



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA



Tesis de Doctorado en Química

**Desarrollo de metodologías analíticas
para especiación de arsénico
en matrices ambientales y biológicas
con técnicas alternativas al HPLC-ICP-MS
y su aplicación a estudios poblacionales.**

Autor: Valery Bühl Padial

Dirección Académica: Prof. Dra. Nelly Mañay
Dirección de Tesis:

Dra. Mariela Pistón

Dra. Nelly Mañay

Dra. María H. Torre (por PEDECIBA-Química)

**Química Analítica
CEQUIMTOX
Departamento Estrella Campos**

**Facultad de Química
Universidad de la República**

**Montevideo – Uruguay
2017**



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República

Área Química

ACTA. En Montevideo a los veintinueve días del mes de julio de 2017, se reúne en la Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula la Q. F. Valery Bühl Padial (CI: 2.699.731-2), cuyo título es *“Desarrollo de metodologías analíticas para especiación de arsénico en matrices ambientales y biológicas con técnicas alternativas al HPLC-ICP-MS y su aplicación a estudios poblacionales”*.

Asisten todos sus integrantes: Dres. Horacio R. Beldoménico, Adriana Cousillas e Iván Jachmanián

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

La tesis ha involucrado un plan de trabajo que ha sido exhaustivo abordando dos grandes aspectos: el primero de índole químico-analítica consistente en el desarrollo de métodos analíticos en el campo de las espectrometrías atómicas para la determinación de Arsénico y sus especies en orina y agua, y el segundo relacionado con estudios de base toxicológica sobre exposición laboral a Arsénico en trabajadores de plantas industriales que utilizan CCA para conservación de maderas de variado uso en el país. La temática así resulta relevante desde el punto de vista científico tanto por los aportes al desarrollo de métodos actualizados no existentes para estos fines en el país, como a la concreción de estudios toxicológicos inéditos en el mismo. Los resultados y hallazgos así obtenidos constituyen aportes originales al conocimiento existente y de mucha relevancia para Uruguay.

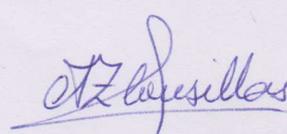
Un importante mérito adicional del trabajo ha sido la potenciación de coordinación mancomunada de los recursos y capacidades del sistema académico-científico con las áreas y actividades de salud pública en temas de alta complejidad y de gran interés para la sociedad.

En la exposición, la tesista ha desarrollado con claridad los distintos contenidos con buen uso de material didáctico de apoyo, evidenciando un sólido manejo de los aspectos conceptuales de los temas abordados.

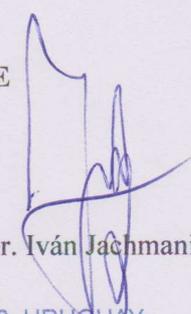
Por lo anterior, el tribunal le otorga la calificación de **EXCELENTE**



Dr. Horacio R. Beldoménico



Dra. Adriana Cousillas



Dr. Iván Jachmanián

Facultad de Química. Av. General Flores 2124, Montevideo 11800, URUGUAY

Teléfonos: (+598) 29242338. Fax: (+598) 29241906.

Página web: www.pedeciba.edu.uy/quimica

Correo electrónico: lsegredo@fq.edu.uy – gabig@fq.edu.uy

AGRADECIMIENTOS

A mis tres directoras de Tesis por estar siempre disponibles para enseñarme y acompañarme en este proceso.

A mis compañeros y amigos de Toxicología y de Analítica.

A los organismos financiadores:



Fondo María Viñas, 2014 (FMV_3_2013_1_100439)



PEDECIBA Química

A la Gerencia de Salud y Seguridad Ocupacional de la Administración de Usinas y Transmisiones Eléctricas (UTE)

A mi familia: a mis padres porque siempre me motivaron a seguir estudiando, a Ariel por su apoyo y a mis hijos por todo el tiempo que les he quitado.

¡Gracias a todos!.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos	1
Índice de contenidos	2
Abreviaturas	5
Índice de figuras	6
Índice de Tablas	8
Resumen	10
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	12
1. Arsénico: Química y propiedades.	13
2. Toxicidad Del Arsénico. Historia y estado del arte.	16
3. Arsénico: Ambiente y salud.	22
3.1. Fuentes naturales de exposición a As.	24
3.2 Fuentes Antropogénicas de exposición a As.	26
4. Arsénico: Monitoreo ambiental y biológico.	27
4.1. Evaluación de los niveles de As en aguas de consumo.	27
4.2. Toxicocinética del As y Evaluación de la Exposición Ocupacional y Ambiental	27
5. CCA: Situación actual	32
5.1. Composición química del CCA	34
5.2. Proceso de impregnación de madera con CCA	35
5.3. Vías de contacto e ingreso al organismo	37
5.4. Impregnación de madera con CCA en Uruguay y marco legal	39
5.5. Empresas impregnadoras en Uruguay	43
6. Metodologías analíticas para determinación de Arsénico	48
6.1. As total y Especiación.	48
6.2. Espectrometría absorción atómica con atomización electrotérmica (ET-AAS).	51

6.3. Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS)	53
6.4. Técnicas Acopladas	56
7. Validación de Métodos analíticos	59
CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN	73
CAPÍTULO 3: OBJETIVOS	76
CAPÍTULO 4: MÉTODOS ANALÍTICOS DESARROLLADOS	78
1. Determinación de especies de As mediante HG-AAS	79
1.1. Reactivos e instrumentación	79
1.2. Método	83
1.2.1 Determinación de especies de As en orina	84
1.2.1.1. Resultados y discusión	89
1.2.1.2. Conclusiones Parciales	100
1.2.2. Determinación de especies de As en agua	101
1.2.2.1. Antecedentes en Uruguay.	101
1.2.2.2. Resultados y discusión	103
1.2.2.3. Conclusiones Parciales	110
2. Determinación de As Total en orina mediante ET-AAS	111
2.1. Antecedentes	111
2.2. Reactivos e instrumentación	112
2.3. Método	114
2.4. Resultados y discusión	118
2.5. Conclusiones Parciales	124
3. Determinación de especies de As mediante acople HPLC-HG-AAS	125
3.1. Antecedentes	125
3.2. Reactivos e instrumentación	128
3.3. Resultados y discusión	135
3.4. Conclusiones Parciales	136
CAPÍTULO 5:	
ESTUDIOS DE POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE EXPUESTA A As	137
1. Biomonitorio de trabajadores expuestos (período 2014- 2017)	139
1.1. Antecedentes	139
1.2. Metodología: Relevamiento de datos analíticos	139
1.2.1. Muestreo	139
1.2.2. Determinaciones analíticas	140
1.3. Resultados y discusión	140

2. Estudio piloto en una planta uruguaya de impregnación de madera	143
2.1. Antecedentes: Presentación de la planta	143
2.2. Metodología	153
2.2.1. Muestreo	153
2.1.2. Determinaciones analíticas	154
2.1.3. Encuesta	155
2.1.4. Análisis estadístico	160
2.3. Resultados	161
3. Conclusiones de los estudios de población ocupacionalmente expuesta al As	170
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GLOBALES	171
CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS	174
BIBLIOGRAFÍA	178
TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICADOS	191

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAS: Espectrometría de absorción atómica.
ACGIH: *American Conference of Governmental Industrial Hygienists.*
ANII: Agencia Nacional de Investigación e Innovación.
AFS: Espectrometría de fluorescencia atómica.
APHA: *American Public Health Association.*
AsB: arsenobetaina.
ASME: *American Society of Mechanical Engineers.*
As-U: concentración de especies toxicológicamente relevantes de As en orina.
ATSDR: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry.*
AWPA: *American Wood Protection Association.*
BEI: *Biological Exposure Index.*
CDC: *Center for Disease Control and Prevention.*
CEQUIMTOX: Centro Especializado de Toxicología Química.
CSTEE: *Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment .*
CT: *trapping* criogénico.
DMA: ácido dimetilarsínico.
ET-AAS: espectrometría atómica con atomización electrotérmica.
ES: *electrospray.*
GC: cromatografía gaseosa.
GF-AAS: espectrometría atómica con horno de grafito.
HACRE: Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico.
HG: Generación de hidruros.
HG-AAS: espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.
HG-AFS: espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros.
HPLC: cromatografía líquida de alta performance.
IARC: *International Agency of Research in Cancer. World Health Organization.*
iAs: especies de arsénico inorgánico.
ICP-OES: espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo.
ICP-MS: espectrometría de masa con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
LC: límite de cuantificación (LOQ: *Limit of Quantification*).
LD: límite de detección (LOQ: *Limit of Detection*).
LOF: *lack of fit.*
MMA: ácido monometilarsónico.
MSP: Ministerio de Salud Pública.
NRC: *US National Research Council.*
OSE: Obras Sanitarias del Estado.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
UAA: Unidad de Análisis de Aguas de Facultad de Química.
UDELAR: Universidad de la República.
UNIT: Intituto Uruguayo de Normas Técnicas
URSEA: Unidad Reguladora de Servicios de Energía y Agua
UTE: Administración Nacional de Usinas y Transmisiones Eléctricas.
US EPA: *United States Environmental Protection Agency.*
VIM: Vocabulario Internacional de Metrología.
WHO: *World Health Organization.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As-O ₂ -H ₂ O.	14
Figura 1.2	Versión de mediados del siglo XIX del ensayo de Marsh.....	17
Figura 1.3	Manifestación del HACRE: queratosis palmar y plantar	23
Figura 1.4	Distribución mundial de los principales acuíferos con altos contenidos de arsénico	25
Figura 1.5	Reacciones de metilación del As(V) en el organismo.....	28
Figura 1.6	Esquema del metabolismo y la excreción de iAs y AsB	30
Figura 1.7	Autoclaves de dos empresas diferentes	35
Figura 1.8	Portadas de la Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera.....	42
Figura 1.9	Superficie destinada a la forestación en el año 2011	44
Figura 1.10	Plantas impregnadoras del Uruguay; en azul plantas de CCA, en verde ACQ	45
Figura 1.11	Diagrama: pasos involucrados en el análisis con diferentes técnicas espectroscópicas..	48
Figura 1.12	Esquema de posicionamiento del tubo de grafito.	52
Figura 1.13	Esquema de un equipo de absorción atómica con atomización electrotérmica.	52
Figura 1.14	Esquema de un instrumento HG-AAS	54
Figura 1.15	Ejemplo de selección del rango de trabajo.	62
Figura 1.16	Comparación de pendientes que pone en evidencia un efecto matriz.	66
Figura 1.17	Gráfico de calibración de adiciones estándar.	67
Figura 4.1	Espectrómetro de absorción atómica Varian SpectrAA 55B/Varian VGA 77.	80
Figura 4.2	Esquema del módulo comercial VGA 77	81
Figura 4.3	Diagrama del sistema en flujo del módulo VGA 77.....	81
Figura 4.4	Separador gas-líquido (izquierda: esquema; derecha: foto).....	82
Figura 4.5	Celda de cuarzo donde se produce la atomización.	82
Figura 4.6	Mecanismo propuesto para la formación de hidruros utilizando L-cisteína y tioglicerol..	84
Figura 4.7	Gráfico de Absorbancia en función del tiempo de reposo luego de agregar L-cisteína. .	88
Figura 4.8	Curvas de calibración: As(V) en agua; As(V) en pool de orina.....	90
Figura 4.9	Curva de calibración de HG-AAS previa derivatización con L-cisteína	91
Figura 4.10	Correlación entre el método de referencia y el desarrollado.	94
Figura 4.11	Elipse de confianza para la comparación del método HG-AAS con HPLC-ICP-MS	95
Figura 4.12	Diagrama de Shewhart para los valores de pendiente de la curva de calibración.	99
Figura 4.13	Curvas de calibración de las especies As(III) y As(V) en agua.	104
Figura 4.14	Correlación entre el método de referencia ET-AAS y el desarrollado HG-AAS.	106
Figura 4.15	Elipse de confianza; comparación del método HG-AAS con el método ETAAS	107
Figura 4.16	Ubicación de las zonas donde se muestrearon aguas termales	109
Figura 4.17	Espectrómetro Thermo iCE 3000 Series.	113
Figura 4.18	Variación de la señal analítica con las temperaturas de calcinación y atomización.....	117
Figura 4.19	Curva de calibración para determinación de As total mediante ET-AAS.	120
Figura 4.20	Correlación entre el método de referencia y el desarrollado.	122

Figura 4.21	Elipse de confianza; comparación método ET-AAS con método HPLC-ICP-MS.....	123
Figura 4.22	Cromatograma: mezcla As(III), As(V), MMA y DMA; fase móvil NH ₄ H ₂ PO ₄ 6 mM	130
Figura 4.23	Cromatograma: 4 especies de As, fase móvil NH ₄ H ₂ PO ₄ 6 mM con gradiente de flujo	131
Figura 4.24	Cromatograma:4 especies de As, fase móvil 0,1% HCOOH, 1%MeOH; flujo cte.....	131
Figura 4.25	Acople del equipo HPLC con el equipo HG-AAS.....	132
Figura 4.26	Detalle del acople: salida de columna del HPLC con entrada al equipo HG-AAS	133
Figura 4.27	Conector de PTFE de dos vías (Omnifit®).....	133
Figura 4.28	Interior del conector.....	134
Figura 4.29	Bypass realizado para el ingreso desde la columna directamente hacia el reactor.	134
Figura 4.30	Esquema del sistema acoplado HPLC-HG-AAS.....	134
Figura 5.1	Niveles de As-U en el período estudiado.....	141
Figura 5.2	Cambio en los niveles de As-U luego del retiro de los trabajadores de su trabajo	142
Figura 5.3	Vista satelital de la planta de forestal de UTE. Se observa la represa Gabriel Terra...	144
Figura 5.4	Folleto con las zonas de la planta de impregnación de madera de UTE	145
Figura 5.5	Postes en la zona 9 de la planta previo a su impregnación con CCA	146
Figura 5.6	Trabajadores colocando las chapas identificatorias	146
Figura 5.7	Máquina cargando las vagonetas.	147
Figura 5.8	Vagonetas cargadas con los postes a impregnar, ingresando al autoclave.....	147
Figura 5.9	Autoclaves	148
Figura 5.10	Izquierda: etiqueta de tarrina de CCA. Derecha: tarrinas almacenadas en depósito... ..	148
Figura 5.11	Izquierda: cañerías dentro de la tarrina de CCA: Derecha: tanques con CCA diluido .	149
Figura 5.12	Trabajadores supervisando el cierre de la puerta del autoclave.	149
Figura 5.13	Izquierda: bombas. Derecha: sala de control.....	150
Figura 5.14	Izquierda: Patio de goteo; Derecha: zona de fijación.	151
Figura 5.15	Acceso a diferentes zonas del vestuario.....	151
Figura 5.16	Trabajadores utilizando máscara, equipo impermeable y guantes de goma.	152
Figura 5.17	Izquierda: muestras. Derecha: heladera para transporte de muestras.....	153
Figura 5.18	Encuesta realizada a los trabajadores.	159
Figura 5.19	Niveles de As-U de los 35 trabajadores de la planta de impregnación; nov. 2015.	161
Figura 5.20	Porcentaje de trabajadores en las diferentes categorías de exposición laboral.....	165
Figura 5.21	Resultados muestras con niveles de As-U y As total con diferencias significativas.....	167
Figura 5.22	Etapas proceso de impregnación y potencial riesgo de exposición de trabajadores. ..	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Especies naturales inorgánicas y orgánicas de As	13
Tabla 1.2	Reacciones químicas de algunos minerales de As	16
Tabla 1.3	DL ₅₀ de los compuestos de As, según sus diferentes especies químicas	19
Tabla 1.4	Composición del CCA según sus diferentes tipos.....	34
Tabla 1.5	Etapas del proceso de impregnación de madera con CCA.....	36
Tabla 1.6	Extraído de tabla de “Vigilancia sanitaria de exposición a factores de riesgo químicos” ..	41
Tabla 1.7	Empresas impregnadoras de madera con CCA del Uruguay	46
Tabla 1.8	Ventajas y desventajas de diferentes técnicas espectroscópicas para determinar As	50
Tabla 4.1	Variación de la señal para cada especie con la concentración de NaBH ₄	86
Tabla 4.2	Pendientes de las curvas de calibración para cada especie al variar la conc. de HCl.	87
Tabla 4.3	Precisión intermedia; conc. de especies por separado 30 µg L ⁻¹ y suma 5 µg L ⁻¹ de c/u .	91
Tabla 4.4	Recuperaciones obtenidas mediante fortificación	92
Tabla 4.5	Resultados de los ensayos interlaboratorio del programa G-EQUAS.....	96
Tabla 4.6	Cifras de mérito validación de la determinación de As en orina mediante HG-AAS.....	97
Tabla 4.7	Control de pendientes curvas de calibración sobre pool de orinas de voluntarios sanos..	98
Tabla 4.8	Programas de temperatura determinación de As en aguas mediante ET-AAS.....	105
Tabla 4.9	Cifras de mérito para la determinación de As(III)+As(V) en muestras de agua	107
Tabla 4.10	Resultados de muestras de agua termales, aguas embotelladas y agua de OSE.	108
Tabla 4.11	Señales orina adicionada con 25 ppb As(V), diluída 1:1, con diferentes modificadores.	116
Tabla 4.12	Condiciones operativas del horno.....	117
Tabla 4.13	Recuperaciones obtenidas de las muestras adicionadas	121
Tabla 4.14	Cifras de mérito de validación de determinación de As en orina mediante ET-AAS	123
Tabla 4.15	Ejemplos de diferentes modos de separación cromatográfica en sistemas acoplados ..	126
Tabla 4.16	Tiempos de retención para el cromatograma de la figura 4.22.	130
Tabla 4.17	Tiempo de retención de las cuatro especies	132
Tabla 5.1	Resultados del biomonitoreo de trabajadores en el período 2014-2017.....	140
Tabla 5.2	Resultados de encuestas a trabajadores de planta de impregnación de UTE	162
Tabla 5.3	Coeficientes de correlación de <i>Spearman</i> entre As-U y variables.	165

Para el desarrollo analítico de esta tesis, se siguieron las pautas del Sistema de Gestión de la Calidad de CEQUIMTOX (Cátedra de Toxicología e Higiene Ambiental de la Facultad de Química, UDELAR) establecidos en los procedimientos internos: PLB 05, versión 004 (Validación de metodologías analíticas); PDI 01, versión 003 (Desarrollo de metodologías analíticas) y PLB 01, versión 006 (Gestión de muestras para el análisis).

