

*Estudio de la toxicidad del Arsénico,  
aguda y crónica, y de las formas de  
evaluación y control del mismo en población  
afectada.*

Tesina de Grado Fiorella laquinta

Tutora: Dra. Nelly Mañay.

Docente Colaborador: Prof. QF. Cristina Alvarez

Cátedra de Toxicología- Facultad de Química- UdelaR

2012.

**INTRODUCCIÓN:**

El Arsénico (As) es conocido en la historia por su relación a los homicidios y suicidios, ya que se utilizaba con esos fines por ser incoloro, sin olor ni gusto, causando una muerte lenta y dolorosa. Existen casos conocidos donde se ha utilizado el semimetal con esta finalidad [1]. No obstante los problemas de contaminación ambiental por Arsénico principalmente en agua de bebida se han tornado de gran interés como problema de salud ambiental así como la exposición de trabajadores a esta sustancia tóxica [2].

**OBJETIVO GENERAL:**

El objetivo general de la Tesina de Graduación consiste en el estudio teórico de la toxicidad del Arsénico, aguda y crónica, y de sus formas de evaluación y control del mismo en población afectada con un trabajo experimental asociado.

Para facilitar el estudio, el trabajo fue dividido en antecedentes teóricos y trabajo experimental; y se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Antecedentes teóricos- Relevamiento bibliográfico de la toxicidad del Arsénico, aguda y crónica y de sus formas de evaluación en la población.
- Trabajo experimental
  - Estudio preliminar de población no expuesta laboralmente al Arsénico mediante análisis de Arsénico en orina.
  - Influencia de las distintas variables, frecuencia de consumo de pescado y mariscos, edad y sexo, en la cantidad de analito en la población de estudio.

***ANTECEDENTES TEÓRICOS***

El Arsénico es un semimetal, con cuatro estados de oxidación, +5, +3, -3 y 0; los cuales dependen del medio donde se encuentra. Los compuestos de Arsénico presentan diferentes grados de toxicidad, dependiendo de la especie química. Si bien el semimetal se encuentra en todas estas especies, el Arsénico inorgánico, es el considerado cancerígeno.

La toxicidad del Arsénico disminuye en función de las especies químicas, siendo aquellas inorgánicas más tóxicas que las orgánicas. Se ha establecido que los compuestos de As (+3) pueden resultar hasta 10 veces más tóxicos de los de As (+5) [1]. La Tabla 1 muestra la relación de dosis letal 50 para las diferentes especies químicas [2].

Tabla 1: DL<sub>50</sub> de los compuestos de As según sus diferentes especies químicas [2].

Especies Químicas de As	DL50 en ratas (mg/kg)
Arsina (AsH <sub>3</sub> )	3
Arsenito (As III)	14
Arsenate (As V)	20
Acido Monometilarsónico (MMA)	700 – 1800
Acido Dimetilarsínico (DMA)	700 – 2600
Arsenocolina	> 10000
Arsenobetaina	> 10000

Para el monitoreo ambiental y biológico se considera que es necesaria la especiación del As, para reconocer las especies presentes a los efectos de evaluar el riesgo tóxico. Por lo tanto la determinación de la concentración de las diferentes formas químicas de este elemento en una matriz determinada, constituyen la concentración total del elemento en la muestra que generalmente es la que se determina y compara con los niveles de referencia (Tablas 1 y 2).

El uso del Arsénico es muy variado, desde la preservación de la madera hasta herbicidas y también se han utilizado sus compuestos inorgánicos con fines curativos en homeopatía y medicamentos para el tratamiento del asma crónica y de la leucemia [3].

La distribución del Arsénico es muy amplia en la corteza terrestre, en la atmósfera y en el agua. Por lo tanto las fuentes de exposición son muy amplias pero la toxicidad va a depender de las especies presentes. Los alimentos representan una fuente importante de Arsénico, sobre todo los que provienen del mar. En los crustáceos, moluscos y peces de agua salada y algas marinas el Arsénico está ligado a las proteínas, pero después de la ingesta y la absorción, las cantidades de Arsénico inorgánico son mínimas, por eso la intoxicación a través de ellos es baja. Otra fuente de exposición es el tabaco, debido a que se lo trata con herbicidas que contienen el semimetal [4]. A pesar de que se prohibió la utilización de compuestos con Arsénico inorgánico como pesticida, se utilizan compuestos orgánicos del mismo como el ácido cacodílico, metilarsenato disodio (DSMA) y metilarsenato monosodio (MSMA). Esto compuestos también se usan en como aditivos en la alimentación de los animales [5]. No obstante, la principal fuente de exposición al Arsénico

inorgánico es el agua de bebida, debido a que lo contiene de forma natural gracias a su origen geológico, los cuales pueden ser: superficial, de lluvia, o subterránea, en donde las concentraciones del semimetal son muy variables dependiendo de su origen.

La mayor concentración se ha encontrado en aguas subterráneas, a causa de los procesos de interacción natural roca- agua [6].

Algunos países sudamericanos como Argentina, Brasil y Chile, son conocidos mundialmente como consumidores de agua de bebida contaminada, pero hay países como Uruguay donde no se ha evaluado aún este problema [7.8].

El metabolismo del Arsénico no es completamente conocido. Una vez ingerido, las formas solubles del Arsénico inorgánico son absorbidas por el tracto gastrointestinal y luego de absorbidos los compuestos son distribuidos a los órganos y tejidos del cuerpo. En las células hepáticas se da un proceso de metilación con la producción de dos metabolitos, ácido metilarsónico (AMMA) y ácido dimetilarsónico (ADMA), como producto de detoxificación, facilitando su excreción por la orina [1].

