,49 µg/l (5,31 µg/g de creatinina), y en aquellos que además manipulaban Hg líquido o fundiciones de amalgama, fueron de 47,35 µg/l (36,50 µg/g de creatinina) y 10,05 µg/l (7,06 µg/g de creatinina), respectivamente. Si observamos, los niveles de referencia para orina de niños entre 6 y 12 años establecidos en 0,7 µg/l por la primera Encuesta de Medio Ambiente alemana (GerES I), advertimos que los valores encontrados en áreas contaminadas o para el colectivo infantil sometido al riesgo de manipulación de Hg son considerablemente elevados.

En la IV Encuesta Ambiental Alemana (GerES IV) se propuso como valor de referencia máximo para Hg en orina 0,4 µg/l. En este estudio se tuvo en cuenta la presencia de amalgamas dentales en 1-2 dientes o más. La ME obtenida para el total de la población estudiada (1.734 niños) así como para aquellos niños con ausencia de amalgamas (1.612), coincidió con el LOD (< 0,1 µg/l). Los valores obtenidos en aquellos niños que poseían 1 ó 2 amalgamas fueron de 0,1 µg/l y aquellos que tenían más de 2 de 0,2 µg/l, apreciándose claramente la influencia de éstas sobre los valores de Hg en orina (Schulz et al., 2009). No obstante, los valores obtenidos fueron inferiores a los hallados en encuestas previas, muy probablemente por la tendencia actual a la disminución en el empleo de este tipo de oclusiones (Schulz et al., 2007).

En un estudio realizado en el distrito minero de Taxco (México), se analizó Hg en 50 muestras de orina de población infantil (26 niñas y 24 niños), con edades entre 6 y 11 años, y que debían haber residido en la zona al menos cuatro años. Se obtuvo una MA de 0,7 µg/l. El 62% de las concentraciones de Hg en orina superaron el límite de cuantificación (LOQ) establecido en 0,6 µg/l. El análisis mostró que aquellos niños que vivían en las proximidades de zonas mineras presentaban una alta carga corporal de metales pesados, lo que los haría más susceptibles de padecer alteraciones neurológicas, cardiovasculares, inmunológicas y/o renales (Moreno et al., 2010).

Puklová y colaboradores (2010) también biomonitorizaron los niveles de Hg total en orina de población infantil (8-10 años), residente en 9 ciudades de la República Checa, durante al menos dos años. Los valores de la ME en el periodo comprendido entre 1996 y 2006, oscilaron entre 0,25 y 0,43 µg/g de creatinina, mientras que en el año 2008 se obtuvo el valor más bajo (0,16 µg/g de creatinina), lo que hablaría a favor de un descenso en los niveles de contaminación ambiental.

Černá y colaboradores (2012) determinaron algunos metales pesados, entre ellos el Hg, en orina de niños entre 8 y 10 años de la República Checa. Tras el análisis de los datos, no se apreciaron diferencias significativas en las concentraciones de Hg en función del género, sin embargo, si se correlacionaron con el número de amalgamas dentales que presentaban los niños, hecho demostrado por otros autores (Schulz et al., 2007). Igualmente se observó una exposición más elevada en la población infantil checa en comparación con la alemana (Schulz et al., 2007), aunque fue bastante similar a la recogida en los niños americanos (CDC, 2009).

II.7.2.5. Plomo

El Pb, como ya ha sido ampliamente expuesto, es un metal neurotóxico bien conocido, enormemente ubicuo, liberado en los procesos de combustión, actividades mineras y de fundición, procesos de refinado, incineración de residuos, envases para alimentos, cerámicas, plantas industriales que emplean carbón, etc. y sin duda

constituye uno de los agentes químicos más relevantes en el ambiente nocivo que pudiera rodear a la población infantil.

La ingestión del Pb a través de los alimentos es una de las principales y usuales vías de exposición en los niños (Finster et al., 2004), siendo además más vulnerables a los efectos de este metal, debido a las características propias de su sistema nervioso central en desarrollo y de la barrera hemato-encefálica en periodo de desarrollo (ATSDR, 1999).

No obstante, en la actualidad se ha advertido un notable descenso en los niveles de contaminación gracias a la concienciación de la población y a la prohibición de numerosos productos que contienen este metal (Stromberg et al., 2008).

Moon et al. (2003) examinaron las concentraciones de Pb en muestras de orina procedentes de 38 niños (4-10 años) hallando una MG de 6,92 $\mu\text{g/g}$ de creatinina.

Por otra parte, en un estudio realizado en diferentes ciudades del condado de Taichung (Taiwan), se midieron los niveles de Pb en la orina de 157 niños (10 y 12 años), residentes en tres pueblos con diferente grado de contaminación (Longgang, Shalach y Shuntain), siendo el primero el más contaminado por su cercanía a una Central Térmica y el último, el que actuó como control y que por ello presentó MG de Pb significativamente más bajas (2,81 $\mu\text{g/g}$ de creatinina) que los dos primeros (3,93 y 3,95 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente). Se midió también la ingesta diaria a partir del agua potable y la comida así como la exposición respiratoria procedente de las partículas del aire y del polvo doméstico que resultó ser la principal fuente de contaminación, observándose una correlación positiva entre la dosis de exposición diaria y los niveles de Pb en orina. La MG fue de 3,26 y 3,85 $\mu\text{g/g}$ de creatinina en niños y niñas, respectivamente, aunque no se observaron diferencias significativas (Chiang et al, 2008).

Banza y colaboradores (2009) evaluaron la exposición a Pb en la población de Katanga (Congo), zona de intensa actividad minera durante varios siglos. Se analizaron los niveles de Pb en muestras de orina de la población (2-74 años), que incluían un total de 47 niños menores de 14 años. Se tomaron 40 sujetos control que vivían a 400

Km de la zona minera, 132 que se encontraban entre 3 y 10 Km y 179 sujetos que residían a menos de 3 Km. Se observaron valores significativamente superiores en la población residente en la zona contaminada respecto de la zona control, y muy especialmente, en el grupo de niños. Las MG fueron de 1,28, 2,93 y 3,17 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente, resultados que se encuentran en el entorno de los valores de referencia descritos para la población general estadounidense (Paschal et al., 1998; CDC, 2005).

Wang y colaboradores (2009) analizaron Pb en la orina de una población infantil (n=317) entre 6 y 12 años residente, durante al menos 5 años, en cuatro aldeas rurales situadas en el sureste de China, con el fin de evaluar la exposición a este metal y los posibles efectos adversos sobre la salud física y conductual de los niños. Los niveles de Pb oscilaron entre 4,0 y 155,2 $\mu\text{g/g}$ creatinina siendo la MG de 11,7 $\mu\text{g/g}$ creatinina, similar en niños y en niñas, así como en los diferentes rangos de edad considerados. Aún cuando los resultados hallados mostraron niveles de exposición moderados, se asociaron con la presencia de déficits neuroconductuales, entre los que cabe mencionar descensos en la inteligencia, comportamientos agresivos, disminución de la capacidad de atención, etc. Además, en análisis previos realizados en la zona de estudio, se hallaron concentraciones de Pb elevadas en el suelo de los jardines y de los parques infantiles así como en las áreas industriales, constituyendo éste una de las principales vías fuentes de contaminación (Ren et al., 2006).

En otro estudio realizado por Richter y colaboradores (2009) en niños estadounidenses se midieron los niveles de Pb en muestras de orina procedentes de niños de 6 a 12 años, encontrando valores medios (MG) de 0,97 $\mu\text{g/g}$ de creatinina.

En un área rural de Bangladesh, donde *a priori* se esperaba que la contaminación fuese muy baja debido a la escasa circulación de vehículos y de industrias, se midieron los niveles de Pb en orina de niños de 5 años, obteniéndose una MA de 5,3 $\mu\text{g/l}$ (ME de 4,3 $\mu\text{g/l}$), aunque ésta difería en las distintas estaciones del año, siendo más elevada en la época estival, muy probablemente en relación con la mayor inhalación de partículas procedentes del suelo procedentes de los juegos al aire libre (Bergkvist et al., 2010). Asimismo, se midió el Pb en algunos alimentos como el arroz,

ciertos utensilios de cocina y en materiales de construcción de las paredes y del techo de las viviendas. Los niveles, en todos ellos, resultaron ser sorprendentemente altos, lo cual sugirió que fuesen importantes fuentes de contaminación para la población infantil de la zona, al encontrarse permanentemente en contacto con todas ellas.

Callan y colaboradores (2012) analizaron los niveles de Pb en orina de 37 niños (entre 1 y 11 años), residentes en Puerto Esperance (Australia Occidental) durante al menos 1 año. También se analizaron las concentraciones de Pb en el agua potable, el suelo residencial y el polvo ambiental. La ME de Pb en orina fue de 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ (1,10 $\mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina). Así mismo, se demostró que aquellas actividades relacionadas con el transporte, aumentaron la contaminación por Pb a nivel ambiental en las diferentes áreas consideradas así como las concentraciones de este metal en la orina de los niños.

En la Tabla 1, y a modo de resumen, se relacionan los diferentes estudios nacionales e internacionales descritos en la bibliografía especializada, por orden alfabético del primer firmante del artículo, que analizan la concentración, expresada usualmente en $\mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina, de As, Cd, Hg, Mn y Pb en orina de población infantil. En dicha tabla se considera el tamaño muestral, la edad (en algunos casos se incluye el rango etario) así como la zona/país de estudio.

Tabla 1. Resumen de los estudios descritos en la bibliografía especializada que analizan la concentración ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) de As, Cd, Hg, Mn y Pb en orina de población infantil

| Referencias | n | As | Cd | Hg | Mn | Pb | Edad (años) | Notas |
|---------------------------------------|------------------|---|---|---|-------------------|--|--------------------|---|
| Aguilera <i>et al.</i> (2010) | 227 | 2.17 ^a ; 1.8 ^b ; 1.6 ^c | 0.59 ^a ; 0.49 ^b ; 0.41 ^c | | | | 5-17 | Expuestos (España) |
| | 196 | 1.94 ^a ; 1.64 ^b ; 1.41 ^c | 0.64 ^a ; 0.58 ^b ; 0.53 ^c | | | | | No expuestos (España) |
| Banza <i>et al.</i> (2009) | 351 | 3.15 ^c | 0.18 ^c | | 0.07 ^c | 1.28 ^c | 2-74 | No expuestos (Congo) |
| | | 10.8 ^c | 0.7 ^c | | 0.4 ^c | 2.93 ^c | | 3-10 km minas (Congo) |
| | | 17.8 ^c | 0.75 ^c | | 0.32 ^c | 3.17 ^c | | <3 km minas (Congo) |
| Batáriová <i>et al.</i> (2006) | 619 | | | 0.37 ^b /0.45 ^c | | | 8-10 | República Checa |
| Bergkvist <i>et al.</i> (2010) | | | | | | 5.3 ^{a,d} /4.3 ^{b,d} | 5 | Bangladesh |
| Bose-O'Reilly <i>et al.</i> (2008) | 50 | | | 0.35 (0.26) ^a ; 0.32 ^b | | | 9-17 | No expuestos (Indonesia y Zimbabue) |
| | 36 | | | 9.16 (11.32) ^a ; 5.31 ^b | | | | Expuestos (Indonesia y Zimbabue) |
| | 80 | | | 36.5 (93.06) ^a ; 7.06 ^b | | | | Manipuladores de Hg (Indonesia y Zimbabue) |
| Callan <i>et al.</i> (2012) | 32 | 12.92 ^b | | | | 1.1 ^b | 1-11 | Australia |
| Carrizales <i>et al.</i> (2006) | 30;63; 45; 70 | 44; 51; 80; 46 ^c | | | | | 3-6;6-7; 8-9;>9 | San Luis Potosí (México) |
| Chiang <i>et al.</i> (2008) | 80/77 | 4.01/4.91 ^c | | | | 3.26/3.85 ^c | 10-12 | Niños/Niñas (Taiwán) |
| Ciesielski <i>et al.</i> (2012) | 2199 | | 0.11 ^{b,d} | | | | 6-15 | EE.UU. |
| Costilla-Salazar <i>et al.</i> (2010) | 23 | | | 4.2 (7.1) ^a | | | 6-14 | Zacatecas (México) |
| Counter <i>et al.</i> (2005; 2006) | 80 | | | 10.9 ^d ; | | | 5-11 | Nambija (Ecuador) |
| | 73 | | | 13.3 ^{a,d} | | | | Portovelo (Ecuador) |
| Erdinger <i>et al.</i> (2004) | 27 | 6.44 ^{a,d} ; 5.55 ^{b,d} | | 0.94 ^{a,d} ; 0.20 ^{b,d} | | | | Aralsk (Kazajstán) |
| | 27 | 9.56 ^{a,d} ; 9.40 ^{b,d} | | 0.29 ^{a,d} ; 0.10 ^{b,d} | | | | Akchi (Kazajstán) |
| Gamiño-Gutiérrez <i>et al.</i> (2013) | 98 | 40.3 (40.0) ^a ; 27.9 ^b | | | | | 4-10 | Villa de la Paz (México) |
| | 42 | 16.3 (9.5) ^a ; 13.1 ^b | | | | | | Área control (México) |
| Jasso-Pineda <i>et al.</i> (2012) | 85 | 44.5/16.8/12.8 ^c | | | | | 4-11 | Villa de la Paz/ Matehuala/ Soledad de Graciano Sánchez (San Luis Potosí- México) |
| Kippler <i>et al.</i> (2010) | 332 | | 0.37 ^{a,d} ; 0.31 ^{b,d} | | | | 5 | Bangladesh |
| Levy <i>et al.</i> (2004) | 60 | | | 2.04 ^c | | | 4-8 | Consumidores de pescado frecuentes (Montreal, Canadá) |
| | | | | 1.23 ^c | | | | Consumidores de pescado poco frecuentes (Montreal, Canadá) |

| | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|---|---|--|--------------------------|-------------------|----------|---------------------------------|
| Link <i>et al.</i> (2007) | 510 | 6.7 (8.29) ^{a,d} ; 4.6 ^{b,d} | | 0.31 (0.62) ^{a,d} ; <0.2 ^{b,d} | | | 9 y 11 | Baden-Wuerttemberg (Alemania) |
| Liu <i>et al.</i> (2010) | 61 | 26.1 (5.4) ^{a,d} ; 28.0 ^{b,d} | | | | | <20 | Niños (China) |
| | | 14.8 (4.6) ^{a,d} ; 16.2 ^{b,d} | | | | | | Niñas (China) |
| Méndez-Gómez <i>et al.</i> (2008) | 65 | 143.0 ^{b,d} | | | | | 6-11 | Gómez Palacio (México) |
| | | 100.0 ^{b,d} | | | | | | Héroe de Nacozari (México) |
| | | 115.0 ^{b,d} | | | | | | Pedro García (México) |
| Moon <i>et al.</i> (2003) | 38 | | 1.69 ^c | | | 6.92 ^c | 4-10 | Korea |
| Moreno <i>et al.</i> (2010) | 50 | 16.5 (8.3) ^{a,d} | 4.7 (2.7) ^{a,d} | 0.7 (0.86) ^{a,d} | 5.2 (0.7) ^{a,d} | | 6-11 | México |
| Ozuah <i>et al.</i> (2003) | 100 | | | 1.08 (1.82) ^{a,d} | | | 1-18 | Nueva York (EE.UU.) |
| Parvez <i>et al.</i> (2011) | 303 | 246.5 ^a | | | | | 8-11 | Bangladesh |
| Richter <i>et al.</i> (2009) | | | 0.09 ^c | | | 0.97 ^c | 6-12 | EE.UU. |
| Rocha-Amador <i>et al.</i> (2007) | 52 | 12.6 ^c | | | | | 6-10 | Moctezuma (México) |
| | 20 | 116 ^c | | | | | | Salitral (México) |
| | 60 | 52.5 ^c | | | | | | 5 de Febrero (México) |
| Rojas <i>et al.</i> (2006) | 65 | | | 2.73 ^c | | | 0.5-12 | Carabobo (Venezuela) |
| Rosado <i>et al.</i> (2007) | 602 | 58.1 ^{a,d} | | | | | 6-8 | Torreón (México) |
| Roy <i>et al.</i> (2011) | 526 | 55.2 ^{b,d} | | | | | 6-7 | Torreón (México) |
| Ruiz <i>et al.</i> (2010) | | | 0.088 ^c | | | | 6-11 | EE.UU. |
| Sakuma <i>et al.</i> (2010) | 398 | 3.60 ^{b,d} | | | | | 7-14 | Cerro Azul (Brasil) |
| | | 6.30 ^{b,d} | | | | | | Ribeira y Adrianópolis (Brasil) |
| | | 6.40 ^{b,d} | | | | | | Vila Mota (Brasil) |
| | | 8.94 ^{b,d} | | | | | | Serra (Brasil) |
| Schulz <i>et al.</i> (2009) | 1734 | 4.5 ^{b,d} | 0.08 ^{b,d} | < 0.1 ^{b,d} | | | 3-14 | Alemania |
| Sughis <i>et al.</i> (2011) | 155 | | 0.5 ^a | | | | 8-12 | Lahore (Pakistán) |
| Tang <i>et al.</i> (2009) | | | 3.0 (1.1) ^{a,d} ; 3.4 ^{c,d} | | | | | Three Gorges (China) |
| Trejo-Acevedo <i>et al.</i> (2009) | 229 | 22.35 ^a | 0.78 ^a | | | | 6-12 | México |
| Umbangtalad <i>et al.</i> (2007) | 59 | | | 13.93 (0.33) ^a | | | | Tailandia |
| Wang <i>et al.</i> (2009) | 317 | | | | | 11.7 ^c | 6-12 | China |
| Wasserman <i>et al.</i> (2006; 2007) | 142; 301 | 133 ^a ; 347.7 ^a | | | | | 10; 6 | Araihazar (Bangladesh) |
| Wilhelm <i>et al.</i> (2005; 2007) | 238; 163 | | 0.09 ^c ; 0.1 ^{b,d} | | | | 5-8; 4-9 | Alemania |

^aMedia aritmética (SD); ^bMediana; ^cMedia Geométrica; ^dNiveles en µg/l

II.7.3. Estudios nacionales e internacionales que evalúan la exposición a As, Cd, Mn, Hg y Pb en cabello procedente de población infantil

II.7.3.1. Arsénico

En un estudio realizado en el sudeste de la comarca del Alentejo (Portugal), Pereira y colaboradores (2004) analizaron el cabello de la población infantil residente en una aldea cercana a la mina de Santo Domingo, así como en un pueblo cercano (Corte do Pinto), con el fin de evaluar la exposición a este metaloide. Las MA obtenidas fueron de 0,245 y 0,352 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, resultando de forma paradójica mayores los niveles en los niños del pueblo, hecho que podría explicarse por el elevado consumo de alimentos procedentes de la zona hipotéticamente más contaminada.

En un estudio realizado sobre 31 niños (11-13 años), residentes en el condado de Ottawa (zona minera), en el noreste de Oklahoma, se evaluaron las concentraciones de As en cabello, con el fin de establecer su posible asociación con la función neuropsicológica. La MA obtenida fue de 17,8 $\mu\text{g/l}$, siendo significativamente menores en niñas. Los valores de As mostraron una asociación inversa con la inteligencia y el coeficiente intelectual de los niños (Wright et al., 2006).

Dongarrà y colaboradores (2012) realizaron un estudio en población infantil (n=336) residente en diferentes zonas geográficas de Sicilia (Italia), con el fin de analizar el contenido de As en el cabello de niños entre 11 y 13 años. Las concentraciones (ME) de As fueron de 0,05 $\mu\text{g/g}$ y se obtuvieron valores más elevados en aquellos que vivían en áreas cercanas a la zona volcánica, posiblemente debido a las propias características geológicas del terreno.

Recientemente, Evrenoglou y colaboradores (2013) han analizado As en cabello. La MG de As en pelo de los niños (11-12 años) de tres regiones de Atenas (Philadelphia, Kifisia y Kryoneri), las dos primeras urbanas y la última, suburbana, han sido de 0,020, 0,036 y 0,026 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

II.7.3.2. Cadmio

Özden et al. (2007) analizaron Cd en cabello de una población de 760 niños (11-13 años) pertenecientes a trece escuelas primarias de Estambul (Turquía), de las cuales 7 se encontraban próximas a las calles principales. La MA fue de 53,38 $\mu\text{g/g}$, siendo la ME de 40 $\mu\text{g/g}$. Los valores aumentaron de manera estadísticamente significativa a medida que aumentaba la proporción de fumadores en el hogar, así como la distancia o proximidad a las vías principales, siendo ambos determinantes importantes en la exposición en la población infantil. También se hallaron diferencias significativas relacionadas con el género, siendo mayores los niveles de Cd en varones.

Bao y colaboradores (2009) analizaron los niveles de Cd en el cabello de una población infantil (n=549) de 7 a 16 años de edad residente en el entorno de una mina de sulfuro en la provincia de Guangdong (China). La ME obtenida fue de 7,33 $\mu\text{g/g}$ y el análisis global de los resultados confirmó la influencia de éstos en el incremento de los problemas emocionales y/o conductuales en los niños.

En la zona costera del Lago Victoria, en Kenia, se biomonitorizaron los niveles de Cd en el cabello de 49 niños de hasta 5 años de edad y se relacionaron con la posible exposición a través del consumo de pescado. El análisis se centró en cuatro áreas diferentes, una urbana y tres rurales: Kisumu City (con diversas industrias y agricultura intensiva), Kendu-Bay (donde se practicaba la agricultura sin fertilizantes), Karungu (que recibía residuos de la minería del oro) y Puerto Victoria (portadora de efluentes industriales de diversas fábricas), siendo común en todas ellas el consumo de pescado como fuente principal de la dieta. Las MA de Cd fueron 0,25, 0,08, 1,08 y 0,13 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Los niveles superiores, correspondientes a la tercera región (Karungu), coincidieron con la zona de mayor consumo de pescado (Oyoo-Okoth et al., 2010).

Stassen y colaboradores (2012), evaluaron los niveles de Cd en el cabello de una población infantil indígena de Weenhayek, en Bolivia, que vivía en tres comunidades a lo largo del río Pilcomayo (Capirendita, Tres Pozos y Tuunteytas) con el fin de compararlos con los de una población de referencia (Wichí). Las concentraciones en la población de Weenhayek fueron estratificadas en cuatro grupos de edad (0-9; 10-

17; 18-72 y 73-144 meses) obteniendo una ME de 0,12 µg/g para el conjunto de niños comprendidos entre 0 y 72 meses (n=61), concentración similar a la de la población de referencia (0,13 µg/g).

Evrenoglou et al. (2013) han analizado los niveles de Cd en el cabello de niños (11-12 años) en tres regiones de Atenas (MG de 0,014, 0,023 y 0,015 µg/g), no apreciándose diferencias significativas entre ellas.

II.7.3.3. Manganeso

Existe un creciente interés por la exposición ambiental a Mn en los niños ya que son considerados una población vulnerable y propensa a sufrir alteraciones cognitivas y trastornos del neurodesarrollo a largo plazo debido a agentes neurotóxicos, entre los que se incluiría dicho metal (Erikson et al., 2007). Estudios más recientes sugieren que el exceso de Mn podría interferir en el desarrollo de las funciones cerebrales (Menezes-Filho et al., 2011). Así, la exposición industrial y/o ambiental a bajos niveles de Mn se ha asociado con disfunción neuroconductual infantil, incluyendo déficits en el tiempo de reacción, efectos adversos sobre la inteligencia, la memoria y la función motora, conductas hiperactivas, un aumento en el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson, etc. (Riojas-Rodríguez et al., 2010). Los recién nacidos y los niños son particularmente susceptibles a los efectos neurotóxicos de la exposición a Mn, incluso a bajas dosis, debido al incipiente desarrollo cerebral, del sistema nervioso central y la capacidad de dicho metal para atravesar la barrera hemato-encefálica aún desestructurada en el recién nacido y acumularse en el cerebro (Aschner, 2006). La exposición a Mn afecta a áreas cerebrales implicadas en la neurotransmisión dopaminérgica, circunstancia que ha sido puesta en evidencia en trabajadores del sector minero. Este hecho ha determinado igualmente que el Mn sea propuesto como un biomarcador de efectos relacionados con la neurotransmisión.

Pereira et al. (2004) analizaron Mn en cabello de una población infantil, residente en la aldea de la mina de Santo Domingo y en un pueblo cercano en la

comarca del Alentejo, en Portugal. Las MA obtenidas fueron de 1,199 y 11,197 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Wright et al. (2006) obtuvieron valores medios (MA) de Mn en cabello de niños residentes en zonas mineras de Ottawa (Oklahoma), de 471,5 $\mu\text{g/l}$ mostrando una asociación inversa significativa con el coeficiente intelectual de los niños.

En otro estudio llevado a cabo por Bouchard y cols. (2007) en Quebec (Canadá), se analizó Mn en muestras de cabello de 46 niños (6-15 años), obteniéndose una MA de 5,1 $\mu\text{g/g}$. Aquellos expuestos a mayores concentraciones de Mn en el agua de bebida presentaron niveles significativamente superiores de Mn en el cabello, existiendo una clara asociación con comportamientos hiperactivos y problemas neuroconductuales, especialmente a concentraciones por encima de 3,0 $\mu\text{g/g}$.

En la región de Salvador, perteneciente al Estado de Bahía (Brasil), se estudiaron los niveles de Mn en el cabello de niños entre 1 y 10 años ($n=109$), que vivían en las proximidades de una planta en la que se producían aleaciones de hierro y manganeso. En la toma de muestras se tuvo en cuenta tanto la proximidad a las fuentes de emisión como la ubicación de la zona de residencia a favor del viento. Además, se tomó como referencia un colectivo de 43 niños no expuestos. Los resultados mostraron que las MG/ME de Mn encontradas fueron superiores en los aquellos niños que residían próximos a la planta (27,37/31,30 $\mu\text{g/g}$) así como en los que se encontraban a favor del viento (21,33/28,96 $\mu\text{g/g}$), siendo la MG del grupo control de 1,37 $\mu\text{g/g}$, considerablemente inferior a la hallada en los expuestos (15,20 $\mu\text{g/g}$) (Menezes-Filho et al, 2009).

En una comunidad de Ohio (EE.UU.), se analizó Mn en muestras de cabello de 141 personas con edades comprendidas entre 2 y 81 años, residentes en las cercanías de una mina de ferromanganeso. La MG obtenida en el colectivo infantil, compuesto por 12 niños, fue de 3,42 $\mu\text{g/g}$, no observándose diferencias significativas en función del género. A pesar de las bajas concentraciones, se mostró una asociación inversa entre los niveles de Mn y el coeficiente intelectual de los niños (Haynes et al., 2010).

En otro estudio realizado por Menezes-Filho et al. (2009) en niños próximos a una planta de producción de aleaciones de ferromanganeso en Bahía (Brasil), se encontraron MG de Mn en cabello de 15,20 $\mu\text{g/g}$ (1,10-95,0 $\mu\text{g/g}$), siendo muy superiores a las halladas en el estudio realizado por Haynes y cols. en 2010.

Kordas y colaboradores (2010), refieren ME de Mn de 1,45 $\mu\text{g/g}$ (0,03-18) en cabello de niños en edad preescolar (6-37 meses) que viven en zonas urbanas de Montevideo (Uruguay).

En el distrito minero de Molango, situado en el centro de México, Riojas-Rodríguez y colaboradores (2010) midieron los niveles de Mn en el cabello de una población infantil (n=79) de 7 a 11 años residente durante al menos 5 años. Se tomó como control una población no expuesta (n=93) externa al distrito minero. Se obtuvo una MG más elevada en aquellos niños expuestos frente a los no expuestos (12,13 vs 0,57 $\mu\text{g/g}$), siendo la ME de 12,60 y 0,56 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Se mostró una asociación inversa entre la exposición ambiental al Mn y el coeficiente intelectual de los niños.

En el Estado de Hidalgo (México), Montes y colaboradores (2011) analizaron Mn en cabello de niños (entre 7 y 11 años) en dos grupos de población, una control (n=93) y otra de niños que habitaban a menos de 1 km de una mina a cielo abierto (n=77). La ME en el grupo control fue de 0,6 $\mu\text{g/g}$, frente a 13,2 $\mu\text{g/g}$ en el colectivo de expuestos, es decir, aproximadamente 20 veces superior.