El estudio realizado a trabajadores de impregnación de madera de UTE fue aprobado oportunamente en un proyecto presentado al Comité de Ética de Facultad de Química; en el marco de convenios de cooperación entre UTE y UDELAR, se aprobó dicho estudio que fue presentado a las autoridades de UTE, en acuerdo con la Gerencia de Salud y Seguridad Ocupacional.

RESUMEN

El Arsénico (As) es un elemento natural que puede estar presente en un amplio rango de concentraciones en el aire, agua, suelos, vegetales y animales, en distintos estados de oxidación (-III, 0, III, V) y en formas inorgánicas y orgánicas. Es un reconocido agente tóxico para la salud humana que se encuentra en el primer lugar de la lista de sustancias peligrosas elaborada por la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR). Se ha demostrado que no todos los compuestos de As presentan el mismo grado de toxicidad, dado que depende de su forma química o especiación, siendo la toxicidad mucho mayor de las especies inorgánicas que de las especies orgánicas: As (-III) > As (III) > As (V) > MMA > DMA >> Arsenobetaina.

Su presencia en el ambiente puede provenir tanto de fuentes naturales como de actividades antropogénicas.

El As se encuentra naturalmente en aguas subterráneas en diferentes puntos del planeta. Su presencia en aguas destinadas al abastecimiento de la población representa una especial preocupación de salud ambiental a nivel internacional. La exposición humana a largo plazo a bajos niveles de As, puede conducir a la intoxicación crónica produciendo lesiones cutáneas y cáncer de piel que son los efectos más característicos, pudiendo desarrollar también cáncer de vejiga, riñón y pulmón. En estos momentos, el límite máximo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la concentración de As en el agua potable es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Entre las actividades antropogénicas que contribuyen a la liberación de As al ambiente se encuentran entre otros, la minería, la fundición de metales y el uso de As en fórmulas de pesticidas y conservantes de la madera.

En Uruguay existen varias plantas que impregnan madera con el plaguicida denominado CCA que contiene óxidos de cromo, cobre y arsénico, por lo que existen trabajadores expuestos al As. En nuestro país es obligatorio el control biológico (biomonitorio) de trabajadores expuestos a As, mediante el análisis de las denominadas “**especies toxicológicamente relevantes**” de As en orina (As(III) + As(V) + DMA (ácido dimetilarsínico) + MMA (ácido monometilarsínico). El límite establecido para la suma de estas especies en orina (As-U) es de $35 \mu\text{g L}^{-1}$.

El objetivo general planteado para esta tesis, consistió en desarrollar herramientas analíticas viables para Uruguay, con el objetivo de evaluar las especies de arsénico en matrices ambientales y biológicas, para aplicarlas a estudios poblacionales, como alternativas a la técnica de referencia internacional (HPLC-ICP-MS), no disponible en el país y altamente costosa para estudios de rutina.

En cuanto a **matrices ambientales**, se realizó la validación de una metodología no acoplada para determinar As (III) + As (V) en agua mediante espectrometría atómica con generación de hidruros (HG-AAS). Los resultados obtenidos para algunas muestras de agua indican que este método es adecuado para el control de las mismas, teniendo en cuenta el valor máximo recomendado por la OMS.

Respecto a **matrices biológicas** se optimizaron y validaron dos metodologías analíticas no

acopladas. Una fue mediante **HG-AAS**, para para el biomonitoreo de especies toxicológicamente relevantes de As en orina (As-U) destinado a la evaluación del riesgo a la salud de los trabajadores expuestos a As a fin de prevenir efectos adversos o intervenciones médicas. Los resultados obtenidos muestran que este método es adecuado para la determinación de las especies: **As(III) + As(V) + DMA + MMA**.

Otra metodología validada fue para la determinación de As total en muestras de orina mediante **ET-AAS**, la cual cuantifica la suma de las especies toxicológicamente relevantes y la especie orgánica arsenobetaína como prueba de la incidencia de las especies orgánicas, poco tóxicas de As, derivadas de la dieta.

Por otra parte, se han optimizado las condiciones de un acople HPLC-HG-AAS utilizando una interfase construida en el laboratorio de la Facultad de Química.

En cuanto a los **estudios poblacionales**, en primer lugar, el desarrollo analítico realizado en el transcurso de esta tesis fue aplicado a controles de biomonitoreo de As-U en trabajadores expuestos a CCA; se revisaron y evaluaron los resultados obtenidos sobre 212 muestras de 73 trabajadores durante tres años y los resultados mostraron niveles de bajo riesgo de exposición ocupacional al As.

En segundo lugar, se realizó un estudio piloto en una planta de impregnación de madera con CCA en el cual paralelamente a la evaluación de los niveles de As-U, se realizó una encuesta a los trabajadores para analizar la contribución de aspectos ocupacionales y no ocupacionales que pudieran incidir en los niveles de As-U determinados, utilizando métodos estadísticos. Los resultados de As-U de los trabajadores se encontraron todos dentro de los valores de la normativa vigente. Sin embargo, se constató que a mayor exposición durante las horas de trabajo, se observan niveles más altos de As-U de los trabajadores y que también existe correlación estadística de As-U con la percepción de los trabajadores de estar expuestos al ruido y con el consumo de agua embotellada. Con respecto a los resultados de As total en orina obtenidos en estos trabajadores, se comprobó la influencia de la ingesta reciente de pescado o frutos del mar, en los niveles de arsénico total en orina por el aporte “dietario” de AsB de muy baja toxicidad. Este resultado se obtuvo en 8 de los 35 trabajadores coincidiendo con su declaración de haber consumido pescado o frutos de mar en la encuesta. Por lo anterior, resulta fundamental la indicación de las “especies toxicológicamente relevantes” para la evaluación del riesgo de exposición a arsénico como lo recomienda la ACGIH y el MSP de acuerdo a sus valores límites. Hasta el alcance de nuestro conocimiento, esta es la primera revisión de resultados de biomonitoreo de especies toxicológicamente relevantes en trabajadores expuestos a CCA realizada en el Uruguay.

Esta investigación marca un antecedente importante de investigación y desarrollo para futuros estudios científicos interdisciplinarios de índole epidemiológico, destinados a evaluar por ejemplo, la susceptibilidad de la población general expuesta a arsénico a través del agua y alimentos y correlacionar los resultados de As-U con otros biomarcadores de efecto y susceptibilidad para establecer la situación de riesgo presente en la población uruguaya en torno a la exposición al As.



CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

1. ARSÉNICO: QUÍMICA Y PROPIEDADES.

El arsénico (As) es un elemento presente en la corteza terrestre, formando parte de varios minerales. El principal mineral de As es el FeAsS, conocido como arsenopirita o pilo. Dentro de otros arseniuros metálicos comunes, pueden citarse los minerales FeAs₂ (löllingita), NiAs (niccolita), CoAs₂ (esmaltita), CoAsS (cobalto brillante) y NiAsS (gersdorfitita). Muchos minerales de sulfuro contienen también As, destacándose As₄S₄ (realgarita) y As₄S₆ (oropimente). En la corteza terrestre el contenido de As se encuentra en el orden de 5×10⁻⁴ % (Bundschuh, Pérez Carrera, & Litter, 2008).

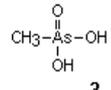
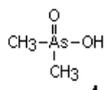
Además de la corteza terrestre, el As está ampliamente distribuido en el aire, agua, vegetales y organismos en un amplio rango de concentraciones (OMS, 2016).

El As en aguas, aire y suelos, puede estar presente en distintos estados de oxidación (-III, 0, III, V) y en formas inorgánicas y orgánicas (Litter, Armienta y Farías, 2009).

La tabla 1.1 muestra las especies de arsénico naturales inorgánicas y orgánicas más comunes.

Tabla 1.1 Especies naturales inorgánicas y orgánicas de As

Nombre	Sinónimo	Abreviatura	Fórmula
arseniato	-	[As(V)]	[1]
arsenito	-	[As(III)]	[2]
ácido metilarsónico	ácido monometilarsónico	MMA	[3]
ácido dimetilarsínico	ácido cacodílico	DMA	[4]
óxido de trimetilarsina	-	TMAO	[5]
ion tetrametilarsonio	-	TMA ⁺	[6]
arsenobetaína	-	AsB	[7]
arsenocolina	-	AsC	[8]

 1	 2	 3	 4
$(\text{CH}_3)_3\text{As}=\text{O}$ 5	$(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$ 6	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ 7	$(\text{CH}_3)\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 8

Las especies de As inorgánico (iAs) incluyen al arseniato AsO_4^{3-} , siendo su estado de oxidación As(V), y arsenito AsO_2^- , con estado de oxidación As(III). El arseniato es la especie arsenical más difundida en el medio ambiente, siendo la mayoritaria en aguas y suelos. También está presente en plantas, algas y animales acuáticos y terrestres. El arsenito es la forma inorgánica reducida y está presente en forma minoritaria en aguas subterráneas, suelos y seres vivos (Litter *et al.*, 2009).

En aguas naturales, el As se encuentra en general formando oxianiones. Los estados de oxidación que predominan son As(III) y As(V). El As(V) aparece como H_3AsO_4 y sus correspondientes productos de disociación (H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} ; pK_{a1} : 2,2; pK_{a2} : 6,7 y pK_{a3} : 11,5), mientras que el As(III) se encuentra como H_3AsO_3 y sus correspondientes derivados protolíticos dependiendo del pH (H_4AsO_3^+ , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-} ; pK_{a1} : 9,2; pK_{a2} : 12,1; pK_{a3} : 13,4) (Ure & Davidson, 2002). El estado de oxidación del As y, por lo tanto, su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH como puede observarse en el diagrama de la figura 1.1 (Lu & Zhu, 2011; Litter *et al.*, 2009).

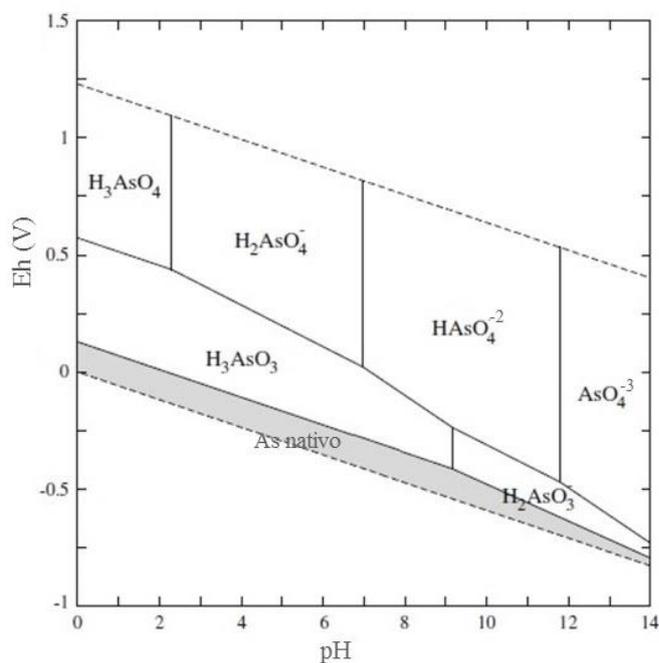


Figura 1.1 Diagrama Eh-pH de especies acuáticas de arsénico en el sistema As-O₂-H₂O. La zona gris indica fase sólida (Lu & Zhu, 2011).

La presencia de niveles elevados de As en agua está directamente relacionada con su liberación desde la fase sólida, con fenómenos de transporte y de transferencia a otros medios y a procesos de dilución por mezcla.

Las aguas superficiales y las subterráneas presentan diferencias notorias, ya que las primeras constituyen sistemas abiertos donde los factores ambientales varían continuamente, mientras que las aguas subterráneas se pueden considerar, en la mayoría de los casos, sistemas semicerrados, donde las condiciones pueden variar, pero de forma discontinua en el tiempo, permitiendo que el sistema solución-fase sólida pueda reequilibrarse.

La explotación de las aguas subterráneas puede introducir cambios importantes en las condiciones originales del acuífero. Se han informado variaciones temporales de las concentraciones de As en agua subterránea atribuidas a las variaciones en el régimen de explotación de los pozos (Bundschuh, 2008; Flora, 2015).

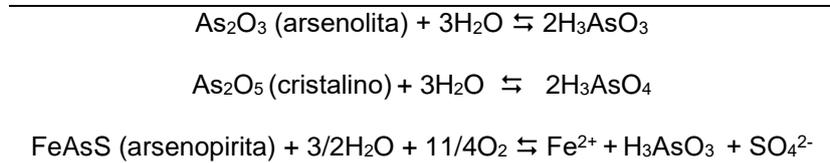
Los principales mecanismos geoquímicos de liberación y movilización de arsénico a las aguas son:

- oxidación de sulfuros, lo cual ocurre cuando el medio se halla en condiciones oxidantes.
- disolución de minerales; los óxidos y oxihidróxidos de Fe y Mn se disuelven en condiciones fuertemente ácidas y el As presente en ellos, se moviliza durante la disolución, lo cual se favorece en aguas subterráneas bajo condiciones fuertemente reductoras.
- desorción a pH elevado bajo condiciones oxidantes, a pH mayores a 8,5 es considerado como uno de los mecanismos más efectivos en cuanto a movilización de As en condiciones oxidantes (Bundschuh, Pérez Carrera, & Litter, 2008).

Algunos ejemplos de las reacciones químicas mencionadas anteriormente pueden observarse en la tabla 1.2 (Lu & Zhu, 2011; Neil *et al.*, 2014).

Tabla 1.2 Reacciones químicas de algunos minerales de As (extraído de Lu & Zhu, 2011; Neil *et al.*, 2014)

Reacción química



Las reacciones de metilación mediadas biológicamente, que ocurren en organismos terrestres y marinos convierten el arsenito y arseniato inorgánico en compuestos metilados de toxicidad moderada, tales como: ácido monometilarsónico [MMA(V)], ácido dimetilarsínico [DMA(V)], óxido de trimetilarsina (TMAO) y el ion tetrametilarsonio (TMA⁺). Estos compuestos son precursores de formas orgánicas más complejas, los arsenolípidos, como la arsenobetaína (AsB) y la arsenocolina (AC). Las especies orgánicas están ampliamente distribuidas en la atmósfera, sistemas acuáticos, suelos, sedimentos y tejidos biológicos (Bundschuh, Pérez Carrera & Litter, 2008).

2. TOXICIDAD DEL ARSÉNICO. HISTORIA Y ESTADO DEL ARTE.

Desde la antigüedad el As era conocido como el “Rey de los venenos”. Fue el agente homicida en el 75 % de los envenenamientos juzgados en Francia durante la década de 1830 y en Gran Bretaña, la proporción llegó a la mitad de los casos enjuiciados entre 1815 y 1860 (Smith, 2016).

También fue conocido como “polvo de la sucesión”, debido a que era utilizado para envenenar personas con el objetivo de heredar sus bienes o para ascender en la realeza. Muchos personajes históricos lo utilizaron, como los Borgia y la Marquesa de Brinvilliers. Incluso se detectaron cantidades elevadas de As en el cabello de Napoleón, en análisis realizados recientemente (Hughes, Beck, Chen, Lewis & Thomas, 2011).

Debido a la cantidad de presuntos envenenamientos por As en los años 1800, se realizaron muchos esfuerzos en encontrar una forma de esclarecer la causa de las muertes. James Marsh (1794-1846), un colaborador de Michael Faraday (1791-1867) en la Royal Institution de Londres, desarrolló una metodología para poder determinar As en diferentes muestras (Hughes *et al.*, 2011).

El ensayo de Marsh (figura 1.2) consistía en colocar la muestra en un recipiente, se añadía ácido sulfúrico y cinc, y se obtenía un gas (arsina) el cual se encendía para lograr depositar sobre la superficie de otro recipiente una fina capa de arsénico metálico (Marsh, 1836).



Figura 1.2 Versión de mediados del siglo XIX del ensayo de Marsh.

El ensayo de Marsh permitía la determinación de arsénico en diferentes muestras sospechosas (sopas, te, café) y fue utilizado para resolver muchos casos de envenenamiento, lo cual fue desmotivando su uso como veneno.

El compuesto de As utilizado para los envenenamientos anteriormente mencionados era el As_2O_3 (óxido arsenioso) o arsenolita, el cual podía disimularse con otros productos como por ejemplo la harina o el azúcar, ya que es inodoro e insípido.

Sin embargo, el As también ha tenido usos medicinales, por ejemplo, la solución de Fowler, que fue descubierta en 1786, es una solución al 1% de arsenito de potasio que se usó en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo malaria, sífilis, asma, eczema y psoriasis. En 1910, Paul Ehrlich introdujo una nueva droga basada en arsénico llamada Salvarsan muy eficaz para el tratamiento de la sífilis y se utilizó

hasta que fue desplazada por la penicilina (Hughes *et al.*, 2011). El As_2O_3 ha sido estudiado para el tratamiento de pacientes con leucemia promielocítica aguda con resultados auspiciosos (Chen *et al.*, 1996; Soignet *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2011). Estudios más recientes reportan que el As podría ser especialmente eficaz para tratar algunos tipos de cáncer en combinación con otros fármacos que se están desarrollando (Beachy *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013; Ally *et al.*, 2016).