En el agua de bebida, el Arsénico se encuentra en forma de arseniato, siendo fácilmente absorbido por el tracto gastrointestinal [9]. Una vez ingerido, es absorbido el Arsénico inorgánico es distribuido por los tejidos y eliminado en la orina, de la forma antes mencionada. Si la ingesta del semimetal es mayor a su excreción, el mismo se acumula en cabello y uñas.

Algunos de los efectos del Arsénico son la inhibición de la respiración celular, alteraciones en la expresión génica de proteínas e inactivación de las mismas y de enzimas, gracias a su afinidad por los grupos sulfhidrilo (SH). También se puede suponer que el Arsénico sea un co-cancerígeno, o un promotor de tumores, en vez de un iniciador, pudiendo afectar la expresión de genes que controlan la proliferación celular [1].

Los efectos de la exposición crónica al Arsénico [10,11,12,13,14], que pueden estar relacionados con la ingesta de agua, entre otros, e incluyen, entre otros cáncer de piel, pulmón, vejiga y riñón, así como también produce cambios en la pigmentación y grosor de la piel. Se pueden resumir en los siguientes puntos:

- La intoxicación crónica por agua de bebida, produce cáncer de piel, pulmón, vejiga y riñón, así como también produce cambios en la pigmentación y grosor de la piel.
- El consumo de agua con Arsénico incrementa el riesgo de padecer cáncer de pulmón o vejiga, y lesiones en la piel, siendo éstas últimas el primer síntoma de exposición crónica, mientras que el cáncer puede tardar años en aparecer.
- No es muy clara la correlación entre la exposición y los efectos en la salud. Se pueden presentar diferentes síntomas, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, diabetes, incluso efectos en la reproducción, todos ellos asociados a la exposición crónica del Arsénico.

- La enfermedad conocida como “pie negro”, es propia de la exposición crónica del Arsénico, mediante al agua de bebida. Esta enfermedad afecta el sistema circulatorio, derivando en gangrena. También se han encontrado formas leves de enfermedades vasculares, relacionadas con la exposición crónica del Arsénico.
- Los signos y síntomas son distintos entre los individuos y las áreas geográficas, por lo tanto, no existe una descripción universal, de las enfermedades causadas por el Arsénico. Este hecho es un problema al ponderar la influencia del Arsénico en la salud. De la misma forma, no existe un método que permita distinguir entre un cáncer causado por la exposición crónica al Arsénico, de otros tipos de cáncer.
- Los signos y síntomas de la intoxicación crónica por agua de bebida y la intoxicación aguda no sólo son distintos, sino que también la terapia de quelación indicada es diferente.

A los efectos de su control y seguimiento clínico, se recomienda la dosificación del Arsénico en orina y en cabello, ya que su seguimiento a través de la sangre, la cantidad medida se refiere a la exposición en las últimas horas, y no es un buen biomarcador para bajas concentraciones de exposición [1].

Los valores de referencia de Arsénico total en orina para la población no expuesta, varían según el país (Tabla 2), al igual que los valores aceptados en aire de ambientes laborales para la población laboralmente expuesta (Tabla 3).

En Uruguay no existen antecedentes de estudios sistemáticos de Arsénico en poblaciones en general, pero se realiza el control biológico en trabajadores de acuerdo a la legislación vigente [15]. La misma establece que el límite de tolerancia a la exposición al semimetal y sus compuestos, en orina, debe ser menor a  $35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Tabla 2. Valores de referencia para Arsénico Total en orina de población no expuesta [1].**

Lugar	As ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Reino Unido	3,65
Italia	$16,7 \pm 1,9$
Alemania	$10,53 \pm 16,76$
Uruguay	0 – 20*

(\*) En nuestro país el valor de referencia es el citado en ATSDR [5].

**Tabla 3. Límites de tolerancia en aire de exposición al Arsénico y sus compuestos, de Brasil y Estados Unidos [1].**

País	Descripción	Límite ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
------	-------------	--

EUA	TLV-TWA (Arsénico elemental y compuestos inorgánicos)	0,01
EUA	REL (Compuestos orgánicos)	0,002
EUA	TWA (8h, compuestos orgánicos)	0,5
EUA	TWA (8h, compuestos inorgánicos)	10
EUA	TWA (8h, trabajadores de la construcción, compuestos orgánicos)	0,5
EUA	TWA (8h, trabajadores de astilleros, compuestos orgánicos)	0,5
Brasil	LT (hasta 48h/sem), arsenamina	0,04 y 0,16

En la presente tesina, como trabajo experimental, se inicio un estudio preliminar de población no expuesta laboralmente al Arsénico mediante análisis de Arsénico en orina.

### **TRABAJO EXPERIMENTAL**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

Para este estudio preliminar fui capacitada y entrenada para utilizar la metodología de muestreo y analítica para Arsénico en orina desarrollada para análisis de rutina en el CEQUIMTOX (Centro Especializado en Química Toxicológica) que es el laboratorio de la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Química.

#### **Población y Muestreo.**

##### ***Estudio preliminar de población no expuesta.***

La población de estudio fueron docentes y estudiantes voluntarios de entre 18 y 52 años, vinculados a la Facultad de Química- UdelaR. Las variables a considerar fueron en base a los parámetros que pueden influir en los niveles de Arsénico (Tabla 4).

**Tabla 4. Distribución de las variables elegidas para el estudio preliminar de población no expuesta laboralmente al Arsénico, basado en un n=36.**

Sexo	Edad	Contacto con As	Consumo de agua por día	Consumo de pescado/mariscos al mes*	Fuma	Trisenox**	Homeopatía

	F	M	≤22	>22	Si	No	≤1L	>1L	≤0,25	>0,25	Si	No	Si	No	Si	No
n=	20	16	22	14	2	34	3	33	16	20	2	34	0	36	3	33

(\*) El consumo de pescado/mariscos al mes está dado en frecuencias, donde 0,25 corresponde al consumo de una vez al mes. (\*\*) Trisenox es un medicamento utilizado para el tratamiento de la leucemia.