Menezes-Filho et al. (2011), hallaron concentraciones medias (MG) de 5,83 $\mu\text{g/g}$ (0,1-86,68) de Mn en el cabello de 83 niños con edades comprendidas entre 6 y 12 años que habían vivido durante al menos un año en las proximidades de una planta de aleación de ferro-manganeso, en la aldea de Cotegipe (Estado de Bahía, Brasil). Una gran proporción (77,1%) superaron los 3,0 $\mu\text{g/g}$, concentración a partir de la cual se asoció con trastornos de la conducta (comportamientos hiperactivos). Los niveles obtenidos se relacionaron inversamente con el coeficiente de inteligencia y el coeficiente intelectual verbal, por lo que dichos hallazgos confirmaron que las elevadas concentraciones de Mn se asocian con un peor rendimiento cognitivo de los niños, especialmente en el dominio verbal.

Bouchard et al. (2011) analizaron los niveles de Mn en el cabello de 302 niños (6 y 13 años), expuestos a través del consumo de agua. Las concentraciones obtenidas (ME de 0,7 µg/g) se asociaron significativamente con la ingesta de Mn a través del agua y con un menor coeficiente intelectual, principalmente en las niñas.

Haynes y colaboradores (2012) midieron los niveles de Mn en el cabello de una cohorte de 38 niños con edades comprendidas entre 7 y 9 años, residentes en áreas próximas a una refinería de ferromanganeso en la Comunidad de Marietta (Ohio). La MA fue de 0,47 µg/g (0,085-1,25). Los resultados mostraron una asociación claramente significativa entre la exposición a Mn y la proximidad de los niños a la refinería. En comparación con otros estudios llevados a cabo sobre población infantil, los valores fueron diez veces más bajos que los encontrados en niños brasileños (5,8 µg/g) (Menezes-Filho et al., 2011), e igualmente inferiores a los hallados en otros estudios realizados en Québec (Cánada) por Bouchard y cols. donde la MA fue de 5,1 µg/g. Sin embargo, fueron muy similares a los datos recogidos por Wright y colaboradores (2006) en niños residentes en las cercanías de un área con residuos peligrosos en Oklahoma (0,47 µg/g; 0,89-2,1).

II.7.3.4. Mercurio

El mercurio (Hg), como ya se ha mencionado, es un metal pesado cuya presencia en el medio ambiente es generalizada y persistente (ATSDR, 1999; NRC, 2000). Es enormemente nocivo y ha causado considerables problemas de contaminación ambiental en las últimas décadas así como episodios de intoxicaciones colectivas como los acontecidos en la Bahía de Minamata y en Irak. El Hg orgánico tiene como diana de acción el sistema nervioso central y la mayor o menor susceptibilidad estaría relacionada con la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y su acumulación en cerebelo, córtex cerebral y retina, de ahí que la toxicidad esté íntimamente ligada al estadio de desarrollo en el que se encuentre el organismo. Por ello, la exposición en etapas precoces de la vida, puede ser absolutamente crítica en el desarrollo neurológico, siendo de gran interés la existencia

de límites de seguridad de exposición al Hg que permitan tener un control de ésta sobre la población antes de que aparezcan los efectos clínicos (Pinheiro et al., 2007).

Debido a que la exposición a metil mercurio (MeHg) ocurre esencialmente a través de la dieta (y más concretamente, por consumo de pescado contaminado) y no por fuentes de exposición ambiental, este contaminante ha sido identificado como el único metal (y quizás también el As) que podría analizarse en pelo y cuyo análisis sería realmente fiable al reflejar claramente la dosis interna, asumiendo que las muestras hayan sido sometidas a una correcta manipulación incluido un exhaustivo lavado (ATSDR, 2001; Harkins and Susten, 2003).

Los niños se hayan expuestos a Hg a través de las madres (vía placentaria y por medio de la lactancia), por la dieta (ingesta de agua y alimentos contaminados, especialmente pescado) e incluso mediante la inmunización con vacunas que pudieran contener timerosal. Son numerosos los estudios que han relacionado la exposición a Hg y los niveles hallados en pelo y su posible impacto en el neurodesarrollo (Rodríguez-Barranco et al., 2013). Los niveles de Hg en pelo están fuertemente influenciados por el consumo de pescado lo que puede determinar una evidente variabilidad entre la población infantil. Sin embargo, otros muchos factores de la dieta (leche materna y costumbres dietéticas familiares concretas) y ambientales (zona de residencia próxima a industrias relacionadas con este metal) pueden influenciar de manera notable los niveles de Hg presentes en niños siendo relevantes las diferencias fisiológicas y la variabilidad genética de la población estudiada (Marques et al., 2007).

A continuación comentaremos aquellos estudios que han tratado de evaluar la exposición a Hg por medio de muestras de cabello procedentes de población infantil.

Yasutake et al. (2003) analizaron los niveles de Hg en el cabello de niños residentes en 5 distritos de Japón. Los niveles medios (MG) obtenidos para los niños y niñas a la edad de 10 años fueron de 1,65 y 1,2 $\mu\text{g/g}$, en Minamata; 1,5 y 1,35 $\mu\text{g/g}$, en Kumamoto; 1,6 y 1,55 $\mu\text{g/g}$, en Tottori; 1,75 y 1,60 $\mu\text{g/g}$, en Wakayama; 2,0 y 1,70 $\mu\text{g/g}$, en Chiba, respectivamente.

En un estudio realizado en las Islas Feroe, en el cual se midieron los niveles de MeHg en muestras de cabello de población infantil (n=903) a la edad de 7 años, se obtuvo una MG de 0,60 µg/g (0,04-7,5) (Budtz-Jørgensen et al., 2004).

McDowell et al. (2004) evaluaron la exposición al MeHg en niños americanos de 1 a 5 años (n=838) mediante el análisis de cabello. La MG y la ME obtenidas fueron de 0,12 y 0,11 µg/g, respectivamente. Los niños que consumían frecuentemente pescado mostraron niveles medios el doble que los no consumidores (0,16 vs 0,08 µg/g). Globalmente, los resultados reflejaron asociaciones significativas entre las concentraciones de Hg total y la edad, la raza/etnia y el consumo de pescado. La MG en consumidores de pescado fue de 0,16 µg/g frente a los 2,99 µg/g recogidos por Budtz-Jørgensen y cols. en 2004.

Dórea y colaboradores (2005) evaluaron los niveles de Hg en el cabello de 203 niños menores de 10 años que residían en tres aldeas de la Amazonia oriental (India), con el fin de examinar si existía o no una relación de las concentraciones de Hg y el consumo de pescado en dichas zonas. Los niveles medios (MA) más elevados (16,55 µg/g) se hallaron en el área en la que el consumo de pescado era superior respecto a las otras dos cuyos niveles fueron de 4,75 y 2,87 µg/g, respectivamente.

Counter y cols. (2006) obtuvieron niveles medios de 8,5 µg/g de Hg en muestras de cabello procedentes de 73 niños andinos con edades comprendidas entre 5 y 11 años que residían en las zonas mineras de oro en Nambija y Portovelo (Ecuador). Los resultados mostraron una asociación directa entre las concentraciones obtenidas y el déficit neurocognitivo de los niños.

Maramba y colaboradores (2006), analizaron los niveles de Hg total y MeHg en muestras de cabello de 37 niños que habían residido, al menos 5 años, en los alrededores de una mina abandonada en Filipinas. Los resultados mostraron que la dieta (esencialmente derivada del consumo de pescado) era el factor principal en la carga corporal de MeHg además del aire, el agua y el suelo. No hay que olvidar que los niños inhalan un mayor volumen de aire e ingieren una mayor cantidad de agua y alimentos por unidad de peso corporal en relación a los adultos, por lo que la exposición relativa a contaminantes es más elevada.

Zhang et al (2006) monitorizaron los niveles de Hg total en muestras de cabello procedentes de niños y adolescentes (entre 1 y 15 años), que vivían en Wujiashan (China), obteniendo una MA de 0,59 $\mu\text{g/g}$ y una MG de 0,45 $\mu\text{g/g}$.

En una investigación llevada a cabo en España, se analizaron los niveles de Hg total y MeHg en el cabello de 130 niños de aproximadamente 4 años, residentes en dos áreas diferentes: la ribera del Ebro (noreste de España; n=71) y la isla de Menorca (Mediterráneo noroccidental; n=59), obteniendo una MA de Hg total de 0,94 $\mu\text{g/g}$ para el total de población considerada. La ME en los niños de la ribera del Ebro fue casi el doble que la existente en los de Menorca (0,63 vs 0,37 $\mu\text{g/g}$), observándose una tendencia similar en el caso del Hg total (0,72 vs 0,47 $\mu\text{g/g}$), mientras que los niveles de Hg inorgánico fueron muy similares en ambas zonas (0,18 vs 0,21 $\mu\text{g/g}$). Asimismo, se distinguieron dos regiones dentro del área de la ribera del Ebro; una población cerca de una planta de cloro-álcalis (Flix) y otra sin influencia directa de la misma. Los resultados mostraron concentraciones medias de Hg total significativamente superiores en Flix (1,26 $\mu\text{g/g}$) en comparación con los niños de Menorca (0,72 $\mu\text{g/g}$), aunque no existieron diferencias importantes entre éstos últimos y los que residían en el área no contaminada de la ribera del Ebro (0,92 $\mu\text{g/g}$). Una vez más, los valores de MeHg fueron más elevados en aquellos niños que consumían pescado más de tres veces por semana (Montuori et al., 2006).

Díez et al. (2007), analizaron las concentraciones de Hg en el cabello de un grupo de niños (n=40) residentes en la isla de Menorca, situada en el Mediterráneo noroccidental (España), zona con baja actividad industrial. La MA/ME encontrados (0,76/0,48 $\mu\text{g/g}$) fueron inferiores a 1,0 $\mu\text{g/g}$, valor de referencia establecido por la Agencia de Protección Medioambiental americana (EPA, 2003) y por debajo del rango que la OMS considera como normal (1-2 $\mu\text{g/g}$) para aquellos que no consumen pescado con alto contenido de MeHg. El 23% de los niños presentaron niveles superiores a 1,0 $\mu\text{g/g}$ (EPA, 2003) y alrededor de un 55% se hallaron por encima de 0,5 $\mu\text{g/g}$. Nuevamente se observó un ligero aumento de los valores de Hg en relación con el consumo de pescado, al igual que en otros estudios, donde se asociaron de forma significativa (Morrissette et al., 2004; McDowell et al., 2004; Agusa et al., 2005; Montuori et al., 2006).

En el análisis llevado a cabo por Guentzel y colaboradores (2007), se evaluaron los niveles de Hg en cabello de población infantil (20 niños) entre 2 y 18 años que vivían en el sur de Veracruz (México), y más concretamente en la cuenca del río Papaloapan, zona en la cual no hay constancia de la existencia de fuentes locales de contaminación por Hg y donde las áreas urbanas más cercanas se encuentran como mínimo a 50 Km. Se halló una concentración media (MA) de 1,12 $\mu\text{g/g}$ de Hg (0,18-2,57). Los resultados no mostraron correlaciones significativas con la edad, el género o el consumo de pescado y marisco.

Pinheiro et al. (2007) analizaron los niveles de Hg en cabello de niños estratificados en tres grupos de edad (0-1; 2-6 y 7-12) y residentes en tres comunidades del Amazonas (Sao Luis do Tapajós y Barreiras como zonas expuestas a actividades mineras relacionadas con el oro, y Panacauera que actuó como zona de no exposición). Las MG mayores se encontraron en Sao Luis do Tapajós (5,97; 13,22 y 10,83 $\mu\text{g/g}$), seguidos de Barreiras (5,35; 6,21 y 6,72 $\mu\text{g/g}$) y, lógicamente, los más bajos aparecieron en Panacauera (1,11; 2,27 y 2,99 $\mu\text{g/g}$).

Umbangtalad y colaboradores (2007) analizaron Hg en cabello de 59 niños que residían en áreas cercanas a una mina de oro en Tailandia, diferenciando dos colectivos (grupo I y II), en función del contacto o no con actividades mineras. Se obtuvo una MA en el total de niños de 0,93 $\mu\text{g/g}$, no mostrando paradójicamente diferencias significativas entre el grupo I y II (0,95 y 0,90 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).

Benefice y colaboradores (2008) biomonitorizaron el Hg en una población infantil residente en el valle del río Beni (Bolivia amazónica), zona en la que el consumo de pescado es una fuente muy importante de la dieta. Se midieron los niveles de Hg en cabello de 292 niños con edades comprendidas entre 0 y 10 años, así como otros factores entre los que se encontraban la actividad económica, el grupo étnico y la frecuencia de consumo de pescado, obteniendo una ME de 3,9 $\mu\text{g/g}$ de Hg y una clara asociación con el consumo de pescado.

Dunn et al. (2008), realizaron el análisis de Hg en el cabello de 534 niños con edades entre 6 y 10 años, residentes en dos zonas diferentes de E.E.U.U.; una rural, Maine (n=243) y el área metropolitana de Boston (n=291). Los resultados mostraron

una MG y una ME de 0,3 y 0,2 $\mu\text{g/g}$, al comienzo del estudio y de 0,2 y 0,2 $\mu\text{g/g}$, en los 5 años sucesivos de seguimiento, respectivamente. Los valores obtenidos fueron muy similares a los de otros niños del norte de Europa con ME de 0,19 $\mu\text{g/g}$ (Benes et al., 2002).

Kim y cols. en 2008, midieron Hg en cabello de 112 niños coreanos (72 niñas y 40 niños) con una edad media de 34 meses (1-186 meses), obteniendo una MG de 0,62 $\mu\text{g/g}$ (0,12-3,46). El 18 % de los niños mostraron concentraciones por encima de 1,0 $\mu\text{g/g}$ (valor de referencia de la EPA) (EPA, 2003). Los mayores de 6 meses presentaron diferencias en función del sexo, la frecuencia de consumo de pescado, etc., siendo los niveles más bajos los correspondientes a los niños más pequeños y a su vez, ligeramente más elevados en aquellos que consumían pescado 1 a 2 veces por semana. La proporción de niños que superaron 1,0 $\mu\text{g/g}$ fue similar (16,7%) a la recogida por Zhang y Wong (2007) en China, y superior a la mostrada Diez et al. (2008) en niños italianos, donde tan sólo el 6% lo superó.

Olivero-Verbel et al. (2008) en una población menor de 20 años, residente en la costa caribeña a orillas de Colombia, hallaron niveles (ME) de Hg total en cabello 1,25 y 0,95 $\mu\text{g/g}$ en niños y niñas, respectivamente, los cuales fueron mayores en aquellos que consumían pescado a diario.

Bose-O'Reilly et al. (2008), analizaron Hg en cabello de población infantil (n=166, 9-17 años) de Indonesia y Zimbabwe. Los resultados mostraron una MA y una ME de 1,23 y 1,08 $\mu\text{g/g}$, para el grupo control, de 2,27 y 2,31 $\mu\text{g/g}$, en la población expuesta que residía en las áreas contaminadas y de 4,08 y 2,34 $\mu\text{g/g}$, en aquellos niños que manipulaban Hg líquido o fundiciones de amalgama, respectivamente, hallándose en este último grupo niveles máximos de 53 $\mu\text{g/g}$.

En un estudio realizado en España se evaluaron los niveles de Hg total y MeHg en el cabello de 136 niños en edad preescolar (4 años), obteniendo una MA de 0,706 y 0,490 $\mu\text{g/g}$ (Menorca) y 1,093 y 0,914 $\mu\text{g/g}$ (Ribera del Ebro) en el caso del Hg total y el MeHg, respectivamente. Los valores recogidos en las niñas fueron algo superiores a los de los niños, tanto en el caso del Hg total como para el MeHg (1,06 y 0,85 $\mu\text{g/g}$ vs 0,73

y 0,54 $\mu\text{g/g}$), aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Díez et al., 2009).

Barbieri et al. (2009) llevaron a cabo un trabajo que trataba de medir Hg total en muestras de cabello ($n=150$) de una población con edades entre 1 y 70 años, perteneciente a Cachuela Esperanza, en la cuenca amazónica boliviana, área con intensa extracción de oro y un elevado consumo de pescado. La MG fue de 3,02 $\mu\text{g/g}$ (0,42-15,65). No se observaron diferencias significativas entre la edad y el sexo, sin embargo, si se encontró una asociación positiva con el consumo de pescado. Se consideraron seis grupos de edad y las MG encontradas para los rangos de 1-5 ($n=23$) y de 6-15 ($n=45$) años, fueron de 2,07 y 2,80 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, apreciándose un claro incremento en los valores de Hg con la edad, típico efecto dado el carácter acumulativo de los metales pesados. No obstante, no habría que olvidar que a pesar de los niveles relativamente bajos, Grandjean y colaboradores (1997), demostraron ciertos efectos en el desarrollo neurológico de los niños (por ejemplo, en las Islas Feroe) con un contenido medio de Hg total en el cabello de 2,99 $\mu\text{g/g}$ por lo que no se podría descartar algún problema en la población diana, y más concretamente, en aquellos subgrupos de población más vulnerables (niños, gestantes y ancianos).

En un estudio realizado en la Isla de Zhoushan, en la costa del mar oriental de China, Cheng y colaboradores (2009) midieron Hg total y MeHg en muestras de cabello en la población infantil residente en la zona. Se incluyeron un total de 48 niños (27 niños y 21 niñas) con edades entre 2 y 7 años, obteniendo una MA de 2,2 y 1,7 $\mu\text{g/g}$ para Hg total y MeHg, respectivamente. La amplia variabilidad en las concentraciones de Hg en el cabello probablemente podría relacionarse con la cantidad, la frecuencia y el tipo de pescado consumido, existiendo una fuerte correlación positiva entre las concentraciones de ambas especies de mercurio en cabello, la cantidad de pescado consumido y la edad. Por otra parte, el 96% de los niños y el 100% de las niñas superaron el nivel de referencia de 1,0 $\mu\text{g/g}$ establecido por la EPA (2003).

Malm et al. (2010) hallaron en las muestras de cabello de 51 niños, con edades entre 1 y 11 años, residentes en un pueblo ribereño a orillas del Río Tapajós en la Amazonia brasileña, MA de Hg total que oscilaron entre 9,5 y 11,4 $\mu\text{g/g}$ y de MeHg

entre 7,6 y 8,6 $\mu\text{g/g}$. En este estudio, además, se valoró la exposición en función del crecimiento del cabello, por lo que se trata de uno de los pocos estudios que han considerado un análisis segmentario del pelo. En el caso de las niñas, se diferenciaron tres segmentos (0-4, 4-8 y 8-12 cm), encontrándose usualmente todos los niños en el primero debido a la escasa longitud de su cabello. Las MA obtenidas para Hg total y MeHg para cada segmento fueron de 11,4 y 8,6 $\mu\text{g/g}$; 9,7 y 7,6 $\mu\text{g/g}$; y 9,5 y 8,2 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Los resultados obtenidos nuevamente mostraron una correlación positiva con el consumo de pescado lo que coincide con estudios previamente mencionados.

Freire y colaboradores (2010), determinaron los niveles de Hg total y MeHg en cabello de 72 niños de 4 años residentes en Granada (España). La MG y ME obtenidas para el Hg total fueron de 0,96 y 1,04 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, mientras que el valor medio para el MeHg fue de 1,81 $\mu\text{g/g}$, existiendo una clara asociación entre ambas formas de mercurio. Los niveles de Hg se asociaron con una mayor frecuencia de consumo de pescado graso, el lugar de residencia, la edad materna y el tabaquismo pasivo. La elevada exposición a dicho metal se asoció con cierto retraso en el desarrollo cognitivo infantil, hecho ampliamente constatado (Rodríguez-Barranco et al., 2013). Los niveles de Hg total encontrados fueron muy superiores a los obtenidos en algunas regiones de EE.UU. y Alemania, sin embargo, se encontraron por debajo de los recogidos en la población infantil expuesta de algunas zonas de Brasil, islas Feroe e Islas Seychelles (Tavares et al., 2005; Myers et al., 2009).

Lim et al. (2010) hallaron MG de 0,51 $\mu\text{g/g}$ de Hg en 124 muestras de cabello de niños (menores de 10 años) que residían en una comunidad próxima a un complejo industrial en Corea. Los resultados indicaron variaciones en las concentraciones de Hg en función del género, la edad, la zona de estudio, los ingresos familiares y la ingesta de pescado, entre otros determinantes.

En una investigación llevada a cabo en una población infantil checa, Puklová y cols. (2010) analizaron los niveles de Hg total en el cabello de niños con edades entre 8 y 10 años. Los valores oscilaron desde 0,13 hasta 0,26 $\mu\text{g/g}$, no observándose diferencias significativas en función del género, aunque sí entre los niños que

consumían pescado una o más veces a la semana frente a aquellos que no solían ingerirlo nunca (0,20 vs 0,15 µg/g).

Black y colaboradores (2011), estudiaron las concentraciones de Hg en el cabello de una población de 0 a >60 años, residente en el delta del Okavango en Botswana (África). Dicha población fue estratificada en diferentes intervalos de edad (0-9; 10-19; etc.). Los resultados mostraron una ME de 0,08 µg/g para los niños comprendidos entre 0 y 9 años, rango de interés a efectos comparativos en la presente memoria de Tesis.

En el distrito minero de Almadén (centro-sur de España), uno de los mayores productores de este metal hasta hace escasos años a nivel mundial, Díez et al. (2011) analizaron las concentraciones de Hg total en el cabello de la población residente en la zona (5-88 años), con el fin de determinar la influencia de los factores más importantes en dicha exposición. Para ello se analizaron los niveles tanto en Almadén, como en un área situada a cientos de kilómetros de distancia. Los resultados fueron mucho más elevados en aquellas personas que vivían en las proximidades de la zona minera superando aproximadamente el 87% la dosis de referencia (1 µg/g) propuesta por la EPA (2003). Las concentraciones de Hg en ambos grupos también se relacionaron con la edad, el género y el consumo de pescado.

Tian et al. (2011) trataron de evaluar la carga corporal de Hg a través de la dieta en el cabello de un colectivo infantil (n=361) de 3 a 5 años residente en diferentes regiones de Canadá. Se obtuvo una MG y una ME de 0,66 y 0,74 µg/g, respectivamente, no observándose diferencias significativas en relación con la edad y el género. El 25 % de los niños tuvieron concentraciones iguales o superiores a 2,0 µg/g, por encima del nivel de referencia establecido por EFSA (EFSA, 2012).

Černá y colaboradores (2012) encontraron niveles de Hg total relativamente bajos en la población infantil de la República Checa, con MA que oscilaron entre 0,13 y 0,26 µg/g, muy por debajo de 1 µg/g, concentración considerada como segura.

Peplow y Augustine (2012) evaluaron recientemente la contaminación en dos regiones de la Guyana (Puleowime y Kawemhakan) sobre un total de 53 y 27 niños,

con edades que oscilaron entre 6 y 14 años. Se obtuvo una MG y ME de 14 $\mu\text{g/g}$ de Hg en el cabello de la población infantil de Puleowime, mientras que en Kawemhakan fueron de 5 y 6 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Un porcentaje importante de la población de Puleowime presentaron niveles por encima de 10 $\mu\text{g/g}$ los cuales podrían estar directamente relacionados con el consumo de pescado al menos 3 veces al día.

Fujimura y colaboradores (2012) refieren concentraciones medias (MA) de Hg en el cabello de niños y niñas amerindianos, residentes en la zona del alto Maroni (Guayana Francesa) de 12,0 y 12,6 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Marques y colaboradores (2012) llevaron a cabo un estudio en la población infantil residente en la amazonia occidental (Ariquemes, Brasil), con el fin de evaluar la exposición a Hg a través del consumo de pescado en relación con el crecimiento y el desarrollo neurológico. Analizaron Hg en muestras de cabello de 688 niños con edades entre 1 y 59 meses. La MA y la ME obtenidas fueron de 2,28 y 2,14 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, mostrando tan sólo el 14% de los niños valores inferiores a 1 $\mu\text{g/g}$ y el 1,7%, valores iguales o superiores a 5 $\mu\text{g/g}$. Aunque el consumo de pescado no afectó al crecimiento lineal, sí mostró una clara influencia positiva sobre el neurodesarrollo infantil.

Recientemente, Evrenoglou y colaboradores (2013) han evaluado los niveles de Hg en el cabello de niños (11-12 años) de tres regiones de Atenas, dos urbanas y otra metropolitana. Las MG han sido 0,44, 0,30 y 0,37 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre las diferentes regiones.

II.7.3.5. Plomo

El Pb es un elemento natural presente en el agua, el suelo y la biota, utilizado desde las primeras civilizaciones y con múltiples aplicaciones. Los niveles elevados de este metal pesado pueden proceder bien de fuentes naturales o bien antropogénicas, incluyendo el consumo de alimentos contaminados (Hang et al., 2009). Numerosos informes han demostrado que el Pb constituye un problema de salud pública en todo el mundo. La exposición a este metal puede generar efectos adversos en el

rendimiento intelectual y el desarrollo neuromotor, especialmente en niños y adolescentes (Lanphear et al., 2005; Barbosa et al., 2005; Rodríguez-Barranco et al., 2013).

En un estudio realizado en cabello de 222 niños procedentes de dos pueblos de Cerdeña, Portoscuso (n=117) y Sestu (n=105), se determinaron los niveles de Pb, siendo Portoscuso uno de los complejos industriales más importantes de la isla, de ahí que fuera considerada como área con un alto riesgo de contaminación ambiental. Como confirmación de lo anterior, los valores más elevados se hallaron en dicha población infantil (MG de 8,46 $\mu\text{g/g}$), siendo mayores en niños que en niñas (10,88 vs 6,87 $\mu\text{g/g}$). Los niveles de Sestu, considerada como área semiurbana y no expuesta a contaminación por Pb, fueron notablemente más bajos (MG de 1,99 $\mu\text{g/g}$), aunque con idéntico patrón, es decir, mayores en varones (2,60 vs 1,77 $\mu\text{g/g}$) (Sanna et al., 2003).

Benes et al. (2003) encontraron niveles (ME) de 1,6 $\mu\text{g/g}$ de Pb en muestras de cabello de población infantil residente en la República Checa, mientras Hasan et al. (2004) hallaron concentraciones medias (MA) de 0,79 y 3,47 $\mu\text{g/g}$ de Pb en el cabello de 42 niños (6-18 años) residentes en zonas rurales y urbanas, respectivamente, de los Emiratos Árabes.

Valores medios (MG) de 2,9 y 3,1 $\mu\text{g/g}$ y ME de 2,7 y 2,9 $\mu\text{g/g}$ de Pb fueron hallados por Strumylaite y cols. (2004) en el cabello de niños y niñas, respectivamente, entre 10 y 13 años de edad, residentes en Lituania.

En un estudio realizado en 31 niños (11-13 años), residentes en el condado de Ottawa (zona minera), se midieron las concentraciones de Pb en pelo, con el fin de evaluar su posible asociación con la función neuropsicológica. La MA obtenida para el Pb fue de 1680 $\mu\text{g/l}$ (Wright et al., 2006).

Dunicz-Sokolowska y colaboradores (2006) estudiaron los niveles de Pb en el cabello de niños polacos (1-10 años), obteniendo los valores más elevados en los más pequeños (1 a 5 años). Los valores (MA y ME) fueron mayores en las niñas de 1 a 2 años (2,57 y 2,10 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) y en los niños de 3 a 4 años (2,83 y 2,14 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).

Özden et al. (2007) estudiaron los niveles de Pb en cabello de 760 niños (11-13 años) de Estambul obteniendo una MA de 2,41 $\mu\text{g/g}$, siendo la ME de 1,90 $\mu\text{g/g}$. Al igual que ocurrió en este mismo estudio con el Cd, los niveles fueron directamente proporcionales al número de fumadores en el hogar, así como a la proximidad a las calles con mayor tráfico.

En el análisis llevado a cabo por Sanna y colaboradores (2008) se analizaron los niveles de Pb en el cabello de 193 niños residentes en tres pueblos de Cerdeña (Carbonia, Gonnese y Sinnai), obteniéndose como valores medios (MA) 2,04, 1,61 y 0,56 $\mu\text{g/g}$, siendo las ME de 1,47, 0,87 y 0,27 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Se observaron diferencias significativas en función del género.

En un análisis llevado a cabo por Bao y colaboradores (2009), se evaluaron los niveles de Pb en el cabello de niños ($n=549$) de 7 a 16 años residentes en el entorno de una mina de sulfuro en la provincia de Guangdong (China), obteniendo una ME de 29,32 $\mu\text{g/g}$.