Estos usos históricos del arsénico como veneno, así como su uso medicinal e industrial, han dado lugar a importantes conocimientos sobre los efectos del As en seres humanos.

En la actualidad el As es un elemento reconocido como tóxico para la salud humana que se encuentra ubicado en el primer lugar de la lista de sustancias peligrosas elaborada por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR (2015) y es reconocido como sustancia cancerígena para seres humanos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2012).

No todos los compuestos de As presentan el mismo grado de toxicidad, sino que su toxicidad es diferente dependiendo de su forma química o especiación. El iAs (que incluye arseniato, arsenito, óxido arsenioso y óxido arsénico) es caracterizado como “el tóxico”, mientras que las especies arsenicales orgánicas presentes en alimentos marinos han resultado de muy baja toxicidad.

En la tabla 1.3 se expresa la toxicidad del As según la Dosis Letal 50 en ratas donde se observa que la especie más tóxica es la arsina, es decir el As en su estado de oxidación (-III) (Rojas Martini, 2013). Las especies arsenito y arseniato también tienen toxicidad elevada mientras que las especies orgánicas como arsenocolina y arsenobetaína presentan muy baja toxicidad (Casarett & Doull's, 2013).

Tabla 1.3 DL₅₀ de los compuestos de As, según sus diferentes especies químicas (Rojas Martini, 2013)

Especies químicas de As	DL₅₀ en ratas (mg/kg)
Arsina (AsH ₃)	3
Arsenito [As(III)]	14
Arseniato [As(V)]	20
Ácido Monometilarsónico (MMA)	700 - 1800
Ácido Dimetilarsínico (DMA)	700 - 2600
Arsenocolina	> 10000
Arsenobetaina (AsB)	> 10000

En los años 70 y 80 algunos investigadores plantearon la posibilidad de que el arsénico inorgánico tuviera algún rol esencial (Uthus, 1992). En 1988 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) convocó a un grupo de panelistas especializado para evaluar si esto era factible; estos panelistas en base a una extensa revisión de la literatura concluyeron en aquel momento, que existía información experimental que indicaba que el arsénico inorgánico podría tener algún rol esencial para algunos animales (US EPA, 1988). En esta misma línea, para Baran (1995) existían evidencias de que la presencia de As era fundamental para el crecimiento y la reproducción de los organismos superiores, aunque hasta ese momento solo se habían realizado estudios con animales de laboratorio los cuales demostraron que ante ausencia estricta de As se producían variaciones importantes en las concentraciones de zinc, arginina, colina, metionina y ácido guanidoacético.

Sin embargo, para la US EPA, luego de la reunión de 1988, muy poca información había surgido sobre este tema. En 1999 la National Research Council (NRC), -una organización sin fines de lucro estadounidense, no gubernamental, que produce informes, redacta políticas e informa a la opinión pública en las áreas de ciencia, la ingeniería y la medicina - reportó que la esencialidad del As en humanos no había sido evaluada hasta la fecha y que no existía proceso bioquímico para el cual este elemento pudiera ser considerado como esencial (NRC, 1999). Además, en el

2007 la US EPA volvió a reunir un panel de expertos, que nuevamente revisaron la información del año 1988 y no habiendo nuevas evidencias sobre esencialidad simplemente concluyeron que debería seguirse estudiando el tema (US EPA, 2007).

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en elucidar el metabolismo del As en seres humanos, ya que numerosas investigaciones han evidenciado que existe un vínculo entre el metabolismo y la toxicidad del As aún a concentraciones muy bajas. Dependiendo de la dosis, la exposición crónica al As puede afectar varios órganos, siendo los efectos más graves el cáncer, principalmente de piel, vejiga y pulmón. El modo de acción del As para desencadenar esta enfermedad está actualmente en estudio (Hughes *et al.*, 2011).

Se han investigado los metabolitos del As y que algunos de estos metabolitos pueden mediar los efectos tóxicos y carcinógenos asociados con la exposición al arsénico inorgánico. Recientemente se ha estudiado que la adaptación a la exposición crónica al arsénico, genera cambios genómicos; sin embargo, la evidencia de adaptaciones específicas en seres humanos sigue siendo limitada. No obstante, en el estudio de Schlebusch *et al.* (2015) de los habitantes de los Andes, del norte de Argentina, donde las concentraciones elevadas de arsénico en el agua potable disponible son comunes, la población presenta un único metabolismo de arsénico, con metilación eficiente y excreción del principal metabolito arsénico dimetilado (DMA) y una menor excreción del metabolito monometilado (MMA) altamente tóxico, encontrándose una fuerte asociación entre el gen AS3MT (arsénico (III) metiltransferasa) y el arsénico mono y dimetilado en la orina, lo que sugiere que el gen AS3MT es el principal gen para el metabolismo del arsénico en los seres humanos.

De estos esfuerzos ha surgido un cuadro más completo de las complejas relaciones entre el metabolismo y la toxicidad del arsénico y el papel que juega la variación inter-individual en la capacidad de metabolizar el As como un determinante del riesgo de desarrollar cáncer.

La formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por el arsénico es uno de los mecanismos de acción más estudiados para la toxicidad del As hoy en día (Hughes y Kitchin, 2006; Kitchin y Ahmad, 2003; Lantz y Hays, 2006; Shi *et al.*, 2004).

Estas especies reactivas están implicadas en la genotoxicidad, transducción de señales, proliferación celular e inhibición de la reparación del ADN.

Con los avances en la tecnología y el reciente desarrollo de modelos animales para la carcinogenicidad del arsénico, la comprensión de la toxicología del arsénico continuará mejorando (Hughes *et al.*, 2011).

3. ARSÉNICO: AMBIENTE Y SALUD.

El As presente en el medioambiente puede provenir de fuentes naturales o de actividades antropogénicas. Se encuentra naturalmente en aguas subterráneas en diferentes puntos del planeta, así como también se libera al ambiente por erupciones volcánicas y debido a la erosión de depósitos minerales que contienen arsénico (Bundschuh *et al.*, 2008).

Es un elemento con muy alta movilidad y capacidad de transformación que puede sorberse o desorberse de partículas, o cambiar de estado de oxidación al reaccionar con oxígeno u otras moléculas del aire, del agua o del suelo o por acción de microorganismos. De allí proviene su particular disposición a estar presente en muchos espacios ambientales, entre ellos el agua (Litter *et al.*, 2009).

Entre las actividades antropogénicas que contribuyen a la liberación de As al ambiente se encuentran la minería, la fundición de metales, así como en procesos de fabricación de vidrio, pigmentos, textiles, papel, adhesivos metálicos o el uso de As en fórmulas de pesticidas y conservantes de la madera (OMS, 2016).

Por lo tanto, la población en general puede estar expuesta a As presente en el aire, suelo, agua potable y alimentos (ATSDR, 2007).

Desde la antigüedad se sabe que el arsénico es un veneno para el ser humano, y una dosis oral grande puede dar lugar a la muerte (ATSDR, 2007). Por otro lado, la exposición a largo plazo a bajos niveles de iAs, puede conducir a la intoxicación crónica por arsénico, produciendo lesiones cutáneas y el cáncer de piel que son los efectos más característicos (OMS, 2016). La población expuesta es propensa a desarrollar también cáncer de vejiga, riñón y pulmón (ATSDR, 2016).

Es sabido también que la presencia de As en aguas de consumo ha ocasionado la diseminación del Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE) que afecta a más de cien millones de personas en todo el mundo (OMS, 2016)

El caso internacional más grave, se ha descrito en Bangladesh (West Bengal), donde el agua subterránea, conteniendo elevados niveles de As, ha sido la responsable de la muerte de más de 9.000 personas y más de 125.000 se reportaron con afecciones graves en 2001. Se estima que existen millones de personas que

pueden estar aún afectadas por el consumo de agua contaminada en esa región (OMS, 2001; OMS, 2010).

Las principales manifestaciones tóxicas del HACRE son a nivel dermatológico como melanodermia, leucodermia y/o queratosis palmo-plantar, (figura 1.3) evolucionando hacia patologías más graves que pueden relacionarse a distintos tipos de cáncer en piel y en órganos internos (esófago, estómago, hígado, colon, pulmón y vejiga) (Selinus O, 2004; OMS, 2016).



Figura 1.3 Manifestación del HACRE: queratosis palmar y plantar. (Imágenes de <http://hacretucuman.blogspot.com.uy/>)

Por los motivos anteriormente mencionados, el As es una de las 10 sustancias químicas que la OMS considera más preocupantes para la salud pública, por lo que ha definido un valor guía para el arsénico en sus “Guías para la calidad del agua potable” cuya finalidad es servir en el mundo entero de base para las tareas de reglamentación y normalización en esta esfera (OMS, 2016).

En estos momentos, el límite máximo recomendado por la OMS para la concentración de As en el agua potable es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque este valor de referencia se considera provisional dadas las dificultades analíticas y las dificultades prácticas relacionadas con la eliminación del As del agua de bebida. Cuando hay problemas para respetar el valor guía, los Estados Miembros pueden establecer límites más elevados teniendo en cuenta las circunstancias locales, los recursos disponibles y los riesgos asociados a fuentes con bajos niveles de As contaminadas

microbiológicamente (OMS, 2016).

En Uruguay las aguas de consumo son suministradas y controladas por Obras Sanitarias del Estado (OSE) siendo el valor máximo permitido para As total de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, teniendo como objetivo alcanzar el límite de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de la OMS (UNIT, 2010). Paralelamente la URSEA (Unidad Reguladora de Servicios de Energía y Agua) institución estatal, que regula, fiscaliza y asesora en los sectores de energía, combustible y agua, realizó un convenio con la Unidad de Análisis de Agua de Facultad de Química de la Universidad de la República (UDELAR) en el marco del cual se realizan controles periódicos de aguas de consumo de todo el país, incluyendo el control de los niveles de As.

3.1. FUENTES NATURALES DE EXPOSICIÓN A AS.

En América Latina la presencia de As en aguas superficiales y subterráneas es natural y está asociada al volcanismo terciario y cuaternario desarrollado en la Cordillera de los Andes. Proviene de la disolución de minerales, la erosión y la desintegración de rocas y por deposición atmosférica (aerosoles).

Los casos con mayor antigüedad reconocidos son los de Argentina, Chile y Brasil (Castro de Esparza, 2006; Bundschuh, 2008).

Uno de los problemas fundamentales respecto a las aguas subterráneas y el As radica en que su explotación puede introducir cambios importantes en las condiciones originales de los acuíferos. Se han informado variaciones temporales de las concentraciones de As en agua subterránea atribuidas a las variaciones en el régimen de explotación de los pozos (Welch, Westjohn, Helsel & Wanty, 2000).

Considerando los problemas de salud pública a nivel global, el medio de exposición actual al As más difundido, es entonces el agua de bebida que contiene este elemento en forma natural, debido principalmente a su origen geogénico.

El HACRE entonces, se debe principalmente a los niveles naturalmente altos en las aguas subterráneas en diferentes regiones de nuestro planeta, según puede observarse en la Figura 1.4; así como también debido a actividades relacionadas a la minería.

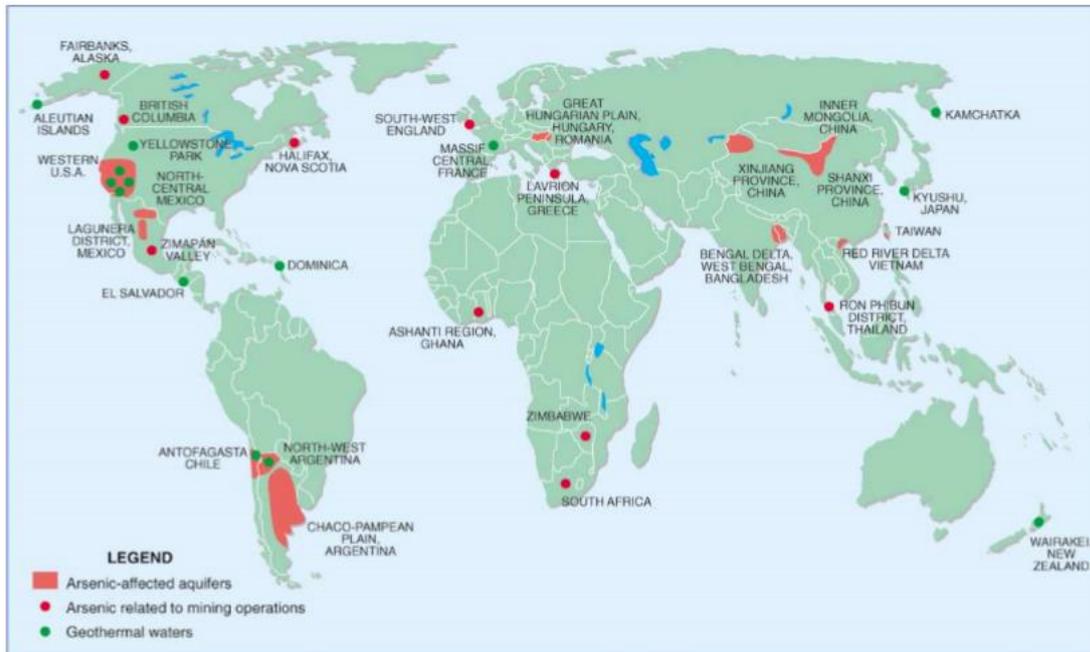


Figura 1.4 Distribución mundial de los principales acuíferos con altos contenidos de arsénico (Smedley & Kinniburgh, 2002)

Se puede observar en el mapa que hay una zona roja que curiosamente finaliza sobre la frontera de Uruguay en el Río Uruguay. Esto se debe a que al momento de publicar el atlas de HACRE no había información disponible sobre nuestro país.

Es necesario que se investigue para una mejor comprensión de la distribución geográfica y de la génesis geológica del As en acuíferos, sedimentos y suelos, en los factores que influyen en su movilidad en el agua subterránea, su permeación a suelos, y su absorción por las plantas.

Otras contribuciones a la ingesta iAs incluyen verduras, frutas y bebidas (OMS, 2010; Ciminelli *et al.*, 2016). En cereales, como el arroz, iAs y la especie DMA representan desde un 60% a casi el 100% del total de As presente como un componente "natural". Por otra parte, los pescados y los mariscos pueden contener especies orgánicas de As, sobre todo arsenobetaína (AsB) con toxicidad muy baja (Hughes *et al.*, 2006); esta especie de As es llamada comúnmente "arsénico de los peces" (ATSDR, 2011).

Otra contribución que debe tenerse en cuenta es la exposición de los fumadores, ya que el tabaco contiene iAs. Varios autores señalan que la contribución del

tabaquismo es similar a la de los alimentos (OMS, 2010; Iwai T, 2016). Farzan *et al.* publicaron un estudio que sugiere una relación sinérgica entre la exposición a niveles bajos de As y el hábito de fumar, en la incidencia de enfermedades cardíacas. Los resultados son consistentes con la evidencia de una correlación entre la exposición al arsénico y el tabaquismo en los efectos a la salud y apoyan el rol de la exposición al arsénico a niveles bajos, en la mortalidad por enfermedad isquémica del corazón (Farzan *et al.*, 2015).

3.2 FUENTES ANTROPOGÉNICAS DE EXPOSICIÓN A AS.

La minería, fundiciones e industrias son fuentes de contaminación ambiental antropogénicas, debido a los efluentes y las emisiones al ambiente, principalmente de humos y materiales particulados enriquecidos en diferentes compuestos de As. El uso de combustibles fósiles, plaguicidas y del conservador de la madera a base cromo, cobre y As (CCA), son otras aplicaciones contemporáneas que aportan As al ambiente (Smedley & Kinniburgh, 2005).

El CCA se utiliza extensamente como preservante de la madera para evitar su deterioro. Este uso constituye de por sí, un riesgo ocupacional y de exposición ambiental (Azevedo & Chasin, 2003; ATSDR, 2007). Si bien en algunos países, se están utilizando compuestos alternativos sin As, la madera presurizada con CCA se sigue utilizando en muchas aplicaciones industriales y domésticas. Es motivo de controversia, en qué medida los productos de madera tratados con CCA contribuyen a que la población sea expuesta a As (ATSDR, 2007).

Actualmente, los compuestos inorgánicos de As se han dejado de utilizar en la agricultura. Sin embargo, sus compuestos orgánicos, específicamente el ácido cacodílico, el arsenato de metilo bisódico (DSMA) y el arsenato de metilo monosódico (MSMA), aún se utilizan como plaguicidas, principalmente en cultivos de algodón (ATSDR, 2007). En su forma elemental se utiliza en pequeñas cantidades en aleaciones de metales buscando mejorar características físicas. También se incorpora en la fabricación de baterías para automóviles. Otro uso importante es en la fabricación de diferentes semiconductores y fotodiodos (Azevedo & Chasin, 2003)

4. ARSÉNICO: MONITOREO AMBIENTAL Y BIOLÓGICO.

4.1. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE AS EN AGUAS DE CONSUMO.

Para la evaluación de los niveles de As en aguas naturales, se necesitan metodologías de determinación de As a nivel de trazas, compatibles con el límite recomendado por la OMS anteriormente citado. Algunas tecnologías para estos estudios no están disponibles o accesibles para ciertas regiones del mundo, sobre todo en aquellos lugares con pocos recursos económicos para invertir en estos temas. Por otra parte, la mayor proporción de la población afectada por la presencia de As en agua de bebida y alimentos habita en regiones rurales o zonas urbanas dispersas, no conectadas a redes de agua potable, por lo que es fundamental el desarrollo y puesta a punto de tecnologías de abatimiento y remoción de As que sean eficientes y económicas (Litter, 2009; Litter, Sancha & Ingallinella, 2010). Los métodos analíticos para esta evaluación se describirán en detalle en este capítulo.