Para realizar el estudio se pidió autorización al Comité de Ética, perteneciente a la Facultad de Química (Ver Anexo) en el marco de un proyecto de trabajo: Evaluación de Niveles de Referencia de Arsénico en Orina de la población no ocupacionalmente expuesta para llevar a cabo los objetivos específicos del trabajo experimental de esta tesina.

Los voluntarios reclutados para el estudio, firmaron su consentimiento y fueron entrevistados por la suscrita supervisada por la profesora QF. Cristina Álvarez de la Cátedra de Toxicología y luego entregaron la muestra de orina según protocolo en la Cátedra de Toxicología (Ver Anexo).

### **Conservación de la muestra.**

La muestra se mantuvo congelada a  $-23^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis.

### **Metodología Analítica.**

El método de análisis es la absorción atómica por generador de hidruros. El mismo, a diferencia de otros métodos de análisis, no es influenciado por la arsenobetaína, la cual es la principal forma de expresión del Arsénico en los peces y moluscos. Es muy difícil la transformación a su fase inorgánica, por lo que al utilizar este método, la misma no interviene [16]. La técnica utilizada en la Cátedra como metodología de rutina es una adaptación de la usada para la cuantificación de Arsénico en el agua [17].

### **Absorción atómica por generador de hidruros**

La absorción atómica es un tipo de espectroscopía basada en la atomización del compuesto de interés, es decir, que para la determinación cualitativa y cuantitativa de uno o varios elementos de la muestra, es necesario convertir los componentes de la misma en átomos o iones gaseosos. A este proceso se le llama atomización. Una de las formas de llevar a cabo este proceso, es la atomización por llama (técnica usada en este estudio), en donde una disolución de la muestra se pulveriza en una llama mediante un nebulizador, el cual transforma la disolución en pequeñas gotas de aerosol, donde están los átomos o iones de interés. La técnica de generación de hidruros proporciona un método para la introducción de Arsénico y otros semimetales, como gases en un atomizador, permitiendo la determinación de algunos elementos a bajos niveles de concentración [18]. Para esto, el  $\text{As}^{+3}$  es transformado en arsina ( $\text{AsH}_3$ ) utilizando borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) en medio ácido. Esta sustancia, gaseosa, es arrastrada por una corriente de nitrógeno hasta la llama, donde es atomizada.

La absorción del Arsénico se da cuando éste se encuentra de forma inorgánica, y en estado de oxidación +3. Dado que en la muestra de orina, el Arsénico se puede encontrar tanto de forma orgánica como inorgánica y en sus dos estados de oxidación (+3 y +5), la misma es sometida a una etapa previa de digestión que tiene como objetivo la eliminación de la materia orgánica y posteriormente una etapa de reducción para llevar todo el Arsénico un mismo estado de oxidación ( $\text{As}^{+3}$ ). En estas condiciones se procede a cuantificar al analito.

Para la verificación del procedimiento y el equipo, se analizaron algunas muestras por duplicado, y otras cargadas con  $6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de Arsénico a partir de la solución estándar de  $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , elegidas al azar. Ambos procedimientos tienen que ser coherentes en sus resultados.

### **Materiales y Equipos.**

- Equipo de Absorción Atómica Varian - Spectr AA 55B
- Nitrógeno
- Lámpara de cátodo hueco de Arsénico
- Tubo atomizador de cuarzo
- Estándar de Arsénico  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Solución de HCl 5N: En un matraz erlenmeyer de 250 mL colocar aproximadamente 30 mL de agua destilada, luego agregar lentamente 40 mL de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a 100 mL con agua destilada.
- Solución de NaOH 0,5%: Disolver 0,5 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua destilada
- Solución de Borohidruro de Sodio 0,6%: Disolver 0,6 g de borohidruro de sodio en 100 mL de NaOH 0,5%. Preparar diariamente.
- Solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5N: En un matraz erlenmeyer de 250 mL colocar aproximadamente 30 mL de agua, luego agregar muy lentamente 7 mL de ácido sulfúrico. Esperar a que enfríe y llevar a 100 con agua destilada.
- Solución de Persulfato de Potasio 5%: Disolver 5 g de persulfato de potasio en 100 mL de agua destilada.
- Solución de HCl 1.5%: Diluir 15 mL de ácido clorhídrico en 985 mL de agua destilada.
- Solución de NaI 20%: Disolver 20 g de ioduro de sodio en 100 mL de agua. Puede utilizarse KI a una concentración de 22% (m/v).
- HCl concentrado (12M)



- Octanol
- Pipetas automáticas de 10 a 100  $\mu\text{L}$ , 100 a 200  $\mu\text{L}$ , 200 a 1000  $\mu\text{L}$ .
- Tips descartables para las pipetas automáticas
- Programa estadístico R 2.12.2

#### Preparación del estándar de 300 ppb:

A partir del estándar de Arsénico de 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  preparar una solución de 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Solución intermedia) tomando de 0,5 mL de estándar de 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y llevando a 25,00 mL con HCl 1,5 %.

Tomar 0,375 mL de la solución intermedia y llevar a 25,00 mL con HCl 1,5 %. Esta solución final tendrá una concentración de 300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### Procedimiento.

##### Condiciones instrumentales:

- Longitud de Onda: 193.7 nm
- Ganancia: < 35%
- Ancho de rendija: 0.7 nm
- Gas portador: Nitrógeno
- Corrección de Fondo: Lámpara de Deuterio
- Tiempo de Integración: 10 segundos.