En el sureste de China, Wang y colaboradores (2009) hallaron concentraciones elevadas de Pb en el cabello de niños (6-12 años) residentes en una de las cuatro áreas rurales estudiadas (30,7 $\mu\text{g/g}$). En general, los niveles oscilaron entre 1,3 y 395,2 $\mu\text{g/g}$ y la MG en el total de la población infantil ($n=317$) fue de 12,5 $\mu\text{g/g}$, siendo superior en niños que en niñas (16,6 vs 9,6 $\mu\text{g/g}$), así como en el rango de edad de 6-10 años frente al de 11-12 años (14,4 vs 10,4 $\mu\text{g/g}$). Estos resultados posiblemente podrían atribuirse al mayor tiempo que pasaban los niños de 6 a 10 años jugando al aire libre en relación con el de las niñas de 11 a 12 años, lo que supondría un mayor contacto con el suelo y el polvo contaminado, fuentes importantes de contaminación. Por otro lado, en la zona donde se obtuvieron los valores más elevados, la contaminación por Pb fue superior probablemente debido a que se trataba de una zona donde hubo fábricas de baterías.

Oyoo-Okoth y colaboradores (2010), analizaron los niveles de Pb en pelo de población infantil (49 niños/as) de hasta 5 años de edad en cuatro áreas diferentes de la zona costera del Lago Victoria (Kenia): Kisumu City, Kendu-Bay, Karungu y Puerto Victoria, y trataron de relacionarlos con la posible exposición a través del consumo de

pescado. Las MA de Pb obtenidas fueron 6,0; 2,0; 22,0 y 5,0 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, destacando los niveles de la zona de Karungu, zona donde se corroboró un mayor consumo de pescado.

Shah y colaboradores (2011) midieron los niveles de Pb en el cabello de 189 niños (102 niños y 87 niñas) de 5 a 10 años, con domicilio continuado en la zona de al menos 2 años así como escolaridad en las inmediaciones de una zona industrial en Hyderabad (Pakistán), con el fin de comparar los resultados con los de una zona no expuesta a la contaminación industrial (150 en total, 90 niños y 60 niñas). La MA de Pb para la población infantil expuesta fue de 9,3 y 8,9 $\mu\text{g/g}$ en niños y niñas, respectivamente. Esta diferencia significativa podría deberse a las emisiones de contaminantes procedentes de las industrias de la zona. Se observó que las concentraciones de Pb en el cabello de los niños, tanto para la población expuesta como para la no expuesta, fueron más elevadas que los de las niñas, probablemente debido a los hábitos relacionados con juegos al aire libre lo que podría determinar una mayor exposición. Otra de las variables importantes que influyeron en la concentración de Pb en el cabello de la población expuesta fue la edad, existiendo una correlación positiva entre ambas (lo que enfatiza el carácter acumulativo del tóxico).

En un estudio llevado a cabo en niños pertenecientes a una población indígena (Weenhayek) que habitan en comunidades distribuidas a lo largo del río Pilcomayo (Bolivia), se analizaron los niveles de Pb en el cabello con el fin de compararlos con los de una población de referencia (Wichí). Las concentraciones (ME) halladas en la en los niños entre 0 y 72 meses de la población Weenhayek fueron de 47,6 $\mu\text{g/g}$, muy por encima de las observadas en la población de referencia (9,4 $\mu\text{g/g}$) (Stassen et al., 2012).

Menezes-Filho y cols. (2012), analizaron las concentraciones de Pb en el cabello de niños residentes en Brasil en una zona expuesta (n=88) y en otra no expuesta (n=44). Los valores hallados (MA y ME) fueron muy similares e incluso paradójicamente más elevados en el área control (2,45 y 1,26 $\mu\text{g/g}$ vs 2,68 y 2,09 $\mu\text{g/g}$), no observándose diferencias significativas en función del género.

Dongarrà y cols. (2012) analizaron los niveles de Pb en niños sicilianos, comprobando que aquellos que vivían próximos a una zona con canteras antiguas o bien en zonas industriales con actividad petroquímica mostraron altas concentraciones de Pb en pelo (ME de 1,10 y 1,58 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).

Finalmente, Evrenoglou y colaboradores (2013) han evaluado los niveles de Pb en el cabello de niños (11-12 años) en tres regiones de Atenas. Las MG obtenidas fueron de 1,29 $\mu\text{g/g}$ en Kifisia), 0,78 $\mu\text{g/g}$ en Philadelphia) y 0,60 $\mu\text{g/g}$ en Kryoneri.

En la Tabla 2, y a modo de resumen, se relacionan los diferentes estudios nacionales e internacionales descritos en la bibliografía especializada, por orden alfabético del primer firmante del artículo, que analizan la concentración, expresada usualmente en $\mu\text{g/g}$, de As, Cd, Hg, Mn y Pb en cabello de población infantil. En dicha tabla se considera el tamaño muestral, la edad (en algunos casos se incluye el rango etario) así como la zona/país de estudio.

Tabla 2. Resumen de los estudios descritos en la bibliografía especializada que analizan la concentración ($\mu\text{g/g}$) de As, Cd, Hg, Mn y Pb en cabello de población infantil

| Referencias | n | As | Cd | Hg | Mn | Pb | Edad (años) | Notas |
|--|-----|--|--|---|---|--|-------------|--|
| Batista <i>et al.</i> (1996) | 233 | | | 0.77 ^c | | | 6-16 | Tarragona (España) |
| Bao <i>et al.</i> (2009) | 549 | | 7.33 ^b | | | 29.32 ^b | 7-16 | China |
| Barbieri <i>et al.</i> (2009) | 45 | | | 2.8 ^c | | | 6-15 | Amazonia Boliviana |
| Benefice <i>et al.</i> (2008) | 292 | | | 3.9 ^b | | | 0-10 | Amazonia Boliviana |
| Benes <i>et al.</i> (2003) | | | 0.14 ^b | 0.19 ^b | | 1.6 ^b | | República Checa |
| Black <i>et al.</i> (2011) | | | | 0.08 (0.03) ^a ; 0.08 ^b | | | 0-9 | Botswana (África) |
| Bose-O'Reilly <i>et al.</i> (2008) | 50 | | | 1.23 (0.81) ^a ; 1.08 ^b | | | 9-17 | No expuestos (Indonesia y Zimbabwe) |
| | 36 | | | 2.27 (0.83) ^a ; 2.31 ^b | | | | Expuestos (Indonesia y Zimbabwe) |
| | 80 | | | 4.08 (7.07) ^a ; 2.34 ^b | | | | Manipuladores de Hg (Indonesia y Zimbabwe) |
| Bouchard <i>et al.</i> (2007) | 46 | | | | 5.1 (4.3) ^a | | 6-15 | Québec (Canadá) |
| Bouchard <i>et al.</i> (2011) | 362 | | | | 0.7 ^b | | 6-13 | Québec (Canadá) |
| Cheng <i>et al.</i> (2009) | 48 | | | 2.2 ^a | | | 2-7 | China |
| Counter <i>et al.</i> (2006) | 73 | | | 8.5 ^a | | | 5-11 | Nambija y Portovelo (Ecuador) |
| Díez <i>et al.</i> (2007) | 40 | | | 0.760 (0.722) ^a ; 0.484 ^b | | | N.I. | Isla de Menorca (España) |
| Díez <i>et al.</i> (2009) | 136 | | | 0.706 (0.665) ^a | | | 4 | Isla de Menorca (España) |
| | | | | 1.093 (1.016) ^a | | | | Ribera del Ebro (España) |
| Dongarrà <i>et al.</i> (2012) | 336 | 0.004 ^a ; 0.0003 ^b | 0.04 ^a ; 0.03 ^b | | 0.307 ^a ; 0.268 ^b | 1.01 ^a ; 0.78 ^b | 11-13 | Palermo (área urbana) (Sicilia-Italia) |
| | | 0.055 ^a ; 0.038 ^b | 0.066 ^a ; 0.077 ^b | | 0.37 ^a ; 0.35 ^b | 1.82 ^a ; 1.58 ^b | | Pace del Mela (área industrializada) (Sicilia-Italia) |
| | | 0.04 ^a ; 0.04 ^b | 0.034 ^a ; 0.037 ^b | | 0.40 ^a ; 0.40 ^b | 0.93 ^a ; 0.70 ^b | | Mistretta (área rural) (Sicilia-Italia) |
| | | 0.038 ^a ; 0.002 ^b | 0.007 ^a ; 0.0005 ^b | | 0.39 ^a ; 0.36 ^b | 1.95 ^a ; 1.10 ^b | | Antillo-Fiumedinisi (área mineralizada) (Sicilia-Italia) |
| | | 0.06 ^a ; 0.05 ^b | 0.007 ^a ; 0.002 ^b | | 6.67 ^a ; 3.61 ^b | 1.36 ^a ; 1.04 ^b | | Nicolosi (área volcánica) (Sicilia-Italia) |
| Dórea <i>et al.</i> (2005) | 203 | | | 16.55 (11.44) ^a | | | <10 | Kayabi (India) |
| | | | | 4.75 (2.09) ^a | | | | Missão-Cururu (India) |
| | | | | 2.87 (2.13) ^a | | | | Kuburua (India) |
| Dunn <i>et al.</i> (2008) | 534 | | | 0.2 ^b ; 0.3 ^c | | | 6-10 | EE.UU. |
| Dunicz-Sokolowska <i>et al.</i> (2006) | | | 0.244 (0.25) ^a ; 0.165 ^b | | | 2.827 (2.14) ^a ; 2.140 ^b | 10-20 | Niños (Polonia) |
| Evrenoglou <i>et al.</i> (2013) | | 0.031 (0.029) ^a ; 0.02 ^c | 0.028 (0.028); 0.014 ^c | 0.49 (0.18) ^a ; 0.44 ^c | | 1.36 (1.47); 0.78 ^c | 11-12 | Philadelphia (Atenas) |

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|--|--|---|--|--|-------|--|
| | | 0.035 (0.011) ^a ; 0.036 ^c | 0.029 (0.021); 0.023 ^c | 0.52 (0.61) ^a ; 0.30 ^c | | 3.31 (6.86) ^a ; 1.29 ^c | | Kifisia (Atenas) |
| | | 0.026 (0.009) ^a ; 0.026 ^c | 0.025 (0.037) ^a ; 0.015 ^c | 0.36 (0.14) ^a ; 0.37 ^c | | 0.80 (0.67) ^a ; 0.6 ^c | | Kryoneri (Atenas) |
| Freire <i>et al.</i> (2010) | 72 | | | 1.04 ^b ; 0.96 ^c | | | 4 | Huelva (España) |
| Fujimura <i>et al.</i> (2012) | | | | 12.0 ^a /12.6 ^a | | | | Niños/Niñas (Guiana francesa) |
| Guentzel <i>et al.</i> (2007) | 20 | | | 1.12 (0.62) ^a | | | 2-18 | México |
| Hasan <i>et al.</i> (2004) | 42 | | | | | 0.79 (0.10) ^a | 6-18 | Áreas rurales (Emiratos Árabes Unidos) |
| | | | | | | 3.47 (0.47) ^a | | Áreas urbanas (Emiratos Árabes Unidos) |
| Haynes <i>et al.</i> (2010) | 12 | | | | 4.0 (1.96) ^a ; 3.52 ^b ; 3.42 ^c | | N.I. | Ohio (EE.UU.) |
| Haynes <i>et al.</i> (2012) | 38 | | | | 0.47 (0.3) ^a | | 7-9 | Ohio (EE.UU.) |
| Kim <i>et al.</i> (2008) | 112 | | | 0.74 ^a ; 0.59 ^b ; 0.62 ^c | | | 0-15 | Korea |
| Kordas <i>et al.</i> (2010) | 180 | 0.13 (0.14) ^a ; 0.09 ^b | 0.28 (0.53) ^a ; 0.17 ^b | | 2.16 (2.25) ^a ; 1.45 ^b | 17.64 (17.43) ^a ; 13.69 ^b | 0-3 | Montevideo (Uruguay) |
| Lim <i>et al.</i> (2010) | 124 | | | 0.51 ^c | | | <10 | Korea |
| Malm <i>et al.</i> (2010) | 51 | | | 11.4 (4.6) ^a | | | 1-11 | Amazonia Brasileña |
| Marques <i>et al.</i> (2007) | 82 | | | 2.6 (3.5) ^a | | | 5 | Porto Velho (Amazonia Brasileña) |
| Marques <i>et al.</i> (2012) | 688 | | | 2.28 (1.15) ^a ; 2.14 ^b | | | 0-5 | Ariquemes (Brasil) |
| McDowell <i>et al.</i> (2004) | 838 | | | 0.11 ^b ; 0.12 ^c | | | 1-5 | EE.UU. |
| Menezes-Filho <i>et al.</i> (2009) | 109 | | | | 15.2 ^c | | 1-10 | Expuestos (Bahía, Brasil) |
| | 43 | | | | 1.37 ^c | | | No expuestos (Bahía, Brasil) |
| Menezes-Filho <i>et al.</i> (2011) | 83 | | | | 5.83 ^c | | 6-12 | Expuestos (Estado de Bahía, Brasil) |
| Menezes-Filho <i>et al.</i> (2012) | 88 | | | | | 2.45 (3.70) ^a ; 1.26 ^b | 1-11 | Expuestos (Brasil) |
| | 44 | | | | | 2.68 (2.06) ^a ; 2.09 ^b | | No expuestos (Brasil) |
| Montes <i>et al.</i> (2011) | 77 | | | | 13.2 ^b | | 7-11 | Expuestos (Hidalgo, México) |
| | 93 | | | | 0.6 ^b | | | No expuestos (Hidalgo, México) |
| Montuori <i>et al.</i> (2006) | 130 | | | 0.938 (0.908) ^a | | | 4 | Isla de Menorca y Ribera del Ebro (España) |
| Nadal <i>et al.</i> (2005) | 134 | <0.13 ^{a,b} | <0.13 ^{a,b} | 0.70 (0.45) ^a ; 0.61 ^b | 0.16 (0.23) ^a ; 0.10 ^b | 0.86 (2.02) ^a ; 0.31 ^b | 12-14 | Cataluña (España) |
| Olivero-Verbel <i>et al.</i> (2008) | | | | 1.25 ^b / 0.95 ^b | | | <20 | Niños/Niñas (Costa del Caribe, Colombia) |
| Oyoo-Okoth <i>et al.</i> (2010) | 49 | | 0.25 ^a | | | 6 ^a | ≤ 5 | Kisumu City (Kenia) |
| | | | 0.08 ^a | | | 2 ^a | | Kendu-Bay (Kenia) |

| | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-----|----------------------------|----------------------------|---|--|--|-------------------|--|
| | | | 1.08 ^a | | | 22 ^a | | Karungu (Kenia) |
| | | | 0.125 ^a | | | 5 ^a | | Port Victoria (Kenia) |
| Özden <i>et al.</i> (2007) | 760 | | 53.38 (44.13) ^a | | | 2.41 (2.22) ^a | 11-13 | Estambul (Turquía) |
| Peplow and Augustine (2012) | 53 | | | 14 ^b ;14 ^c | | | 6-14 | Puleowime (Wayana) |
| | 27 | | | 6,0 ^b ;5,0 ^c | | | | Kawemhakan (Wayana) |
| Pereira <i>et al.</i> (2004) | 9 | 0.245 (0.044) ^a | 0.183 (0.056) ^a | | | 1.199 (0.256) ^a | | N.I. Expuestos (Portugal) |
| | 3 | 0.352 (0.117) ^a | 0.12 (0.033) ^a | | | 11.197 (5.009) ^a | | No expuestos (Portugal) |
| Pinheiro <i>et al.</i> (2007) | 168 | | | 5.97;13.22;10.83 ^c | | | 0-1; 2-6; 7-12 | Sao Luis do Tapajós (México) |
| | | | | 5.35;6.21;6.72 ^c | | | | Barreiras (México) |
| | | | | 1.11;2.27;2.99 ^c | | | | Panacauera (México) |
| Puklová <i>et al.</i> (2010) | | | | 0.2/0.15 ^b | | | 8-10 | Consumidores de pescado/No consumidores de pescado (República Checa) |
| Riojas-Rodríguez <i>et al.</i> (2010) | 79 | | | | | 12.60 ^b ; 12.13 ^c | 7-11 | Expuestos (Molango, México) |
| | | | | | | 0.56 ^b ; 0.57 ^c | | No expuestos (Molango, México) |
| Sanna <i>et al.</i> (2003) | 117 | | | | | 11.85 (11.68) ^a ; 8.46 ^c | N.I. | Portoscuso (Expuestos) (Cerdeña, Italia) |
| | 105 | | | | | 3.19 (2.54) ^a ; 1.99 ^c | | Sestu (No expuestos) (Cerdeña, Italia) |
| Sanna <i>et al.</i> (2008) | 193 | | | | | 2.04 (1.97) ^a ;1.47 ^b | | Carbonia (Cerdeña, Italia) |
| | | | | | | 1.61 (1.68) ^a ;0.87 ^b | | Gonnesa (Cerdeña, Italia) |
| | | | | | | 0.56 (0.93) ^a ; 0.27 ^b | | Sinnai (Cerdeña, Italia) |
| Shah <i>et al.</i> (2011) | 102 | | | | | 9.3 (1.4) ^a | 5-10 | Niños (Hyderabad, Pakistán) |
| | 87 | | | | | 8.9 (1.2) ^a | | Niñas (Hyderabad, Pakistán) |
| Stassen <i>et al.</i> (2012) | 35 | | 0.07 ^b | | | 19.0 ^b | 0-12 | Expuestos (Weenhayek, Bolivia) |
| | 27 | | 0.13 ^b | | | 9.4 ^b | | No expuestos (Wichí, Bolivia) |
| Strumylaite <i>et al.</i> (2004) | 190 | | | | | 2.7 ^b ;2.9 ^c /2.9 ^b ;3.1 ^c | 10-13 | Niños/Niñas (Lituania) |
| Tian <i>et al.</i> (2011) | 361 | | | 1.43 ^a /0.74 ^b /0.66 ^c | | | 3-5 | Nunavut Inuit (Canadá) |
| Umbangtalad <i>et al.</i> (2007) | 59 | | | 0.93 (0.01) ^a | | | N.I. | Tailandia |
| Wang <i>et al.</i> (2009) | 317 | | | | | 12.5 ^c | 6-12 | China |
| Wright <i>et al.</i> (2006) | 31 | 17.8 ^{a,d} | 57.7 ^{a,d} | | | 471.5 ^{a,d} | 11-13 | Oklahoma (EE.UU.) |
| Yasutake <i>et al.</i> (2003) | | | | 1.65;1.2 ^c | | | 10 | Minamata (Japón) (Niños; Niñas) |
| | | | | 1.5;1.35 ^c | | | | Kumamoto (Japón) (Niños; Niñas) |
| | | | | 1.6;1.55 ^c | | | | Tottori (Japón) (Niños; Niñas) |

| | | | | | | | | |
|----------------------------|----|--|--|--|--|--|------|---------------------------------|
| | | | | 1.75;1.60 ^c | | | | Wakayama (Japón) (Niños; Niñas) |
| | | | | 2.0;1.70 ^c | | | | Chiba (Japón) (Niños; Niñas) |
| Zhang <i>et al.</i> (2006) | 13 | | | 0.59 (0.54) ^a ; 0.45 ^c | | | 1-15 | Wujiazhan (China) |

^aMedia aritmética (SD); ^bMediana; ^cMedia Geométrica; ^dNiveles en µg/l

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. REACTIVOS

En este apartado se relacionan los reactivos utilizados en el presente estudio para el análisis de los diferentes elementos en las muestras de cabello y orina.

III.1.1. Determinación de arsénico (As) total

- Solución patrón de arsénico (As), Panreac, de $1,000 \pm 0,002$ mg/ml (As_2O_5 en H_2O).

- Sistema Milli-Q, Millipore Corp., para la obtención de agua grado reactivo.

- Ácido clorhídrico, HCl, (37%), Panreac, P.A.

- Solución de HCl al 10% (v/v): se diluyen 100 ml de HCl hasta 1 l de agua Milli-Q.

Se utiliza como solución ácida y como diluyente de patrones y muestras.

- Borohidruro sódico, $NaBH_4$, Aldrich, P.A.

- Hidróxido sódico, NaOH, Panreac, P.A.

- Solución de $NaBH_4$ al 0,2% (w/v) y NaOH al 0,05% (w/v): se diluye 1 g de $NaBH_4$ y 0,25 g de NaOH hasta 500 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como solución reductora.

- Ácido ascórbico, $C_8H_8O_6$, Panreac, P.A.

- Yoduro potásico, KI, Panreac, P.A.

- Solución al 5% (w/v) de ácido ascórbico /yoduro potásico: se diluyen 5 g de cada reactivo hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza para tratar el As^{5+} presente en la muestra y transformarlo a As^{3+} y por tanto, como diluyente de patrones y muestras.

III.1.2. Determinación de mercurio (Hg) total

- Solución patrón de mercurio (Hg), Panreac, de $1,000 \pm 0,002$ mg/ml (Hg^{2+} en H_2O).
- Sistema Milli-Q, Millipore Corp., para la obtención de agua grado reactivo.
- Ácido nítrico, HNO_3 , (65%), Panreac, P.A.
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , (96%), Panreac, P.A.
- Solución de HNO_3 y H_2SO_4 al 1,5% (v/v): se diluyen 15 ml de HNO_3 y otros 15 ml de H_2SO_4 hasta 1 l de agua Milli-Q. Esta mezcla de ácidos se utiliza como solución ácida y como diluyente de patrones y muestras.
- Borohidruro sódico, NaBH_4 , Aldrich, P.A.
- Hidróxido sódico, NaOH , Panreac, P.A.
- Solución de NaBH_4 al 3% (w/v) y NaOH al 1% (w/v): se diluyen 7,5 g de NaBH_4 y 2,5 g de NaOH hasta 250 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como solución reductora.
- Permanganato potásico, KMnO_4 , Merck, P.A.
- Solución al 5% de permanganato potásico: se diluyen 5 g de KMnO_4 hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como agente oxidante para eliminar los óxidos de nitrógeno reductores. Debe conservarse al abrigo de la luz.

III.1.3. Resto de metales analizados: Cadmio (Cd), Manganeso (Mn) y Plomo (Pb)

Debido a la técnica usada para analizar el resto de metales (Cd, Mn y Pb), la mayoría de los reactivos son comunes de ahí que se hayan agrupado al objeto de evitar reiteraciones.

III.1.3.a. Soluciones patrón

- Solución patrón de cadmio (Cd), Carlo Erba, de $1,000 \pm 0,002$ mg/ml ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en HCl).

- Solución patrón de manganeso (Mn), Carlo Erba, de $1,000 \pm 0,002$ mg/ml ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en HCl).

- Solución patrón de plomo (Pb), Carlo Erba, de $1,000 \pm 0,002$ mg/ml ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3).

III.1.3.b. Diluyente

- Sistema Milli-Q, Millipore Corp., para la obtención de agua grado reactivo.

- Ácido nítrico, HNO_3 , (65%), Panreac, P.A.

- Solución al 0,2% (v/v) de ácido nítrico en agua Milli-Q: se diluyen 0,2 ml de HNO_3 hasta 100 ml de agua Milli-Q. Se utiliza como diluyente de patrones y muestras y también como blanco.

III.1.3.c. Modificadores de matriz

- 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 100 ml de agua Milli-Q.

- Dihidrogenofosfato de amonio, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ Suprapur, Merck, P.A.

• Solución de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ al 1 % (w/v) en solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v): se pesan 0,5 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ hasta 50 ml de solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v). Se utiliza como modificador de matriz para el plomo.

- 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 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 para el cadmio.

- Ácido nítrico, HNO_3 , (65%), Panreac, P.A.

• Solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 1% (w/v), HNO_3 al 1% (v/v) y Tritón X-100 al 0,1% (v/v) en H_2O Milli-Q: se diluyen 1 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ con 100 ml de una solución de 0,05 ml de Tritón X-100 y 1 ml de HNO_3 en agua Milli-Q. Se utiliza como modificador de matriz para el manganeso.

III.1.4. Digestión de las muestras

- Sistema Milli-Q, Millipore Corp., para la obtención de agua grado reactivo.

- Ácido nítrico Suprapur, HNO_3 , (65%), Merck, P.A.

- Ácido clorhídrico Suprapur, HCl , (30%), Merck, P.A.

- Peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , (30%), Merck, P.A.

III.2. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

- Agitador de tubos de ensayo, Heidolph, modelo REAX2000.

- Balanza analítica Mettler, modelo AE 260.

- Baño de limpieza por ultrasonidos Selecta, modelo 514.

- Congelador Bosch a -32°C .

- Digestor asistido por microondas Anton Paar Multiwave 3000.

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo AAnalyst 800, equipado con corrector de fondo Zeeman.
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 560.
- Lámparas de descarga sin electrodos (EDL) Perkin Elmer para el As, el Cd y el Hg o de cátodo hueco (HCL) Perkin Elmer para el Mn y el Pb.
- Tubos de grafito con plataforma integrada de L'vov pirolizada.
- Generador de hidruros Perkin Elmer, modelo FIAS 100 (arsénico).
- Generador de hidruros Perkin Elmer, modelo MHS 10 (mercurio total).
- Material de vidrio (matraces, matraces Erlenmeyer, probetas, vasos de precipitado y pesa-sustancias).
- Pipetas DragonMed de volúmenes variables (50-200 μ l, 200-1000 μ l y 1-5 ml).
- Pipeta Rainin de volumen variable (1-10 ml).
- Puntas de plástico desechables para las pipetas.
- Tubos de propileno de 3 y 10 ml.
- Pocillos de fondo cónico de propileno de 2 ml.
- Película autosellante, Parafilm "M".
- Gradillas de plástico.
- Pipetas Pasteur de 3 ml, Copan.

III.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

La técnica seleccionada para la determinación de las concentraciones totales de metales en las muestras de cabello y orina ha sido la Espectrometría de Absorción Atómica –EAA- (*Atomic Absorption Spectrometry*, AAS). En esta técnica se produce la atomización a través de una llama (atomización por llama) o un horno de grafito

(atomización electrotérmica). El vapor atómico obtenido absorbe la radiación emitida por una fuente y un detector fotoeléctrico mide la intensidad de dicha radiación. También cabe la posibilidad de que ese vapor atómico sea obtenido generando el hidruro del metal correspondiente ya sea en frío (en el caso del Hg) o en caliente (para el As).

III.3.1. Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica

Se utilizó para la determinación de Cd, Mn y Pb. Esta técnica normalmente se emplea cuando se necesita disponer de límites de detección bajos de elementos no muy volátiles como suele ser el caso de niveles de dichos metales en muestras de cabello y orina. En este tipo de técnica es muy importante el uso de un modificador de matriz adecuado, tanto para patrones como para las muestras, para así eliminar las posibles interferencias en la medida. Una vez inyectada la muestra, las condiciones operativas del sistema de atomización, horno de grafito en este caso, transcurren de la siguiente forma:

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, lo que asegura 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 que permita estabilizar el elemento a analizar y someterlo a una mayor temperatura de calcinación para que ésta sea más eficaz. 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.

Además hay que tener en cuenta el tiempo de vida útil de los hornos de grafito el cual depende en gran medida 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) para así eliminar posibles impurezas y permitir una distribución uniforme de la temperatura en su interior.

III.3.2. Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros

Esta técnica se utiliza para los elementos capaces de formar su hidruro correspondiente (en nuestro caso para el As, el AsH_3 y para el Hg, el HgH_2). Estos hidruros, al ser volátiles, se arrastran hacia una célula de cuarzo previamente calentada a 900°C en el caso del As y a temperatura ambiente en el caso del Hg (atomización en vapor frío). Los hidruros son producidos por la adición de una solución reductora, NaBH_4 en NaOH, que genera hidrógeno naciente en contacto con los ácidos. Los hidruros gaseosos y el hidrógeno producido son arrastrados por una corriente de argón hacia la célula de cuarzo.

En el sistema de inyección de flujo automático FIAS-100 utilizado para el As, la muestra es llevada al detector en una corriente continua de flujo. Por el contrario, el generador de hidruros MHS-10 utilizado para el Hg opera de forma manual.

III.4. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS METÁLICOS EN CABELLO Y ORINA

III.4.1. Tratamiento previo de las muestras de cabello y orina

Antes del análisis de los metales en cabello, como primer paso, es necesario realizar un lavado del mismo para evitar posibles interferencias debido a la contaminación de productos cosméticos y otros contaminantes ambientales que puedan contener. El procedimiento de lavado y secado fue el siguiente:

En primer lugar, se lavó el material a utilizar (vasos de precipitado y matraz de 1l) con ácido nítrico al 69% y se enjuagó con H₂O milli-Q. Posteriormente se introdujeron en una estufa a 80° C hasta su completo secado.

A continuación, se preparó una dilución AL 25% de etanol. En un matraz de 1 l se diluyeron 250 ml de etanol en H₂O milli-Q (hasta su enrase).

Luego se vertieron unos 40 ml de la disolución preparada anteriormente en cada uno de los vasos de precipitado destinados al lavado del cabello, previamente etiquetados con el número de muestra que se fuese a colocar en cada uno de ellos.