4.2. TOXICOCINÉTICA DEL ARSÉNICO Y EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL Y AMBIENTAL

Las principales vías de entrada del As al organismo son la ingestión, la inhalación y la absorción dérmica (ATSDR, 2011). Esto puede ocurrir tanto por exposición ocupacional o ambiental al As.

Por lo general, el As presente en el agua de bebida se encuentra como arseniato; esta especie puede ser absorbida con facilidad en el tracto gastrointestinal en una proporción entre 40 y 100% (Frederick , Kenneth & Chien-Jen, 1994).

En casos de exposición ocupacional, la inhalación es la vía de ingreso más importante del As y sus compuestos. Por esta vía, la absorción está condicionada por el tamaño de las partículas, por su solubilidad y por la especie química presente. En el aire del ambiente laboral metalúrgico predominan partículas conteniendo As (III) y su inhalación sigue las pautas de los aerodispersoides: las partículas más grandes se depositan en el tracto respiratorio superior y desde allí pueden ser removidas por las

vibras o por el mucus hacia el exterior o hacia el tubo digestivo y en éste, dependiendo de su solubilidad, se absorben bien. En el pulmón, las partículas menores de 7 μm se absorben entre 75 y 85%. El iAs en estado de oxidación (III) es más soluble en lípidos, mientras que el iAs en estado de oxidación (V) se absorbe mejor por el intestino y la absorción de ambos a lo largo de la vía digestiva, disueltos en agua, llega a 95%. Por la piel, los arsenicales húmedos se absorben bien; secos, su absorción solo alcanza 2% (Ramírez, 2013).

Cuando iAs ingresa en el organismo a través de las vías de entrada descritas anteriormente, experimenta reacciones de metilación, formándose las especies metiladas MMA y DMA, ambas menos tóxicas que las especies iAs. Se postula que el hígado es el órgano donde ocurren las reacciones de metilación del As, especialmente luego de la ingestión, cuando el As absorbido pasa inicialmente a través del hígado. Sin embargo, la mayoría de los tejidos parecen tener capacidad de metilación de As. La mayor cantidad de actividad metilante del As se encuentra en el citosol de los riñones, del hígado y del pulmón (Vahter, 2001).

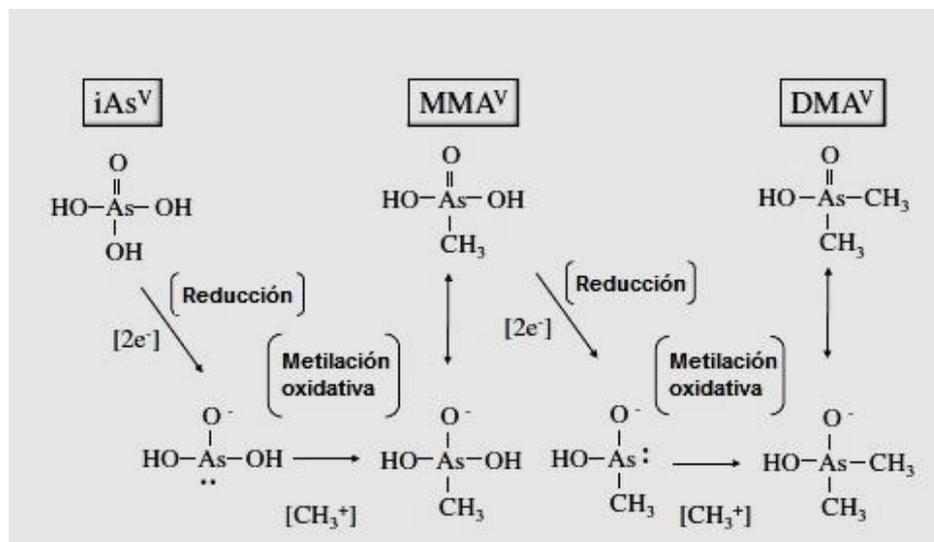


Figura 1.5 Reacciones de metilación del As(V) en el organismo. Adaptado de (Watanabe & Hirano, 2013).

El mecanismo postulado para la formación de las especies metiladas MMA y DMA, puede observarse en la figura 1.5 y consiste en una reducción del As(V) a As(III)

y una posterior metilación oxidativa, donde ocurre simultáneamente la oxidación de As(III) a As(V) y la metilación por transferencia del catión metileno (CH_3^+) desde la Sadenosilmetionina (Watanabe & Hirano, 2013).

La capacidad de metilación que presentan los individuos expuestos al arsénico en forma crónica, se ha vinculado con la gravedad del desarrollo de enfermedades asociadas. Los estudios más recientes han sugerido que el desarrollo de patologías humanas asociadas con la exposición crónica al arsénico como la hipertensión, lesiones y cáncer de piel, y cáncer de vejiga, no sólo están determinadas por la dosis de exposición sino por la capacidad de metilación y patrones metabólicos de los individuos (Tseng, 2007). En las recientes revisiones de Tseng (2007) y Hughes *et al.* (2011) sobre la influencia del As ambiental y las variables individuales en la metabolización del As, se establece que los sujetos expuestos al As, muestran una variación importante inter-individuo en los patrones de concentración de los metabolitos urinarios de arsénico. Esta variación inter-individuo en la metilación del As, puede ser en parte la responsable de la variación en la susceptibilidad a la toxicidad del As. De acuerdo a esta evidencia, se ha investigado sobre las posibles causas de esta marcada variación en el metabolismo entre los individuos y poblaciones considerando el polimorfismo genético en la regulación de las enzimas involucradas en el metabolismo del As (Hughes *et al.*, 2011).

La orina es la ruta principal para la excreción de iAs. Éste se excreta como una mezcla de 10-30% de iAs sin cambios, 10-15% de MMA y 50-70% de DMA (Vahter, 2001; Hughes, 2006). La principal prueba diagnóstica de laboratorio para una exposición reciente de arsénico es su determinación en orina como biomarcador. (ATSDR, 2009).

Dentro de las especies orgánicas naturales, la arsenobetaína tiene una toxicidad muy baja y hasta el momento no hay evidencia de que sea metabolizada por los seres humanos, siendo rápidamente absorbida y excretada en la orina (OMS, 2010; Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2016). En un trabajo realizado por Thomas & Bradham (2016), después de la ingestión de mariscos, la AsBet representó alrededor del 40% del aumento de la concentración total de As en la orina, por lo cual

no solo hay que considerar la exposición al As ambiental, sino los hábitos alimenticios de los individuos en torno a los pescados y mariscos.

La figura 1.6 presenta un esquema del metabolismo y la excreción del iAs y de la AsB.

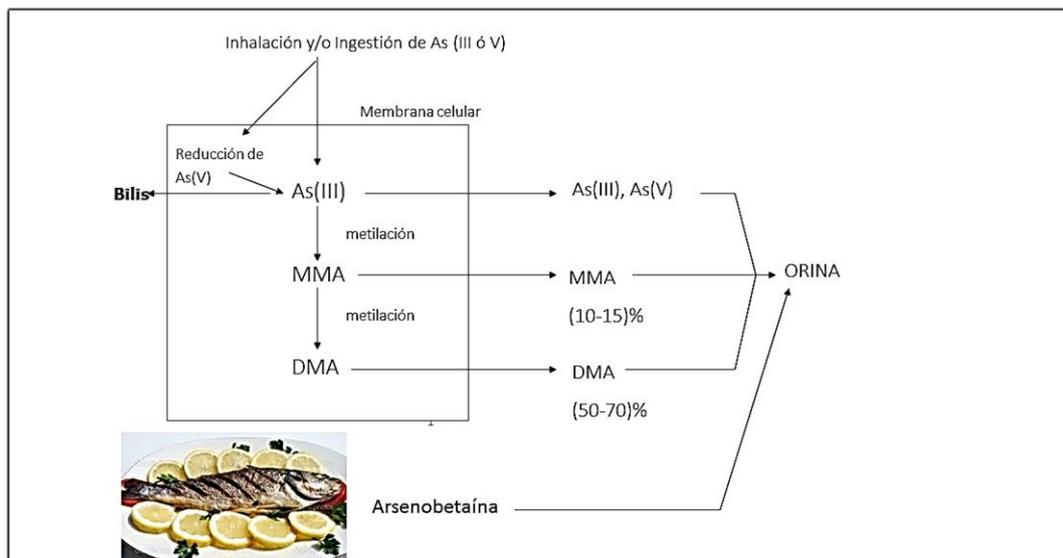


Figura 1.6 Esquema del metabolismo y la excreción de iAs y AsB

Debido a que como fue mencionado anteriormente, las especies orgánicas presentes en alimentos marinos son de baja toxicidad, su presencia en orina puede que no represente un riesgo a la salud significativo. Por tanto, la especiación de As urinario en formas orgánicas e inorgánicas y aún en sus estados de oxidación, aporta información fundamental para evaluar el riesgo de exposición a iAs (Hughes, 2006). En Estados Unidos se realizó una Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2003-2004) en la cual se midieron los niveles de arsénico total en orina y los niveles de las diferentes especies de arsénico en una muestra representativa de la población. Los resultados revelaron la existencia de exposiciones de fondo en la población estadounidense con contribuciones de arsénico inorgánico y de arsénico relacionado con mariscos. Se constató que si se observaba un incremento en los niveles de arsénico total en orina desde menos de 20 a 20-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e incluso mayores de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, un alto porcentaje del arsénico total en orina se debía a la arsenobetaina (arsénico de los peces) (ATSDR, 2009).

Por lo tanto, la biomonitorización ocupacional y varias investigaciones se han centrado en la determinación de la suma de arseniato, arsenito, DMA y MMA como un parámetro de la exposición a iAs con el fin de evitar la contribución de las especies orgánicas de As (predominantemente AsB) proveniente del consumo de ciertos alimentos, como los alimentos marinos (CDC, 2016).

En esa misma línea, la American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) recomienda la determinación de iAs más sus metabolitos metilados en la orina para estimar el riesgo real de exposición a iAs con un nivel máximo recomendado de $35 \mu\text{g L}^{-1}$. Por lo tanto, se ha establecido que sean las denominadas "**especies toxicológicamente relevantes**" las que se cuantifican en la orina (**As(III) + As(V) + DMA + MMA**), para el biomonitoreo y la evaluación del riesgo de los trabajadores expuestos a fin de prevenir efectos adversos o intervenciones médicas (ACGIH, 2016; Ng, 2005). A los efectos de su referencia en esta tesis, se le denominará **As-U** a la suma de las concentraciones de estas especies de As determinadas en orina.

5. CCA: SITUACIÓN ACTUAL

Se conoce como CCA a un grupo de plaguicidas que contienen óxidos de cromo, cobre y arsénico; la sigla CCA corresponde a la inicial de los elementos químicos de los óxidos que lo componen: **C**romo, **C**obre y **A**rsénico. Estos plaguicidas protegen la madera contra las termitas, hongos y otras plagas que pueden degradar o amenazar la integridad de productos de madera.

El CCA se ha usado para preservar diferentes tipos de madera en los Estados Unidos desde 1940 (US EPA, 2008).

Desde la década del 70 hasta principios de la década de 2000, la mayoría de la madera utilizada en los Estados Unidos en entornos residenciales al aire libre era tratada con este tipo de preservantes. Se utilizaban, por ejemplo, para fabricar terrazas, mesas y sillas de exteriores, cercas, patios, pasarelas, paseos marítimos e incluso en juegos infantiles (US EPA, 2003).

Debido a posibles riesgos para la salud debido al contacto con la madera tratada y los residuos que puede dejar en los suelos en contacto con las maderas tratadas, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) recibió presiones de la ciudadanía de los Estados Unidos para prohibir el uso de madera tratada con CCA, sobre todo en juegos infantiles. En febrero de 2002, la US EPA anunció que los fabricantes eliminarían voluntariamente la producción de madera tratada con CCA para usos residenciales durante los siguientes dos años y en enero de 2004 la US EPA prohibió oficialmente la fabricación de objetos y muebles de madera tratada con CCA para uso residencial (US EPA, 2008).

Al día de hoy se sigue produciendo madera tratada con CCA en Estados Unidos, pero solamente para uso industrial, por ejemplo, maderas para construcción de carreteras, pilotes y postes usados para estructuras en granjas, postes utilizados en la construcción de edificios y madera aserrada utilizada para sostener estructuras residenciales y comerciales.

En la Unión Europea la situación es similar a la de los Estados Unidos, ya que, desde junio de 2004, el uso de madera tratada con CCA se ha visto severamente reducido con una modificación de la Directiva 76/769/CEE de la Unión Europea. Esta

enmienda señala que los compuestos de As no pueden utilizarse en la conservación de la madera y que la madera así tratada no podrá comercializarse. Las únicas excepciones son las maderas para uso industrial en que la integridad estructural de la madera sea necesaria para la seguridad humana o ganadera y en las cuales el contacto de la piel de las personas sea improbable durante su vida útil (Official Journal of the European Communities, 2003). Se prohibió el uso de madera tratada con CCA en construcciones residenciales o domésticas, sea cual fuere el propósito.

Esta enmienda de la Unión Europea es la consecuencia de una evaluación de riesgos realizada por la Dirección General de Empresa de la Comisión Europea que identifica una serie de riesgos inaceptables, incluidos los riesgos para los niños en juegos de madera tratados con CCA, los riesgos ambientales derivados de la combustión y los riesgos para la salud derivados del uso de madera tratada con CCA (Department for Environment, Food and Rural Affairs, DEFRA, 2003; Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, CSTEE, 2003)

En Canadá también el CCA se retiró voluntariamente del uso en aplicaciones residenciales el 31 de diciembre de 2003 y sólo puede utilizarse para productos de madera industrial (Environment and Climate Change Canada, 2014).

Existen diferentes alternativas al uso de CCA, aunque generalmente son más caras, como cobre alcalino cuaternario (ACQ), boratos, cobre azole (CA), entre otros. Actualmente el ACQ es ampliamente utilizado como conservante de madera para aplicaciones residenciales (US EPA, 2016).

En Uruguay, sin embargo, así como en la mayoría de los países de Latinoamérica, no existen restricciones en cuanto al uso de maderas impregnadas con CCA.

Como se describirá más adelante, existen varias empresas que impregnan madera con CCA en nuestro país, comercializando sus productos a nivel local y para exportación. Existen muy pocas empresas que comercializan madera tratada con ACQ a nivel local.

5.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CCA

Existen tres formulaciones de CCA descritas por la American Wood Protection Association denominadas A, B y C y que varían en el porcentaje de sus diferentes compuestos, como se observa en la tabla 1.4. El tipo A es rico en cromo, el B es más rico en arsénico, mientras que el C es intermedio entre los otros dos tipos. Solo el tipo C está ampliamente difundido por su excelente fijación a la madera a raíz de la completa reacción química con la celulosa y la lignina (AWPA, American Wood Preservers' Association, 1996).

Tabla 1.4 Composición del CCA según sus diferentes tipos (AWPA, 1996).

	CCA-tipo A	CCA-tipo B	CCA-tipo C
Cromo (expresado como CrO ₃)	65,5%	35,3%	47,5%
Cobre (expresado como CuO)	18,1%	19,6%	18,5%
Arsénico (expresado como As ₂ O ₅)	16,4%	45,1%	34,0%

Se comercializa generalmente como solución acuosa diluida, pero existe formulación en polvo. La formulación en polvo minimiza los riesgos durante el transporte y almacenamiento del producto, pero su utilización en planta requiere de mayor manipulación de los operarios, por lo que en muchos países no está autorizada su comercialización y no hay oferta de esta formulación en Uruguay. La formulación en pasta sería una alternativa de menor riesgo para el transporte y almacenamiento, aunque su manipulación para preparar la solución presenta riesgos similares a la formulación líquida (Guía de Buenas Prácticas, Tomo 1, 2007).

El CCA generalmente es adquirido por las plantas de impregnación, en forma de solución concentrada al 60%, envasado en tambores que pueden ser plásticos o metálicos. Este concentrado se diluye entre 1 y 3,5% dependiendo fundamentalmente del tipo de madera a tratar. Esta dilución se realiza trasvasando el concentrado a un tanque y diluyéndolo con agua hasta alcanzar la concentración deseada.

5.2. PROCESO DE IMPREGNACIÓN DE MADERA CON CCA

El proceso de impregnación de madera con CCA más utilizado es denominado “vacío-presión-vacío”, realizado en autoclaves (Guía de Buenas Prácticas, Tomo 2, 2007).

El autoclave cilíndrico de metal se coloca en posición horizontal como puede observarse en la figura 1.7. Debe soportar un vacío de aproximadamente 700 mm Hg y una presión en el entorno de 12 kg/cm². Dadas estas exigencias de presión y vacío, los recipientes son diseñados y construidos bajo las normas de la American Society of Mechanical Engineers (ASME, 2013).

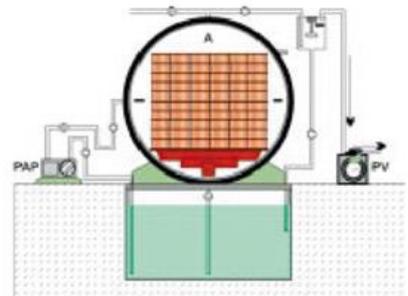
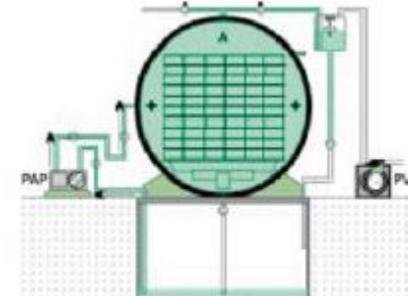
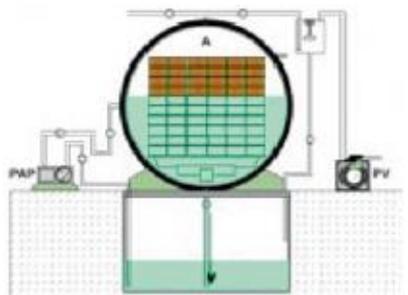
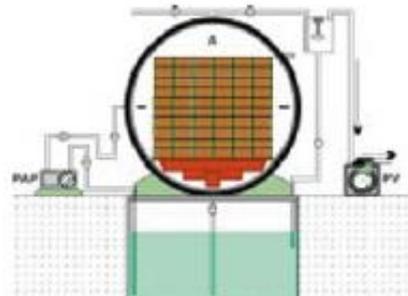
La función del autoclave es contener el líquido preservante y la madera para someterla al proceso de vacío – presión – vacío. Sus dimensiones son, en general, de 10 m de largo, 1 m de diámetro, con un volumen interior en el entorno de los 8000 L. El autoclave cuenta con una puerta hermética de rápido accionamiento por donde entra y sale la madera.