##### Curva de calibración:

Para la curva de calibración se toman 10 mL de muestra de orina de un adulto no expuesto ocupacionalmente al Arsénico, se transfieren a un matraz erlenmeyer y se agregan 0, 0,20 y 0,40 mL de solución final de Arsénico. Las concentraciones obtenidas serán de 0, 6, 12  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente.

Luego de agregado el estándar, se realiza la técnica como con las demás muestras.

##### Verificación del procedimiento y del equipo:

Previamente se debe elegir al azar cuales muestras serán cargadas con 6 ppb de Arsénico, y cuales se harán por duplicado. Para cargar la muestra con 6 ppb, se agregan 0,20 mL de solución final de Arsénico a 10 mL de muestra.

Luego de agregado el estándar, se realiza la técnica como con las demás muestras.

#### Digestión:

- 1.- Llevar la muestra a temperatura ambiente.
- 2.- Tomar 10 mL de la muestra y colocarlos en un matraz erlenmeyer.
- 3.- Agregar 10 mL de agua destilada.
- 4.- Agregar 0,6 mL de ácido sulfúrico 2,5 N, y 1,2 mL de persulfato de potasio.
- 5.- Calentar las muestras en una plancha calefactora a ebullición lenta, hasta que el volumen se reduzca a 10 ml aproximadamente, y dejar enfriar.

#### Reducción:

- 6.- Llevar a 20 mL con agua destilada.
- 7.- Agregar 2 mL de ácido clorhídrico concentrado (12 M) y 2 mL de ioduro de sodio 20%. Homogeneizar y dejar reposar durante 30 minutos.
- 8.- Trasvasar la muestra a un tubo de 10 mL, agregar 3 gotas de octanol y agitar.
- 9.- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3500 rpm.

#### Manejo del Equipo:

- Abrir la válvula del cilindro de nitrógeno. La presión debe ser de 50 psi.
- Abrir la válvula del cilindro de acetileno. La presión debe ser de 15 psi.
- Encender el extractor.
- Encender el compresor de aire.
- Colocar la lámpara de Arsénico.
- Encender el equipo.
- Encender la lámpara y dejar estabilizar durante 15 min. Luego alinear.
- Colocar la celda y alinearla.
- Encender la llama.
- Ajustar los tubos de bomba verificando que queden correctamente puestos. No modificar la presión a menos que sea necesario.

- Medir la curva de calibración y las muestras por triplicado, haciendo circular agua destilada por el sistema entre cada medida para evitar la formación de espuma en el separador.
- Al finalizar, cortar el flujo de nitrógeno.
- Apagar la llama.
- Hacer circular agua por el sistema durante 5 minutos.
- Apagar la bomba y liberar los tubos.
- Apagar el compresor y cerrar los cilindros.
- Apagar el equipo.
- Retirar la celda.

Antes de comenzar la medida de las muestras como la de la curva, se debe verificar que la absorbancia de una solución de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  sea mayor a 0,045.

### **Cálculos.**

La curva de calibración se realiza graficando la absorbancia promedio de los puntos de la curva, menos el promedio de la absorbancia del blanco en función de la concentración de Arsénico en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Luego se calcula la pendiente y la ordenada según el método de mínimos cuadrados. Para que la curva de calibración sea aceptable el R debe ser mayor a 0.995.

Una vez obtenida la ecuación de la curva se calcula la concentración de Arsénico de cada muestra, según la ecuación:

Absorbancia = (pendiente. [Concentración de As]) + ordenada en el origen

### ***Influencia de distintos factores que pueden afectar la concentración del analito.***

Con este objetivo se realizó un estudio estadístico, para el cual se utilizó el programa R 2.12.2, donde se toman como variables de fuente de Arsénico el sexo, la edad y la frecuencia con la cual se come pescado y mariscos durante la semana (mayor a 0,25 veces por semana, lo que implica una vez al mes, y menor o igual). El error aceptado será de  $\alpha < 0.05$ .

La razón por la que se eligieron estos criterios es porque de todos los datos éstos eran los más homogéneos y más prácticos de usar. La elección de la división de la frecuencia con que se come pescado y mariscos era para hacer al estudio lo más equitativo posible, es decir que hubiera aproximadamente la misma cantidad de personas en ambos grupos.

**RESULTADOS:**

Previo a la obtención de los resultados de la cuantificación, se realizó una base de datos con la información obtenida en la encuesta. Finalmente se completó la base de datos con los resultados obtenidos de la cuantificación.

***Estudio preliminar de niveles de As en orina de población no expuesta al laboralmente al Arsénico.***

Con los valores de concentración de analito obtenidos, se estimaron los niveles normales de Arsénico de la población estudiada. En los resultados obtenidos no se encontró diferencia entre las personas no expuestas y los 2 individuos que manifestaron que podían estar en contacto laboralmente al Arsénico, por lo que para esta etapa del estudio, se utilizó toda la población reclutada con un total de 36 personas.

Por lo tanto la población estudiada fue un total de 36 adultos, entre 18 y 57 años. Como resultado se obtuvo una media geométrica de  $4,96 \pm 1,78 \mu\text{g.L}^{-1}$ , con un rango de valores entre  $11,21 \mu\text{g.L}^{-1}$  y  $2,67 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

***Influencia de las variables seleccionadas en la concentración de Arsénico.***

En esta etapa se intentó evidenciar la influencia del sexo, edad y frecuencia con la cual se consume pescado y mariscos por semana, sobre la cantidad de Arsénico cuantificada, para lo cual se utilizó el programa estadístico R 2.12.2. La frecuencia fue ingresada como factor, considerando dos categorías: mayores a 0,25, es decir más de una vez al mes ( $n=21$ ), y menores e iguales a 0,25 ( $n=16$ ). Se llevó a cabo un modelo lineal generalizado, equivalente a un ANCOVA, (análisis de covarianza) en el cual la cantidad de Arsénico fue ingresada como variable de respuesta y las restantes tres como variables explicativas (Fig. 1). Este análisis permite ver como varía una variable de respuesta continua en función de otras variables que incluyen tanto continuas como factores.