Después se colocaron las muestras de cabello en sus vasos correspondientes con etanol y se introdujeron en el baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, se extrajeron y, mediante el uso de unas pinzas de plástico, previamente lavadas con etanol, se pasó cada una de las muestras de cabello a otros vasos que contenían H₂O milli-Q, y que previamente fueron preparados y etiquetados con el número de muestra correspondiente, para su aclarado.

De esta forma, se volvieron a colocar dichos vasos con H₂O milli-Q en el baño ultrasonidos durante 15 minutos.

Pasado este tiempo, se sacaron y, con ayuda de las pinzas de plástico, se extrajo cada muestra de cabello y se colocó sobre un papel de filtro para su secado, con la precaución de no mezclar unas muestras con otras.

A continuación se taparon con otro papel de filtro y se dejaron secar durante toda una noche a temperatura ambiente.

Por último, una vez que las muestras estaban completamente secas, se volvieron a empaquetar y marcar con su identificación correspondiente para su posterior mineralización y análisis.

Además del lavado, también fue necesario obtener una disolución de la muestra de cabello. En nuestro estudio se optó por una digestión ácida asistida por la energía de las microondas (Anton para, Multiwave 3000). El procedimiento de tratamiento de la muestra fue el siguiente:

- 1- Las muestras de cabello, previamente dispensadas en sobres de papel, fueron llevadas al laboratorio mediante cajas de cartón perfectamente selladas para evitar la pérdida de muestras.
- 2- En el momento de proceder a realizar los análisis, se extrajo una parte de la muestra, cuyo peso exacto debería ser de 0,05 g anotándose éste como *peso de mineralización*.
- 3- Esta porción fue sometida al proceso de digestión ácida (mineralización), depositándola en un tubo de cuarzo junto a 2 ml de H₂O Milli-Q, 2 ml de H₂O₂, 1 ml de HNO₃ suprapuro y 0,5 ml de HCl suprapuro.
- 4- Los tubos de cuarzo con cada muestra de cabello se dispusieron en el digestor junto a un tubo con los reactivos anteriormente citados pero sin muestra sirviendo así como *blanco de mineralización*.
- 5- El digestor fue convenientemente cerrado y se ejecutó el programa de digestión "Hair" cuyos parámetros están optimizados para muestras de cabello. Dichos parámetros fueron: 280°C de temperatura, 1400 W de potencia y 80 bar de límite de presión (10 min de rampa, 20 min de mantenimiento a 1400 W y 15 min de refrigeración).

- 6- Una vez finalizado el programa de digestión, el contenido de los tubos fue recogido en tubos de propileno de 10 ml, los cuales se sellaron con Parafilm M y fueron almacenados en cámara frigorífica quedando listos para su análisis.

En lo que se refiere a las muestras de orina, éstas fueron transportadas hasta el laboratorio en neveras portátiles debidamente aisladas para su conservación antes del análisis, no precisando procedimiento de digestión alguno.

III.4.2. Metodología analítica para la determinación de arsénico por generación de hidruros (FIAS-100)

Para llevar a cabo el análisis de arsénico (As) se trató previamente la muestra para reducir el As^{5+} (forma en la que se encuentra el arsénico) a As^{3+} , estado en el cual se midió. La reducción se llevó a cabo añadiendo a 1 ml de muestra o solución patrón, 1 ml de HCl concentrado y 1 ml de solución al 5% (w/v) de ácido ascórbico/yoduro potásico, siendo esta solución la que conseguiría la reducción. Tras una hora a temperatura ambiente, se diluyó con H_2O Milli-Q hasta 10 ml, de tal forma que el HCl quedara al 10%.

La curva patrón para el *calibrado* del espectrómetro se realizó a partir de soluciones hijas obtenidas de la solución patrón comercial del As de $1,000 \pm 0,002$ mg/ml. Así, para obtener las soluciones hijas se prepararon diluciones seriadas de la solución madre en 5 tubos de propileno (a-e) procediéndose de esta manera:

- a) Solución madre de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- b) Solución de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 500 μl de a) y 4,5 ml de H_2O Milli-Q.
- c) Solución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 500 μl de b) y 4,5 ml de H_2O Milli-Q.
- d) Solución de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 500 μl de c) y 4,5 ml de H_2O Milli-Q.
- e) Solución de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 500 μl de d) y 4,5 ml de H_2O Milli-Q.

La preparación de la curva patrón acuosa se llevó a cabo siguiendo la Tabla 3. Una vez preparada se dejaron reaccionar estos 3 ml durante una hora. Transcurrida dicha hora, se adicionaron 7 ml de H₂O Milli-Q a cada uno de los patrones.

Tabla 3. Metodología para la realización de la curva patrón acuosa de arsénico.

| Concentración (µg /l) | ml As de 0,1 µg/ml | ml de H ₂ O Milli-Q | ml HCl concentrado | ml mezcla KI/AA |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------|
| 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 0,5 | 0,05 | 0,95 | 1 | 1 |
| 1,5 | 0,15 | 0,85 | 1 | 1 |
| 2,5 | 0,25 | 0,75 | 1 | 1 |

En lo que concierne a la *preparación de la muestra*, experiencias previas demostraron la existencia de interferencia de matriz, de ahí que la preparación se realizara según el método de adición, de tal forma que la muestra tuviera una dilución final 1/20 (0,5 ml de muestra en un volumen final de 10 ml).

El método de adición (o adición de patrón interno) se llevó a cabo añadiendo a cada punto de la curva patrón acuosa, una misma cantidad de muestra, en este caso 0,5 ml completando hasta 1 ml con H₂O Milli-Q (Tabla 4). Igualmente, dejamos reaccionar estos 3 ml una hora y a continuación se agregaron 7 ml de H₂O Milli-Q a cada una de las muestras.

Tabla 4. Metodología para la preparación de las muestras en la determinación de As.

| Concentración (µg/l) | ml As 0,1 µg/ml | ml H ₂ O Milli-Q | ml de muestra | ml HCl concentrado | ml mezcla KI/AA |
|----------------------|-----------------|-----------------------------|---------------|--------------------|-----------------|
| 0+X | 0 | 0,5 | 0,5 | 1 | 1 |
| 0,5+X | 0,05 | 0,45 | 0,5 | 1 | 1 |
| 1,5+X | 0,15 | 0,35 | 0,5 | 1 | 1 |
| 2,5+X | 0,25 | 0,25 | 0,5 | 1 | 1 |

X= Concentración de la muestra.

Las *condiciones* de trabajo del espectrómetro de absorción atómica para la determinación de As fueron las siguientes:

- Lámpara de descarga sin electrodos (EDL) para As.
- Longitud de onda: 193,7 nm
- Rendija: 0,7 nm
- Modo de lectura: Altura de pico

Las condiciones en el sistema FIAS fueron:

- Temperatura de la célula: 900 °C
- Volumen de inyección de muestra: 500 µl

Para la determinación de As con el sistema FIAS-100 se precisaron varias etapas (Tabla 5):

Tabla 5. Etapas requeridas para la determinación de As mediante el sistema FIAS-100.

| Etapa | Tiempo (s) | Velocidad bomba | Posición válvula | Lectura |
|------------|------------|-----------------|------------------|---------|
| Prellenado | 10 | 120 | Llenado | |
| 1ª | 10 | 120 | Llenado | |
| 2ª | 45 | 120 | Inyección | X |
| 3ª | 1 | 1 | Llenado | |

Para la obtención de los *resultados* fue necesario realizar una recta de regresión lineal ($y=a + bx$) utilizando como variable dependiente “y” las adiciones efectuadas, es decir, 0; 0,5; 1,5 y 2,5 y como variable independiente “x” o lo que es igual, sus correspondientes absorbancias corregidas considerando la señal del blanco (*Blank Correction Signal*). De esta manera se obtendría la ordenada en el origen (a) y la pendiente (b), siendo la concentración de cada muestra igual a la expresión “a/b x dilución” en nuestro caso a/b x 20 ya que la dilución de la muestra fue 20 (0,5 ml de muestra en un volumen final de 10 ml).

III.4.3. Metodología analítica para la determinación de mercurio mediante generación de hidruros (MHS-10)

El mercurio también utiliza la generación de hidruros para su análisis pero en este caso no fue necesario aplicar a la determinación de este metal un método de adición. Tanto las muestras como los patrones, fueron preparados con una mezcla de ácidos de HNO₃ y H₂SO₄ al 1,5% (v/v) y se les adicionaron justo antes de realizar la medida 0,5 ml de KMnO₄ al 5% como agente oxidante. Primeramente, la curva de *calibrado* del espectrómetro se realizó a partir de soluciones hijas obtenidas de la solución patrón comercial de Hg de 1,000 ± 0,002 mg/ml. Para obtener las soluciones hijas se prepararon diluciones seriadas de la solución madre en 5 tubos de propileno, procediéndose de esta manera:

- a) Solución madre de 1000 µg/ml.
- b) Solución de 100 µg/ml: 500 µl de a) y 4,5 ml de mezcla de ácidos.
- c) Solución de 10 µg/ml: 500 µl de b) y 4,5 ml de mezcla de ácidos.
- d) Solución de 1 µg/ml: 500 µl de c) y 4,5 ml de mezcla de ácidos.
- e) Solución de 0,1 µg/ml: 500 µl de d) y 4,5 ml de mezcla de ácidos.

La preparación de la curva patrón acuosa se llevó a cabo siguiendo lo indicado en la Tabla 6:

Tabla 6. Metodología para la realización de la curva patrón acuosa de Hg.

| Concentración (µg/l) | µl de 0,1 µg/ml | ml de mezcla de ácidos |
|----------------------|-----------------|------------------------|
| 0 | 0 | 10 |
| 2,5 | 250 | 9,75 |
| 5 | 500 | 9,5 |
| 10 | 1000 | 9 |

Para la *preparación de la muestra* se empleó la misma mezcla de ácidos, diluyendo con 9 ml de ésta, 1 ml de muestra. La dilución fue de 1/10.

Las *condiciones* instrumentales del espectrómetro de absorción atómica para la determinación del Hg fueron las siguientes:

- Lámpara de descarga sin electrodos (EDL) para Hg.
- Longitud de onda: 253,6 nm
- Rendija: 0,7 nm
- Modo de lectura: Altura de pico

Las condiciones en el sistema MHS-10 fueron las siguientes:

- Temperatura de la célula: ambiente (no precalentada)
- Inyección manual de la muestra

Los *resultados* se obtuvieron al interpolar los datos de absorbancia corregidos con el blanco (aportado únicamente por la muestra de ácidos) en la curva de calibrado.

III.4.4. Metodología analítica para la determinación de metales por horno de grafito

III.4.4.1. Cadmio

1- 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%.

2- Patrones

Para realizar la curva patrón 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 tabla 7:

Tabla 7. Curva patrón de calibrado para la determinación de Cd.

| Concentración ($\mu\text{g/l}$) | ml Cd de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ | ml HNO_3 0,2% |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 0,5 | 0,25 | 4,75 |
| 1 | 0,5 | 4,5 |
| 1,5 | 0,75 | 4,25 |

3- Muestra

Se agregaron 400 μl de H_2O Milli-Q a 100 μl consiguiéndose de este modo una dilución 1/5 de la muestra.

4- Modificador de matriz

Muestras y patrones precisaron de la adición de un modificador de matriz. Para la determinación de Cd el que se utilizó fue el compuesto por una mezcla de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 0,03% y $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ al 3,3%.

5- Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

- Lámpara de descarga sin electrodos (EDL) para Cd
- Longitud de onda: 228,8 nm
- Rendija: 0,7 nm
- Modo de lectura: Área de pico
- Corrector de fondo: Zeeman
- Tiempo de retardo (s): 0
- Volumen de muestra (μl): 20

–Volumen de modificador (μl): 20

–Programación del horno (Tabla 8):

Tabla 8. Programación de temperaturas para la determinación de Cd.

| Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) | Tiempo de rampa (s) | Tiempo de mantenimiento (s) | Ar (ml min^{-1}) | Lectura |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 100 | 10 | 5 | 250 | |
| 120 | 5 | 10 | 250 | |
| 600 | 10 | 10 | 250 | |
| 700 | 10 | 5 | 250 | |
| 1600 | 0 | 5 | 0 | X |
| 2600 | 4 | 6 | 250 | |

III.4.4.2. Manganeso

1- Soluciones hijas

- a) Solución madre de $1000 \mu\text{g/ml}$.
- b) Solución de $100 \mu\text{g/ml}$: $500 \mu\text{l}$ de a) y $4,5 \text{ ml}$ de HNO_3 $0,2\%$.
- c) Solución de $10 \mu\text{g/ml}$: $500 \mu\text{l}$ de b) y $4,5 \text{ ml}$ de HNO_3 $0,2\%$.
- d) Solución de $1 \mu\text{g/ml}$: $500 \mu\text{l}$ de c) y $4,5 \text{ ml}$ de HNO_3 $0,2\%$.
- e) Solución de $0,1 \mu\text{g/ml}$: $500 \mu\text{l}$ de d) y $4,5 \text{ ml}$ de HNO_3 $0,2\%$.
- f) Solución de $0,01 \mu\text{g/ml}$: $500 \mu\text{l}$ de e) y $4,5 \text{ ml}$ de HNO_3 $0,2\%$.

2- Patrones

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

Tabla 9. Curva patrón de calibrado para la determinación de Mn.

| Concentración (µg /l) | ml Mn de 0,01 µg/ml | ml HNO ₃ 0,2% |
|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| 1 | 0,5 | 4,5 |
| 2,5 | 1,25 | 3,75 |
| 5 | 2,5 | 2,5 |
| 10 | 5 | 0 |

3- Muestra

Se agregaron 300 µl de H₂O Milli-Q a 100 µl consiguiéndose de este modo una dilución 1/4 de la muestra.

4- Modificador de matriz

Muestras y patrones precisaron de la adición de un modificador de matriz. Para la determinación de Mn el que se utilizó fue una solución de Mg(NO₃)₂ al 1% (w/v), HNO₃ al 1% (v/v) y Tritón X-100 al 0,1% (v/v) en H₂O Milli-Q.

5- Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

–Lámpara de cátodo hueco (HCL) para Mn

–Longitud de onda: 279,5 nm

–Rendija: 0,2 nm

- Modo de lectura: Área de pico
- Corrector de fondo: Zeeman
- Tiempo de retardo (s): 0
- Volumen de muestra (μl): 20
- Volumen de modificador (μl): 20
- Programación del horno (Tabla 10):

Tabla 10. Programación de temperaturas para la determinación de Mn.

| Temperaturas (°C) | Tiempo de rampa (s) | Tiempo de mantenimiento (s) | Ar (ml min^{-1}) | Lectura |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 110 | 1 | 30 | 250 | |
| 130 | 15 | 30 | 250 | |
| 1300 | 10 | 20 | 250 | |
| 1900 | 0 | 5 | 0 | X |
| 2450 | 1 | 3 | 250 | |

III.4.4.3. Plomo

1- Soluciones hijas

- a) Solución madre de 1000 $\mu\text{g/ml}$.
- b) Solución de 100 $\mu\text{g/ml}$: 500 μl de a) y 4,5 ml de HNO_3 0,2%.
- c) Solución de 10 $\mu\text{g/ml}$: 500 μl de b) y 4,5 ml de HNO_3 0,2%.
- d) Solución de 1 $\mu\text{g/ml}$: 500 μl de c) y 4,5 ml de HNO_3 0,2%.

2- Patrones

Para realizar la curva patrón de plomo se adicionaron las cantidades de la solución de 1 µg/ml de Pb y de HNO₃ 0,2% que se relacionan en la siguiente tabla:

Tabla 11. Curva patrón de calibrado para la determinación del Pb.

| Concentración (µg /l) | ml Pb de 1 µg/ml | ml HNO ₃ 0,2% |
|-----------------------|------------------|--------------------------|
| 50 | 0,25 | 4,75 |
| 100 | 0,5 | 4,5 |
| 200 | 1 | 4 |

3- Muestra

Se agregaron 400 µl de H₂O Milli-Q a 100 µl de muestra consiguiéndose de este modo una dilución 1/5.

4- Modificador de matriz

Muestras y patrones precisaron de la adición de un modificador de matriz. Para la determinación de Pb el que se utilizó fue el compuesto por la solución de (NH₄)H₂PO₄ al 1 % (w/v) en una solución de Tritón X-100 al 0,1% (v/v).

5- Condiciones en el espectrofotómetro de absorción atómica

–Lámpara de cátodo hueco (HCL) para Pb

–Longitud de onda: 283,3 nm

–Rendija: 0,7 nm

–Modo de lectura: Área de pico

- Corrector de fondo: Zeeman
- Tiempo de retardo (s): 0
- Volumen de muestra (μl): 10
- Volumen de modificador (μl): 10
- Programación del horno (Tabla 12):

Tabla 12. Programación de temperaturas para la determinación de Pb.

| Temperaturas (°C) | Tiempo de rampa (s) | Tiempo de mantenimiento (s) | Ar (ml min^{-1}) | Lectura |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 110 | 10 | 10 | 250 | |
| 200 | 10 | 10 | 250 | |
| 800 | 10 | 10 | 250 | |
| 850 | 10 | 5 | 250 | |
| 1700 | 0 | 5 | 0 | X |
| 2600 | 1 | 3 | 250 | |

III.5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

En el contexto de los objetivos de la calidad del proyecto de tesis y concretamente en la determinación de los elementos metálicos en las muestras de cabello y orina, creímos absolutamente necesario contar con una validación analítica que permitiera conocer diversos parámetros de acuerdo a la Normativa Internacional (UNE-EN ISO/IEC 17025:2005) 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 y la recuperación.

En el caso de nuestro laboratorio, los métodos utilizados en el estudio para la determinación de Hg total, As total, Cd, Mn y Pb descritos en los apartados anteriores fueron previamente validados (Gil et al., 2006; Olmedo et al., 2010). Como datos más relevantes de dicha validación hemos de destacar que los límites de detección (LOD) para la orina ($\mu\text{g/l}$) y el pelo ($\mu\text{g/g}$) fueron: 0,030 y 0,0033 para As y Cd; 0,002 y 0,00022 para Hg; 0,120 y 0,0132 para Mn; y 0,830 y 0,0913 para Pb, respectivamente. Los límites de cuantificación (LOQ) para la orina ($\mu\text{g/l}$) y el pelo ($\mu\text{g/g}$) fueron: 0,100 y 0,010 para As; 0,090 y 0,010 para Cd; 0,007 y 0,0007 para Hg; 0,390 y 0,040 para Mn; y 2,710 y 0,274 para Pb, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) del análisis fueron 6,70; 4,94; 3,56; 2,57 y 2,63 (%) para As, Cd, Hg, Mn y Pb, respectivamente (Gil et al., 2006; Olmedo et al., 2010).

III.6. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS, CHEQUEO DEL EQUIPO Y LIMPIEZA DE MATERIAL

III.6.1. 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 (error de lectura de los datos, de cálculo, etc.) y mejora la estimación del verdadero valor 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 así la exactitud. Este proceso se repitió cada vez que se analizó un grupo de muestras o bien, se comenzó una nueva jornada de trabajo.

Durante el análisis de las muestras se analizó un patrón 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.6.2. 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 0,995.

- 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.6.3. 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, orina y cabello.

Los materiales de referencia para las muestras orina fueron suministrados por SERONORMTM, ref.201205 (Billinngstaid, Noruega).

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

III.6.4. 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 abundantemente 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 almacenó en bolsas de plástico estériles.

III.7. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA EL MUESTREO

III.7.1. Diseño epidemiológico y población de estudio

Se ha realizado un estudio epidemiológico transversal (Hernández, 2002; Rothman et al., 2008), en el cual se determinan los niveles de As, Cd, Mn, Hg y Pb en cabello y orina de la población infantil de 6-9 años residente en Huelva capital y en los municipios colindantes a la Ría de Huelva (Aljaraque, Punta Umbría, San Juan del Puerto, Moguer, Palos de la Frontera) y la comarca minera del Andévalo onubense (Tharsis, Valdelamusa), para evaluar el grado de impregnación a los metales pesados y el metaloide anteriormente mencionados.

III.7.2. Procedimiento de selección de la población de estudio

Previa solicitud de los permisos pertinentes a la Delegación de Educación de Huelva, se contactó con los directores de los colegios públicos de primaria de los municipios incluidos en el estudio para informarles sobre los objetivos del mismo. Una vez que se obtuvo la autorización de la Dirección de las escuelas, se le entregó a cada niño una carta informativa sobre los objetivos del estudio para seleccionar aquellos

que cumplieran con los criterios de inclusión de éste. En segundo lugar, se solicitó a los padres cuyos hijos cumplieran con los criterios de inclusión, la autorización necesaria para que su hijo participara, previa firma de un consentimiento informado.

Los criterios de selección que se establecieron para la población infantil que ha formado parte del estudio fueron:

- Como criterios de *inclusión* se establecieron: aquellos niños/as que tuviesen entre 6 y 9 años de edad, que asistiesen a colegios públicos de los municipios incluidos en el estudio, que llevasen residiendo en la zona de estudio como mínimo un año de manera continuada y que tanto ellos como al menos uno de sus padres o tutor, hablase español.

- Como criterios de *exclusión* se consideraron que no formarían parte del estudio aquellos niños que hubiesen presentado problemas pre- y perinatales, diabetes, enfermedades neurológicas, traumatismo cerebral, cirugía con anestesia total o la existencia de patologías hepáticas (hepatitis aguda o crónica) o renales en el momento de la captación de sujetos debido a que podría verse afectado el metabolismo y excreción de estos compuestos, respectivamente.

III.7.3. Muestreo y Tamaño muestral

Se realizó un muestreo aleatorio de 22 colegios de Huelva capital y de los municipios de la provincia seleccionados para el estudio (n=16). Luego se entregó a todos los niños y niñas matriculados en los colegios escogidos una invitación para participar en el estudio. De todos los niños y niñas entre 6 y 9 años que se contó con la aprobación de sus padres o tutor legal para participar en el estudio, previa firma de una carta de consentimiento informado, se realizó un muestro aleatorio estratificado por sexo.

Dado que este estudio se enmarca en un proyecto para evaluar la asociación entre la exposición a metales pesados y arsénico y desarrollo neuropsicológico en población infantil, el cálculo del tamaño muestral se realizó tomando como referencia los hallazgos de Tong et al. (1996), donde se encontró una reducción de -4.3 en el

cociente intelectual medido a través de la escala de inteligencia general del WISC para niños con incremento de los niveles de Pb, por lo que el tamaño muestral necesario para detectar un resultado similar con un error alfa de 0.05 y una potencia del 80% se estimó inicialmente en 252 (126 niños y 126 niñas). Finalmente se tomaron 261 muestras de orina (135 niños y 126 niñas), al objeto de contemplar las posibles pérdidas durante el estudio. En este sentido, el número total de muestras de cabello fueron 220.

III.7.4. Toma de muestras biológicas

La toma de muestra fue llevada a cabo de diferente manera según el tipo de muestra de la que se tratara (cabello u orina). En todos los casos se procuró recoger un volumen de muestra suficiente para realizar todos los análisis, precisando como mínimo de 100 mg de cabello y 30 ml de orina por muestra. El día anterior a la toma de muestra se entregó a cada uno de los niños y niñas un recipiente de polipropileno para que recogiesen la primera orina de la mañana. A un 10% de los niños/as seleccionados aleatoriamente se les tomaron muestras repetidas de orina (al menos 2) en diferentes semanas, para evaluar la variabilidad intra-individual de la exposición a metales pesados y arsénico. En cuanto a las muestras de cabello, éste se tomó de la parte occipital del cuero cabelludo y se almacenó en sobres de papel que, a su vez, fueron introducidos en bolsas de plástico independientes. Los recipientes con las muestras de orina y las muestras de cabello fueron entregados al personal de trabajo de campo en las respectivas escuelas. Tanto a cada muestra de cabello como a cada muestra de orina se les asignó un código preciso.

III.7.5. Codificación

A cada bolsa de plástico con las muestras de cabello se le colocó una etiqueta para identificarlas, la cual contenía un código con una numeración. Del mismo modo se procedió para el caso de las muestras de orina, en las cuales la etiqueta con el código se ubicó en el lateral de cada recipiente de polipropileno. Además se realizó una base

de datos en la que se registraron las numeraciones (códigos) y los nombres y apellidos de los niños a los que correspondiesen y de los cuales procedían las muestras recogidas.

III.7.6. Transporte y almacenamiento

Las muestras de cabello y orina colocadas en sus bolsas y recipientes de polipropileno correspondientes y con sus respectivos códigos fueron recogidas por el personal de trabajo de campo en las escuelas. Posteriormente, las muestras de cabello se empaquetaron en cajas perfectamente selladas para evitar su pérdida y las de orina se colocaron en neveras para su transporte, refrigeradas a -4 °C. Ambos tipos de muestras fueron transportadas hasta el laboratorio donde las muestras de orina se almacenaron a -20 °C y se conservaron hasta el momento del lavado y la digestión (en el caso del cabello) para su posterior análisis. Para conservar el contenido del cabello sobrante, se utilizó la misma bolsa de plástico en la que fue previamente envasado.

III.7.7. Obtención de información a través de cuestionario

Se recogió información sobre potenciales factores asociados con la exposición a metales pesados y arsénico y otras covariables a través de dos cuestionarios estructurados. Así, se administró a las madres, padres o tutor un cuestionario autoaplicado y otro mediante una entrevista telefónica, que recogían entre otros información de los siguientes aspectos:

III.7.7.a. Cuestionario autoaplicado:

- 1) Hábitos alimenticios de los/as niños/as. Lugar donde comen, tipo de agua que consumen, origen de los productos que consumen y forma de cocinar los alimentos.
- 2) Hábitos higiénicos. Frecuencia con la que se ducha y se lava las manos antes de comer.

3) Actividad física del niño/niña.

III.7.7.b. Cuestionario mediante entrevista telefónica:

1) Variables socio-demográficas: edad y sexo de los niños/as, país de origen de los padres, nivel educativo y de ingresos de los padres, núcleo de población donde viven (urbano, metropolitano, rural) y tiempo en el domicilio actual.

2) Historia laboral de los padres y hábitos de higiene laboral.

3) Exposiciones ambientales a sustancias químicas y consumo de tabaco.

4) Tabaquismo pasivo

5) Presencia de animales en casa.

6) Hábitos de limpieza en la vivienda.

7) Antecedentes patológicos e información sobre medicación de los niños/as.

Variabes antropométricas:

III.7.8. Medidas antropométricas

A todos los niños/as se les realizaron mediciones del peso y talla, con objeto de calcular el índice de masa corporal

III.8. TRATAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS

III.8.1. Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis descriptivo de las concentraciones de metales expresados en $\mu\text{g/l}$ y $\mu\text{g/g}$ de creatinina en el caso de la orina, y en $\mu\text{g/g}$ para el cabello, mediante medidas de tendencia central robustas (media geométrica y mediana) y los percentiles

25, 50, 75, 95 y valor máximo. Para las muestras no detectables, se utilizaron los criterios descritos por la Organización Mundial de la Salud, empleando el valor del límite de detección de cada metal expresado en las unidades correspondientes en cada tipo de muestra dividido por la raíz cuadrada de dos (CDC, 2009).

Se estudiaron las diferencias en las concentraciones en función de las variables de edad, género, lugar de residencia, índice de masa corporal (IMC), tipo de agua de consumo habitual, actividad física, etc. mediante los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Se empleó además el coeficiente de correlación de Spearman para cuantificar la correlación entre los cinco analitos medidos en cada medio biológico. Para todos los test de hipótesis se consideró un nivel de significación $\alpha=0.05$.

Para evaluar los factores asociados a los niveles de compuestos se construyeron modelos de regresión Tobit univariantes y multivariantes, incluyendo como variables dependientes cada uno de los metales analizados, y como variables independientes aquellas relativas a hábitos de vida, exposiciones ambientales, características socio-demográficas y prácticas preventivas. Los modelos Tobit son muy útiles para modelizar variables censuradas, y por tanto, son adecuados para las medidas que tienen un límite mínimo de detección por debajo del cual se desconoce el valor real. Estos modelos tienen en cuenta la incertidumbre en las estimaciones, la cual será mayor cuanto más elevado sea el número de valores censurados. Las variables dependientes fueron transformadas mediante logaritmo neperiano para reducir así la asimetría de su distribución y cumplir los supuestos de normalidad del modelo.