Figura 1.7 Autoclaves de dos empresas diferentes. (Imágenes extraídas de: <http://www.madex.es/index.php?id=295> y <http://www.madeirasmataverde.com.br/conteudo/madeira-autoclavada>)

Las principales etapas del proceso de impregnación de madera se describen en la tabla 1.5 (Guía de Buenas Prácticas, Tomo 2, 2007).

Tabla 1.5 Etapas del proceso de impregnación de madera con CCA (Adaptado de Guía de buenas prácticas en impregnación de madera, Tomo 2, 2007).

	<p>Carga del autoclave La carga la madera se coloca sobre vagonetas montadas sobre rieles; las vagonetas se introducen dentro del autoclave junto con la carga de madera. La puerta se cierra herméticamente.</p>
	<p>Vacío inicial Utilizando una bomba de vacío se logra un descenso de la presión en el interior de la madera lo que permite la posterior penetración del preservante. Tiempo: 20 a 230 min. Presión: 0,8 kg/cm²</p>
	<p>Llenado /presión La solución de impregnación diluida se canaliza desde el tanque de depósito hacia el autoclave y se aplica presión. Tiempo: 30 a 180 minutos. Presión: 10 a 12 kg/cm².</p>
	<p>Descarga de la solución Se descarga la solución de impregnación bombeándola nuevamente hacia el tanque de depósito. Se trabaja en ciclo cerrado previniendo la contaminación ambiental y haciendo el proceso más rentable.</p>
	<p>Vacío final Permite eliminar los restos de solución de impregnación remanentes. Tiempo: 20 a 40 min. Presión: 0,8 kg/cm² Al finalizar se equilibran las presiones y se procede a la apertura de la puerta.</p>



Descarga del autoclave

Existe siempre un goteo remanente de la propia madera y de la solución retenida en la estructura de las vagonetas, por lo cual los rieles por donde circulan las vagonetas deben ser colocados sobre superficies diseñadas de forma de captar dichos goteos (patios de goteo).



Curado

La madera se estiba por un lapso de tiempo tal que asegure la fijación de los productos químicos que aún no han reaccionado (aprox. 15 días).



Maquinado de la madera

Algunas empresas incluyen una serie de etapas de maquinado de la madera, que incluye entre otros la remoción de nudos, recortes, moldurado y cepillado.

5.3. VÍAS DE CONTACTO E INGRESO AL ORGANISMO

A pesar de las medidas de seguridad y prevención de riesgos para mejorar las condiciones de salud de los trabajadores que impregnan madera con CCA, las principales vías de contacto e ingreso al organismo tanto de As como de Cr durante la jornada laboral son: la vía dérmica, la vía respiratoria y la ingestión. Los trabajadores deben usar equipos de protección individual orientados a evitar la inhalación, el contacto cutáneo y la salpicadura de ojos. Se utiliza ropa adecuada, así como máscaras respiratorias con filtros, lentes de seguridad y guantes, dependiendo de la etapa del proceso de impregnación.

Si bien la absorción a través de la piel es de menor magnitud que por vía respiratoria, el principal riesgo en este proceso es la exposición cutánea al producto antes de su dilución debido a la alta concentración de sus componentes. La exposición

cutánea puede ocurrir también con el líquido diluido o con residuos de la madera y/ o con superficies contaminadas con el producto debido a pequeñas pérdidas o derrames (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Aunque los componentes del CCA no son volátiles, el ingreso al organismo por vía inhalatoria debe ser considerado en este proceso industrial, debido a la generación de nieblas del producto en varias etapas del proceso. Además, se debe considerar en aquellas etapas en las cuales se produce polvo de madera impregnada, como por ejemplo en las etapas del maquinado de la madera posteriormente a su impregnación.

La ingestión puede ocurrir si se fuma, come, se toma mate o se bebe en el lugar de trabajo o en el entorno inmediato, prácticas que están prohibidas. También sucede si no se cumplen las medidas higiénicas adecuadas (lavado riguroso de manos) previo al ingreso a la zona de comedor (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Diferentes autores estudiaron estas vías de ingreso al organismo en trabajadores de la industria de la madera.

Takahashi *et al.* (1983) realizaron un relevamiento de la exposición a CCA de trabajadores de ocho plantas de impregnación de madera en Hawái. En este trabajo encontraron que los trabajadores utilizaban protecciones adecuadas como guantes de goma, delantales de goma, botas y protección respiratoria y que debido a que las plantas están equipadas con un ciclo de tratamiento programado, estos operadores no se exponen a la solución de CCA hasta que la madera tratada se extrae del cilindro. En este estudio los autores manifiestan que la mayor vía de exposición de estos trabajadores es la inhalatoria (Takahashi, Pfenninger & Wong, 1983).

Garrod *et al.* (1999) estudiaron la exposición por vía dérmica y por vía inhalatoria de los trabajadores expuestos al CCA en plantas industriales del Reino Unido que usaban productos de base acuosa y el proceso de impregnación de vacío-presión-vacío. Los resultados mostraron una baja absorción por vía dérmica y que la exposición por inhalación no era riesgosa si se utilizaban las protecciones personales adecuadas. En esta investigación se sugiere que la ropa de trabajo debería ser cambiada más frecuentemente que lo que habitualmente se hace, que es una vez a

la semana, ya que la ropa tiende a ir absorbiendo CCA a lo largo de la semana laboral, por lo que la piel tendrá cada vez más contacto con el producto a medida que transcurren los días. También observaron que las malas condiciones higiénicas antes de comer o fumar pueden contribuir a la absorción por ingestión como una vía secundaria de exposición (Garrods, Martínez, Pearsons & Proud, 1999).

En otro trabajo, Garrod *et al.* (2001) estudiaron la transferencia de los contaminantes cuando los trabajadores se sacan los guantes y se los vuelven a poner para continuar alguna operación. El uso de guantes ya contaminados en su interior tiende a dar exposiciones dérmicas más elevadas, por lo que se recomienda el reemplazo regular de los guantes o usarlos una sola vez, para reducir el potencial de dicha exposición (Garrod, Phillips & Pemberton, 2001).

5.4. IMPREGNACIÓN DE MADERA CON CCA EN URUGUAY Y MARCO LEGAL

A nivel nacional, el CCA está comprendido, como otros productos químicos tóxicos, en el Capítulo II: Riesgos Químicos, del Decreto 406/1988, que refiere a la identificación, etiquetado y simbología a utilizar en los recipientes, envases, instalaciones y tuberías que lo contengan (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

También está comprendido en el Decreto 183/1982: Prevención y control de riesgos profesionales por sustancias o agentes cancerígenos, ya que posee compuestos de arsénico y cromo los cuales se encuentran listados en la tabla IV de sustancias o agentes cancerígenos de este decreto.

El artículo 5 de dicho decreto establece: *“Prohíbese el uso o empleo de las sustancias enumeradas en la Tabla Anexa IV, salvo cuando se asegure a los trabajadores ocupados niveles óptimos de higiene ambiental y se les provea previamente a la ejecución de sus tareas de los elementos de protección personal contra inhalación de las sustancias cancerígenas y/o el contacto con dichos agentes. Los trabajadores deberán cumplir las órdenes que se les impartan para su seguridad, así como usar los elementos de protección. La desobediencia o el incumplimiento de las obligaciones a que se refieren los incisos anteriores dará lugar a la imposición de las sanciones*

previstas en el reglamento interno de la empresa.”

En el artículo 8: *“El propietario o la persona responsable de la dirección de los Establecimientos (...) queda obligado a comunicar al Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, información completa sobre: A) naturaleza de la sustancia o agente caracterizado como cancerígeno por este decreto utilizado en el establecimiento; B) la finalidad de uso; C) nombre, edad y número de los trabajadores expuestos a sus efectos; D) duración y niveles de exposición; E) medidas que ha adoptado o se propone adoptar para sustituir dichas sustancias o agentes o reducir al mínimo los riesgos derivados de su exposición; F) información y adiestramiento que brinda a sus trabajadores acerca de los peligros de dichas sustancias y su forma de evitarlos; G) exámenes médicos periódicos e investigaciones biológicas que proporciona a sus trabajadores”* (Decreto 183/1982, 1982).

Por otra parte, según la ordenanza 145 del Ministerio de Salud Pública (MSP) acerca de la obligatoriedad de exámenes preventivos, límites y periodicidades, se establece *“el esquema básico referente a los diversos factores de riesgo químicos y físicos, los respectivos controles y análisis médicos, así como la determinación de los períodos específicos para cada caso, a que deben ser sometidos todos los trabajadores que se desempeñan en forma permanente o transitoria, retribuida o no, en establecimientos públicos o privados de naturaleza industrial, comercial o de servicio, cualquiera sea su actividad o finalidad, instalados o que se instalen en el futuro”* (Ordenanza N°145/009, MSP, 2009).

En el caso del As y del cromo (Cr) se resume el plan de vigilancia sanitaria en la tabla 1.6.

Tabla 1.6 Extraído de tabla de “Vigilancia sanitaria de exposición a factores de riesgo químicos” de la ordenanza 145 del Ministerio de Salud Pública.

Exposición	Monitoreo biológico	Periodicidad	Valor de referencia (BEI)	Observaciones
Arsénico	Arsénico urinario	Semestral	35 µg L ⁻¹	Final de la semana laboral
Cromo Total	Cromo urinario	Semestral	25 µg L ⁻¹	Final de la jornada, finalizando la semana de trabajo
	Cromo urinario		10 µg L ⁻¹	Incremento durante la jornada

Vale aclarar, que la ACGIH desde el año 2008 y hasta la última publicación del 2016, establece que el BEI® (Biological Exposure Index), para el control de As a nivel ocupacional es de 35 µg L⁻¹ de arsénico inorgánico más sus metabolitos metilados (As(III) + As(V) + MMA + DMA) o “especies toxicológicamente relevantes”, determinado en orina recolectada al final de la semana laboral. Los BEI son valores de referencia destinados a guiar la evaluación de riesgos potenciales para la salud en la práctica de la higiene industrial.

La tabla de vigilancia del MSP no ha sido actualizada desde el año 2009. Existe una inconsistencia entre la tabla del MSP, que indica monitorear arsénico urinario (que es arsénico total en orina) y la recomendación de la ACGIH que establece monitorear especies toxicológicamente relevantes.

En el año 2006, en el marco del proyecto Mercosur de Competitividad y Medio Ambiente, se realizó un relevamiento y diagnóstico de las empresas del sector de impregnación de madera en el Uruguay identificándose una serie de debilidades, para las cuales se proyectó la ejecución de un plan de acción tendiente a minimizar los riesgos para el ambiente y la salud de los trabajadores. En el relevamiento se identificaron en Uruguay 15 empresas instaladas en 8 departamentos que utilizaban la misma tecnología, desarrollándose para ellas una guía de buenas prácticas, cuya aplicación permitiera minimizar los impactos sobre el ambiente, la salud y potenciara la competitividad de las empresas.

En el año 2007 se publicó la “Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera” integrada por el Tomo I: “Seguridad y Salud Ocupacional” y Tomo II: “Gestión

Ambiental y Producción más Limpia” (Figura 1.8).

Participaron en su desarrollo el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente a través de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA), el Ministerio de Salud Pública, el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay y el sector industrial de impregnación de madera, entre otros.



Tomo 1: Seguridad y Salud Ocupacional



Tomo 2: Gestión Ambiental y
Producción más Limpia

Figura 1.8 Portadas de la Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera. Tomo 1: Seguridad y Salud Ocupacional; Tomo 2: Gestión Ambiental y Producción más Limpia”

En suma, en nuestro país el biomonitoreo de Cr y As en orina es obligatorio para los trabajadores expuestos a CCA y se debe realizar dos veces al año. Cuando uno o ambos biomarcadores son más altos que los límites de ACGIH, se debe seguir un protocolo, que indica que, el trabajador debe ser retirado de sus actividades de trabajo y el análisis se repite 15 días después. Mientras tanto, es necesario buscar las razones que pueden haber llevado a esos niveles fuera de las especificaciones y luego llevar a cabo una evaluación higiénica y las correspondientes acciones correctivas (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Este análisis de biomonitoreo se realiza en la Universidad de la República, en Montevideo, en el Centro Especializado de Toxicología Química (CEQUIMTOX) en la Facultad de Química. El CEQUIMTOX realiza monitoreo biológico de exposición a contaminantes químicos y ambientales. Este laboratorio toxicológico obtuvo la certificación ISO 9001: 2001 (y sus correspondientes actualizaciones) en sistemas de

gestión de calidad en Uruguay y obtuvo la acreditación ISO / IEC 17025: 2005 para algunos ensayos. Desde 2001, las autoridades sanitarias lo han considerado como el laboratorio de referencia del país para realizar vigilancia e investigación en salud ambiental, ocupacional y toxicológica.

5.5. EMPRESAS IMPREGNADORAS EN URUGUAY

En la última década, las prioridades gubernamentales han sido la promoción de una producción maderera de buena calidad, así como la diversificación de las industrias madereras para aumentar la producción de productos de mayor valor añadido (Dieste, 2012). La actividad forestal en Uruguay ha crecido de manera constante en los últimos 25 años. En la figura 1.9 puede observarse la superficie del país destinada a la forestación en el año 2011. En los últimos años, la superficie plantada se ha multiplicado por 30, alcanzando en 2015, los 25.000 km² (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2015). Excluyendo los bosques nativos, el 73% de la superficie forestal total corresponde al género *Eucalyptus*, mientras que el género *Pinus* representa el 26% del área total (Uruguay XXI, 2017).

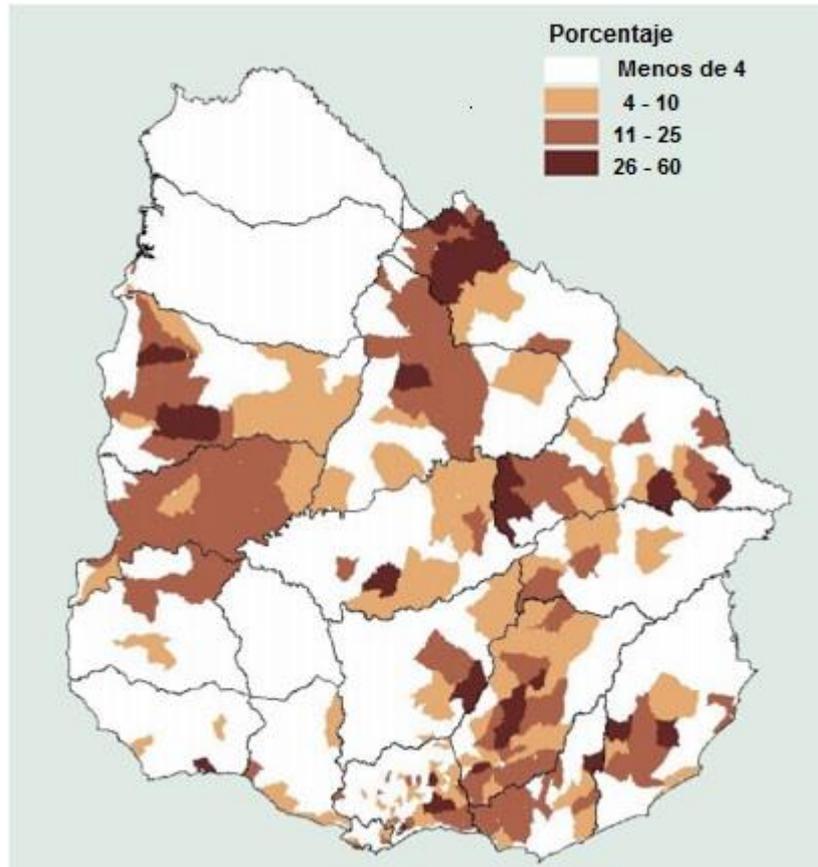


Figura 1.9 Superficie destinada a la forestación en el año 2011 (Extraído de Regiones Agropecuarias del Uruguay, Elaborado por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca; Dirección de Estadísticas Agropecuarias, 2015 <http://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/regiones/Regiones2015.pdf>)

Como se mencionó anteriormente, la conservación de la madera ha crecido constantemente entre otras industrias relacionadas con la silvicultura, con 20 plantas de impregnación de madera instaladas según un relevamiento realizado en el año 2012, produciendo 100.000 m³ de madera tratada anualmente (Dieste, 2012). La mayoría de ellas utilizan CCA como agente de conservación de la madera. En consecuencia, alrededor de 500 toneladas de CCA se importan anualmente en Uruguay (Dieste, 2015).

El producto comercial utilizado en nuestro país es el denominado CCA-C, consistente en una solución acuosa al 60%, formulado con: 28,5% de Cr expresado como CrO₃; 11,1% de Cu expresado como CuO; 20,4% de As expresado como As₂O₅ y 40% de agua (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Este producto es registrado como plaguicida de uso restringido con el nombre Wolmanac Concentrado 60%® y es importado por la firma Arch Wood Protection Inc y con el nombre MOQK33.C (Guía de Buenas Prácticas, 2007; Material Safety Data Sheet, Chromated Copper Arsenate (CCA) Treating Solution, 2009).