Primeramente se contempló en el modelo tanto la influencia de las tres variables por separado sobre la cantidad de Arsénico, así como las interacciones entre ellas. Por ejemplo, de qué forma influía la interacción entre la edad y el sexo sobre la cantidad de Arsénico cuantificada.

```

Call:
glm(formula = conc ~ sexo * frec * edad, data = datos)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.4600 -1.0665 -0.1811  0.6140  4.7550

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  5.44208    1.68032   3.239  0.00309 **
sexoM        3.04699    2.45784   1.240  0.22538
frecB        1.72411    2.24774   0.767  0.44947
edad       -0.02646    0.06683  -0.396  0.69510
sexoM:frecB -3.65004    3.74575  -0.974  0.33818
sexoM:edad  -0.08654    0.09377  -0.923  0.36396
frecB:edad  -0.03331    0.08218  -0.405  0.68827
sexoM:frecB:edad 0.08765    0.14049   0.624  0.53778
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 3.228352)

    Null deviance: 110.605  on 35  degrees of freedom
Residual deviance:  90.394  on 28  degrees of freedom
AIC: 153.31

Number of Fisher Scoring iterations: 2

```

Figura 1. Resultados del modelo que contempla tanto la acción independiente de las variables explicativas como sus interacciones. SexoM: masculino; frecB: frecuencia que se consume pescado y mariscos menor o igual a 0,25. Sexo femenino y frecuencia mayor a 0,25 son tomadas por defecto como referencia por el programa para el cálculo de los restantes parámetros, por lo tanto, están contempladas en el intercepto (Intercept).

Los resultados muestran que las interacciones entre los factores, incluso la combinación de los tres, no influyen en la cantidad de analito ( $P > 0.05$ ).

Luego se consideró solo la influencia de cada factor por separado, sobre la cantidad de analito (Fig. 2).

```

Call:
glm(formula = conc ~ sexo + frec + edad, data = datos)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.6989 -1.1916 -0.1657  0.5629  5.5559

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  6.50075    0.88280   7.364 2.25e-08 ***
sexoM        0.22563    0.59032   0.382  0.7048
frecB        0.25945    0.59335   0.437  0.6649
edad       -0.05957    0.03043  -1.957  0.0591 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 3.062962)

Null deviance: 110.605  on 35  degrees of freedom
Residual deviance:  98.015  on 32  degrees of freedom
AIC: 148.22

Number of Fisher Scoring iterations: 2

```

Figura 2. Resultados del modelo que contempla la acción independiente de las variables explicativas por separado. SexoM: masculino; frecB: frecuencia que se consume pescado y mariscos menor o igual a 0,25.

El resultado fue que la influencia de la edad sobre la cantidad de Arsénico es marginalmente significativa ( $P=0.0591$ ), mientras que los otros dos factores no influirían sobre la variable de respuesta.

A continuación, se llevó a cabo el análisis de residuos de este último modelo. El mismo indicó que los datos son heterogéneos en cuanto a la varianza. Con el fin de hacerlos más homogéneos fueron transformados a logaritmo. Finalmente se probó un modelo que incluye como única variable explicativa a la edad (Fig. 3).

```

Call:
glm(formula = log(conc) ~ log(edad), data = datos2)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.69787 -0.16881 -0.00416  0.12215  0.71900

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  2.6523     0.5196   5.105 1.26e-05 ***
log(edad)   -0.3302     0.1625  -2.033  0.05 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 0.08492058)

    Null deviance: 3.2382  on 35  degrees of freedom
Residual deviance: 2.8873  on 34  degrees of freedom
AIC: 17.328

Number of Fisher Scoring iterations: 2

```

Figura 3. Resultados del modelo que tiene como variable de respuesta el logaritmo de la concentración y el logaritmo de la edad como variable explicativa.

En este modelo la edad influye de forma significativa sobre la concentración de Arsénico ( $P=0,05$ ).

Posteriormente se llevó a cabo el análisis gráfico de los residuos (Fig. 4).