Para construir el mejor modelo predictivo para cada metal se analizó en primer lugar la asociación bivariante con cada una de las variables independientes y se seleccionaron aquellas que presentaron una $p<0.20$ en el test de Wald. En un segundo paso, se construyó un modelo de regresión multivariante con las variables candidatas y se eliminaron mediante un procedimiento "*backward*" de selección aquellas que no resultaron asociadas con la variable dependiente con una $p<0.10$.

Las variables dependientes (concentración de metal expresada como $\mu\text{g/l}$) fueron enfrentadas frente a los potenciales predictores (variables independientes)

entre los que se encontraban los estilos de vida o las características sociodemográficas. De acuerdo con Barr y colaboradores (2005), los niveles de creatinina en orina fueron incluidos como covariable independiente en los modelos de regresión en lugar de emplear las concentraciones de metal ajustadas en función de los valores de creatinina en orina (ajuste por creatinina), ya que esta aproximación es más correcta de cara a evitar estimaciones del efecto sesgadas.

Los análisis estadísticos se realizaron con los paquetes estadísticos IBM SPSS 19 y Stata11.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. RESULTADOS

En el estudio participaron finalmente un total de 261 niños, de los cuales 126 fueron niñas y 135, niños (Tabla 13). El 56% de dicha población infantil se encontraba en el rango de 6 a 7 años, mientras que el 44% tenían entre 8 y 9 años. Por otro lado, aproximadamente el 45% de las madres trabajaban, el 43% se definía como ama de casa y el 13% eran desempleadas. Entre los padres, el 25% resultó no tener empleo. La mayoría de los niños (91%) vivía en zonas urbanas, entendiéndose por ello aquellos que vivían en ciudades (capitales de provincia), mientras que el área metropolitana hacía referencia a aquellos niños que vivían próximos a las ciudades, en el cinturón que rodea a las mismas.

La distribución de los niveles de As, Cd, Hg, Mn y Pb en orina y cabello de la población de estudio se muestran en las Tablas 14 y 15. Dado que los valores no se ajustaban a una distribución normal, se presentan los percentiles (25, 50 -medianas, 75 y 95) y el nivel máximo, así como las medias geométricas para cada elemento en las dos matrices biológicas estudiadas. El 90% y el 76% de las muestras de orina se encontraron por debajo del límite de detección (LOD) tanto para el Pb como para el Mn, respectivamente. A su vez, el 61%, el 57% y el 35% de las muestras de cabello estuvieron por debajo del LOD para el Cd, Pb y As, respectivamente. Los valores medios (media aritmética) se incluyen a efectos comparativos con otros estudios referidos en la literatura especializada.

Las tablas 16, 17, 18 y 19 muestran los datos del análisis bivariado relativo a las concentraciones de elementos metálicos en orina y cabello así como algunas variables predictoras que incluyeron el género, el agua de consumo, el lugar de residencia y el índice de masa corporal. Las niñas presentaron niveles significativamente mayores de Cd, Hg, Mn y Pb en cabello, siendo aproximadamente el doble que las halladas en niños. Resulta interesante destacar el hecho de que aquellos niños que bebían agua de pozo o manantial presentaron altos niveles de As en orina. Asimismo, se observó una correlación entre los niveles de Hg en orina y el hecho de vivir en zonas urbanas.

Tabla 13. Descripción de las características sociodemográficas de los participantes

| | N | (%) |
|---|----------|------------|
| Sexo | | |
| Niños | 135 | (51,7) |
| Niñas | 126 | (48,3) |
| Edad | | |
| 6-7 | 145 | (55,6) |
| 8-9 | 116 | (44,4) |
| Residencia | | |
| Urbana | 225 | (89,6) |
| Metropolitana | 15 | (6,0) |
| Rural | 11 | (4,4) |
| Distancia a las zonas mineras | | |
| Menos de 200 m | 12 | (5,7) |
| Entre 200-500 m | 4 | (1,9) |
| Entre 500-1000 m | 41 | (19,5) |
| Más de 1000 m | 153 | (72,9) |
| Distancia a las áreas industriales | | |
| Menos de 200 m | 7 | (3,6) |
| Entre 200-500 m | 1 | (0,5) |
| Entre 500-1000 m | 10 | (5,1) |
| Más de 1000 m | 178 | (90,8) |
| Distancia a las áreas agrícolas | | |
| Menos de 200 m | 28 | (13,5) |
| Entre 200-500 m | 13 | (6,3) |
| Entre 500-1000 m | 46 | (22,2) |
| Más de 1000 m | 120 | (58,0) |
| Ocupación de la madre | | |
| Empleada | 112 | (44,6) |
| Ama de casa | 107 | (42,6) |
| Desempleada | 32 | (12,8) |
| Ocupación del padre | | |
| Empleado | 168 | (75,0) |
| Desempleado | 56 | (25,0) |

Tabla 14. Niveles de metales pesados y arsénico en muestras de orina de la población de estudio

| Metal | N | %<LOD | MA (SD) | MG | P25 | Mediana | P75 | P95 | Máximo |
|--------------------------|-----|-------|----------------------|----------------|--------|----------------|--------|--------|---------|
| Orina^a | | | | | | | | | |
| As | 261 | 14,2 | 1,417 (1,294) | 0,701 | 0,500 | 1,170 | 1,930 | 3,900 | 8,340 |
| Cd | 261 | 8,4 | 0,319 (0,229) | 0,215 | 0,130 | 0,292 | 0,456 | 0,712 | 1,502 |
| Hg | 261 | 21,1 | 1,305 (1,230) | 0,304 | 0,330 | 1,130 | 2,000 | 3,460 | 9,850 |
| Mn | 261 | 65,5 | < 0,120 | < 0,120 | <0,120 | < 0,120 | <0,120 | 0,946 | 6,127 |
| Pb | 261 | 90,0 | < 0,830 | < 0,830 | <0,830 | < 0,830 | <0,830 | 1,580 | 7,320 |
| Orina^b | | | | | | | | | |
| As | 261 | 14,2 | 5,370 (6,500) | 2,438 | 1,535 | 3,398 | 6,659 | 20,784 | 44,059 |
| Cd | 261 | 8,4 | 1,370 (1,610) | 0,747 | 0,400 | 0,853 | 1,582 | 4,839 | 10,074 |
| Hg | 261 | 21,1 | 5,880 (9,370) | 1,059 | 0,696 | 3,100 | 6,914 | 20,126 | 74,103 |
| Mn | 261 | 65,5 | NC | NC | NC | NC | NC | 3,781 | 107,735 |
| Pb | 261 | 90,0 | NC | NC | NC | NC | NC | 9,390 | 54,806 |

MA (DE): Media (Desviación estándar); MG: Media Geométrica; Px: Percentil x; ^aµg/l; ^bµg/g creatinina. Límites de detección (LOD) en orina (µg/l): 0,030 para As y Cd; 0,002 para Hg; 0,120 para Mn y 0,830 para Pb.

NC: no computable (la MA, MG, P25 y mediana de los niveles de Mn y Pb en orina, ajustados por creatinina, no pueden mostrarse a causa del alto porcentaje de muestras que se encontraron por debajo del límite de detección).

Tabla 15. Niveles de metales pesados y arsénico en muestras de cabello de la población de estudio

| Metal | N | %<LOD | MA (SD) | MG | P25 | Mediana | P75 | P95 | Máximo |
|-------------------------|----------|-----------------|---------------------|--------------------|------------|-------------------|------------|------------|---------------|
| Hair^a | | | | | | | | | |
| As | 220 | 34,9 | 0,067(0,104) | 0,017 | <0,0033 | 0,021 | 0,093 | 0,302 | 0,575 |
| Cd | 220 | 61,3 | < 0,0033 | < 0,0033 | <0,0033 | <0,0033 | 0,007 | 0,067 | 0,320 |
| Hg | 220 | 7,3 | 1,282(1,524) | 0,407 | 0,376 | 0,910 | 1,726 | 4,128 | 15,110 |
| Mn | 220 | 13,0 | 0,263(0,271) | 0,137 | 0,082 | 0,199 | 0,375 | 0,717 | 2,624 |
| Pb | 220 | 57,1 | < 0,0913 | < 0,0913 | <0,0913 | <0,0913 | 0,251 | 2,089 | 13,750 |

MA (DE): Media (Desviación estándar); MG: Media Geométrica; Px: Percentil x; ^aµg/g. Límites de detección (LOD) en cabello (µg/g): 0,0033 para As y Cd; 0,00022 para Hg; 0,0132 para Mn y 0,0913 para Pb.

Tabla 16. Concentraciones de metales pesados (valores medios \pm desviación estándar) en orina y cabello en relación al género como posible factor predictor

| Metal pesado | Muestra biológica | Género | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | | Masculino | Femenino |
| As | Orina ^a | 5,89 \pm 7,34 | 4,82 \pm 5,44 |
| | Cabello ^b | 0,06 \pm 0,08 | 0,08 \pm 0,12 |
| Cd | Orina ^a | 1,34 \pm 1,47 | 1,41 \pm 1,75 |
| | Cabello ^b | < 0,0033 | < 0,0033 |
| Hg | Orina ^a | 5,60 \pm 7,36 | 6,18 \pm 11,16 |
| | Cabello ^b | 0,98\pm1,10 | 1,51\pm1,75** |
| Mn | Orina ^a | NC | NC |
| | Cabello ^b | 0,16\pm0,15 | 0,35\pm0,31** |
| Pb | Orina ^a | NC | NC |
| | Cabello ^b | < 0,0913 | < 0,0913 |

^a $\mu\text{g/g}$ creatinina; ^b $\mu\text{g/g}$; ** $p < 0,01$. Los límites de detección (LODs) en pelo ($\mu\text{g/g}$) fueron: 0,0033 para As y Cd; 0,00022 para Hg; 0,0132 para Mn y 0,0913 para Pb.

NC: No Computable (los niveles de Mn y Pb en orina, ajustados por creatinina, no pueden mostrarse debido al alto porcentaje de muestras por debajo del límite de detección).

Tabla 17. Concentraciones de metales pesados (valores medios \pm desviación estándar) en orina y cabello en relación al índice de masa corporal (IMC) como posible factor predictivo

| Metal pesado | Muestra biológica | IMC | | | |
|--------------|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Bajo peso | Normopeso | Sobrepeso | Obesidad |
| As | Orina ^a | 5,9 \pm 5,95 | 5,26 \pm 5,84 | 6,91 \pm 8,73 | 4,85 \pm 8,24 |
| | Cabello ^b | 0,22\pm0,20† | 0,06\pm0,10 | 0,07\pm0,12 | 0,05\pm0,09 |
| Cd | Orina ^a | 2,06 \pm 1,32 | 1,36 \pm 1,67 | 1,63 \pm 1,77 | 1,15 \pm 1,14 |
| | Cabello ^b | < 0,0033 | < 0,0033 | < 0,0033 | < 0,0033 |
| Hg | Orina ^a | 2,29 \pm 3,09 | 5,77 \pm 9,80 | 7,74 \pm 10,65 | 5,94 \pm 6,48 |
| | Cabello ^b | 1,38 \pm 1,91 | 1,22 \pm 1,57 | 1,41 \pm 1,31 | 1,51 \pm 1,37 |
| Mn | Orina ^a | NC | NC | NC | NC |
| | Cabello ^b | 0,27 \pm 0,17 | 0,26 \pm 0,22 | 0,23 \pm 0,25 | 0,32 \pm 0,48 |
| Pb | Orina ^a | NC | NC | NC | NC |
| | Cabello ^b | < 0,0913 | < 0,0913 | < 0,0913 | < 0,0913 |

^a $\mu\text{g/g}$ creatinina; ^b $\mu\text{g/g}$; † $p < 0.10$. Los límites de detección (LODs) en pelo ($\mu\text{g/g}$) fueron: 0,0033 para As y Cd; 0,00022 para Hg; 0,0132 para Mn y 0,0913 para Pb. NC: No Computable (los niveles de Mn y Pb en orina, ajustados por creatinina, no pueden mostrarse debido al alto porcentaje de muestras por debajo del límite de detección).

Tabla 18. Concentraciones de metales pesados (valores medios \pm desviación estándar) en orina y cabello en relación al agua de consumo habitual como posible factor de confusión

| Metal pesado | Muestra biológica | Agua de consumo habitual | | | | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| | | Municipal | Municipal filtrada | Embotellada | Municipal + Embotellada | Pozo o manantial |
| As | Orina ^a | 4,38\pm5,43 | 2,30\pm2,83 | 6,53\pm6,52 | 6,23\pm9,24 | 13,75\pm13,96** |
| | Cabello ^b | 0,07 \pm 0,10 | 0,08 \pm 0,16 | 0,06 \pm 0,09 | 0,06 \pm 0,10 | 0,17 \pm 0,27 |
| Cd | Orina ^a | 1,20 \pm 1,34 | 1,69 \pm 3,00 | 1,63 \pm 1,80 | 1,03 \pm 1,37 | 1,99 \pm 1,66 |
| | Cabello ^b | < 0,0033 | < 0,0033 | < 0,0033 | < 0,0033 | < 0,0033 |
| Hg | Orina ^a | 5,24 \pm 7,67 | 10,95 \pm 22,95 | 5,31 \pm 6,35 | 9,08 \pm 15,72 | 8,54 \pm 15,81 |
| | Cabello ^b | 1,17 \pm 1,21 | 0,84 \pm 0,67 | 1,26 \pm 1,07 | 2,09 \pm 3,47 | 1,44 \pm 2,01 |
| Mn | Orina ^a | NC | NC | NC | NC | NC |
| | Cabello ^b | 0,25\pm0,31 | 0,46\pm0,31* | 0,25\pm0,22 | 0,27\pm0,16 | 0,45\pm0,19 |
| Pb | Orina ^a | NC | NC | NC | NC | NC |
| | Cabello ^b | < 0,0913 | < 0,0913 | < 0,0913 | < 0,0913 | < 0,0913 |

^a $\mu\text{g/g}$ creatinina; ^b $\mu\text{g/g}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los límites de detección (LODs) en pelo ($\mu\text{g/g}$) fueron: 0,0033 para As y Cd; 0,00022 para Hg; 0,0132 para Mn y 0,0913 para Pb. NC: No Computable (los niveles de Mn y Pb en orina, ajustados por creatinina, no pueden mostrarse debido al alto porcentaje de muestras por debajo del límite de detección).

Tabla 19. Concentraciones de metales pesados (valores medios \pm desviación estándar) en orina y cabello en relación al área de residencia como posible factor de confusión

| Metal pesado | Muestra biológica | Área de residencia | | |
|--------------|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Urbana | Metropolitana | Rural |
| As | Orina ^a | 5,24 \pm 6,21 | 5,07 \pm 8,48 | 3,34 \pm 2,88 |
| | Cabello ^b | 0,06 \pm 0,10 | 0,07 \pm 0,06 | 0,14 \pm 0,18 |
| Cd | Orina ^a | 1,34 \pm 1,56 | 0,97 \pm 0,94 | 1,38 \pm 1,48 |
| | Cabello ^b | < 0,0033 | < 0,0033 | < 0,0033 |
| Hg | Orina ^a | 6,30\pm9,83* | 4,14\pm5,42 | 2,08\pm3,70 |
| | Cabello ^b | 1,33 \pm 1,58 | 1,29 \pm 1,28 | 0,71 \pm 0,94 |
| Mn | Orina ^a | NC | NC | NC |
| | Cabello ^b | 0,27 \pm 0,28 | 0,18 \pm 0,13 | 0,29 \pm 0,24 |
| Pb | Orina ^a | NC | NC | NC |
| | Cabello ^b | < 0,0913 | < 0,0913 | < 0,0913 |

^a $\mu\text{g/g}$ creatinina; ^b $\mu\text{g/g}$; * $p < 0,05$. Los límites de detección (LODs) en pelo ($\mu\text{g/g}$) fueron: 0,0033 para As y Cd; 0,00022 para Hg; 0,0132 para Mn y 0,0913 para Pb. NC: No Computable (los niveles de Mn y Pb en orina, ajustados por creatinina, no pueden mostrarse debido al alto porcentaje de muestras por debajo del límite de detección).

Por otra parte, el hallazgo más sobresaliente en la Tabla 20 que muestra los coeficientes de correlación de Spearman para la concentración de metales pesados en las dos muestras biológicas estudiadas (cabello y orina), fue la correlación directa entre los niveles de As y Cd en orina. A su vez, ambos compuestos mostraron una correlación inversa en el cabello. Por otro lado, los valores de As en orina se correlacionaron inversamente con los valores de Cd en cabello. Sin embargo, los niveles de Pb en orina mostraron una correlación positiva tanto con el Cd como con el As. Los niveles de Mn y Cd se correlacionaron positivamente en el cabello, así como los de Hg en la orina y el cabello.

Tabla 20. Coeficientes de correlación de Spearman para la concentración de metales pesados en las dos muestras biológicas estudiadas (cabello y orina)

| | Orina† | | | | | Cabello‡ | | | | |
|-----------------|----------|---------|---------|----|---------|----------|----------|---------|---------|----|
| | As | Cd | Hg | Mn | Pb | As | Cd | Hg | Mn | Pb |
| Orina † | | | | | | | | | | |
| As | | 0,337** | | | 0,198** | | -0,227** | | | |
| Cd | 0,337** | | | | 0,275** | | | | | |
| Hg | | | | | | | | 0,287** | | |
| Mn | | | | | | | | | | |
| Pb | 0,198** | 0,275** | | | | | | | | |
| Cabello‡ | | | | | | | | | | |
| As | | | | | | | | -0,173* | | |
| Cd | -0,227** | | | | | -0,173* | | | 0,269** | |
| Hg | | | 0,287** | | | | | | | |
| Mn | | | | | | | | 0,269** | | |
| Pb | | | | | | | | | | |

*p<0,05; **p<0,01; †Concentraciones en orina (µg /l); ‡Concentraciones en cabello (µg/g)

Las tablas 21, 22, 23, 24 y 25 muestran los análisis de regresión múltiple (Tobit log-lineal) para la concentración de As, Cd, Mn, Hg y Pb en la orina y el cabello ajustados por la edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), alimentos consumidos (por ejemplo, el tipo de pescado más consumido y el agua de consumo habitual), estilo de vida (por ejemplo, la actividad física del niño, la frecuencia de limpieza del hogar, el lavado de las manos antes de comer, la frecuencia del baño o ducha del niño, la presencia de mascotas en el hogar,...) y la zona de residencia. Las niñas mostraron niveles significativamente más altos de elementos metálicos en el cabello, en comparación con los niños, a excepción del As. Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre el sexo y los compuestos metálicos en la orina. Los niveles de As en orina mostraron una asociación directa con el agua de consumo (en particular, la proveniente de pozo o manantial) y con el aumento de la actividad física. Los valores de As y Cd en el cabello se asociaron con el consumo de pescado congelado, pero de forma diferente, ya que el As mostró una asociación positiva mientras que en el caso del Cd ésta fue negativa. Igualmente, se observó un incremento de los niveles de Cd y Mn en la orina de los niños que vivían cerca de las zonas agrícolas, al igual que ocurrió

con los niveles de As en cabello. Por el contrario, se observó una disminución de las concentraciones de Hg en la orina de los niños que vivían en las cercanías de las zonas mineras. Otra asociación interesante fue la encontrada entre el Pb en el cabello y el índice de masa corporal de los niños con sobrepeso, de manera que éstos mostraron valores estadísticamente significativos elevados de dicho metal en el cabello.

Tabla 21. Análisis de regresión múltiple Tobit log-lineal de la concentración de As en las diferentes muestras biológicas estudiadas (cabello y orina)

| Metal | Muestra biológica | Pseudo R ² | Variable predictora | β | p-valor | IC 95% | | |
|---|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|-------|---------------|
| As | Cabello | 0,0156 | Distancia al área industrial | | | | | |
| | | | Menos de 1 km | 1,02 | 0,036 | (0,07; 1,97) | | |
| | | | Tipo de pescado más consumido | | | | | |
| | | | Congelado | 1,05 | 0,036 | (0,07; 2,04) | | |
| | | | Orina | 0,0564 | Agua de consumo habitual | | | |
| | | | | | Municipal filtrada | -0,59 | 0,284 | (-1,68; 0,49) |
| | Embotellada | 0,79 | | | 0,001 | (0,34; 1,25) | | |
| | Municipal + Embotellada | 0,77 | | | 0,050 | (-0,00; 1,55) | | |
| | Pozo o manantial | 1,46 | | | 0,046 | (0,03; 2,90) | | |
| | Actividad física del niño | | | | | | | |
| | Moderadamente activo | 0,87 | | | 0,030 | (0,09; 1,65) | | |
| | Bastante activo | 1,00 | 0,014 | (0,21; 1,79) | | | | |
| | Muy activo | 1,13 | 0,052 | (-0,01; 2,28) | | | | |
| Frecuencia de limpieza del hogar | | | | | | | | |
| Una vez a la semana | -0,53 | 0,039 | (-1,03; -0,03) | | | | | |

Referencias: Residencia a más de 1 km del área industrial; Consumo de pescado fresco; Consumo de agua municipal; Escasa actividad física del niño; Limpieza del hogar superior a una vez por semana.

Tabla 22. Análisis de regresión múltiple Tobit log-lineal de la concentración de Cd en las diferentes muestras biológicas estudiadas (cabello y orina)

| Metal | Muestra biológica | Pseudo R ² | Variable predictora | β | p-valor | IC 95% | |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------------|---|---------------|---------------|--------------|
| Cd | Cabello | 0,0603 | Género | | | | |
| | | | Niñas | 1,69 | 0,002 | (0,65; 2,74) | |
| | | | Tipo de pescado más consumido | | | | |
| | | | Congelado | -1,65 | 0,013 | (-2,95;-0,35) | |
| | | | Mascotas en el hogar | | | | |
| | | | Si | 1,26 | 0,016 | (0,24; 2,29) | |
| | | | | Frecuencia de limpieza del hogar | | | |
| | | | | Una vez a la semana | 0,99 | 0,077 | (-0,11; 2,1) |
| | Orina | 0,0781 | Edad (incremento por año) | 0,17 | 0,017 | (0,03; 0,30) | |
| | | | Distancia al área agrícola | | | | |
| | | | Menos de 1 km | 0,58 | <0,001 | (0,31; 0,85) | |
| | | | Agua de consumo habitual | | | | |
| | | | Municipal filtrada | -0,13 | 0,713 | (-0,84; 0,57) | |
| | | | Embotellada | 0,39 | 0,008 | (0,10; 0,67) | |
| Municipal + Embotellada | | | 0,24 | 0,332 | (-0,25; 0,73) | | |
| Pozo o manantial | | | 0,40 | 0,353 | (-0,45; 1,25) | | |
| | | | Lavado de manos antes de comer | | | | |
| | | | Si | 0,44 | 0,056 | (-0,01; 0,88) | |

Referencias: Residencia a más de 1 Km del área agrícola; Consumo de pescado fresco; Consumo de agua municipal; Limpieza del hogar más de una vez por semana; Niños (género); Inexistencia de mascotas en el hogar; No lavado de las manos antes de comer.

Tabla 23. Análisis de regresión múltiple Tobit log-lineal de la concentración de Mn en las diferentes muestras biológicas estudiadas (cabello y orina)

| Metal | Muestra biológica | Pseudo R ² | Variable predictora | β | p-valor | IC 95% |
|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------|---------|----------------|
| Mn | Cabello | 0,0399 | Género | | | |
| | | | Niñas | 1,02 | 0,000 | (0,64; 1,41) |
| | | | Frecuencia del baño/ducha | | | |
| | | | 4-6 veces por semana | -0,43 | 0,049 | (-0,85; -0,00) |
| | | | 1-3 veces por semana | -0,61 | 0,138 | (-1,41; 0,20) |
| | | | Orina | 0,0428 | | |
| | Distancia al área agrícola | | | | | |
| | Menos de 1 km | 0,85 | 0,049 | (0,00; 1,70) | | |
| | Ingresos mensuales familiares | | | | | |
| | 1001-2000 € | -1,68 | 0,010 | (-2,95; -0,41) | | |
| > 2000 € | -0,99 | 0,147 | (-2,34; 0,35) | | | |
| Frecuencia del baño/ducha | | | | | | |
| 4-6 veces por semana | -0,34 | 0,478 | (-1,30; 0,61) | | | |
| 1-3 veces por semana | 1,37 | 0,058 | (-0,05; 2,80) | | | |

Referencias: Residencia a más de 1 km del área agrícola; Niños (género); Ducha o baño del niño una vez al día; Ingresos mensuales de la familia \leq 1000 €.

Tabla 24. Análisis de regresión múltiple Tobit log-lineal de la concentración de Hg en las diferentes muestras biológicas estudiadas (cabello y orina)

| Metal | Muestra biológica | Pseudo R ² | Variable predictora | β | p-valor | IC 95% |
|-------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|-------|----------------|---------------|
| Hg | Cabello | 0,0144 | Género | | | |
| | | | Niñas | 1,15 | 0,002 | (0,42; 1,88) |
| | | | Índice de Masa Corporal | | | |
| | | | Bajo peso | 0,32 | 0,774 | (-1,89; 2,53) |
| | | | Sobrepeso | 0,09 | 0,893 | (-1,18; 1,36) |
| | | | Obesidad | 0,93 | 0,088 | (-0,14; 1,99) |
| | | | Frecuencia del baño/ducha | | | |
| | | | 4-6 veces por semana | 0,29 | 0,481 | (-0,51; 1,09) |
| | | | 1-3 veces por semana | 1,32 | 0,085 | (-0,19; 2,82) |
| | Orina | 0,0081 | Distancia al área minera | | | |
| | | Menos de 1 km | -1,83 | 0,031 | (-3,49; -0,17) | |

Referencias: Residencia a más de 1 km del área minera; Niños (género); Ducha o baño del niño una vez al día; Normopeso (IMC): 18,5 kg/m²–25 kg/m².

Tabla 25. Análisis de regresión múltiple Tobit log-lineal de la concentración de Pb en las diferentes muestras biológicas estudiadas (cabello y orina)

| Metal | Muestra biológica | Pseudo R ² | Variable predictora | β | p-valor | IC 95% |
|-------|-------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------|---------|---------------|
| Pb | Cabello | 0,0223 | Género | | | |
| | | | Niñas | 1,15 | 0,024 | (0,15; 2,15) |
| | | | Índice de masa corporal (IMC) | | | |
| | | | Bajo peso | 1,03 | 0,448 | (-1,64; 3,71) |
| | Sobrepeso | 1,63 | 0,038 | (0,09; 3,17) | | |
| | Obesidad | 0,00 | 0,996 | (-1,41; 1,42) | | |
| | Orina | 0,0557 | Distancia al área agrícola | | | |
| | | | Menos de 1 km | 0,88 | 0,077 | (-0,10; 1,85) |

Referencias: Residencia a más de 1 km del área agrícola; Niños (género); Normopeso (IMC): 18,5 kg/m²–25 kg/m².

IV.2. DISCUSIÓN

IV.2.1. Concentraciones de metales en cabello

La biomonitorización humana (*Human Biomonitoring, HBM*) se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en salud pública y ambiental para la medida de la dosis interna de sustancias tóxicas pues permite evaluar los cambios que pueden ocurrir en las poblaciones expuestas a un determinado contaminante o tóxico ambiental a lo largo del tiempo (Schumacher et al., 2002; Gil y Hernández, 2009; Nunes et al., 2010).

A pesar de que la sangre y la orina constituyen las muestras clásicas para la evaluación de las concentraciones de elementos metálicos en el organismo, el pelo es una matriz muy interesante ya que los compuestos metálicos pueden alcanzar en él concentraciones hasta 10 veces más elevadas que los niveles hallados en las muestras de sangre y orina (Cespón-Romero y Yebra-Biurrun, 2007). En este sentido, la EPA considera el cabello como una de las muestras biológicas más importantes para la monitorización ambiental de elementos metálicos (Druyan et al., 1998). Además, el uso del cabello ha sido considerado como un indicador fiable de la exposición crónica a elementos tóxicos ambientales e incluso algunos autores han planteado que pudiera proporcionar una mejor estimación de la exposición que los niveles sanguíneos, permitiendo así una mejor evaluación del riesgo a largo plazo para la población general (Chatt et al., 1980; Foo et al., 1993; Bencko, 1995).

Sin embargo, existe una importante controversia acerca de si la medida de una sustancia tóxica en el pelo refleja de forma exacta y fidedigna la dosis interna (carga corporal) o es reflejo de una exposición externa o exógena. De momento, excepto para Hg, y más concretamente para metil-Hg (MeHg) y muy probablemente también en el caso del As, los datos existentes son insuficientes como para indicar de manera fiable una dosis interna así como para predecir los efectos sobre la salud derivados de la medida de una sustancia concreta en dicha matriz biológica (ATSDR, 2001; Harkins y Susten, 2003).