La Figura 1.10 muestra la ubicación de las plantas de CCA en nuestro país que pudieron relevarse mediante búsqueda web. La tabla 1.7 reúne información relevante de aquellas empresas que figuran en el mapa.



Figura 1.10 Plantas impregnadoras del Uruguay; en azul plantas de CCA, en verde ACQ (adaptado de Google Maps <https://www.google.com/maps>)

Tabla 1.7 Empresas impregnadoras de madera con CCA del Uruguay (relevamiento web realizado en marzo de 2017)

Empresa	Ubicación	Preservante	Datos de interés
Industrias forestales ARAZATÍ	San José, Carretera Arazatí.	CCA	No especifican tipo de CCA.
			http://www.arazati.com/planta-industrial/
Aserradero e impregnadora CERRO PELADO	Maldonado, Camino Nardone frente al Cerro Pelado	Wolman CCA	Posee 2 autoclaves. 40 años en plaza.
			http://www.cerropelado.com.uy/
Forestal BANCARIA CAJA	Piedras Coloradas, Paysandú; Ruta 90 km 48.500		Más de 18000 hectáreas forestadas. Exportan a más de 15 países.
			http://www.forestalbancaria.com.uy/
LIDENOR S.A.	La Floresta. Canelones; Ruta 35, Km 64.	CCA-C	CCA origen USA.
			http://lidenor.com.uy/
MATRA S.A.	PLANTA FLORES: Trinidad; Pancho Lopez 1013. PLANTA FLORIDA: Ruta 5, km 95.500.	CCA-C	Posee 3 autoclaves. Exporta a diferentes países. 72000 m ² de área industrial; potencial productivo superior a los 40000 m ³ anuales.
MADEX	Jaureguiberry. Canelones; Ruta Interbalnearia, km 76.500	Wolman CCA	
			http://www.madex.tk
OXIPAL S.A.	Paysandú; Av. Wilson F. Aldunate 2697	CCA-C	Fundada en 1963. Realizan aserrado, secado, tratamiento con CCA y moldurado de madera. Posee un autoclave.
			http://www.oxipal.com/
PROFUN S.A.	Salinas; Ruta 87 Km 49	CCA Arch Wood Protection Inc	Poseen 2 autoclaves. Impregnan desde hace 10 años.
RJ maderas – Aliral S.A.	Maldonado; Camino Lussich y Camino a la Pataia.	CCA de ARCH Química Internacional	20 años en el ramo. Poseen 2 autoclaves.
			http://www.rimaderas.com

Empresa	Ubicación	Preservante	Datos de interés
Planta forestal UTE http://www.ute.com.uy/conex/Secciones_conex/Productos/Industrial/otr_impregnacion.htm	Tacuarembó; Rincón del Bonete	CCA-C argentino	Poseen 2 autoclaves.
DON JOSÉ Barraca de maderas http://www.barracadonjose.com.uy/	Maldonado; José Miguez - Bo. Villa Delia	Wolman E (Copper Ammonium Carbonate)	
Barraca AZORES http://www.azores.com.uy/index.php/8-home/3-que-es-el-acq	Ruta interbalnearia km 48	ACQ (cobre y amonio cuaternario)	Proceso de curado artesanal por absorción.

6. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO

6.1. AS TOTAL Y ESPECIACIÓN.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) ha definido la especiación como la distribución de las especies químicas de un elemento en un sistema específico, entendiendo por especies químicas a las formas específicas de un elemento químico: composición isotópica, estado de oxidación, y/o formación de complejos o estructuras moleculares.

La especiación analítica es la separación, identificación y/o determinación de las concentraciones de una o más especies o formas individuales de un elemento químico, que constituyen la concentración total del mismo en esa matriz (Templeton *et al.*, 2000).

Aunque la determinación de la concentración total de elementos a nivel de trazas es todavía importante, el conocimiento de la especiación brinda información relevante en estudios de bioaccesibilidad, biodisponibilidad, toxicidad, movilidad y bioacumulación (Lai *et al.*, 2004; Litter *et al.*, 2009).

La figura 1.11 reúne las metodologías analíticas más utilizadas actualmente para la determinación de As total y para su especiación.

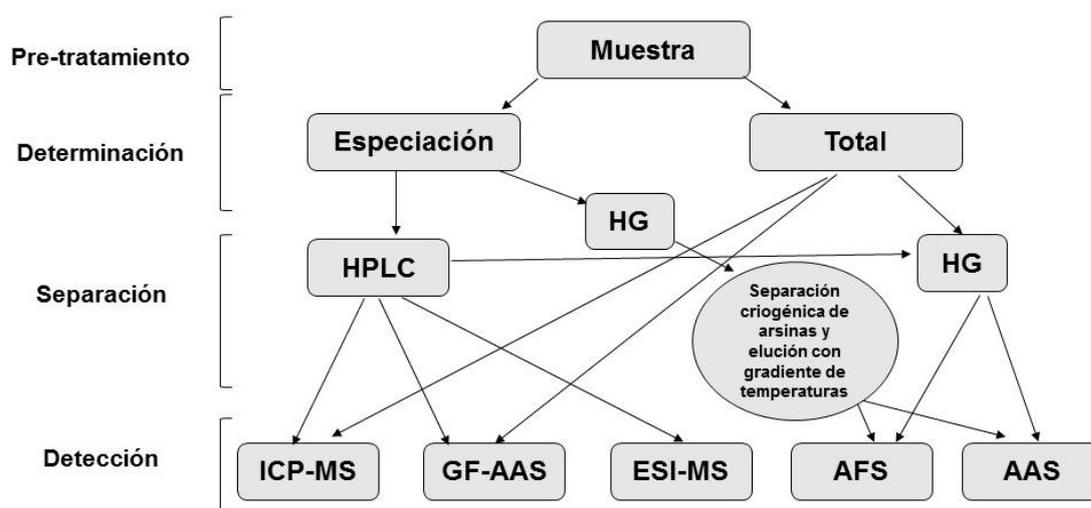


Figura 1.11 Diagrama que muestra los pasos involucrados en el análisis involucrando diferentes técnicas espectroscópicas. HPLC: cromatografía líquida de alta performance; ICP-MS: Plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas; HG-AAS: espectrometría atómica con generación de hidruros; HG-AFS: espectrometría de fluorescencia con generación de hidruros; GF-AAS: espectrometría atómica con horno de grafito (Adaptado de Brima *et al.*, 2006).

Como se observa en la figura 1.11, para la determinación de As total pueden utilizarse técnicas atómicas como ser la espectrometría atómica con atomización electrotérmica, también llamada de horno de grafito (ET-AAS o GF-AAS), la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS), la espectrometría atómica de fluorescencia con generación de hidruros (HG-AFS), la espectrometría de emisión con plasma de acoplamiento inductivo óptico (ICP-OES) y acoplada a detección de masas (ICP-MS) (Brima, Jenkins & Haris, 2006).

La mayoría de las metodologías para el análisis de especiación se basan en una separación previa de las especies, combinada con un sistema de detección que alcance bajos límites de detección.

El acoplamiento o hibridación instrumental es *“la combinación a través de una interfase de dos técnicas analíticas independientes, que genera una información única e integral de la composición de la muestra y se caracteriza por ser más completa que la información alcanzada independientemente por cada técnica”* (Valcárcel & Gómez Hens, 2003).

Dentro de los sistemas acoplados mencionados anteriormente, el más utilizado actualmente para especiación de As y considerada la técnica de referencia o *“gold technique”* es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría atómica (con o sin generación de hidruros) con detección de masas (HPLC-ICP-MS; HPLC-HG-ICP-MS) (Terlecka, 2005). Otros acoplamientos para la determinación de As total o especiación parcial también utilizados son HG-ICP-OES y HG-ICP-MS (Feldmann, 2005; Norton *et al.*, 2009; Lai, Sun, Ting, Cullen & Reimer, 2004).

Lindberg *et al.* (2007) reportaron que tanto HPLC-HG-AFS como HG-AAS son alternativas simples y de bajo costo alternativas al HPLC-HG-ICP-MS para la determinación de As inorgánico y sus metabolitos en muestras de orina con concentraciones totales de As por encima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Brima *et al.* (2006) también realizan una comparación de varias técnicas espectroscópicas frecuentemente utilizadas para determinación de As en orina (tabla 1.8)

Tabla 1.8 Ventajas y desventajas de diferentes técnicas espectroscópicas para la determinación de arsénico (Adaptado de Brima *et al.* (2006))

Técnica	Ventajas	Limitaciones
HPLC-ICP-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad alta • Bajos LD (ppt) • Amplio rango dinámico • Detección multi-elemento 	<ul style="list-style-type: none"> • Costoso • Interferencias poliatómicas
HG-AAS	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad buena • Bajos LD (ppb) • Relativamente libre de interferencias • Selectivo • Simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta sólo compuestos generadores de hidruros • (As (III), As (V), MA, DMA). No puede detectar compuestos orgánicos de arsénico como la arsenobetaina. • La generación de hidruros depende del pH
HG-AFS	<ul style="list-style-type: none"> • LD menor que HG-AAS • Relativamente libre de interferencias • Selectivo • Sencillo • Poco efecto memoria • Baja señal de fondo • Amplio rango lineal 	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta sólo compuestos generadores de hidruros • (As (III), As (V), MA, DMA). No puede detectar compuestos orgánicos de arsénico como la arsenobetaina. • La generación de hidruros depende del pH
GF-AAS	<ul style="list-style-type: none"> • Simple • Se requiere poca preparación de la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayoritariamente para arsénico total • Especiación sólo <i>off-line</i>

Brima *et al.* señalan al igual que Lindberg, los altos costos asociados al uso de ICP-MS y que tanto HG-AAS como HG-AFS son técnicas simples, de bajo costo y con límites de detección, rango dinámico y sensibilidad adecuados. Se señala como una limitación, el hecho de que ambas técnicas no detectan ciertas especies orgánicas de As (ej, Arsenobetaina), ya que estas no forman hidruros. Sin embargo, a los efectos de la determinación de las especies toxicológicamente relevantes en orina: As(III)+As(V)+DMA+MMA, esto se transforma en una ventaja, ya que se puede desarrollar una metodología adecuada para el biomonitorio de población expuesta a As según las recomendaciones sanitarias (Ordenanza N°145/009, MSP, 2009; ACGIH, 2016).

6.2. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA (ET-AAS).

En los atomizadores electrotérmicos, unos pocos microlitros de la muestra se evaporan primero a baja temperatura y luego se calcinan a una temperatura más alta en un tubo de grafito calentado eléctricamente. Tras la calcinación, la corriente se incrementa rápidamente a varios cientos de amperios, lo que eleva la temperatura a unos 2000 o 3000 °C; la atomización de la muestra se produce en un período de tiempo de unos pocos milisegundos a segundos. En estas condiciones se mide la absorción de las partículas atomizadas en la zona situada inmediatamente por encima de la superficie calentada (Skoog, Holler & Crouch, 2009).

En general, el mejor desempeño de ET-AAS para determinación de As se logra utilizando una longitud de onda de 193,7 nm con corrección de fondo Zeeman. La división y la polarización de las líneas espectrales atómicas en presencia de un campo magnético se denomina efecto Zeeman. El campo magnético no afecta a moléculas y partículas existentes en la matriz. Con el campo magnético desactivado se mide la absorbancia total y con el campo magnético activado se mide sólo el fondo (Beach, 2010).

Una muestra de líquido (5 - 100 µL) se introduce directamente en el horno, utilizando un muestreador automático. El horno de grafito se mantiene en su lugar entre dos electrodos y se alinea con la trayectoria óptica en el instrumento AAS. Se llevan a cabo tres pasos controlando la temperatura del horno: secado, pirólisis y atomización, cada uno en sus temperaturas particulares.

En general se añaden modificadores para estabilizar al analito durante la atomización. Se utiliza un gas inerte, nitrógeno o argón, para purgar el horno.

La atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito abierto en ambos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra mediante un inyector automático. Este tubo intercambiable se ajusta perfectamente a un par de contactos eléctricos que se ubican en los dos extremos del mismo. Estos contactos se mantienen dentro de un módulo refrigerado por agua. Dos corrientes de gas inerte circulan por este módulo: una corriente externa que evita la entrada de aire exterior y permite que dentro del tubo se alcance la atomización de la muestra y una corriente interna que fluye por entre los dos extremos del tubo y sale por el orificio central del

compartimiento de muestra. Esta corriente no solo elimina el aire, sino que sirve también para desalojar los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento (Figura 1.12).

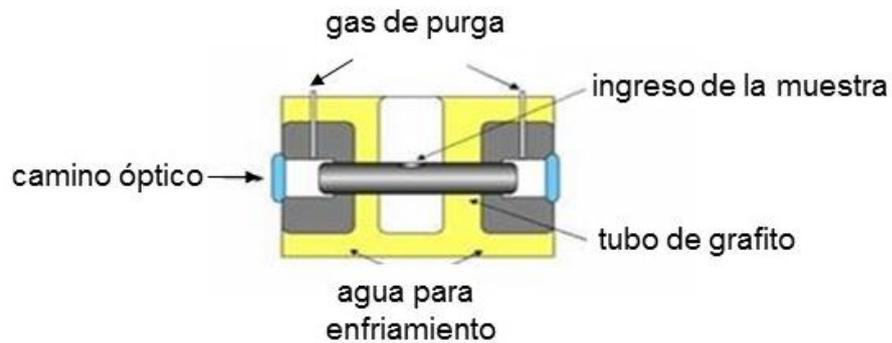


Figura 1.12 Esquema de posicionamiento del tubo de grafito.

Los tubos de grafito pueden adquirir dos posiciones distintas dentro del instrumento según la forma en que fue diseñado: en posición longitudinal o transversal respecto al haz de luz proveniente de la lámpara. Un esquema de un equipo ET-AAS puede observarse en la figura 1.13

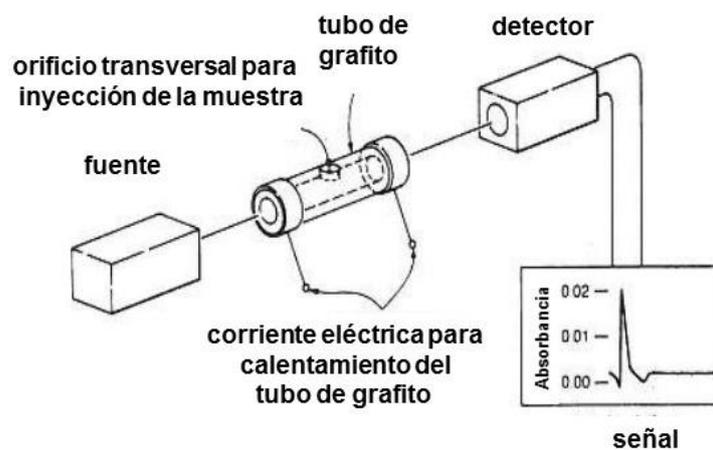


Figura 1.13 Esquema de un equipo de absorción atómica con atomización electrotérmica.

Una de las ventajas del uso de la técnica ET-AAS es que se requiere poca preparación de la muestra. Una desventaja importante, sin embargo, es que la especiación sólo puede realizarse “*off-line*” (fuera de línea), pero es adecuada para la determinación de As total y fue utilizada en esta tesis para dicho fin (Brima *et al.*, 2006).

6.3. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS (HG-AAS)

La técnica de absorción atómica con generación de hidruros puede utilizarse para determinar aquellos elementos que forman hidruros volátiles en medio ácido cuando se hacen reaccionar con un agente reductor como por ejemplo el tetrahidrobórato de sodio (NaBH_4). Este método es particularmente útil para la determinación de As, Sb, Bi y Se.

Los hidruros liberados fluyen del recipiente de reacción por medio de una corriente de un gas portador inerte (N_2 o Ar) a un tubo de cuarzo abierto en los extremos, el cual es calentado por medio de una llama de aire/acetileno. El tubo de cuarzo se monta por encima del quemador y se alinea con el haz de radiación proveniente del espectrómetro. La temperatura del tubo calentado de esta manera es tal que los hidruros se descomponen para producir átomos libres de los elementos a ser determinados e hidrógeno (Figura 1.14).

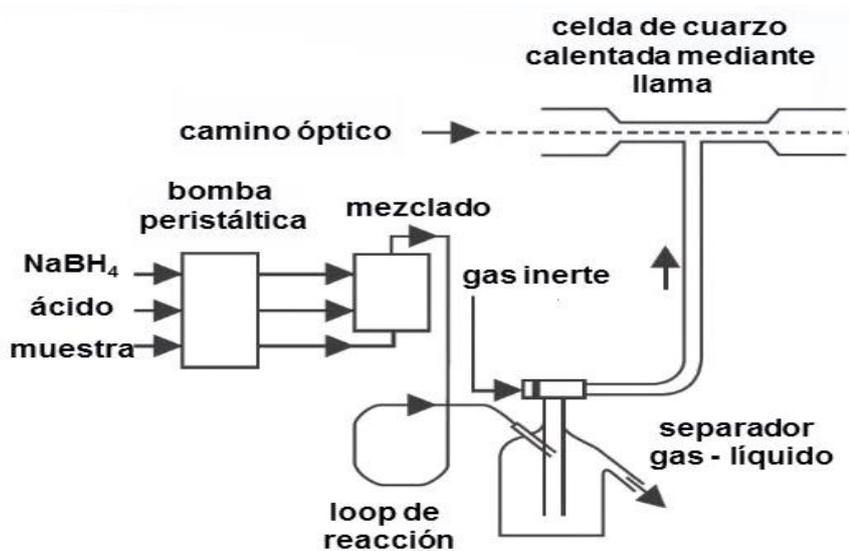


Figura 1.14 Esquema de un instrumento HG-AAS
(Modificada de <http://www.gbcsoci.com/products/aas/aa-accessories/>)

La respuesta es dependiente de los estados de oxidación de los elementos a ser determinados. Los compuestos de As deberán contenerlo en su estado (III) antes del agregado de NaBH_4 (Ramesh & Riyazuddin, 2005).