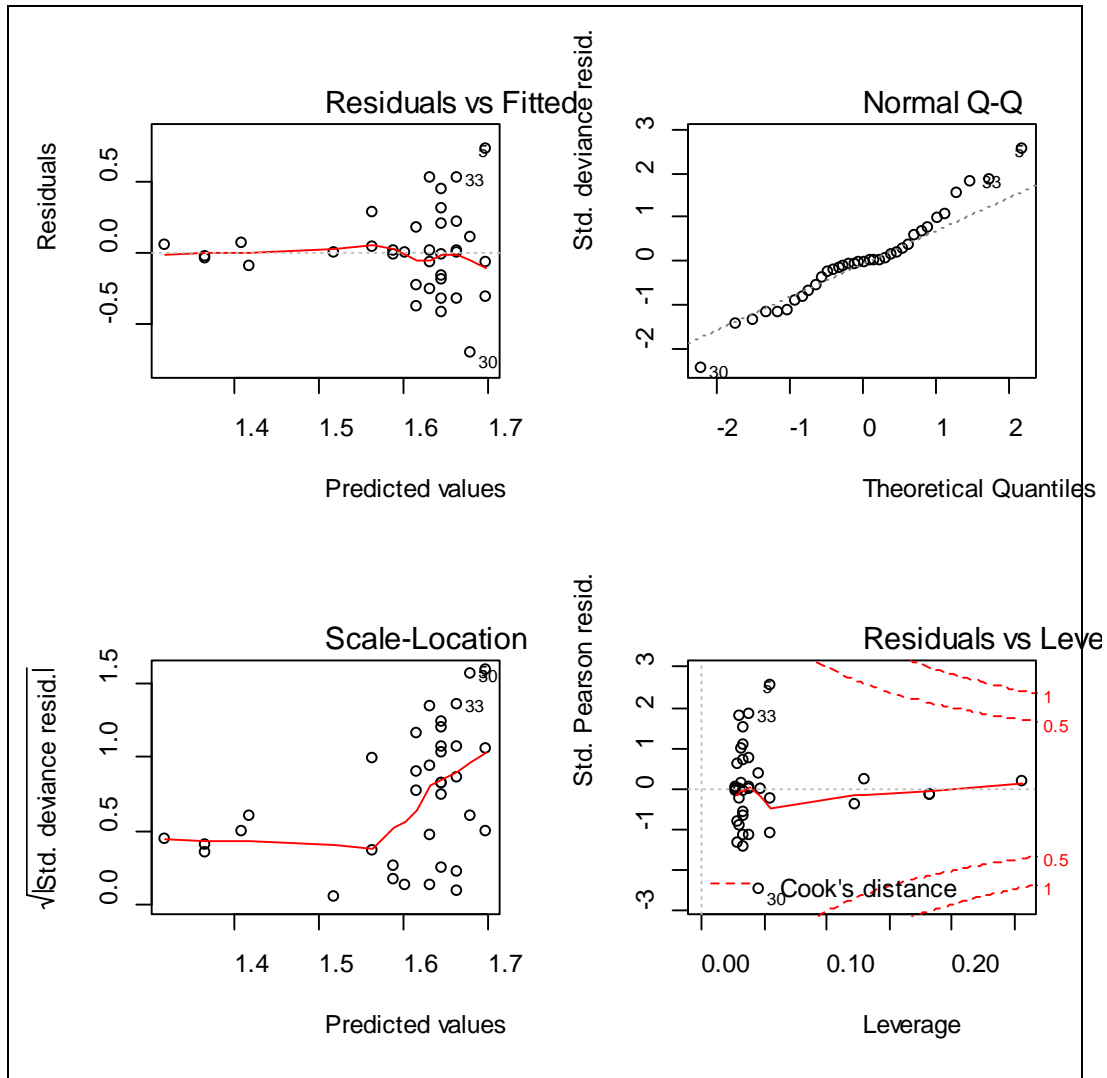


Figura 4. Análisis gráfico de los residuos del modelo que tiene como variable de respuesta el logaritmo de la concentración de Arsénico y como variable explicativa el logaritmo de la edad.

Mediante la transformación logarítmica se logró minimizar la heterogeneidad de los datos. En el primer gráfico no se observa una tendencia residual de los datos pero en el tercero sí. Además, el segundo gráfico (Q-Q plot) indica que los datos no ajustan correctamente a una distribución normal.

#### **DISCUSIÓN:**

Los valores “normales” obtenidos de la población no expuesta laboralmente al Arsénico,  $4,96 \pm 1,78\mu\text{g.L}^{-1}$ , están dentro de los valores esperados (Tabla 2).

En cuanto a la influencia en la cantidad de Arsénico de las variables estudiadas, los resultados muestran que la única variable que puede afectar la concentración final del semimetalo, es la edad. El hecho de que los residuos del modelo final (Figura 4) no se ajusten perfectamente a una



distribución normal no tendría mayor importancia, ya que análisis como el aquí realizado son muy robustos a desviaciones de dicha distribución. Sin embargo, el problema de las tendencias residuales sí es importante. Debe considerarse que la base de datos para el análisis contenía un n de 36, lo cual es extremadamente bajo para sacar conclusiones definitivas. Si bien no es posible conocer cuál sería el n más apropiado para evidenciar la verdadera relación entre las variables aquí consideradas, se podría repetir el estudio considerando un mayor número de muestras. También es de recordar que al ser el área de estudio la Facultad de Química, la mayoría de los voluntarios tenían entre 20 y 25 años, es decir que en el estudio no hay una amplia heterogeneidad en cuanto a la edad, sino que mayoritariamente se concentró en ese rango. Para establecer la relación entre la edad y la concentración de Arsénico encontrada, es conveniente obtener muestras de población más heterogéneas en cuanto a esa variable. De hecho algunos estudios indican que la edad no influye en relación a la cantidad de Arsénico encontrada, ya sea evaluando sus metabolitos [19], o estudiándolo también como variable [12]. Si bien en nuestro estudio la edad fue estadísticamente significativa, el valor obtenido fue de  $P=0,05$ , lo que es exactamente el valor fijado como máximo error tolerado, por lo que la relación encontrada, se está en el límite de error establecido.

### **CONCLUSIONES:**

Los niveles de Arsénico obtenidos para población no expuesta laboralmente son aceptables de acuerdo a los valores de referencia citados.

Con respecto a la influencia de variables en la cuantificación final del semimetal, si bien la edad en este trabajo es estadísticamente significativa, es necesario realizar más estudios de mayor tamaño de muestra, y más heterogéneos, con lo que respecta a la edad, para poder establecer una relación.

Asimismo, el consumo de pescado y mariscos en la población estudiada no es altamente significativo con relación a la frecuencia de consumo mensual que se observa en otros estudios.