En nuestro estudio, la mediana de los niveles de elementos metálicos en el cabello mostró el siguiente orden: Hg > Mn > Pb > As > Cd (Tabla 15). En general, los niveles encontrados en nuestra población infantil fueron muy similares a los descritos por Dongarrà y cols. (2012) y Evrenoglou y cols. (2013) en Sicilia y Atenas, respectivamente (Tabla 2).

El arsénico (As) está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y puede encontrarse presente en concentraciones elevadas de forma natural en suelos y aguas (ATSDR, 1993). Por otra parte, la fuente dietética predominante de As es el marisco, en donde se encuentra principalmente en forma de As orgánico, atóxico. Las concentraciones normales de As en el cabello de población no expuesta generalmente oscilan entre 0,02 y 1 µg/g (Hindmarsh et al., 1999). La concentración (mediana) de As en el cabello de nuestra población infantil fue de 0,021 µg/g (rango 0,001-0,575), similar a la concentración normal anteriormente descrita por Hindmarsh et al., (1999). Además, tanto el percentil 95 como el valor máximo obtenido de As en pelo en nuestra población, estuvo muy por debajo del valor crítico establecido por la OMS en 1 µg/g (Hindmarsh et al., 2000).

Puesto que la arsenobetaina, el compuesto de As orgánico mayoritario en productos de la pesca (especialmente, marisco) no se acumula en el pelo (Vahter y cols., 1983), los niveles de As en esta muestra únicamente reflejan la exposición a As inorgánico. En general y a la vista de los datos consultados en la bibliografía (Tabla 2), nuestros resultados indican una baja contribución de la contaminación ambiental a la carga corporal de As y por este motivo no parece probable que se pudieran derivar efectos adversos de la exposición a este metaloide sobre la población infantil objeto de nuestro estudio lo que representa un hecho destacable teniendo en cuenta el papel que juega este metaloide como carcinógeno.

El cadmio (Cd) es un metal tóxico no esencial, ampliamente distribuido a bajas concentraciones en el medio ambiente. A pesar de que sus efectos tóxicos agudos y crónicos son bien conocidos, los posibles efectos sobre el desarrollo y otros efectos potencialmente adversos sobre la salud de los niños son, en gran medida, desconocidos (ATSDR, 2008). La dieta, especialmente a través del consumo de cereales

y verduras, representa la principal fuente de exposición al Cd para la población general, incluida la infantil. En nuestro estudio, aunque la mediana fue inferior al límite de detección, los percentiles 75 y 95 (0,007 y 0,067 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) fueron similares a los valores (medianas) recogidos por Dongarrà y cols. (2012) para una población no expuesta ocupacionalmente y con residencia cercana a áreas industrializadas de Sicilia (0,0005-0,077 $\mu\text{g/g}$). Asimismo, fue muy inferior si se compara con otros estudios que encuentran concentraciones (medianas) de 7,33 y 0,13 $\mu\text{g/g}$ en población infantil de China (Bao et al., 2009) y Bolivia (Stassen et al., 2012), respectivamente.

El mercurio (Hg) es uno de los elementos tóxicos más relevantes debido a que se trata de un contaminante ambiental que puede afectar potencialmente al desarrollo neurológico de los niños (Rodríguez-Barranco et al., 2013). El contenido de Hg en el cabello parece estar más relacionado con la exposición alimentaria, particularmente, con el consumo de pescado siendo ésta la principal vía de exposición al metil-Hg (Cheng et al., 2009; Olmedo et al., 2013). A pesar de que el Hg total ha sido ampliamente cuantificado en numerosos estudios epidemiológicos en población general, el 80% del Hg total en cabello es metil-Hg y ambos están linealmente relacionados (McDowell et al., 2004).

Debido a que la exposición a metil-Hg ocurre únicamente a través de la dieta, fundamentalmente merced al consumo de pescado contaminado, y no de forma secundaria por fuentes externas, este contaminante ha sido identificado como el único que podría ser interpretado con fiabilidad a través del análisis del pelo, y que por ello sería fiel reflejo de la dosis interna o carga corporal, obviamente asumiendo en todo momento una correcta manipulación, lavado y análisis del mismo (ATSDR, 2001; Harkins y Susten, 2003).

Sin embargo, mientras el cabello puede ser una muestra útil para la determinación de Hg en población general, éste tendría menos interés en individuos ocupacionalmente expuestos a compuestos mercuriales.

En nuestro estudio, la concentración (mediana) de Hg total (0,91 $\mu\text{g/g}$) en el cabello se encontró por debajo del límite de seguridad de 1 $\mu\text{g/g}$ (NRC, 2000) y del

nivel medio de 1,99 $\mu\text{g/g}$ referido por la EFSA (2012) para la población infantil europea. La encuesta NHANES 1999-2000 proporciona datos poblacionales de Hg en pelo de niños con edades comprendidas entre 1 y 5 años con una media geométrica (MG) y un percentil 95 de 0,12 y 0,64 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (McDowell et al., 2004), los cuales son comparativamente bastante inferiores a los hallados en nuestro estudio.

Varios estudios han demostrado que los niveles de Hg en el cabello dependen del consumo de pescado (Peplow y Augustine, 2012). Así, Grandjean et al. (1999) obtuvieron una MG de 2,99 $\mu\text{g/g}$ de Hg en el cabello de los niños (7 años) que consumían pescado de forma asidua en las Islas Feroe.

Por otra parte, el contenido de Hg (mediana) en el cabello de los niños de la Amazonia boliviana, una región con una elevada actividad pesquera y un importante consumo de pescado, fue de 3,9 $\mu\text{g/g}$ (Benefice et al., 2008). Malm et al. (2010) hallaron altas concentraciones de Hg en cabello que oscilaron entre 9,5 y 11,4 $\mu\text{g/g}$ en niños de 1 a 11 años pertenecientes a una población ribereña tradicional del Rio Tapajós (Amazonia brasileña).

En general, nuestros resultados son comparables a otros estudios procedentes de poblaciones con una exposición baja o moderada a Hg a través del consumo de pescado (Guentzel et al., 2007).

Los niños y los recién nacidos pueden ser particularmente susceptibles a los efectos neurotóxicos de la exposición ambiental a bajos niveles de manganeso (Mn). La exposición a bajas concentraciones de Mn se han asociado con efectos adversos sobre el neurodesarrollo en los niños incluyendo déficits en las pruebas de inteligencia, conducta hiperactiva y alteraciones sobre la memoria y la función motora (Riojas-Rodríguez et al., 2010). Las concentraciones de Mn –medianas- (0,20 $\mu\text{g/g}$) encontradas en el cabello de nuestra población infantil, no superaron las halladas anteriormente por Haynes et al. (2012) y Kordas et al. (2010) (3,52 y 1,45 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Por el contrario, Montes y cols. (2011) refieren concentraciones (medianas) de 0,6 y 13,2 $\mu\text{g/g}$ en población no expuesta y expuesta, respectivamente.

El plomo (Pb) es uno de los elementos más tóxicos. Posee una gran persistencia en el medio ambiente y puede ocasionar alteraciones en el aprendizaje así como una disminución del crecimiento en los niños. Las principales fuentes de exposición al Pb incluyen los suelos y el polvo contaminado, los alimentos, el aire y la cerámica. Watanabe et al. (2000) explicaron que el 59 % y el 81 % del Pb total captado en las zonas urbanas y rurales, respectivamente, podrían atribuirse a la dieta.

Por otra parte, las alteraciones neurológicas y del desarrollo que causa el Pb en los niños son bien conocidas en la literatura especializada (ATSDR, 2007). Los valores de referencia para el contenido de Pb en el cabello han resultado ser inferiores a 6,0 $\mu\text{g/g}$, aunque el nivel de preocupación para los niños se estableció en 9 $\mu\text{g/g}$ (Esteban et al., 1999).

En nuestro estudio, aunque la concentración (mediana) de Pb en el cabello se encontró por debajo del límite de detección, los percentiles 75 y 95 (0,251 y 2,089 $\mu\text{g/g}$) estuvieron por debajo de los valores de referencia y/o preocupación descritos con anterioridad. Además, estos percentiles se encuentran en el mismo rango de concentraciones (medianas) descritos por Sanna et al. (2008), en niños que vivían en las proximidades de áreas industriales de Cerdeña (Italia), los cuales oscilaron entre 0,27 y 1,47 $\mu\text{g/g}$ y las concentraciones (también medianas) recogidas por Dongarrá y cols. (2012) en niños residentes en zonas industrializadas de Sicilia, situadas entre 0,70 y 1,58 $\mu\text{g/g}$. Por todo ello, y de acuerdo a los resultados obtenidos, no cabría esperar efectos adversos derivados de la exposición a Pb ambiental en nuestra población infantil.

IV.2.2. Concentraciones de metales en la orina

La orina es una muestra biológica no invasiva, frecuentemente empleada en estudios de biomonitorización en Estados Unidos y Alemania (NHANES o GerEs, respectivamente) y particularmente interesante en población infantil en donde ciertas muestras como la sangre, presentan dificultades para su obtención, lo que

indudablemente podría incidir directamente en una menor tasa de participación en dichos estudios y por consiguiente, en una disminución del tamaño de muestra.

Las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideran que aquellas muestras de orina que presenten valores de creatinina inferiores a 0,3 g/l o por encima de 3 g/l no son representativas, por lo que dichas muestras deberían excluirse del análisis estadístico de cara a minimizar tanto la infra como la sobreestimación en el cálculo de las concentraciones ajustadas.

En nuestra población, ninguna muestra de orina superó los 3 g/l y un 35% presentaron valores de creatinina en orina por debajo de 0,3 g/l. No obstante, se desarrolló un test de sensibilidad eliminando aquellos niños con cifras de creatinina inferiores a 0,3 g/l de cara a comparar los coeficientes en los modelos de regresión, no observándose cambios significativos en los coeficientes de regresión con respecto al análisis global que incluía este 35% con valores inferiores a 0,3 g/l. Por todo ello, con la única finalidad de no perder tamaño muestral y dado que no afectaba a las conclusiones del estudio, se optó por incluir a estos niños que presentaron valores inferiores de creatinina. No hay que olvidar, por otra parte, que dicho rango (<0,3 y >3,0 g/L) es de aplicación general para la población adulta y los niños, usualmente, presentan valores de creatinina inferiores, hecho que se ha podido confirmar en la muestra del presente estudio.

En general, nuestra población infantil presentó concentraciones (medianas) relativamente bajas para cada uno de los metales analizados en las muestras de orina respecto a otros estudios recogidos en la literatura especializada (Tabla 1). La población infantil objeto de nuestro análisis mostró una concentración de As total en orina por debajo de 50 o 100 µg/g de creatinina, siendo éstos los niveles de acción propuestos por el Centro para el control de enfermedades americano (CDC) y la OMS, respectivamente (Carrizales et al., 2006).

La concentración (mediana) de As de 3,40 µg/g de creatinina encontrada en nuestro estudio es notablemente inferior a 27,9 µg/g de creatinina referida por Gamiño-Gutiérrez et al. (2013) y sensiblemente mayor que el valor (mediana) de 1,80

$\mu\text{g/g}$ de creatinina recogido por Aguilera y cols. (2010) en una investigación previa llevada a cabo sobre niños residentes en nuestra misma área de estudio.

En relación a la media geométrica (MG) de As en orina, nosotros encontramos un valor de $2,44 \mu\text{g/g}$ de creatinina, cifra bastante inferior a la MG de $44\text{-}80 \mu\text{g/g}$ de creatinina hallada por Carrizales et al. (2006) e inferior a la MG de $12,8\text{-}44,5 \mu\text{g/g}$ de creatinina referida por Jasso-Pineda et al. (2012) y la MG de $4,01\text{-}4,91 \mu\text{g/g}$ de creatinina publicada por Chiang et al. (2008). En cualquier caso, la concentración máxima de As en orina hallada por nosotros se situó muy por debajo del valor de referencia de $15 \mu\text{g/l}$ establecido por Wilhelm et al. (2006).

Por otra parte, la medida de los niveles de As en orina es aceptada usualmente como un bioindicador fiable de exposición reciente a As. Sin embargo, el As total en orina es un biomarcador de exposición a As inorgánico menos útil, salvo que se tenga la certeza de que la ingesta de productos de la pesca puede excluirse. Esto es particularmente importante cuando la exposición a As inorgánico es baja.

En lo que concierne al Cd, el valor de la mediana hallado en nuestra población infantil ($0,85 \mu\text{g/g}$ de creatinina) es más alto que la concentración (mediana) publicada por Aguilera et al. (2010) próxima a nuestra zona de estudio. No obstante, ambos valores se encuentran por debajo del límite de $1,0 \mu\text{g/g}$ de creatinina establecido para jóvenes menores de 25 años (Wilhelm et al., 2005). Sin embargo, cuando nuestros datos se comparan con valores de referencia en población alemana de $0,2 \mu\text{g/l}$ (Schulz y cols., 2009), algo más del 50% de nuestra población, presentó concentraciones por encima de dicho valor de referencia, lo cual debe ser objeto de preocupación habida cuenta que el Cd es un carcinógeno ampliamente reconocido.

Por otra parte, concentraciones de Cd en orina por encima de $1 \mu\text{g/g}$ de creatinina se han asociado a disfunción tubular renal, alteraciones en el metabolismo del calcio y a un alto riesgo de cáncer de pulmón (Banza et al., 2009). En nuestro estudio, un porcentaje nada despreciable y algo inferior al 50% de la población infantil mostró concentraciones de Cd en orina por encima de $1 \mu\text{g/g}$ de creatinina, valor asociado a los efectos clínicos adversos anteriormente descritos.

El Hg en orina es usualmente empleado en los test de exposición a vapor de Hg metálico así como a las formas inorgánicas de Hg. La medida de Hg en sangre o en pelo es usada para biomonitorizar la exposición a metil-Hg, sin embargo, la orina no es un fluido adecuado para determinar la exposición a metil-Hg. No obstante, las concentraciones de Hg en sangre, orina y pelo pueden utilizarse de forma conjunta al objeto de poder predecir posibles efectos adversos derivados de la exposición a las diferentes formas de Hg (ATSDR, 1999).

La MG de Hg en orina hallada en nuestra población (1,06 $\mu\text{g/g}$ de creatinina) fue similar al valor de la MG de 1,23 $\mu\text{g/g}$ de creatinina referido por Levy et al. (2004) en niños de 4-8 años y más baja que la MG de 2,73 $\mu\text{g/g}$ de creatinina hallada por Rojas et al. (2006) para niños expuestos a fuentes ambientales de Hg. Sin embargo, menos del 50% (siendo los P75 y P95 de 6,914 y 20,126, respectivamente) de nuestra población presentó valores de Hg en orina por encima de 5 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, el cual es considerado como un nivel de referencia adecuado para Hg en niños (ATSDR, 2007). Por todo ello, esta subpoblación de niños podría estar sometida a un mayor riesgo de efectos adversos sobre la salud derivados de la exposición a Hg.

Aún cuando bajos niveles de Mn son considerados atóxicos, concentraciones extremadamente altas pueden producir efectos adversos sobre el desarrollo cerebral en niños, incluyendo cambios en el comportamiento y disminución en habilidades relacionadas con el aprendizaje y la memoria (ATSDR, 2012).

Además, concentraciones de Mn en orina pueden ser útiles en la detección de grupos con una exposición por encima de la media. Sin embargo, las medidas en los individuos no sólo están relacionadas con la dosis de exposición una vez que ésta ha cesado (ATSDR, 2012). La MG de 0,42 $\mu\text{g/g}$ de creatinina hallada en nuestro estudio es comparable al valor (MG) de 0,40 $\mu\text{g/g}$ de creatinina publicado por Banza et al. (2009) para una población de niños menores de 14 años residente en áreas próximas a zonas con actividad minera y la MG de 0,48 $\mu\text{g/g}$ de creatinina referida en el programa de biomonitorización NHANES III en una población de 500 americanos, que incluía niños mayores de 6 años (Paschal et al., 1998). Por el contrario, algo menos del 25% de nuestra población infantil presentó concentraciones de Mn en orina por encima del

percentil 95 referido por Heitland y Köster (2006) para niños alemanes y que se cifró en 0,25 µg/l.

Aunque la medida de las concentraciones de Pb en orina ha sido empleada para valorar la exposición a Pb, dichos niveles no son tan fiables como los existentes en sangre, la cual es la muestra más usual y exacta de cara a valorar la exposición reciente a Pb (ATSDR, 2007). Sin embargo, el uso de muestras no invasivas como pueden ser el pelo o la orina, puede proporcionar información útil en los estudios de biomonitorización humana, y muy especialmente, en determinados subgrupos de población como pueden ser los niños en donde la extracción de sangre supone un método invasivo que dificulta el desarrollo del estudio y que generalmente conduce a una menor tasa de reclutamiento.

La MG de Pb en orina (2,22 µg/g de creatinina) en nuestra población infantil fue comparable a la publicada por Banza y cols. (2009) de 1,28 µg/g de creatinina para niños no expuestos aunque más baja que la MG de 3,85 µg/g de creatinina descrita por Chiang et al. (2008).

IV.2.3. Contribución de los distintos determinantes de la exposición

En el presente estudio, las niñas mostraron concentraciones significativamente mayores de metales pesados en el cabello que los niños (Tabla 16), hecho previamente descrito por otros autores (Batista et al., 1996; Fujimura et al., 2012; Menezes-Filho et al., 2009). Esta observación podría ser explicada por la diferente tasa de crecimiento del cabello en los individuos, ya que cuanto más lento es el crecimiento, mayor es la acumulación de metales en el mismo (Sanna et al., 2008). Sin embargo, al respecto existen también resultados controvertidos pues Olivero-Verbel et al. (2008) y Sanna et al. (2003) encontraron en los varones niveles significativamente mayores de Hg y Pb, respecto de las mujeres.

Las mayores concentraciones de As en orina fueron halladas en los niños que consumían el agua procedente de algún pozo o manantial (Tabla 18). De hecho, Liu et

al. (2010) sugieren que las diferentes concentraciones de As en el agua de bebida podrían influir de manera directa en la concentración de As en los niños.

Aunque se ha planteado la hipótesis de que los niveles de metales podrían estar relacionados con el tipo de residencia, nuestro estudio (Tabla 19) muestra que, a excepción del Hg en orina, la zona de residencia (urbana, metropolitana o rural) no es un determinante crítico en las concentraciones de los metales analizados en orina y por ello, no contribuye significativamente a dichas concentraciones. Este hallazgo también fue descrito por Aguilera et al. (2010) en una población próxima a nuestra área de estudio.

La correlación entre los niveles de metales en el cabello y otras muestras biológicas tales como la sangre u orina, comúnmente utilizadas para evaluar la exposición ambiental a contaminantes, se han estudiado previamente con fines de biomonitorización (Gil et al., 2011). Nuestros resultados mostraron una correlación entre las concentraciones de metales en pelo y orina únicamente en el caso del Hg (Tabla 20). Sin embargo, mientras el contenido en pelo está relacionado con exposiciones pasadas, los niveles en orina reflejan exposición reciente, a excepción del Cd. Estas diferencias toxicocinéticas podrían explicar la falta de correlaciones encontradas en nuestro estudio.

El Cd en pelo mostró una correlación negativa con el As en la orina ($r = -0,227$). Por el contrario, el Cd en orina se correlacionó positivamente con el As ($r = 0,337$) y el Pb ($r = 0,198$) en orina (Tabla 20). Moreno et al. (2010) observaron una correlación positiva estadísticamente significativa entre el As-Cd ($r = 0,35$) y el Cd-Mn ($r = 0,34$) en muestras de orina. Sin embargo, Kippler et al. (2010) no encontraron correlación significativa entre el Cd y el As en orina. Bao et al. (2009) mostraron una correlación positiva débil ($r = 0,249$) entre los niveles de Pb y Cd en el cabello, aunque nuestros resultados no corroboran esta asociación. No obstante, gran parte de estas asociaciones son difíciles de explicar con la información disponible y serían necesarios nuevos estudios de cara a poder comprender mejor las correlaciones halladas entre las diferentes muestras o fluidos biológicos.

Los análisis de regresión múltiple (Tablas 21 a la 25), mostraron una asociación entre los niveles de As en el cabello y aquellos niños que vivían a menos de 1 Km de zonas industriales, donde era de esperar una elevada contaminación ambiental. Las niñas mostraron niveles significativamente mayores de Cd, Hg, Mn y Pb en el cabello que los niños (Tablas 22-25), sugiriendo que el contenido de metal en pelo varia con el sexo, hecho previamente observado por otros autores (Evrenoglou et al., 2013; Fujimura et al., 2012; Menezes-Filho et al., 2009). No obstante, la justificación de este hallazgo no está suficientemente clara, y muy probablemente pudiera ser atribuible a ciertas diferencias toxicocinéticas.

Los hábitos dietéticos también pueden afectar claramente al contenido de metales en el cabello y la orina (Gil et al., 2011). El presente estudio mostró asociaciones significativas entre el consumo de agua procedente de pozos o manantiales y las concentraciones de As en orina. Así mismo, encontramos una asociación inversa entre el consumo de pescado congelado y los niveles de As en cabello.

Además se encontró una asociación directa entre las concentraciones de As en orina y una elevada actividad física del niño, probablemente debido a que la mayor frecuencia respiratoria facilitaría la inhalación del As presente en el aire.

También se han encontrado otras asociaciones que son difíciles de explicar (niveles de Cd y presencia de mascotas en el hogar o niveles de Pb en cabello e índice de masa corporal), hallazgos que generan controversia, y que han sido puestos de manifiesto por otros autores como Umbangtalad et al. (2007).

V. CONCLUSIONES

Primera. El presente estudio determina las concentraciones (carga corporal) de As, Cd, Mn, Hg y Pb en muestras de orina y cabello en población infantil residente en las proximidades de zonas industriales/mineras de Huelva.

Segunda. Nuestros resultados muestran una correlación entre las concentraciones de metales en pelo y orina únicamente para el caso del Hg. Además, el Cd en orina se correlacionó positivamente con el As y el Pb, ambos en orina.

Tercera. En general, la mayor parte de las concentraciones halladas para los elementos metálicos analizados son similares a las recogidas en la bibliografía especializada en estudios similares realizados en otras zonas geográficas. No obstante, las concentraciones de Cd y Hg fueron más altas en nuestra población infantil en relación con niños procedentes de otros países europeos.

Cuarta. Aproximadamente, entre un 25 y un 50% de la población presenta concentraciones de Cd y Hg en orina por encima de los niveles de referencia considerados para población infantil. Teniendo en cuenta que el Cd es un conocido carcinógeno y que el Hg afecta al neurodesarrollo, dicho porcentaje de población podría estar sometido a un mayor riesgo para la salud, habida cuenta además de la especial susceptibilidad de la población infantil a los efectos adversos derivados de la exposición a xenobióticos ambientales.

Quinta. En el presente estudio, las niñas mostraron niveles significativamente mayores de Cd, Hg, Mn y Pb en el cabello que los niños, hecho previamente descrito por otros autores y que podría estar en relación con la diferente tasa de crecimiento del cabello en los individuos.

Sexta. Las mayores concentraciones de As en orina fueron halladas en los niños que consumían agua procedente de pozo o manantial.

Séptima. A excepción del Hg en orina, la zona de residencia (urbana, metropolitana o rural) no ha sido un determinante crítico en las concentraciones de los metales analizados en orina, hecho ya descrito por otros autores en la misma población. No

obstante, los análisis de regresión múltiple, mostraron una asociación entre los niveles de As en el cabello y aquellos niños que vivían a menos de 1 Km de las zonas industriales, donde era de esperar una elevada contaminación ambiental.

Octava. Debido a la potencial acumulación de numerosos compuestos metálicos en ciertos tejidos humanos, incluyendo el cabello, sugerimos el uso del mismo para evaluar la exposición a metales en los niños, bien como muestra adicional a la sangre o la orina en los programas de biomonitorización.

VI. BIBLIOGRAFÍA

AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición), 2014.

http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/web/evaluacion_riesgos/seccion/estudios_dietal_total.shtml (acceso el 1 de enero de 2015).

Aguilera I, Daponte A, Gil F, Hernández AF, Godoy P, Pla A, et al. Biomonitoring of urinary metals in a population living in the vicinity of industrial sources: a comparison with the general population of Andalusia, Spain. *Sci Total Environ* 2008; 407: 669-78.

Aguilera I, Daponte A, Gil F, Hernández AF, Godoy P, Pla A, et al. Urinary levels of arsenic and heavy metals in children and adolescents living in the industrialised area of Ria of Huelva (SW Spain). *Environ Int* 2010; 36(6): 563-9.

Agusa T, Kunito T, Iwata H, Monirith I, Tana TS, Subramanian A, et al. Mercury contamination in human hair and fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assessment. *Environ Pollut* 2005; 134: 79-86.

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): 284-7.

Almendro JME, Ojeda CB, 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: 1749-51.

Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 201-28.

Apostoli P. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B* 2002; 778: 63-97.

- Apostoli P, Cortesi I, Mangili A, Elia G, Drago I, Gagliardi T, et al. Assessment of reference values for mercury in urine: the results of an Italian polycentric study. *Sci Total Environ* 2002; 289: 13-24.
- Arcand Y, Hawari J, Guiot SR. Solubility of pentachlorophenol in aqueous solutions: The pH effect. *Water Res* 1995; 29(1): 131-6.
- Arora M, Weuve J, Schwartz J, Wright RO. Association of environmental cadmium exposure with pediatric dental caries. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 821-5.
- Aschner M. The transport of manganese across the blood-brain barrier. *Neurotoxicology* 2006; 27(3): 311-4.
- Aschner M, Guilarte T, Schneider J, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221: 131-47.
- Ashraf W, Jaffar M. Concentrations of selected metals in scalp hair of an occupationally exposed population segment of Pakistan. *Int J Environ Stud* 1997; 51: 313-21.
- Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *J Carcinog* 2000; 21: 2097-104.
- ATSDR (Agency of Toxic substances and Disease Registry) 1993; 1999; 2000; 2007; 2008; 2012. Draft toxicological profile for arsenic, lead, cadmium, manganese and mercury. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp> [acceso el 27 de diciembre de 2014] o a través del portal español <http://www.atsdr.cdc.gov/es/index.html> (acceso el 28 de diciembre de 2014)
- ATSDR (Agency of Toxic substances and Disease Registry) 2001. Hair analysis panel discussion: exploring the State of the Science. Summary Report. Atlanta, GA: Agency of Toxic substances and Disease Registry. http://www.atsdr.cdc.gov/hac/hair_analysis/ (acceso el 28 de diciembre de 2014)

- Au WW. Susceptibility of children to environmental toxic substances. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205: 501-3.
- Ayuso M, Pacual JA, Garcia C, Hernandez T. Evaluation of urban wastes for agricultural use. *Soil Sci Plant Nutrit* 1996; 42(1): 105-11.
- Banks EC, Ferretti LE, Shucard DW. Effects of low level of lead exposure on cognitive function in children: a review of behavioral, neuropsychological and biological evidence. *Neurotoxicol* 1997; 18(1): 237-81.
- Banza CLN, Nawrot TS, Haufroid V, Decrée S, De Putter T, Smolders E, et al. High human exposure to cobalt and other metals in Katanga, a mining area of the Democratic Republic of Congo. *Environ Res* 2009; 109(6): 745-52.
- Bao QS, Lu CY, Song H, Wang M, Ling W, Chen WQ, et al. Behavioural development of school-aged children who live around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2009; 9: 217.
- Barbieri FL, Cournil A, Gardon J. Mercury exposure in a high fish eating Bolivian Amazonian population with intense small-scale gold-mining activities. *Int J Environ Health Res* 2009; 19(4): 267-77.
- 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.
- Barman SC, Kumar N, Singh R, Kisku GC, Khan AH, Kidwai MM, et al. Assessment of urban air pollution and its probable health impact. *J Environ Biol.* 2010; 31(6):913-20.
- Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 192-200.
- Bartual Sanchez J, Cuenca Sanchez De Castro C, Eransus Izquierdo FJ, García-Gutierrez Muñoz, et al. Límites de exposición profesional para agentes químicos en

España 2001-2002. Valencia: Generalitat Valenciana, Consellería D'Economia, Hisenda I Ocupació 2001.

Batáriová A, Spěváčková V, Benes B, Čejchanová M, Šmíd J, Černá M. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209: 359-66.

Batista J, Schuhmacher M, Domingo JL, Corbella J. Mercury in hair for a child population from Tarragona Province, Spain. *Sci Total Environ* 1996; 193(2): 143-8.

Batista BL, Souza JM, De Souza SS, Barbosa Jr F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *J Hazard Mater* 2011; 191: 342-8.