El proceso de determinación de elementos que forman compuestos volátiles por medio de cualquier método espectrométrico involucra tres pasos independientes: (1) preparación de la muestra, (2) generación del compuesto volátil y (3) atomización/detección (Dědina & Tsalev, 1995).

El primer paso involucra convertir la muestra en una disolución sin pérdidas de analito y sin contaminación. Las matrices biológicas u orgánicas se deben descomponer totalmente (digestión previa).

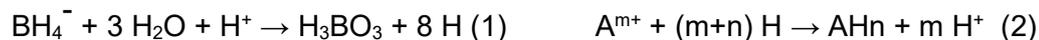
El segundo paso, la generación del compuesto volátil, consiste en la pre-reducción y en la liberación del compuesto volátil de la disolución de la muestra, y su posterior transferencia a la fase gaseosa; el transporte del compuesto liberado se realiza mediante un flujo de gas portador hacia un atomizador/detector. En el caso del As la mayoría de los procedimientos de pre-reducción emplean yoduros y/o ácido ascórbico, o L-cisteína (Dědina, 1999).

Un procedimiento típico para análisis de especies inorgánicas de As se basa en la determinación del analito en su menor estado de oxidación en una alícuota (As (III)) de la muestra y de la suma del analito en ambos estados en una segunda alícuota (As total). Luego se calcula el contenido del analito en su mayor estado de oxidación (As (V)) por diferencia (Qiu, 1995; Dědina, 1999; Sigrist & Beldoménico, 2004).

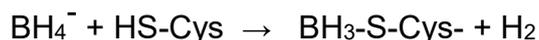
La técnica de HG-AAS se utiliza bastante en especiación de As debido a su bajo costo comparado por ejemplo con ICP-MS (Terlecka, 2005).

MECANISMOS PROPUESTOS: La formación de hidruros por medio de la reducción con tetrahidrobórato (BH_4^- / medio ácido) del analito es llevada a cabo usualmente en medio ácido (más comúnmente HCl).

En la ecuación (1) se forma hidrógeno atómico en la reacción de la descomposición del BH_4^- y en la ecuación (2) el analito se reduce de acuerdo a la reacción indicada (Welz & Sperling, 1999).

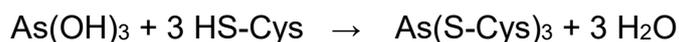


También hay numerosos artículos que describen un efecto beneficioso si se utiliza cisteína en la generación de hidruros de As, Sb y Sn (Ramesh & Riyazuddin, 2005; Pitzalis *et al.*, 2009) Se postula que la adición de cisteína a la disolución de la muestra facilita la reacción de formación de hidruros, reduce las interferencias de la fase líquida y pre-reduce las formas As (V) y Sb (V) a las correspondientes formas (III). Chen, Brindle & Le (1992) encontraron evidencia por medio de espectros UV y RMN de la formación de un complejo entre el BH_4^- y la cisteína, sugiriendo la siguiente reacción entre el grupo tiol de la cisteína (Cys-SH) y el BH_4^- :



El complejo así formado puede ser el intermediario que resulta más eficiente en la reacción de formación del hidruro. Le *et al.* (1994) presentaron una explicación alternativa al efecto significativo de la adición de cisteína a la solución de la muestra

en la generación de arsina. Mesmer y Jolly (1962), quienes estudiaron la descomposición del tetrahidrobórato (THB) en medio ácido, llevaron a cabo experimentos utilizando reactivos deuterados, algunos de estos experimentos mostraron que la reacción de As (III) y As (V) con NaBD₄ en HCl y propusieron que el ácido arsénico reacciona con cisteína para formar un complejo Cys-As(III):



Howard & Salou (1996) sugirieron que el complejo Cys-As (III) puede ser rápidamente reducido a arsina por el BH₄⁻.

El mecanismo real de la reacción de reducción aún continúa sin ser clarificado. No obstante, el mecanismo en sí no es de importancia primaria en la práctica analítica dado que hay siempre un exceso de BH₄⁻ en varios órdenes de magnitud respecto al analito (Dědina, 1999; Laborda, 2002).

Como se explicará en la sección experimental, en esta tesis se desarrollaron métodos que utilizan L-cisteína para la determinación de As.

6.4. TÉCNICAS ACOPLADAS

A continuación, se describen las técnicas analíticas acopladas más reportadas para especiación de As (Francesconi & Kuehnelt, 2004; Lindberg, Goessler, Nermell & Vahter, 2007):

HG- (CT) GC-AAS y HG- (CT) GC-AFS Generación de hidruros acoplado a *trapping* criogénico (CT) (preconcentración y separación con nitrógeno líquido).

Se trata de técnicas relativamente económicas, aplicables únicamente a las especies formadoras de hidruros. Son adecuadas para muestras de agua y orina. Las arsinas producidas se suelen atrapar criogénicamente (N₂ líquido) en un tubo que contiene soporte sólido (conteniendo fases estacionarias como las utilizadas en cromatografía), que es posteriormente calentado en forma gradual, por lo que las

arsinas atrapadas son secuencialmente volatilizadas e introducidas en el detector: AAS o AFS (Hernández-Zavala *et al.*, 2008; Matoušek *et al.* 2008; Musil *et al.*, 2014; Svoboda *et al.*, 2015).

HPLC-ICP-MS

Se trata de una técnica robusta y muy sensible. Es adecuada para muestras acuosas, para extractos acuosos de muestras ambientales y para muestras biológicas; puede detectar todas las especies de As con una respuesta esencialmente uniforme lo que facilita enormemente la cuantificación de las diversas especies. Posee muy bajos límites de detección (del orden de las partes por trillón).

Tiene como limitación que es una técnica que presenta interferencias poliatómicas (Brima, 2006) (por ejemplo, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$), pero éstas pueden ser superadas mediante el uso de celdas de reacción/colisión o analizadores de masas de alta resolución (Francesconi & Kuehnelt, 2004).

Es una técnica que está generalmente restringida al uso de fases móviles con bajo contenido orgánico por lo que no se ha aplicado todavía a la determinación de especies de arsénico no polar (por ejemplo, arsenolípidos). La asignación de las especies es por comparación cromatográfica con estándares (tiempos de retención), y por lo tanto el método depende de la disponibilidad de estándares; no proporciona información estructural y por lo tanto está muy restringida en su capacidad para identificar nuevas especies de arsénico (Francesconi & Kuehnelt, 2004). Aunque existen algunos reportes de autores que han logrado identificar arsenolípidos mediante HPLC-ICP-MS (Schmeisser *et al.*, 2005; Amayo *et al.*, 2013)

HPLC-HG-ICP-MS

Proporciona las ventajas mencionadas anteriormente para HPLC-ICP-MS con límites de detección mejorados para especies arsenicales formadoras de hidruros; principalmente utilizado para el análisis de muestras de agua o de orina que contienen mayoritariamente especies formadoras de hidruros (Francesconi & Kuehnelt, 2004).

HPLC-ESMS y HPLC-ESMS-MS

Cada vez más se utiliza para confirmar la identificación de especies de arsénico, y proporcionar información estructural sobre nuevos compuestos de arsénico; pueden sufrir importantes efectos por matriz y la cuantificación es dificultosa (Francesconi & Kuehnelt, 2004).

HPLC-HG-AAS y HPLC-HG-AFS

Puede utilizarse para aquellas especies formadoras de hidruros (no detecta arsenobetaina (AsB)). Se han aplicado principalmente a muestras de agua y muestras de orina porque éstas contienen principalmente As(III), As(V), MMA y DMA que son todas formadoras de hidruros, en mayor o menor extensión bajo condiciones adecuadas. Cuando se utiliza con fluorescencia atómica como detección el método tiene límites de detección casi comparables con aquellos obtenidos mediante HPLC-ICP-MS (Francesconi & Kuehnelt, 2004).

La principal limitación de utilizar HG-AAS es la necesidad de grandes volúmenes de muestra lo que lo hace menos adecuado para acoplar directamente a HPLC y para el análisis de la especiación.

Los métodos que utilizan AFS y AAS son menos costosos que ICP-MS y por lo tanto pueden ser una elección en entornos donde el alto costo de ICP-MS no está justificado en relación con el uso previsto del instrumento (Lindberg, 2007).

En esta tesis se desarrolló un sistema acoplado como herramienta tecnológica para la determinación de especies de As en agua que podrá ser utilizado también para la determinación de especies en orina.

7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método solo puede ocurrir después que éste ha sido desarrollado y optimizado; la etapa de optimización requiere muchas veces el mayor esfuerzo y tiempo, sin embargo, no es un proceso aislado de la validación ya que muchas veces la optimización y validación se superponen en algún momento. Además, la validación no es solamente evaluar que se cumplan determinados requisitos (parámetros de desempeño o cifras de mérito) sino también la adecuación del nuevo método a la aplicación buscada (*fit for purpose*), saber cuáles son las limitaciones que tiene e identificar las variables de influencia que rigen el proceso.

Existen diferentes definiciones acerca de lo que es el proceso de validación:

- “Establecer evidencia documentada que provea un alto grado de certeza de que un proceso específico producirá de modo consistente un producto que cumpla ciertas especificaciones predeterminadas y atributos de calidad”. US FDA “*General Principles of Validation*” (1987)
- “Confirmación mediante el examen y la aparición de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista”. ISO 8402.
- “Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista”. OUA - Organismo Uruguayo de Acreditación.

En el pasado, la validación de un método se caracterizaba sólo por la evaluación de las características de rendimiento o desempeño (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014)

Como ya se mencionó, un proceso o método analítico se valida para demostrar la calidad de los resultados analíticos y para demostrar su adecuación al uso. Para validar se establecen parámetros de desempeño del método (evaluados mediante cifras de mérito), definiendo cuales son importantes para caracterizarlo y estableciendo valores límites o especificaciones para cada una de las cifras de mérito seleccionadas de acuerdo al propósito para el que se aplicará el mismo. Existen guías

que se pueden utilizar para el diseño de una validación, como por ejemplo las guías de las siguientes organizaciones: *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *United States Environmental Protection Agency (US EPA)*, *United States Food and Drug Administration (FDA)*, *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, Dirección General de Sanidad y Protección del Consumidor de la Comunidad Europea (DG-SANCO) y *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods*.

Según la guía Eurachem, utilizada como referencia para todos los ensayos de validación de esta tesis, para validar un nuevo método se deben evaluar los siguientes parámetros de desempeño (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014):

- Intervalo lineal y de trabajo
- Sensibilidad
- Límite de detección y límite de cuantificación
- Precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad)
- Selectividad / Especificidad
- Veracidad (sesgo, recuperación) / Exactitud
- Robustez
- Incertidumbre de medición

Estrictamente, la incertidumbre de medición no es una característica de rendimiento de un procedimiento de medición particular, sino una propiedad de los resultados obtenidos usando ese procedimiento de medición, pero debe evaluarse para completar la caracterización del método.

INTERVALO LINEAL Y RANGO DE TRABAJO

La linealidad define la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración del analito, en un rango de concentraciones definido. El intervalo de concentraciones del analito de interés dentro del cual los valores de la magnitud medida son proporcionales a la concentración del analito, se define como el intervalo lineal (Inczédy *et al.*, 1998).

El intervalo de las concentraciones analíticas sobre las cuales el método va a ser aplicado es el intervalo de trabajo. Se refiere al intervalo de concentraciones en las disoluciones medidas realmente, no a las muestras originales.

La función matemática de calibración $y = f(x)$ se obtiene mediante el ajuste de los datos experimentales a un modelo matemático adecuado.

La función de calibración más conveniente es la lineal:

$$Y = aX + b$$

$$a = \frac{N \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad b = Y - aX$$

Y = señal medida o respuesta

X = variable independiente

a = pendiente

b = ordenada

El proceso analítico debe realizarse sobre el blanco y patrones o muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración. Es conveniente realizar la determinación a por lo menos 6 niveles de concentración más el blanco para construir una curva de calibración, dicha curva se construye graficando la respuesta de la medición (eje y) en función de la concentración (eje x).

Posteriormente se debe realizar una inspección visual para identificar el intervalo lineal aproximado y los límites inferiores y superiores del intervalo de trabajo, o rango de trabajo (Figura 1.15).

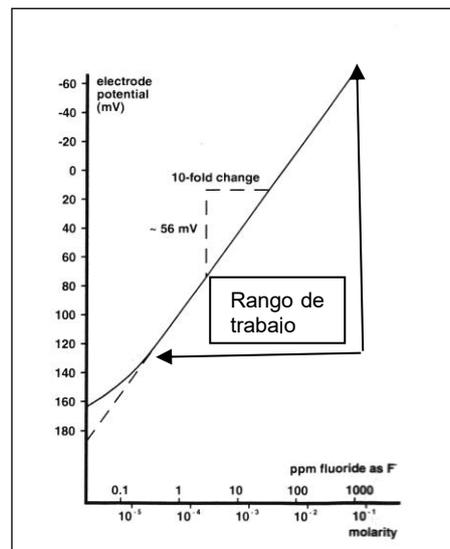


Figura 1.15 Ejemplo de selección del rango de trabajo.

Para validar el modelo lineal se pueden aplicar métodos matemáticos y visuales.

El método más frecuentemente utilizado para estimar los coeficientes de un modelo de regresión es el de mínimos cuadrados (Ramis y García, 2001). Un ensayo estadístico que suele usarse es el test de *lack-of-fit* (LOF) este test permite detectar la falta de ajuste y si las suposiciones del modelo son correctas.

SENSIBILIDAD

Sensibilidad de calibración (o simplemente sensibilidad) es la pendiente de la curva de calibración (Inczédy *et al.*, 1998).

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

La mínima señal detectable (S_m) se puede definir (en base a la relación señal / ruido: S/N) con distintos criterios. En forma general se define en base a una relación $S/N = k$. El ruido se estima con la desviación (σ) de la señal del blanco $\Rightarrow S_m = k sB$. Se usa habitualmente $k = 3$ (o 3,3 en otras referencias) $\Rightarrow S_m = 3 sB$

El límite de cuantificación LC (LOQ: *Limit of Quantification*) es la menor concentración o masa que puede ser cuantificada a un nivel de confianza especificado. Entre el LD (LOD: *Limit of Detection*) y el LC podemos afirmar que el analito está presente pero no podemos informar su concentración. Por encima del LC

se puede informar un valor de concentración. El LC también depende de la precisión (relación señal / ruido) y se calcula de modo similar al LD.

Para calcular el límite de detección se sugiere realizar la determinación sobre 10 blancos de muestra independientes medidos una vez cada uno, esto solo es útil cuando la medida del blanco da una desviación estándar diferente de cero (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014).

Cuando la desviación estándar del blanco vale cero, como alternativa se sugiere medir 10 blancos de muestra independientes fortificados con la menor cantidad de analito aceptable, medidos una vez cada uno (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014).

Luego de obtener estas medidas se calcula la desviación estándar y se expresa el límite de detección como la concentración correspondiente a $3s$ (3 veces la desviación estándar) de la medida promedio del blanco o de la medida de la disolución de mínima concentración de analito según corresponda el caso. La media y la desviación estándar del blanco son dependientes de la matriz del blanco, consecuentemente, el límite de detección, será dependiente de la matriz.

El límite de cuantificación es la concentración mínima del analito en una muestra que puede determinarse con un nivel de incertidumbre aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas. “Es una característica de desempeño que señala la habilidad de un proceso de medición química, para cuantificar adecuadamente” (Inczédy *et al.*, 1998).

Como ocurre con el límite de detección en este caso también existen diferentes alternativas para obtener este valor. Análogamente al cálculo del límite de detección se sugiere realizar la determinación sobre 10 blancos independientes medidos una vez cada uno, calcular la desviación estándar de estas medidas multiplicarla por el valor de k asignado (habitualmente 10) y obtener el valor de concentración correspondiente (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014). O también se puede fortificar alícuotas del blanco de muestra a varios niveles de concentración cercanos al límite de detección, (esto implica preparar por ejemplo 10 disoluciones a cada nivel de concentración y medir una vez cada uno) y luego calcular la desviación

estándar a cada nivel de concentración (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014).

Cabe destacar que el límite de cuantificación normalmente forma parte del estudio para determinar el intervalo de trabajo. Éste no deberá determinarse por extrapolación por debajo de la concentración más baja del blanco fortificado. Estos cálculos son útiles también para tener idea de la precisión a este nivel de concentración.

PRECISIÓN (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad)

Es el grado de concordancia de los resultados de una serie de medidas de una muestra o un estándar (preferentemente una muestra). Se relaciona con la dispersión. Se estudia a tres niveles:

- **Repetibilidad:** Análisis repetido varias veces dentro de un mismo laboratorio, por un mismo operador con el mismo equipo en un corto período de tiempo. La única variable es el tiempo. Todo lo demás debe permanecer incambiado. Habitualmente se repite la determinación analítica completa, sobre alícuotas de la misma muestra. La guía Eurachem recomienda al menos 6 determinaciones con muestras reales.
- **Precisión intermedia:** Variabilidad a largo plazo del proceso de medición (semanas). Pueden variar: operadores; modalidad de trabajo; instrumento; proveedores de reactivos y estándares. Se intenta demostrar que dentro de un mismo laboratorio el procedimiento producirá los mismos resultados cuando esté en uso de rutina.
- **Reproducibilidad:** Representa la precisión obtenida al repetir el análisis de alícuotas de la misma muestra en diferentes laboratorios. Consiste en probar si el procedimiento dará los mismos resultados en diferentes laboratorios (“se podrá reproducir”): se analizan alícuotas de lotes homogéneos de un material, con diferentes analistas, en diferentes laboratorios (y países), con condiciones ambientales diferentes.