No obstante, la importancia de estos resultados, radica en que este ha sido el primer estudio sistemático en población adulta no expuesta laboralmente en Uruguay, que podrá servir como base para generar estudios posteriores con un diseño estadístico representativo de la población con más variables de inclusión y exclusión.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.- De Azevedo F. A., Da Matta Chasin A. A. Metais gerenciamento da toxicidade. Editorial Atheneu, San Pablo, Brasil, 2003. Cap. 8, p. 203-238.
- 2.- Mañay N., Rojas Martini M. Toxicología ambiental y ocupacional. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela, 2011. Cap. 11, p. 279-298.

- 3.- Soignet, S. L.; Frankel, S. R.; Douer, D. et al (2001). United States Multicenter Study of Arsenic Trioxide in Relapsed Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 19, No.18, p. 3852-3860.
- 4.- WHO (2010) Preventing disease through healthy environments. Exposure to arsenic: a major public health concern.
- 5.- ATSDR (2007) As Toxicological Profile in: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>
- 6.- Mañay N. (2008). Importancia de las especies de semimetales y semimetaloides en el estudio de la toxicidad ambiental: desarrollo de metodología de especiación analítica de Arsénico ambiental y biológico. Proyecto CSIC 2008.
- 7.- Guerequiz, R.; Mañay, N.; Goso, C.; Bundschuh, J. (2007). Estudio preliminar de la hidrogeoquímica de semimetales tóxicos en aguas subterráneas de Uruguay: riesgo ambiental por presencia de Arsénico en el Acuífero Raigón, Departamento de San José-Uruguay. XI Congreso Brasileiro de Geoquímica 21-26 de octubre 2007.
- 8.- Guerequiz, R.; Mañay N.; Goso, C.; Bundschuh, J. (2006). Assessment of the environmental risk caused by the presence of arsenic in the western area of the Raigón aquifer, department of San José, Uruguay. Project presentation. Taller de distribución del Arsénico en Iberoamérica. RED Temática 406RT282 IBEROARSEN. 27 al 30 de noviembre de 2006. Centro Atómico Constituyentes, Buenos aires, Argentina.
- 9.- Frederick, P.; Kenneth, B; Chien-Jen (1994). Health implications of arsenic in drinking water. *Journal AWWA* 86(9):52-63.
- 10.- WHO (2001) Arsenic in drinking water. World Health Organization Fact Sheet No. 210 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en>.
- 11.- WHO-IPCS (2001) Environmental Health Criteria 224 Arsenic and Arsenic Compounds World Organisation. International Program of Chemical Safety WHO Library Cataloguing in Publication Data <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>
- 12.- ATSDR (2007) As Toxicological Profile in: <http://www.atsdr.cdc.gov>
- 13.- Mumford, J. L.; Kegong, W.; Xia, Y.; Kwok, R.; Yang, Z.; Foster, J.; Sanders, W. E. (2007). Chronic Arsenic Exposure and Cardiac Repolarization Abnormalities with QT Interval Prolongation in a Population-based Study. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 115, No. 5, p. 690:694.
- 14.- Guha Mazumder, D. N.; Haque, R.; Ghosh, N.; De, B. K.; Santra, A.; Chakraborty, D.; Smith A. H. (1998). Arsenic levels in drinking water and the prevalence of skin lesions in West Bengal India. *International Journal of Epidemiology*. No. 27, p. 871:877.
- 15.- Ordenanza Ministerio de Salud Pública 145/2009.

- 16.- Vahter M. (1994). What are the Chemical Forms of Arsenic in Urine, and What Can They Tell Us About Exposure?. *Clinical Chemistry*. Vol. 40, No. 5, p. 679-680.
- 17.- Farson M. A. H et al. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20<sup>th</sup> edición. Editorial American Publish Association, 1998. Cap. 3114, p. 3-32:3-37
- 18.- Skoog, Leary. *Análisis Instrumental*. 4<sup>ta</sup> edición. Editorial Mac Graw Hill, Madrid, España, 1994. Cap. 10.
- 19.- Hopenhayn-Rich, C.; Biggs, M.L.; Smith, A. H.; Kalman, D. A.; Moore, L. E. (1996). Methylation Study of a Population Environmentally Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 104, No. 6, p. 620:628.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO.

Montevideo, Fecha.....

Yo, Sr/Sra.....Cl.....  
(nombre y apellidos escritos por el participante del estudio)

Doy mi pleno consentimiento, de manera libre, para participar en el proyecto de investigación **“Evaluación de Niveles de Referencia de Arsénico en Orina de la población no ocupacionalmente expuesta”**, a cargo de la Prof. Dra Nelly Mañay (Cátedra de Toxicología e Higiene Ambiental de la Facultad de Química habiendo sido informado/a de los alcances del mismo.

He sido invitado/a a participar y se me realizará una encuesta por parte de integrantes del equipo investigador.

He comprendido que la investigación es una contribución para conocer y generar el conocimiento sobre los niveles de este tóxico ambiental y entiendo que los datos serán tratados en forma estadística, por lo que se mantendrá mi identidad en forma confidencial.

Estoy de acuerdo en que se tomen registros de mis datos para ser utilizados en dicha investigación y en suministrar una muestra de orina, según instructivo, para que se realicen los estudios de laboratorio.

Doy mi permiso para que los registros sean utilizados por el equipo de investigación para generar publicaciones y recomendaciones específicas de salud, entendiendo que la información que pudiera identificarme será utilizada en forma confidencial y se eliminará, al terminar el estudio.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He comprendido que este trabajo es una contribución a la ciencia y a la mejora de las condiciones de salud ambiental en Uruguay.

Comprendo que mi participación es voluntaria y gratuita, y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio. Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier fase del procedimiento.

Nombre y Apellidos (*participante*).....