Baumbach G, Vogt U. Experimental determination of the effect of mountain-valley breeze circulation on air pollution in the vicinity of Freiburg. *Atmos Environ* 1999; 33(24-25): 4019-27.

Becker K, Kaus S, Krause C, Lepom P, Schulz C, Seiwert M, et al. German Environmental Survey 1998 (GerES III): environmental pollutants in blood of the German population. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205: 297-308.

Bellinger DC. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr* 2008; 20: 172-7.

Benach J, Yasui Y, Martínez JM, Borrell C, Pasarin MI, Daponte A. The geography of the highest mortality areas in Spain: a striking cluster in the southwestern region of the country. *Occup Environ Med* 2004; 61: 280-1.

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.

Benefice E, Monrroy SJ, Rodriguez RW. A nutritional dilemma: fish consumption, mercury exposure and growth of children in Amazonian Bolivia. *Int J Environ Health Res* 2008; 18(6): 415-27.

- Benes B, Spevackova V, Smid J, Cejchanova M, Kaplanova E, Černá M, et al. Determination of normal concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in urine of the population in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health* 2002; 10(1-2): 3-5.
- Benes B, Sladká J, Spevácková V, Smid J. Determination of normal concentration levels of Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se and Zn in hair of the child population in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health* 2003; 11(4): 184-6.
- Benoit JM, Gilmour CC, Heyes A, Mason RP, Miller CL. Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic environments. En: *Biogeochemistry of environmentally important trace elements*, Cai Y, Braids OC, eds. ADS Symposium Series Washington DC, American Chemical Society 2003, 262-297.
- 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): 281-7.
- Bergquist ER, Fischer RJ, Sugden KD, Martin BD. Inhibition by methylated organo-arsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *J Organomet Chem* 2009; 694: 973-80.
- Bergkvist C, Kippler M, Hamadani JD, Grandér M, Tofail F, Berglund M, et al. Assessment of early-life lead exposure in rural Bangladesh. *Environ Res* 2010; 110: 718-24.
- Berlin M, Zalups RK, Fowler BA. Mercury. En: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Nordberg GF et al, eds. Academic Press, Burlington MA, 2007 (3rded), 675-729.
- 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): 105-20.

- Bermejo-Barrera P, Moreda-Pineiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera AM. Application of multivariate methods of scalp hair metal data to distinguish between drug-free subjects and drug abusers. *Anal Chim Acta* 2002; 455(2): 253-65.
- Bernhoft RA. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *J Environ Public Health* 2012; 460-508.
- Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and celular mechanisms. *Arch Toxicol* 2008; 82: 493-512.
- Bian GG. Lead level in blood for Chinese countryside children. *Environmental Science and Technology* 2008; 31(6): 101-6.
- Biswas BK, Dhar RK, Samanta G, Mandal BK, Chakraborti D, Faruk I, et al. Detailed study report of Samta, one of the arsenic-affected villages of Jessore District, Bangladesh. *Curr Sci* 1998; 74(2): 134-45.
- Black FJ, Bokhutlo T, Somoxa A, Maethamako M, Modisaemang O, Kemosedile T, et al. *Sci Total Environ* 2011; 409: 1967-75.
- Blaha K, Bencko V, Cikrt M. La exposición al plomo y la salud humana en la República Checa. *Cent Eur J Public Health* 1996; 4(4): 233-41.
- Blanco AL, Alonso D, Jiménez De Blas O, Santiago M, Manzano BM. Estudio de los niveles de plomo, cadmio, zinc y arsénico en aguas de la provincia de Salamanca. *Rev Esp Salud Pública* 1998; 72(1): 53-65.
- Bose-O'Reilly S, Lettmeier B, Gothe RM, Beinhoff C, Siebert U, Drasch G. Mercury as a serious health hazard for children in gold mining areas. *Environ Res* 2008; 107: 89-97.
- Bouchard MF, Lafortest F, Vandelac L, Bellinger D, Mergler D. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect* 2007; 115(1): 122-7.

- Bouchard MF, Sauvé S, Barbeau B, Legrand M, Brodeur ME, Bouffard T, et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 138-43.
- Bridbord K, Hanson D. A personal perspective on the initial federal health-based regulation to remove lead from gasoline. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 1195-201.
- Brown RM, Newton D, Pickford CJ, Sherlock JC. Human metabolism of arsenobetaine ingested with fish. *Human Exp Toxicol* 1990; 9: 41-6.
- Budtz-Jørgensen E, Grandjean P, Jørgensen PJ, Weihe P, Keiding N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. *Environ Res* 2004; 95: 385-93.
- Calafat AM. The US National Health and Nutrition Examination Survey and human exposure to environmental chemicals. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215: 99-101.
- Calderón J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Santos-Diaz MA, Golden A, Rodríguez-Leyva I, et al. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res* 2001; 85: 69-76.
- Caldwell KL, Jones RL, Verdon CP, Jarrett JM, Caudill SP, Osterloh JD. Levels of urinary total and speciated arsenic in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2009; 19: 59-68.
- Callan AC, Winters M, Barton C, Boyce M, Hinwood AL. Children's Exposure to Metals: A Community-Initiated Study. *Arch Environ Contam Toxicol* 2012; 62: 714-22.
- Campfens J, Mackay D. Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ Sci Technol* 1997; 31(2): 577-83.
- Cao Y, Chen A, Radcliffe J, Dietrich KN, Jones RL, Caldwell K, et al. Postnatal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age. *Environ Health Persp* 2009; 117: 1580-6.

Carrizales L, Razo I, Téllez-Hernández JI, Torres-Nerio R, Torres A, Batres LE, et al. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environ Res* 2006; 101(1): 1-10.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. NCEH 05-0570, 2005, 1-475.

<http://www.biomonitoring.ca.gov/sites/default/files/downloads/NHANES%20Exposure%203rd%20report.pdf>

(Acceso 5 de enero de 2015)

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. National Public Health Institute. USA. 2009. Available: <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/fourthreport.pdf> (Acceso 31 de Diciembre de 2014).

Černá M, Krsková A, Čejchanová M, Spěváčková. Human biomonitoring in the Czech Republic: An overview. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215: 109-19.

Cespón-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; 600:221–5.

Chatt A, Secord CA, Tiefenbach B, Jervis RE. Scalp hair as a monitor of community exposure to environmental pollutants. In: Brown AC, Crouse RG, editors. *Hair Trace Elements and Human Illness*. New York: Praeger; 1980. p. 46–73.

Chen CN, Yang WF. Metal volatility during plastic combustion. *J Environ Sci Health part A: Toxic-Hard Substan Environ Eng* 1998; 33(5): 783-99.

Cheng J, Gao L, Zhao W, Liu X, Sakamoto M, Wang W. Mercury levels in fisherman and their household members in Zhoushan, China: Impact of public health. *Sci Total Environ* 2009; 407(8): 2625-30.

- Chiang WF, Yang HJ, Lung SC, Huang S, Chiu CY, Liu IL, et al. A comparison of elementary schoolchildren's exposure to arsenic and lead. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2008; 26(3): 237-55.
- Chillrud SN, Bopp RF, Simpson HJ, Ross JM, Shuster EL, Chaky DA, et al. Twentieth century atmospheric metal fluxes into Central Park Lake, New York City. *Environ Sci Technol* 1999; 33(5): 657-62.
- Chojnacka K, Górecka H, Chojnacki A, Górecki H. Inter-element interactions in human hair. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 20: 368-74.
- Chojnacka K, Górecka H, Górecki H. The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 22: 52-57.
- Chojnacka K, Michalak I, Zieńliska A, Górecka H, Górecki H. Inter-relationship between elements in human hair: the effect of gender. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010; 73: 2022-28.
- Chopin EIB, Alloway BJ. Distribution and mobility of trace elements in soils and vegetation around the mining and smelting areas of Tharsis, Riotinto and Huelva, Iberian Pyrite Belt, SW Spain. *Water Air Soil Pollut* 2007; 182: 245-61.
- Ciesielski T, Weuve J, Bellinger DC, Schwartz J, Lanphear B, Wright RO. Cadmium exposure and neurodevelopmental outcomes in US children. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 758-63.
- Cikrt M, Smerhovský Z, Blaha K, J Nerudová, Sediva V, Fornusková H, et al. El control biológico de la exposición al plomo infantil en la República Checa. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 406-11.
- Conrad A, Schulz C, Seiwert M, Becker K, Ullrich D, Kolossa-Gehring M. German Environmental Survey IV: Children's exposure to environmental tobacco smoke. *Toxicol Lett* 2010; 192: 79-83.
- Cordero MTS, de Torres AG, 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): 1689-701.

- Costilla-Salazar R, Trejo-Acevedo A, Rocha-Amador D, Gaspar-Ramírez O, Díaz-Barriga F, Pérez-Maldonado IN. Assessment of polychlorinated biphenyls and mercury levels in soil and biological samples from San Felipe, Nuevo Mercurio, Zacatecas, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 2011; 86: 212-16.
- Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198(2): 209-30.
- Counter SA, Buchanan LH, Ortega F. Mercury levels in urine and hair of children in an Andean gold-mining settlement. *Int J Occup Environ Health* 2005; 11(2): 132-7.
- Counter SA, Buchanan LH, Ortega F. Neurocognitive screening of mercury-exposed children of Andean gold miners. *Int J Occup Environ Health* 2006; 12(3): 209-14.
- Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 2004; 17(8): 544-53.
- Cullen JT, Maldonado MT. Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. *Met Ions Life Sci.* 2013;11:31-62.
- Da Silva DS, Lucotte M, Roulet M, Poirier H, Mergler D, Santos EO, et al. Trophic structure and bioaccumulation of mercury in fish of three natural lakes of the Brazilian Amazon. *Water Air Soil Pollut* 2005; 165: 77-94.
- Davidson PW, Myers GJ, Weiss B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics* 2004; 113: 1023-9.
- Davis JW. Physico-chemical factors influencing ethylenamine sorption to soil. *Environ Toxicol Chem* 1993; 12(1): 27-35.
- De Prisco PP, Volpe MG, Petitto F, Palladino C, Saturnino C, Capasso A, Di Stasio M, De Prisco R. Level of essential and toxic metals in urban adolescents hair: preliminary study. *Biomed Res* 2010; 21(2): 131-40.
- De Vos G, Abotaga S, Liao Z, Jerschow E, Rosenstreich D. Selective effect of mercury on Th2-type cytokine production in humans. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2007; 29(3-4): 537-48.

- Dhar RK, Biswas BK, Samanta G, Mandal BK, Chakraborti D, Roy S, et al. Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Curr Sci* 1997; 73(1): 48-59.
- Díez S, Montuori P, Querol X, Bayona JM. Total mercury in the hair of children by combustion atomic absorption spectrometry (Comb-AAS). *J Anal Toxicol* 2007; 31(3): 144-9.
- Díez S, Montuori P, Pagano A, Sarnacchiaro P, Bayona JM, Triassi M. Hair mercury levels in an urban population from southern Italy: fish consumption as a determinant of exposure. *Environ Int* 2008; 34: 162-7.
- Díez S, Delgado S, Aguilera I, Astray J, Pérez-Gómez B, Torrent M, et al. Prenatal and early childhood exposure to mercury and methylmercury in Spain, a high-fish-consumer country. *Arch Environ Contam Toxicol* 2009; 56: 615-22.
- Díez S, Esbrí JM, Tobias A, Higuera P, Martínez-Coronado A. Determinants of exposure to mercury in hair from inhabitants of the largest mercury mine in the world. *Chemosphere* 2011; 84: 571-77.
- Dolbec J, Mergler D, Larribe F, Roulet M, Lebel J, Lucotte M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Sci Total Environ* 2001; 271: 87-97.
- Dongarrà G, Varrica D, Tamburo E, D'Andrea D. Trace elements in scalp hair of children living in differing environmental contexts in Sicily (Italy). *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 34(2): 160-9.
- Dórea JG, de Souza JR, Rodrigues P, Ferrari I, Barbosa AC. Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Mundurucu and Kayabi Indians of Amazonia. *Environ Res* 2005; 97(2): 209-19.
- Dórea JG, Barbosa AC, Ferrari I, de Souza JR. Fish consumption (hair mercury) and nutritional status of Amazonian Amer-Indian children. *Am J Hum Biol* 2005; 17: 507-14.

- Druyan ME, Bass D, Puchyr R, Urek K, Quig D, Harmon E, et al. Determination of reference ranges for elements in human scalp hair. *Biol Trace Elem Res* 1998; 62:183–97.
- Dunicz-Sokolowska A, Radomska K, Dlugaszek M, Graczyk A. Contents of bioelements and toxic metals in the Polish population determined by hair analysis Part 1. Children aged 1 to 10 years. *Magnesium Res* 2006; 19(1): 35-45.
- Dunn JE, Trachtenberg FL, Barregard L, Bellinger D, McKinlay S. Scalp hair and urine mercury content of children in the Northeast United States: the New England Children’s Amalgam Trial. *Environ Res* 2008; 107(1): 79-88.
- EFSA (European Food Safety Authority). Cadmium in Food-Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. 2009. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/980.htm> (acceso el 28 de diciembre de 2014).
- EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 2012; 10(12): 2985.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 2006; 114(8): 1172-8.
- Elinder CG. Cadmium as an environmental hazard. *IARC Sci Pub* 1992; 1118: 123-32.
- EPA (United States Environment Protection Agency). Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury, Final. EPA-823-R-01-001. Washington. 2001. <http://yosemite.epa.gov/water/owrcatalog.nsf/9da204a4b4406ef885256ae007a79c7/d4b7ccf7f686ffa785256b5e005750e0!OpenDocument> (acceso el 4 de enero de 2015).
- EPA (United States Environment Protection Agency). Mercury. 2003. <http://www.epa.gov/mercury/> (acceso el 1 de enero de 2015).

- EPA (United States Environment Protection Agency). Framework for Metals Risk Assessment. Office of the Science Advisor. Risk Assessment Forum, 2007. <http://www.epa.gov/raf/metalsframework/pdfs/metals-risk-assessment-final.pdf> (acceso el 28 de diciembre de 2014).
- Erdinger L, Eckl P, Ingel F, Khussainova S, Utegenova E, Mann V, et al. The Aral Sea disaster-human biomonitoring of Hg, As, HCB, DDE, and PCBs in children living in Aralsk and Akchi, Kazakhstan. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207: 541-7.
- Erikson K, Thompson K, Aschner J, Aschner M. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 369-77.
- Esteban E, Rubin CH, Jones RL, Noonan G. Hair and blood as substrates for screening children for lead poisoning. *Arch Environ Health* 1999; 54(6): 436-40.
- Esteban M, Castano A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ Int* 2009; 35: 438-49.
- Evans MS, Lockhart WL, Doetzel L, Low G, Muir D, Kidd K, et al. Elevated mercury concentrations in fish in lakes in the Mackenzie River Basin: the role of physical, chemical, and biological factors. *Sci Total Environ* 2005; 351-352: 479-500.
- Evrenoglou L, Partsinevelou SA, Stamatis P, Lazaris A, Patsouris E, Kotampasi C, et al. Children exposure to trace levels of heavy metals at the north zone of Kifissos River. *Sci Total Environ* 2013; 443: 650-61.
- Finkelman RB. Modes of occurrence of trace elements in coal. IEA Coal Research. The Clean Coal Centre, London, UK, 1981, 36.
- Finster ME, Gray KA, Binns HJ. Lead levels of edibles grown in contaminated residential soils: a field survey. *Sci Total Environ* 2004; 320(2-3): 245-57.
- Foo SC, Khoo NY, Heng A, Chua LH, Chia SE, Ong CN, et al. Metals in hair as biological indices for exposure. *Arch Occup Environ Health* 1993; 65:S83-6.

- Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa MJ, Díez S, Vioque J, Ballester F, et al. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res* 2010; 110: 96-104.
- Fujimura M, Matsuyama A, Harvard JP, Bourdineaud JP, Nakamura K. Mercury contamination in humans in Upper Maroni, French Guiana between 2004 and 2009. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 88(2): 135-9.
- Furman A, Laleli M. Semi-occupational exposure to lead: a case study of child and adolescent street vendors in Istanbul. *Environ Res* 2000; 83(1): 41-5.
- Gabrio T, Broser S, Erdinger L, Felder-Kennel A, Fichtner G, Häberle E, et al. Human biomonitoring investigation of organochlorine compounds -PCB, DDE, HCB, beta- and gamma- HCH, PCDD/PCDF, Dioxin-like PCB's and polybrominated biphenyl ethers. *Gesundheitswesen* 2005; 67: 302-11.
- Gamiño-Gutiérrez SP, González-Pérez CI, Gonsebatt ME, Monroy-Fernández MG. Arsenic and lead contamination in urban soils of Villa de la Paz (Mexico) affected by historical mine wastes and its effect on children's health studied by micronucleated exfoliated cells assay. *Environ Geochem Health* 2013; 35(1): 37-51.
- Gellein K, Lierhagen S, Brevik PS, Teigen M, Kaur P, Singh T, et al. Trace element profiles in single strands of human hair determined by HR-ICP-MS. *Biol Trace Elem Res* 2008; 123: 250-60.
- Gil F, Pla A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. (Review Article) *J Appl Toxicol* 2001; 21: 245-55.
- Gil F, Gisbert-Calabuig JA. Intoxicación por otros metales. Capítulo 70. En: Gisbert-Calabuig *Medicina Legal y Toxicología*, Villanueva-Cañadas ed., Masson SA, Barcelona, 2004 (6ª ed.), 964-980.
- Gil F, Capitán-Vallvey LF, De Santiago E, Ballesta J, Pla A, Hernández AF, et al. Heavy metal concentrations in the general population of Andalusia, South of Spain: a

comparison with the population within the area of influence of Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Sci Total Environ* 2006; 372(1): 49-57.

Gil F, Hernández AF. Significance of biochemical markers in applied toxicology. En: *General and Applied Toxicology*, Ballantyne B, Marrs TC and Syversen T, eds., John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, 2009 (Vol. 2), 847-858.

Gil F, Hernandez AF, Marquez C, Femia P, Olmedo P, López-Guarnido O, et al. 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: 1172-80.

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*, Gil F ed., Elsevier, Barcelona, 2012 (2ª ed), Volumen 1, 333-350.

Grabeklis AR, Skalny AV, Nechiporenko SP, Lakarova EV. Indicator ability of biosubstances in monitoring the moderate occupational exposure to toxic metals. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25: 41-4.

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 19(6): 417-28.

Grandjean P, Budtz-Jørgensen E, White RF, Jørgensen PJ, Weihe P, Debes F, et al. Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am J Epidemiol* 1999; 150(3): 301-5.

Grandjean P, White RF, Weihe P, Jørgensen PJ. Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Ambul Pediatr* 2003; 3:18-23.

Greenberg I, Hamilton J, Phillips D, McCluskey J. Mining industry. En: *Occupational, Industrial and Environmental Toxicology*, Greenberg I ed., Mosby, Pennsylvania, USA, 2003; 498-517.

- Grigg J. Las toxinas ambientales, su impacto en la salud de los niños. Arch Dis Child 2004; 89: 244-50.
- Guentzel JL, Portilla E, Keith KM, Keith EO. Mercury transport and bioaccumulation in riverbank communities of the Alvarado Lagoon System, Veracruz State, Mexico. Sci Total Environ 2007; 388(1-3): 316-24.
- Guo HR, Chiang HS, Hu H, Lipsitz SR, Monson RR. Arsenic in drinking water and incidence of urinary cancers. Epidemiology. 1997; 8(5):545-50.
- Hall MN, Liu X, Slavkovich V, LLievski V, Pilsner JR, Alam S, et al. Folate, cobalamin, cysteine, homocysteine, and arsenic metabolism among children in Bangladesh. Environ Health Perspect 2009; 117(5): 825-31.
- Hang X, Wang H, Zhou J, Ma C, Du C, Chen X. Risk assessment of potentially toxic element pollution in soils and rice (*Oryza sativa*) in a typical area of the Yangtze River Delta. Environ Pollut 2009; 157: 2542-9.
- Harkins DK, Susten AS. Hair analysis: exploring the state of the Science. Environ. Health Perspect 2003; 111 (4): 576-78.
- Hartwig A, Blessing H, Schwerdtle T, Walter I. Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. Toxicology 2003; 193: 161-9.
- Hartwig A, Pelzer A, Asmuss M, Bürkle A. Very low concentrations of arsenite suppress poly (ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. Int J Cancer 2003; 104: 1-6.
- Hasan MY, Kosanovic M, Fahim MA, Adem A, Petroianu G. Trace metal profiles in hair samples from children in urban and rural regions of the United Arab Emirates. Vet Hum Toxicol 2004; 46(3): 119-21.
- Haynes EN, Heckel P, Ryan P, Roda S, Leung YK, Sebastian K, et al. Environmental manganese exposure in residents living near a ferromanganese refinery in southeast Ohio: a pilot study. Neurotoxicol 2010; 31(5): 468-74.

- Haynes EN, Ryan P, Chen A, Brown D, Roda S, Kuhnell P, et al. Assessment of personal exposure to manganese in children living near a ferromanganese refinery. *Sci Total Environ* 2012; 427-428: 19-25.
- Heitland P, Köster HD. Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clin Chim Acta* 2006; 365(1-2): 310-318.
- Herawati N, Suzuki S, Hayashi K, Rivai IF, Koyama H. Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. *Bull Environ Contam Toxicol* 2000; 64(1):33-9.
- Hernández A. Del case report a la evidencia epidemiológica de causalidad en investigación biomédica. *Arbor* 2002, 675: 589-608.
- Hernández AF y Gisbert-Calabuig JA. Intoxicación por arsénico. En: En: Gisbert-Calabuig Medicina Legal y Toxicología, Villanueva-Cañadas ed., Masson SA, Barcelona, 2004 (6ª ed.), 930-38.
- Hernández AF, Gil F, Tsatsakis AM. Biomarkers of chemical mixture toxicity. En: Biomarkers in Toxicology. Gupta RC ed., Academic Press, Oxford, UK, 2014, 655-670.
- Hernández-Bonilla D, Schilmann A, Montes S, Rodríguez-Agudelo Y, Rodríguez-Dozal S, Solís-Vivanco R, et al. Environmental exposure to manganese and motor function of children in Mexico. *Neurotoxicol* 2011; 32(5): 615-21.
- Hindmarsh JT, Dekerkhove K, Grime G, Powell J. Hair arsenic as an index of toxicity. In: Chappell, E.R., Abernathy CO and Calderon RL. (Eds.). Arsenic exposure and health effects. Elsevier, New York, 1999, 41-49.
- Hindmarsh JT. Arsenic – its clinical and environmental significance. *J Trace Elem Exp Med* 2000; 13: 165–172.
- 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): 1109-15.

- Horvath B, Gruiz K. Impact of metalliferous ore mining activity on the environment in Gyongyosorozi, Hungary. *Sci Total Environ* 1996; 184: 215-27.
- Hu H. Exposure to metals. *Primary Care* 2000; 27: 983-96.
- Hu H, Shine J, Wright O. The challenge posed to children's health by mixtures of toxic waste: the Tar Creek superfund site as a case-study. *Pediatr Clin N Am* 2007; 54: 155-75.
- Huber R, Otto S. Environmental behavior of bentazon herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* 1994; 137: 111-34.
- Hughes MF. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Persp* 2006; 114: 1790-6.
- Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.
- Hysong TA, Burgess JL, García MEC, O'Rourke MK. House dust and inorganic urinary arsenic in two Arizona mining towns. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2003; 13: 211-8.
- Inaba K, Shiraishi H, Soma Y. Effects of salinity, pH and temperature on aqueous solubility of four organotin compounds. *Water Res* 1995; 29(5): 1415-7.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). Methylmercury (Environmental Health Criteria 101). Geneva: World Health Organization, 1990. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm> (acceso el 4 de enero de 2015).
- Ip P, Wong V, Ho M, Lee J, Wong W. Environmental mercury exposure in children: South China's experience. *Pediatr Int* 2004; 46(6): 715-21.
- Jakubowski M, Trzcinka-Ochocka M. El control biológico de la exposición: Tendencias y desarrollos clave. *J Occup Salud* 2005; 47: 22-8.

- Jantunen MJ, Hänninen O, Katsouyanni K, Knöppel H, Kuenzli N, Lebrete E, et al. Air pollution exposure in European cities: the "EXPOLIS"-study. *JEAE* 1998; 8(4): 495-518.
- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003; 68: 167-82.
- Järup L, Åkesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(3): 201-8.
- Jasso-Pineda Y, Díaz-Barriga F, Calderón J, Yáñez L, Carrizales L, Pérez-Maldonado IN. DNA damage and decreased DNA repair in peripheral blood mononuclear cells in individuals exposed to arsenic and lead in a mining site. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146(2): 141-9.
- Jensen GE, Olsen ILB. Occupational exposure to inorganic arsenic in wood workers and taxidermists air sampling and biological monitoring. *J Environ Sci and Health* 1995; 30(4): 921-38.
- Jensen RR, Karki S, Salehfar H. Artificial neural network-based estimation of mercury speciation in combustion flue gases. *Fuel Process Technol* 2004; 85: 451–62.
- Jensen TK, Grandjean P, Jorgensen EB, White RF, Debes F, Weihe P. Effects of breast feeding on neuropsychological development in a community with methylmercury exposure from seafood. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005; 15: 423-30.
- Jiang JK, Hao JM, Wu H, Streets DG, Duan L, Tiao HZ. Development of mercury emission inventory from coal combustion in china. *Environ Sci* 2005; 26: 34-39 [in Chinese].
- Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 2011; 31(2): 95-107.
- Jones RL, Homa DM, Meyer PA, Brody DJ, Caldwell KL, Pirkle JL, et al. Trends in blood lead levels and blood lead testing among U.S. children aged 1 to 5 years, 1988–2004. *Pediatrics* 2009; 123: 376-85.

- Juberg DR, Kleiman CF, Kwon SC. Documento de posición del Consejo Americano de Ciencia y Salud: el plomo y la salud humana. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997; 38: 162-80.
- Kalbitz K, Wennrich R. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Sci Total Environ* 1998; 209(1): 27-39.
- Kashem A, Singh BR. Heavy metal contamination of soil and vegetation in the vicinity of industries in Bangladesh. *Water Air Soil Pollut* 1999; 115(1-4): 347-61.
- Khalique A, Shah MH, Jaffar M, Shaheen N, Tariq SR, Manzoor S. Multivariate analysis of the selected metals in the hair of cerebral palsy patients versus control. *Biol Trace Elem Res* 2006; 111: 11-22.
- Kim SA, Jeon CK, Paek DM. Hair mercury concentrations of children and mothers in Korea: Implication for exposure and evaluation. *Sci Total Environ* 2008; 402: 36-42.
- Kimbrough RA, Litke DW. Pesticides in streams draining agricultural and urban areas in Colorado. *Environ Sci Technol* 1996; 30(3): 908-16.
- Kliment V, Kubínová R, Kazmarová H, Havlík B, Sisma P, Ruprich J, et al. System of monitoring the environmental impact on population health of the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*. 1997; 5(3):107-16.
- Kintz P, Gouille JP, Fornes P, Ludes B. A new series of hair analyses from Napoleon confirms chronic exposure to arsenic. *J Anal Toxicol* 2002; 26(8): 584-5.
- Kippler M, Ekström EC, Lönnerdal B, Goessler W, Akesson A, El Arifeen S, et al. Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladesh women. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222(2): 221-6.
- Kippler M, Nermell B, Hamadani J, Tofail F, Moore S, Vahter M. Burden of cadmium in early childhood: Longitudinal assessment of urinary cadmium in rural Bangladesh. *Toxicol Lett* 2010; 198(1): 20-5.

- Kordas K, Queirolo EI, Ettinger AS, Wright RO, Stoltzfus RJ. Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo. Uruguay. *Sci Total Environ* 2010; 408(20): 4488-94.
- Lanphear B, Hornung R, Khoury J. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ Health Persp* 2005; 113(7): 894-9.
- Lau YL, Liu D LS, Pacepavicius GJ, Maguire RJ. Volatilization of metolachlor from water. *J Environ Sci Health Part B Agric Wastes* 1995; 30(5): 605-20.
- Lauwerys RR. *Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales*. Masson S.A Barcelona, 1994.
- Lee WC, Lee MJ, Lee SM, Kim JS, Bae CS, Parka TK. An observation on the mercury contents of scalp hair in the urban residents of South Korea. *Environ Toxicol Pharmacol* 2000; 8: 275-8.
- Levy M, Schwartz S, Dijak M, Weber JP, Tardif R, Rouah F. Childhood urine mercury excretion: dental amalgam and fish consumption as exposure factors. *Environ Res* 2004; 94(3): 283-90.
- Li YH, Ji YF, Yang LS, Li SJ. Effects of mining activity on heavy metals in surface water in lead-zinc deposit area. *J Agro-environ Sci* 2007; 26: 103-7.
- Licata P, Trombetta D, Cristani M, Naccari C, Martino D, Calò M, et al. Heavy metals in liver and muscle of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the Straits of Messina (Sicily, Italy). *Environ Monit Assess* 2005; 107(1-3): 239-48.
- Lim S, Chung HU, Paek D. Low dose mercury and heart rate variability among community residents nearby to an industrial complex in Korea. *Neurotoxicol* 2010; 31: 10-16.
- Link B, Gabrio T, Zoellner I, Piechotowski I, Paepke O, Herrmann T, et al. Biomonitoring of persistent organochlorine pesticides, PCDD/PCDFs and dioxin-like PCBs in blood of children from South West Germany (Baden-Wuerttemberg) from 1993 to 2003. *Chemosphere* 2005; 58: 1185-201.

- Link B, Gabrio T, Piechotowski I, Zöllner I, Schwenk M. Baden-Wuerttemberg Environmental Health Survey (BW-EHS) from 1996 to 2003: Toxic metals in blood and urine of children. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 357-71.
- Liu CP, Luo CL, Gao Y, Li FB, Lin LW, Wu CA, et al. Arsenic contamination and potential health risk implications at an abandoned tungsten mine, southern China. *Environ Pollut* 2010; 158(3): 820-6.
- Liu B, Wu E, Li X, Fu Z, Deng Q, Mo C, et al. Arsenic, antimony and bismuth in human hair for potentially exposed individuals in the vicinity of antimony mines in South-west China. *Microchem J* 2011; 97: 20-4.
- López-Abente G, Ramis R, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez-Barroso D, et al. Municipal atlas of cancer mortality in Spain, 1989-1998. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2006.
- Lugli A, Clemenza M, Corso PE, Di Costanzo J, Dirnhofer R, Fiorini E, et al. The medical mystery of Napoleon Bonaparte: an interdisciplinary exposé. *Adv Anat Pathol* 2011; 18(2): 152-8.
- Malm O, Dórea JG, Barbosa AC, Pinto FN, Weihe P. Sequential hair mercury in mothers and children from a traditional riverine population of the Rio Tapajós, Amazonia: Seasonal changes. *Environ Res* 2010; 110(7): 705-9.
- Manay N, Pereira L, Cousillas Z. La contaminación por plomo en Uruguay. *Rev. Environ Contam Toxicology* 1999; 159: 25-39.
- Maramba NP, Reyes JP, Francisco-Rivera AT, Panganiban LC, Dioquino C, Dando N, et al. Environmental and human exposure assessment monitoring of communities near an abandoned mercury mine in the Philippines: A toxic legacy. *J Environ Manage* 2006; 81(2): 135-45.
- Marques RC, Dórea JG, Bastos WR, Malm O. Changes in children hair-Hg concentrations during the first 5 years: Maternal, environmental and iatrogenic modifying factors. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007; 49: 17-24.

- Marques RC, Dórea JG, Leão RS, dos Santos VG, Bueno L, Marques RC, et al. Arch Environ Contam Toxicol 2012; 62: 341-50.
- Mayer H. Air pollution in cities. Atmos Environ 1999; 33(24-25): 4029-37.
- McDowell MA, Dillon CF, Osterloh J, Bolger PM, Pellizzari E, Reshan F, et al. Hair mercury levels in U.S. children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999-2000. Environ Health Perspect 2004; 112(11): 1165-71.
- McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, Deforest DK, Brigham SI, Adams WJ, et al. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. Environ Toxicol Chem 2003; 22(5): 1017-37.
- Meharg AA, Osborn D, Pain DJ, Sanchez A, Naveso MA. Contamination of Doñana food-chains after the Aznalcollar mine disaster. Environ Pollut 1999; 105(3): 387-90.
- Méndez-Gómez J, García-Vargas GG, López-Carrillo L, Calderón-Aranda ES, Gómez A, Vera E, et al. Genotoxic effects of environmental exposure to arsenic and lead on children in region Lagunera, Mexico. Ann NY Acad Sci 2008; 1140: 358-67.
- Menezes-Filho JA, Paes CR, Pontes AMC, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. Neurotoxicol 2009; 30(6): 1207-13.
- Menezes-Filho JA, Novaes CD, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. Elevated manganese and cognitive performance in school-aged children and their mothers. Environ Res 2011; 111(1): 156-63.
- Menezes-Filho JA, Viana GF, Paes CR. Determinants of lead exposure in children on the outskirts of Salvador, Brazil. Environ Monit Assess 2012; 184: 2593-603.
- Mergler D, Anderson HA, Chan LHM, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. Ambio 2007; 36: 3-11.

- Montes S, Schilmann A, Riojas-Rodriguez H, Rodriguez-Agudelo Y, Solis-Vivanco R, Rodriguez-Dozal SL, et al. Serum prolactin rises in Mexican school children exposed to airborne manganese. *Environ Res* 2011; 111(8): 1302-8.
- Montuori P, Jover E, Díez S, Ribas-Fitó N, Sunyer J, Triassi M, et al. Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Sci Total Environ* 2006; 369: 51-8.
- Moon CS, Paik JM, Choi CS, Kim DH, Ikeda M. Lead and cadmium levels in daily foods, blood and urine in children and their mothers in Korea. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76: 282-8.
- Moore JN, Luoma SN. Hazardous wastes from large-scale metal extraction, a case study. *Environ Sci Technol* 1990; 24: 1278-85.
- 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): 947-50.
- Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Ann Rev Ecol Syst* 1998; 29: 543-66.
- Moreno ME, Acosta-Saavedra LC, Meza-Figueroa D, Vera E, Cebrian ME, Ostrosky-Wegman P, et al. Biomonitoring of metal in children living in a mine tailings zone in Southern Mexico: A pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213(4): 252-8.
- Morrisette J, Takser L, St-Amour G, Smargiassi A, Lafond J, Mergler D. Temporal variation of blood and hair mercury levels in pregnancy in relation to fish consumption history in a population living along the St. Lawrence River. *Environ Res* 2004; 95: 363-74.
- Morton J, Carolan VA, Gardiner PHE. Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2000; 455(1): 23-34.

- Moya J, Beare CF, Etzel RA. Children's behavior and physiology and how it affects exposure to environmental contaminants. *Pediatrics* 2004; 113: 996-1006.
- Murata K, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen P, Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year old children exposed to methylmercury. *J Pediatr* 2004; 144(2): 177-83.
- Myers GJ, Thurston SW, Pearson AT, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, et al. *Neurotoxicol* 2009; 30: 338-49.
- Nadal M, Bocio A, Schuhmacher M, Domingo JL. Monitoring metals in the population living in the vicinity of a hazardous waste incinerator: levels in hair of school children. *Biol Trace Elem Res* 2005; 104(3): 203-13.
- National Research Council (NRC). Toxicological effects of methylmercury. National Academy Press, Washington DC, 2000.
- Needham LL, Barr DB, Calafat AM. Characterizing children's exposures: beyond NHANES. *Neurotoxicol* 2005; 26: 547-53.
- Neilson AH. An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiotics. *Int biodeterior biodegrad* 1996; 37(1-2): 3-21.
- Nollen M, Ebert F, Moser J, Mullenders LH, Hartwig A, Schwerdtle T. Impact of arsenic on nucleotide excision repair: XPC function, protein level, and gene expression. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 572-82.
- Novotny V. Diffuse pollution from agriculture. *Water Sci Technol* 1999; 39(3): 1-13.
- NRC (National Research Council). Toxicological effects of MeHg, National Academy Press, Washing DC 2000; 118:113.
- Nunes JA, Batista BL, Rodrigues JL, Caldas NM, Neto JAG, Barbosa Jr F. A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, cooper, manganese, nickel, lead and selenium in blood of the brazilian population *J Toxicol Environ Health A* 2010;73:878-87.

- Oberdörster G, Oberdörster E, et al. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113(7): 823-39.
- Oken E, Wright RO, Kleinman KP, Bellinger D, Amarasiwardena CJ, Hu H, et al. Maternal fish consumption, hair mercury and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1376-80.
- Olajire AA, Ayodele ET, Oyedirdan GO, Oluyemi EA. Levels and speciation of heavy metals in soils of industrial Southern Nigeria. *Environ Monit Assess* 2003; 85(2): 135-55.
- Olivero-Verbel J, Johnson-Restrepo B, Baldiris-Avila R, Güette-Fernández J, Magallanes-Carreazo E, Vanegas-Ramírez L, et al. Human and crab exposure to mercury in the Caribbean coastal shoreline of Colombia: Impact from an abandoned chlor-alkali plant. *Environ Int* 2008; 34(4): 476-82.
- Olmedo P, Pla A, Hernández AF, 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(1-2): 60-7.
- Olmedo P, Pla A, Hernández AF, Barbier F, Ayouni L, Gil F. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ Int* 2013; 59: 63-72.
- Orloff K, Mistry K, Metcalf S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Env Health B* 2009; 12: 509-24.
- Oyoo-Okoth E, Admiraal W, Osano O, Ngure V, Kraak MHS, Omutange ES. Monitoring exposure to heavy metals among children in Lake Victoria, Kenya: Environmental and fish matrix. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010; 73: 1797-803.
- Özden TA, Gökçay G, Ertem HV, Süoğlu OD, Kikiç A, Sökücü S, et al. Elevated hair levels of cadmium and lead in school children exposed to smoking and in highways near schools. *Clin Biochem* 2007; 40: 52-6.

- Ozuah PO, Lesser MS, Woods JS, Choi H, Markowitz M. Mercury exposure in an urban pediatric population. *Ambul Pediatr* 2003; 3: 24-6.
- Pandey AK, Pandey SD, Misra V. Stability constants of metal-humic acid complexes and its role in environmental detoxification. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000; 47(2): 195-200.
- Papanikolaou NC, Hatzidaki EG, Belivanis S, Tzanakakis GN, Tsatsakis AM. Lead toxicity update. A brief review. *Med Sci Monit* 2005; 11(10): 329-36.
- Parvez F, Wasserman GA, Factor-Litvak P, Liu X, Slavkovich V, Siddique AB, et al. Arsenic exposure and motor function among children in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1665-70.
- Paschal DC, Ting BG, Morrow JC, Pirkle JL, Jackson RJ, Sampson EJ, et al. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. *Environ Res* 1998; 76: 53-9.
- Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica* 2008; 24(4): 503-20.
- Peak JD, Harrison RM. The magnitude and relative environmental impact of air pollutant emissions from aerosol industry products. *Environ Technol* 1992; 13(9): 867-73.
- Peplow D, Augustine S. Community-Led assessment of risk from exposure to mercury by native amerindian Wayana in southeast Suriname. *J Environ Public Health* 2012.
- Pereira R, Ribeiro R, Gonçalves F. Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal). *Sci Total Environ* 2004; 327: 81-92.
- Pesch A, Wilhelm M, Rostek U, Schmitz N, Weishoff-Houben M, Ranft U, et al. Mercury concentrations in urine, scalp hair and saliva in children from Germany. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2002; 12(4): 252-8.

- Philip AT, Gerson B. Lead poisoning-Part II.Effects and assay. *Cin Lab Med* 1994; 14: 651-70.
- Pillet S, Rooney AA, Bouquegneau JM, Cyr DG, Fournier M. Sex-specific effects of neonatal exposures to low levels of cadmium through maternal milk on development and immune functions of juvenile and adults rats. *Toxicol* 2005; 209: 289-301.
- Pinheiro MCN, Nakanishi J, Oikawa T, Guimarães G, Quaresma M, Cardoso B, et al. Methylmercury human exposure in riverside villages of Tapajos basin, Para State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 265-9.
- Pinheiro MCN, Crespo-López ME, Vieira JLF, Oikawa T, Guimarães GA, Araújo CC, et al. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. *Environ Int* 2007; 33: 56-61.
- Piomelli S. Childhood lead poisoning. *Pediatr Clin N Am* 2002; 49: 1285–304.
- Pirkle JL, Brody DJ, Gunter EW, Kramer RA, Paschal DC, Flegal KM, et al. The decline in blood lead levels in the United States. The National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *J Am Med Assoc* 1994; 272: 277–83.
- Pirkle JL, Kaufmann RB, Brody DJ, Hickman T, Gunter EW, Paschal DC. Exposure of the U.S. population to lead, 1991–1994. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 745-50.
- Puklová V, Krsková A, Černá M, Cejchanová M, Řehuřková I, Ruprich J, et al. The mercury burden of the Czech population: an integrated approach. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213: 243-51.
- Ramón R, Murcia M, Ballester F, Rebagliato M, Lacasaña M, Vioque J, et al. Prenatal exposure to mercury in a prospective mother-infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. *Sci Total Environ* 2008; 392(1): 69-78.
- Ramón R, Ballester F, Aguinagalde X, Amurrio A, Vioque J, Lacasaña M, et al. Fish consumption during pregnancy, prenatal mercury exposure, and anthropometric measures at birth in a prospective mother-infant cohort study in Spain. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 1047-55.

- Ren HM, Wang JD, Zhang XL. Assessment of soil lead exposure in children in Shenyang, China. *Environ Pollut* 2006; 144(1): 327-35.
- 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): 37-9.
- Richter PA, Bishop EE, Wang J, Swahn MH. Tobacco smoke exposure and levels of urinary metals in the US youth and adult population: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6: 1930-46.
- Riojas-Rodríguez H, Solís-Vivanco R, Schilmann A, Montes S, Rodríguez S, Ríos C, et al. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environ Health Perspect* 2010; 118(10): 1465-70.
- Ritz B, Heinrich J, Wjst M, Wichmann E, Krause C. Effect of cadmium body burden on immune response of school children. *Arch Environ Health* 1998; 53: 272-80.
- Rivai IF, Koyama H, Suzuki S. Cadmium content in rice and its daily intake in various countries. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990; 44: 910-6.
- Rivero Serrano O. Fate, transport, and interactions of heavy metals. *Environ Health Perspect* 1995; 103(1): 7-8.
- Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, Morales R, Calderón J. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica* 2007; 23(4): 579-87.
- Rodríguez VM, Jimenez-Capdeville ME, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett* 2003; 145: 1-18.
- Rodríguez-Barranco M, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Alguacil J, Gil F, González-Alzaga B, et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ* 2013; 454-455: 562-577.

- Roggi C, Merlo E, Maccarini L, Minoia C, Ronchi A, Gatti A. Influenza del consumo di alcool, del fumo e delle abitudini dietetiche sulle concentrazioni ematiche di piombo e cadmio. *Ann Ig* 1996; 8: 657-65.
- Rojas M, Seijas D, Agreda O, Rodríguez M. Biological monitoring of mercury exposure in individuals referred to a toxicological center in Venezuela. *Sci Total Environ* 2006; 354(2-3): 278-85.
- Rojas M, Nakamura K, Seijas D, Squiuate G, Pieters MA, Infante S. Mercury in hair as a biomarker of exposure in a coastal Venezuelan population. *Invest Clin* 2007; 48: 305-15.
- Romieu I, Lacasaña M, McConnell R. La exposición al plomo en América Latina y el Caribe. Dirigir el grupo de investigación de la Organización Panamericana de la Salud. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 398-405.
- Rosado JL, Ronquillo D, Kordas K, Rojas O, Alatorre J, Lopez P, et al. Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1371-5.
- Rosin A. The long-term consequences of exposure to lead. *Isr Med Assoc J* 2009; 11(11): 689-94.
- Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern Epidemiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (3ª ed.), 2008, 758 págs.
- Roy A, Kordas K, Lopez P, Rosado JL, Cebrian ME, Vargas GG, et al. Association between arsenic exposure and behavior among first-graders from Torreón, Mexico. *Environ Res* 2011; 111: 670-6.
- Ruiz P, Mumtaz M, Osterloh J, Fisher J, Fowler BA. Interpreting NHANES biomonitoring data, cadmium. *Toxicol Lett* 2010; 198: 44-8.
- Rybička EH. Impact of mining and metallurgical industries on the environment in Poland. *Appl Geochem* 1996; 11: 3-9.

- Sakuma AM, De Capitani EM, Figueiredo BR, Maio FD, Paoliello MM, da Cunha FG, et al. Arsenic exposure assessment of children living in a lead mining area in Southeastern Brazil. *Cad Saude Publica* 2010; 26(2): 391-8.
- Salonen JT, Seppänen K, Nyyssönen H, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, et al. Intake of mercury from fish, lipid-peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Cir J* 1995; 9: 645-55.
- Samanta G y Dhakraborti D. Flow injection atomic absorption spectrometry for the standardization of arsenic, lead and mercury in environmental and biological standard reference materials. *Fresenius J Anal Chem* 1997; 357(7): 827-32.
- Sanna E, Liguori A, Palmas L, Soro MR, Floris G. Blood and hair lead levels in boys and girls living in two Sardinians towns at different risks of lead pollution. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003; 55(3): 293-9.
- Sanna E, Floris G, Vallascas E. Town and gender effects on hair lead levels in children from three Sardinian towns (Italy) with different environmental backgrounds. *Biol Trace Elem Res* 2008; 124(1): 52-9.
- Saoudi A, Zeghnoun A, Bidondo ML, Garnier R, Cirimele V, Persoons R, et al. Urinary arsenic levels in the French adult population: The French National Nutrition and Health Study, 2006-2007. *Sci Total Environ* 2012; 433: 206-15.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium environmental exposure and health outcomes. *Environ Health Perspect* 2010; 118(2): 182-90.
- Schoeters G, Den Hond E, Zuurbier M, Naginiene R, Van Den Hazel P, Stilianakis N, et al. Cadmium and children: exposure and health effects. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 95: 50-4.
- Schoeters GE, Den Hond E, Koppen G, Smolders R, Bloemen K, De Boever P, Govarts E. Biomonitoring and biomarkers to unravel the risks from prenatal environmental exposures for later health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(6 Suppl):1964S-1969S.

- Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring M, Seiwert M, Seifert B. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring-temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 271-97.
- Schulz C, Angerer J, Ewers U, Heudorf U, Wilhelm M. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine of blood of children in Germany derived from the German environmental survey on children 2003-2006 (GerES IV). *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 637-47.
- 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;75:500-6.
- Schwerdtle T, Walter I, Hartwing A. Arsenite and its biomethylated metabolites interfere with the formation and repair of stable BPDE-induced DNA adducts in human cells and impair XPAz and Fpg. *DNA Repair (Amst)* 2003; 2: 1449-63.
- Sera K, Futatsugawa S, Murao S. Quantitative analysis of untreated hair samples for monitoring human exposure to heavy metals. *Nucl Instrum Methods B* 2002; 189: 174-9.
- Sexton K, Adgate JL, Fredrickson AL, Ryan AD, Needham LL, Ashley DL. Using biologic markers in blood to assess exposure to multiple environmental chemicals for inner-city children 3-6 years of age. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 453-9.
- Shah F, Kazi TG, Afridi HI, Khan S, Kolachi NF, Arain MB, et al. The influence of environmental exposure on lead concentrations in scalp hair of children in Pakistan. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011; 74: 727-32.
- Shah F, Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Baig JA, Shah AQ, et al. Erratum: evaluation of status of trace and toxic metals in biological samples (scalp hair, blood, and urine) of normal and anemic children of two age groups. *Biol Trace Elem Res* 2011; 141: 368.
- Signorelli S. Arsenic in volcanic gases. *Environ Geol* 1997; 32(4): 239-44.

- Silbergeld EK, Davis DL. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem* 1994; 40(7): 1363-7.
- Simon S, Tran H, Pannier F, Potin-Gautier M. Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *J Chromatogr A* 2004; 1024(1-2): 105-13.
- Smith JC, Farris FF. Methyl mercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 137: 245-52.
- Staessen JA, Nawrot T, Hond ED, Thijs L, Fagard R, Hoppenbrouwers K, et al. Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet* 2001; 357: 1660-9.
- Stassen MJ, Preeker NL, Ragas AM, van de Ven MW, Smolders AJ, Roeleveld N. Metal exposure and reproductive disorders in indigenous communities living along the Pilcomayo River, Bolivia. *Sci Total Environ* 2012; 427-428: 26-34.
- Storch HV, Hagner C. Controlling lead concentrations in human blood by regulating the use of lead in gasoline. *J Hum Environ* 2004; 33(3): 126-32.
- Streets DG, Hao JM, Wu Y, Jiang JK, Chan M, Tian HZ, et al. Anthropogenic mercury emissions in China. *Atmos Environ* 2005; 39: 7789-806.
- Stromberg U, Lundh T, Skerfving S. Yearly measurements of blood lead in Swedish children since 1978: the declining trend continues in the petrol-lead-free period 1995-2007. *Environ Res* 2008; 107: 332-5.
- Strumylaite L, Ryselis S, Kregzdyte R. Content of lead in human hair from people with various exposure levels in Lithuania. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207(4): 345-51.
- Sughis M, Penders J, Haufroid V, Nemery B, Nawrot TS. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in children: a cross-sectional study. *Environ Health* 2011; 10: 104.

- Svartengren M, Elinder CG, Friberg L, Lind B. Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res* 1986; 39(1): 1-7.
- Svenson A, Hynning PA. Increased aquatic toxicity following photolytic conversion of an organochlorine pollutant. *Chemosphere* 1997; 34(8): 1685-92.
- Tang J, Xiao T, Wang S, Lei J, Zhang M, Gong Y, et al. High cadmium concentrations in áreas with endemic fluorosis: A serious hidden toxin? *Chemosphere* 2009; 76: 300-5.
- Tavares LM, Camara VM, Malm O, Santos EC. Performance on neurological development test by riverine children with moderate mercury exposure in Amazonia, Brazil. *Cad Saude Publica* 2005; 21: 1160-7.
- Teresa M, Vasconcelos SD, Tavares HMF. Trace element concentrations in blood and hair of young apprentices of a technical-professional school. *Sci Total Environ* 1997; 205: 189-99.
- Tetens I, Hels O, Khan NI, Thilsted SH, Hassan N. Rice-based diets in rural Bangladesh: how do different age and sex groups adapt to seasonal changes in energy intake? *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 406-13.
- Thomas VM, Socolow RH, Fanelli JJ, Spiro TG. Effects of reducing lead in gasoline: an analysis of international experience. *Environ Sci Technol* 1999; 33(22): 3942-8.
- Tian W, Egeland GM, Sobol I, Chan HM. Mercury hair concentrations and dietary exposure among Inuit preschool children in Nunavut, Canada. *Environ Int* 2011; 37: 42-8.
- Tong S, Baghurst P, McMichael A, Sawyer M, Mudge J. Lifetime exposure to environmental lead and children's intelligence at 11-13 years: the Port Pirie cohort study. *BMJ* 1996; 312(7046):1569-75.
- Trasande L, Landrigan PJ, Schechter C. Public health and economic consequences of methyl mercury toxicity to the developing brain. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 590-6.

- Trejo-Acevedo A, Díaz-Barriga F, Carrizales L, Domínguez G, Costilla R, Ize-Lema I, et al. Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere* 2009; 74: 974-80.
- Tsai SY, Chou HY, The HW, Chen CM, Chen CJ. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicol* 2003; 747-53.
- Uchino T, Roychowdhury T, Ando M, Tokunaga, H. Intake of arsenic from water, food composites and excretion through urine, hair from a studied population in West Bengal, India. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 455-61.
- Umbangtalad S, Parkpian P, Visvanathan C, DeLaune RD, Jugsujinda A. Assessment of Hg contamination and exposure to miners and schoolchildren at a small-scale gold mining and recovery operation in Thailand. *J Environ Sci Health A. Tox Hazard Subst Environ Eng* 2007; 42(14): 2071-9.
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. AENOR, Madrid, 2005.
- Unkiewicz-Winiarczyk A, Bagniuk A, Gromysz-Kalkowska K, Szubartowska E. Zinc, manganese, calcium, copper and cadmium level in scalp hair samples of schizophrenic patients. *Biol Trace Elem Res* 2009; 127: 102-8.
- Vahter M, Marafante E, Dencker L. Metabolism of arsenobetaine in mice, rats and rabbits. *Sci Total Environ* 1983; 30: 197-211
- 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.
- Villanueva E. Intoxicación por mercurio. En: Gisbert-Calabuig. *Medicina Legal y Toxicología*, Villanueva-Cañadas E (Ed.), Masson, Barcelona, 2004a (6ªed), 939-46.
- Villanueva E. Intoxicación por plomo. En: Gisbert-Calabuig. *Medicina Legal y Toxicología*, Villanueva-Cañadas E (Ed.), Masson, Barcelona, 2004b (6ªed), 947-63.

- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. Rutes by which pollutants enter ecosystems. En: Walker CH, Hopkin S P, Sibly R M, Peakall D B (Eds.). Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London, 1996; 27-39.
- Wang Q, Zhao HH, Chen JW, Gu KD, Zhang YZ, Zhu YX, et al. Adverse health effects of lead exposure on children and exploration to internal lead indicator. *Sci Total Environ* 2009; 407: 5986-92.
- Wang T, Fu J, Wang Y, Liao C, Tao Y, Jiang G. Use of scalp hair as indicator of human exposure to heavy metals in an electronic waste recycling area. *Environ Pollut* 2009; 157: 2445-51.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Levy D, Factor-Litvak P, et al. Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 124-9.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Kline J, et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2007; 115(2): 285-9.
- Wasserman GA, Liu X, Factor-Litvak P, Gardner JM, Graziano JH. Developmental impacts of heavy metals and undernutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(2): 212-7.
- Watanabe T, Zhang ZW, Qu JB, Gao WP, Jian ZK, Shimbo S, et al. Background lead and cadmium exposure of adult women in Xian City and two farming villages in Shaanxi Province, China. *Sci Total Environ* 2000; 247(1): 1-13.
- WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria, 101, Methylmercury, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1990.
- WHO (World Health Organization). Arsenic and Arsenic Compounds. Environmental Health Criteria 224, Second ed. World Health Organization, Geneva. 2001.
- Wilhelm M, Eberwein G, Hölzer J, Begerow J, Sugiri D, Gladtko D, et al. Human biomonitoring of cadmium and lead exposure of child-mother pairs from

- Germany living in the vicinity of industrial sources (hot spot study NRW). *J Trace Elem Med Biol* 2005; 19(1): 83-90.
- Wilhelm M, Schulz C, Schwenk M. Revised and new reference values for arsenic, cadmium, lead and mercury in blood or urine of children: basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209: 301–305.
- Wilhelm M, Ewers U, Wittsiepe J, Fürst P, Hölzer J, Eberwein G, et al. Human biomonitoring studies in North Rhine-Westphalia, Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 307-18.
- Wilhelm M, Eberwein G, Hölzer J, Gladtko D, Angerer J, Marczynski B, et al. Influence of industrial sources on children's health – Hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 591-9.
- Wolowiec P, Michalak I, Chojnacka K, Mikulewicz M. Hair analysis in health assessment. *Clin Chim Acta* 2013; 419: 139-71.
- Woodruff TJ, Axelrad DA, Kyle AD, Nweke O, Miller GG, Hurley BJ. Trends in environmentally related childhood illnesses. *Pediatr* 2004; 113(4): 1133-40.
- Wright RO, Amarasiriwardena C, Woolf AD, Jim R, Bellinger DC. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *Neurotoxicology* 2006; 27(2): 210-6.
- Yang YG, Liu CQ, Zhang GP, Wu P, Zhu WH. Heavy metal accumulations in environmental media induced by lead and zinc mine development in northwestern Guizhou province, China. *Bull Mineral Petrol Geochem* 2003; 22: 305-9.
- Yasutake A, Matsumoto M, Yamaguchi M, Hachiya N. Current hair mercury levels in Japanese: survey in five districts. *Tohoku J Exp Med* 2003; 199(3): 161-9.

- Zhang L, Wang Q. Preliminary study on health risk from mercury exposure to residents of Wujiazhan town on the Di'er Songhua river, Northeast China. *Environ Geochem Health* 2006; 28: 67-71.
- Zhang L, Wong MH. Environmental mercury contamination in China: sources and impacts. *Environ Int* 2007; 33: 108-21.
- Zhang X, Yang L, Li Y, Li H, Wang W, Ye B. Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. *Environ Monit Assess* 2012; 184: 2261-73.
- Zhao YH, Lang PZ. Evaluation of the partitioning of hydrophobic pollutants between aquatic and solid phases in natural systems. *Sci Total Environ* 1996; 177(1-3): 1-7.
- Zhong K, Zhang JL. Sources and influencing factors of children blood lead in China. *J Environ Health* 2008; 25: 651-4.
- Zhou HY, Wong MH. Mercury accumulation in freshwater fish with emphasis on the dietary influence. *Water Res* 2000; 34: 4234-42.