Firma del participante.....

Confirmando que he explicado al participante el carácter y el propósito del proyecto de investigación.

Nombre y Apellido (*encuestador*).....

Firma (*encuestador*).....

Entrega muestra SI / NO Fecha.....

Firma del investigador principal .....

Prof. Dra. Nelly Mañay

**Encuesta - Cuestionario:**                      **Código Participante:** \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Apellido: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Domicilio \_\_\_\_\_ Barrio \_\_\_\_\_

E-Mail: \_\_\_\_\_ Teléfono/ Cel \_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_

¿En qué consiste su trabajo? \_\_\_\_\_ ¿está en contacto con As? \_S/N\_

Donde Ud. vive, ¿hay alguna fábrica próxima? \_S/N\_ \_\_\_\_\_

¿cuál (es)? \_\_\_\_\_

¿Hay tránsito pesado?    Bajo / Medio / Alto

¿Cómo consume el agua? Embotellada                      S /N

Água de Grifo OSE    S /N

Água de Grifo POZO S /N

Otros ¿cuál? \_\_\_\_\_

¿Cuánta agua consume por día incluyendo en el mate, sopa, etc?  $\geq 1L$  > /  $\leq 1L$  >

¿Consume pescado? \_S/N\_ ¿cuántas veces por semana? \_\_\_\_\_

¿Fuma? \_S/N\_      ¿cuántos cigarros por día? \_\_\_\_\_

¿Alguien de su familia fuma en su hogar? \_S/N\_      ¿Cuántos integrantes? \_\_\_\_\_

¿Fuman en el interior del domicilio? \_\_\_\_\_ S/N \_\_\_\_\_

¿En algún momento ha recibido la medicación Trisenox? \_S/N\_ ¿Cuándo? \_\_\_\_\_

¿Toma Homeopatía? \_\_\_\_\_ S/N \_\_\_\_\_      ¿Cuál? \_\_\_\_\_

Fecha recepción muestra orina -----

Observaciones:

**Proyecto: Evaluación de niveles de Referencia de Arsénico en Orina de la población no ocupacionalmente expuesta. Estudio preliminar.**

Instructivo para la recolección de muestra de orina

- Agradecemos su participación en este estudio. Ud va a recoger la primera orina de la mañana por ser la más concentrada.
- Se le entrega un envase limpio y estéril con su identificación. Manténgalo cerrado hasta coleccionar la muestra.
- Deje caer el primer chorro de la micción en el inodoro, coleccionar la orina del chorro del medio y retirar el envase sin tocar la boca de este, para terminar de orinar en el inodoro.
- Entregar la muestra en el Laboratorio. De no entregarla enseguida debe mantener la orina refrigerada para evitar su descomposición.

## INFORMACION DE REFERENCIA PARA EL PARTICIPANTE

Adaptado del documento: ATSDR : As ToxFAQ, 2007 (<http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts2.pdf>)

*Esta hoja informativa contesta las preguntas más frecuentes acerca del arsénico y sus efectos. Es importante que usted entienda esta información ya que esta sustancia puede ser perjudicial para la salud. Los efectos de la exposición a cualquier sustancia tóxica dependen de la dosis, la duración, la manera como usted está expuesto, sus hábitos y características personales y de la presencia de otras sustancias químicas.*

**Importante:** La exposición a niveles de arsénico más altos que lo normal ocurre principalmente en lugares de trabajo, cerca de sitios de desechos peligrosos o en áreas con niveles de arsénico ambiental naturalmente elevados.

### Arsénico

El arsénico es un elemento natural ampliamente distribuido en la corteza terrestre. Los compuestos inorgánicos de arsénico se usan principalmente para preservar la madera (CCA), mientras que los compuestos orgánicos se han usado como plaguicidas.

### Arsénico y medio ambiente

El arsénico ocurre naturalmente en la corteza terrestre. Por lo tanto, puede ingresar al aire, agua y a suelos mediante el polvo que levanta el viento o puede contaminar el agua de bebida mediante efluentes de lluvias, en aguas que se filtran a través del suelo o en el agua subterránea por la presencia de minerales de arsénico.

El arsénico no puede ser destruido en el ambiente. Solamente puede cambiar de forma. Muchos compuestos comunes de arsénico pueden disolverse en agua. La mayor parte del arsénico en el agua terminará eventualmente en el suelo o en el sedimento.

Los peces y mariscos pueden acumular arsénico; la mayor parte de este arsénico está en una forma orgánica llamada arsenobetaína, que es mucho menos peligrosa.

### Exposición al arsénico

- Se pueden ingerir pequeñas cantidades de arsénico presentes en los alimentos y el agua o respirando aire que contiene arsénico.
- Inhalando aserrín o quemando madera que ha sido tratada con arsénico.
- Viviendo en áreas con niveles naturalmente altos de arsénico en las rocas y en el agua subterránea.
- Trabajando en una ocupación en la cual se produce o usa arsénico, por ejemplo tratamiento de madera o aplicación de plaguicidas.

### La salud y el arsénico

#### Arsénico y cáncer

Varios estudios han demostrado que la ingestión de arsénico inorgánico puede aumentar el riesgo de cáncer de la piel y del hígado, la vejiga y los pulmones. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que el arsénico inorgánico es carcinogénico en seres humanos.

#### Examen médico de exposición al arsénico

Existen pruebas para medir la cantidad de arsénico en la sangre, la orina, el cabello y las uñas. La prueba de orina es la más confiable para determinar exposición reciente al arsénico y se establecen niveles límites de exposición para la población no expuesta y expuesta laboralmente.

En Uruguay el límite establecido para agua potable es de 0,050 partes por millón (50 microgramos /Litro) para arsénico.