La precisión es dependiente de la concentración del analito, por tanto, si es relevante debe establecerse la relación entre la precisión y la concentración de analito

Para calcular la precisión entonces, se deben realizar medidas repetidas de material de referencia, blanco, patrones a diferentes niveles de concentración (típicamente 10 medidas según la guía Eurachem) y calcular la desviación estándar en las condiciones especificadas (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014).

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

En las recomendaciones de IUPAC del año 2001 el término se ha definido como “la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar” (Vessman *et al.*, 2001).

Es común que en publicaciones científicas se confunda el término selectividad y especificidad, pero son cosas distintas. “El término especificidad sugiere que ningún componente distinto del analito contribuye al resultado; específico es considerado como 100% selectivo, lo cual significa que no habrá interferencias” (Vessman *et al.*, 2001). IUPAC en sus recomendaciones del año 2001 indica que el término especificidad ni siquiera debería utilizarse (Vessman *et al.*, 2001).

Según la guía Eurachem, la selectividad es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes de la matriz de la muestra bajo condiciones de prueba establecidas. La guía también se refiere al concepto de confirmación de identidad o el establecimiento de que la señal producida en la etapa de medición, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente a él y no a la presencia de algo química o físicamente similar.

Pero más allá de todas estas definiciones la cuestión es qué hacer para evaluar selectividad y especificidad. Primero evaluar el tipo de técnica instrumental a utilizar para la determinación del analito en cuestión y estudiar cuales son las posibles interferencias inherentes al uso de esa técnica (absorción atómica, cromatografía) en función de los fenómenos físicos o químicos en los que se basa.

En lo posible es deseable poder comparar el método candidato con un método independiente y evaluar si producen resultados equivalentes. Para ello se grafica el

valor obtenido por el método propuesto en función del valor obtenido por el método de referencia y si son equivalentes la pendiente debe ser 1 y la ordenada en el origen debe ser 0. Para este tipo de estudios se necesita un número de muestras considerable (mínimo 15, con pocas muestras no es adecuado hacer este tipo de estudios) con valores de concentración del analito variados (en toda la zona del rango de trabajo) (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014).

En esta tesis se utilizó esta estrategia comparando un método desarrollado en el laboratorio con una técnica de espectrometría atómica (HG-AAS) con uno de referencia basado en una técnica atómica que funciona con otros principios (ICP-MS).

Una interferencia es aquella sustancia que causa error sistemático en la determinación, la interferencia puede distorsionar la señal del analito de interés.

Otro tipo de interferencia son las provocadas por la matriz, llamadas efecto matriz. El efecto matriz provoca un error sistemático proporcional, es decir, dependiente de la concentración de analito en la muestra (interferencias multiplicativas), como se muestra en la figura 1.16, existe un cambio en la pendiente de la recta de calibración si se hace con patrones puros o con matriz adicionada de diferentes cantidades exactamente conocidas de analito.

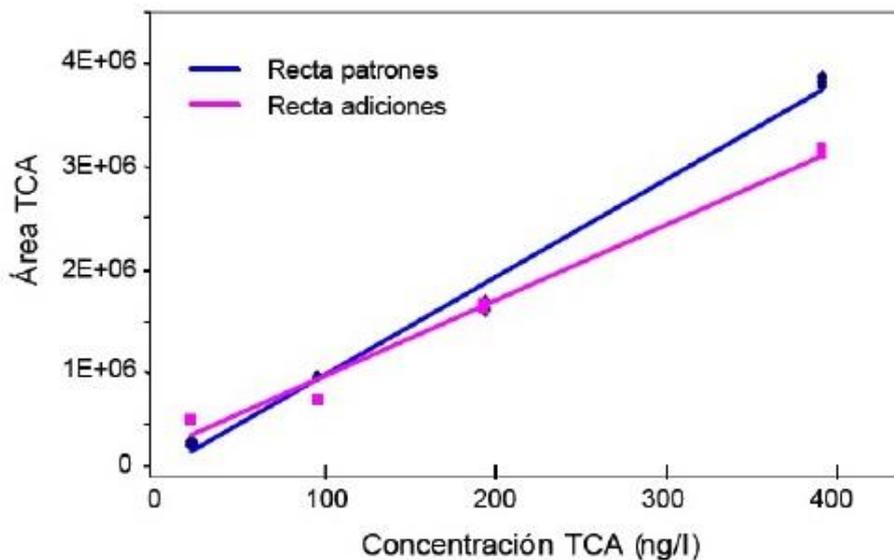


Figura 1.16 Comparación de pendientes que pone en evidencia un efecto matriz.

En el caso de verificar que existe este tipo de interferencia se debe buscar una estrategia para superar esta dificultad. Una posibilidad es construir siempre la recta

de calibración tomando una muestra parecida a la muestra a analizar, pero libre del analito de interés (blanco de muestra), y agregarle cantidades conocidas de analito para obtener disoluciones patrón (Ramis, 2001).

Otra alternativa, consiste en realizar el método de adiciones estándar (SAM). Este método consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes de analito a la propia muestra a analizar, la lectura de las correspondientes lecturas instrumentales y posterior construcción de la recta de adiciones estándar. Luego se realiza la cuantificación del analito por extrapolación de la recta de calibración al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero, como se muestra en la figura 1.17.

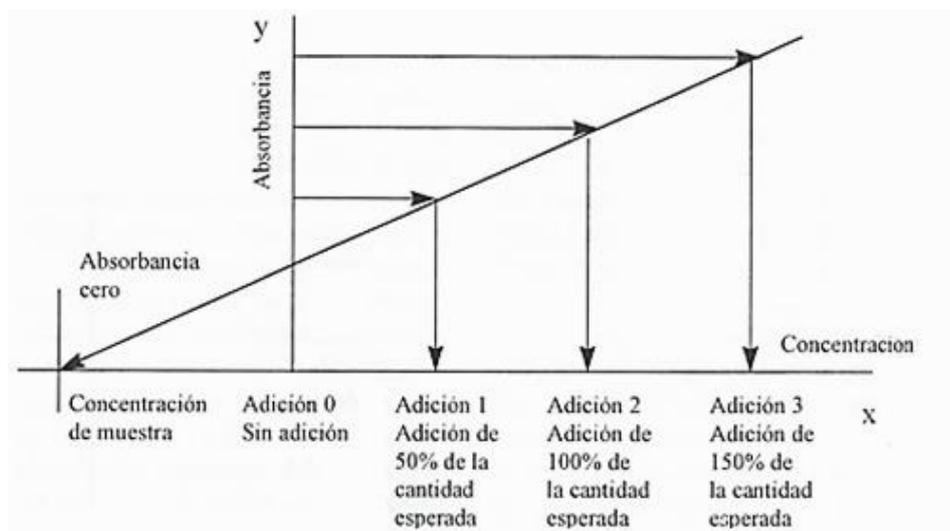


Figura 1.17 Gráfico de calibración de adiciones estándar.

Esto tiene ciertas limitaciones, obviamente la curva de calibración debe ser lineal y el analito agregado debe ser la misma especie que contiene la matriz.

El gran inconveniente está en que para cada muestra debe construirse la curva de adiciones estándar lo que aumenta mucho el tiempo de análisis, el consumo de reactivos y muestras.

Otra opción, que fue utilizada en este trabajo para evaluar posibles interferencias para establecer criterios para construir las curvas de calibración, es la igualación de matrices en la cual se trabaja con una matriz análoga a la de las muestras que se analizan, a la cual se le adicionan cantidades conocidas de analito. Esta forma de trabajo es conocida también como “*matrix-matched standards*”.

El químico analítico debe explorar las opciones de que dispone para conseguir la mejor selectividad, ya sea mediante la optimización de las condiciones experimentales, mediante la remoción directa de las interferencias o mediante análisis multivariante.

VERACIDAD (SESGO, RECUPERACIÓN) Y EXACTITUD

Actualmente se diferencian los términos exactitud y veracidad para el concepto que anteriormente se denominaba simplemente exactitud.

Exactitud se refiere al “grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mensurando” según ISO 3534-1 (1993). También se define como el “grado de concordancia entre un valor de cantidad medido y el valor de cantidad verdadero de un mensurando” según el Vocabulario Internacional de Metrología - VIM 2.13 (2012).

Por otra parte, la veracidad se define según IUPAC como el “Grado de concordancia entre el valor promedio obtenido de una larga serie de resultados de ensayos y un valor de referencia aceptado” (Inczédy *et al.*, 1998) o según el VIM como la “proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia” (VIM 2.14, 2012).

La veracidad se evalúa cuantitativamente con el sesgo (*bias*), el mismo se obtiene de aplicar un método de referencia para determinar la concentración de un analito en un material de referencia y comparar ese valor obtenido con el valor asignado de ese analito en ese material de referencia, ambos valores se comparan estadísticamente (Thomson *et al.*, 2002).

Un material de referencia es definido por IUPAC como el material o sustancia cuyas propiedades son lo suficientemente homogéneas y bien establecidas tal que puede ser usado para calibración de un aparato, para imponer un método de medida, o para asignar valores a materiales (Inczédy *et al.*, 1998). Cuando el material cuenta con un certificado que establece el valor de un analito con su incertidumbre asociada, el cual fue determinado con un procedimiento que establece la trazabilidad del valor a un valor exacto, se le llama material de referencia certificado. Además, un material de referencia certificado debe cumplir ciertos requisitos como ser homogeneidad (en el

certificado del material se especifica cual es la mínima toma en peso o volumen que se debe realizar para garantizar homogeneidad) y estabilidad con el tiempo y en condiciones de transporte. En el caso de esta tesis se trabajó con materiales de referencia de orina y agua que fueron adquiridos en ensayos de aptitud (interlaboratorios) por lo que se pudo evaluar simultáneamente el sesgo y la reproducibilidad de los métodos.

También es bastante común, cuando se propone un nuevo método analítico para alguna determinación que ya tiene un método considerado oficial o de referencia, que este método candidato se compare con aquel que viene siendo utilizado como método de referencia, esta estrategia también se utilizó para evaluar el sesgo.

Dicha comparación se llevó a cabo mediante regresión lineal y se evaluó utilizando el test de hipótesis conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen para la recta de regresión.

Si los resultados obtenidos por ambos métodos son iguales la recta de regresión debería tener pendiente (b) 1 y ordenada en el origen 0 (a). Toda medida experimental está afectada de errores aleatorios que se propagan a los resultados analíticos, por lo que en general los resultados experimentales no se ajustarán exactamente a una recta de pendiente 1 y ordenada en el origen 0 (Miller & Miller, 2005). Es necesario realizar ensayos de la significación de los valores experimentales estimados de a y b respecto a los valores "teóricos" de 0 y 1 respectivamente. Para ello se utilizó el test de hipótesis conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen para la recta de regresión. Se evaluaron en conjunto, involucrando una "región de confianza conjunta", teniendo en cuenta la interacción que existe entre estos parámetros (Mandel & Linnig, 1957).

Se realizó el test $H_0: a = 0; b = 1; H_A: \text{no } H_0$, siendo el estadístico:

$$F = \frac{n(a'-a)^2 + 2(a'-a)(b'-b)\sum x + (b'-b)^2 \sum x^2}{2\sigma^2} \quad (1)$$

Donde

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-2} \left\{ \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right] - \frac{(\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right\},$$

x e y son las respectivas concentraciones encontradas por los dos métodos, a' y b' son los parámetros de regresión estimados.

H_0 puede ser aceptada si el valor experimental del estadístico es $F_{\text{exp}} \leq F_{(1-\alpha, 2, n-2)}$ siendo n el número de muestras en las que se realizaron las determinaciones.

Como la estimación de los parámetros a' y b' está sujeta a error, existen infinitos pares (a', b') que cumplen con la ecuación (1). Para el nivel de confianza seleccionado, los mismos se pueden representar en el plano (a', b') bajo forma de una región elíptica inclinada conocida como "región de confianza conjunta" o "elipse de confianza" (Altesor *et al.*, 1994).

Otra estrategia involucra el uso de la recuperación a partir de muestras fortificadas (*spiking / recovery*). En este contexto, recuperación se define como la cantidad de analito presente en la porción de la muestra o adicionado a ésta, que es cuantificada por un método de ensayo. Se realiza la determinación sobre el material o matriz sin el agregado de analito y con el agregado de una cantidad exactamente conocida del mismo (*spiked*) (Thompson *et al.*, 2002).

Realizar adiciones de analito y evaluar así recuperación es una práctica que puede ser cuestionada debido a que la adición del analito a una determinada matriz no garantiza que el mismo interactúe con matriz de la misma forma que cuando el analito es "nativo" en dicha matriz. El agregado del analito debería agregarse en la misma forma química que se encuentra en la matriz. En este sentido, es que en las muestras de orina analizadas en esta tesis se adicionaba arsénico en las formas químicas más abundantes en la misma según la literatura y se evaluó la recuperación según las distintas especies de arsénico.

La fracción del analito adicionada a una muestra de prueba (fortificada o adicionada) antes del análisis que es determinada efectivamente por el método se calcula como (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014):

$$\%R = \frac{C_f - C_{sf}}{C_a} \times 100$$

C_f = concentración del analito medida en la muestra fortificada

C_{sf} = concentración del analito medida en la muestra sin fortificar

C_a = concentración del analito adicionada (no medida por el método) en la muestra fortificada.

Si el porcentaje de recuperación no arroja un valor satisfactorio (se deberán realizar pruebas estadísticas para evaluar si el porcentaje de recuperación se aparta

significativamente del 100% y evaluar la incertidumbre del método), indican que existe un sesgo afectando el método, o que la matriz tiene una influencia tal que existe algún efecto de ésta sobre el resultado final.

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otras sustancias que forman parte de la matriz, o sea que, para una misma concentración de analito, la determinación en una muestra real y la de una disolución de patrón de analito puro no proporcionan igual respuesta. Si existe efecto matriz se deben utilizar otras estrategias como las adiciones estándar (SAM).

ROBUSTEZ

Para evaluar la robustez primero es necesario identificar las variables de influencia y luego establecer experimentos para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión ocasionado por el cambio introducido.

Este estudio llevará a establecer condiciones definitivas de medición y establecerá evidencia de cuáles serán las variables críticas a controlar.

Parte de los experimentos pueden considerarse dentro de la etapa de optimización del método candidato.

INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

La incertidumbre según IUPAC es el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos la mensurando (Inczédy *et al.*, 1998).

La estimación exhaustiva utilizando los modelos matemáticos adecuados es sin duda engorrosa, en el caso de la acreditación de ensayos de laboratorio es un requisito que se realice la estimación de la incertidumbre en forma completa. Un resultado sin una incertidumbre asociada no significa nada, solo es un número que da poca información si al menos no se hace una estimación de la precisión del método. Sin embargo, existen formas simplificadas de expresar resultados evaluando aquella o aquellas fuentes de incertidumbre de mayor peso en el resultado final.

Según la guía de cuantificación de la incertidumbre (Ellison y Williams, 2012) las etapas que llevan a la estimación de la incertidumbre son en términos generales:

- **Mensurando:** definir los modelos físicos y matemáticos que se usan para calcular la magnitud de mensurando (por ejemplo, concentración de arsénico total en orina: el analito es arsénico; el mensurando es la concentración de arsénico total en orina).
- **Magnitudes de influencia:** definir y organizar las magnitudes de influencia.
- **Cuantificación:** cuantificar magnitudes de influencia y su dispersión
- **Valor del mensurando:** obtener la mejor estimación del mensurando
- **Incertidumbre estándar combinada:** combinar las contribuciones a la incertidumbre del mensurando
- **Incertidumbre expandida:** determinar el intervalo que abarca el valor del mensurando con un cierto nivel de confianza.
- **Informe:** expresar el resultado de la medición incluyendo su incertidumbre.
- Una de las etapas críticas es identificar las variables de influencia, una vez identificadas es ilustrativo construir con esa información los llamados diagramas “causa-efecto” (Magnusson y Örnemark, Eurachem Guide, 2014).

En esta tesis para todos los trabajos desarrollados se han identificado las variables de influencia de forma tal de expresar los resultados con una incertidumbre simplificada, en cada caso en particular se explicará cómo fue estimada.



CAPÍTULO 2:

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país existen potenciales fuentes de contaminación con As, y por otra parte existen varias empresas que impregnan madera con CCA, es necesario realizar controles sobre la población, en particular trabajadores expuestos.

La normativa vigente exigida por los Ministerios de Salud y Trabajo que toma las recomendaciones de ACGIH, ya no exige la determinación de As total, sino la determinación de especies toxicológicamente relevantes de As en orina de los trabajadores de empresas impregnadoras con CCA.

Para la determinación de As en muestras ambientales como para muestras biológicas es necesario contar con metodologías analíticas validadas que permitan además realizar la especiación de As.

No se han encontrado referencias de estudios anteriores a esta tesis, enfocados en los riesgos de exposición ocupacional a As en Uruguay y no existía hasta el inicio de este trabajo ningún laboratorio que realizara estos análisis de especies de As en el país.

La técnica de referencia para realizar una completa especiación de As en orina (HPLC-ICP-MS) no está disponible para efectuar este tipo de análisis toxicológicos, por lo que las muestras de orina tendrían que ser enviadas a algún laboratorio en el exterior para llevar adelante el biomonitoreo acorde con los requerimientos de la normativa con los grandes costos operativos que ello implica. Como alternativa a esta situación, únicamente se podía optar por un control biológico, en base a la concentración de arsénico total en orina, con los riesgos del aporte dietario de As como arsenobetaína proveniente de pescados y mariscos. Para que esta metodología pudiera ser utilizada de rutina y se pudiera evaluar únicamente la presencia de especies toxicológicamente relevantes, era necesario que el trabajador no ingiriera pescados ni mariscos por lo menos tres días antes a la recolección de la muestra, lo cual resulta una limitante y representa un importante elemento de confusión en la interpretación de resultados en relación con la determinación de este biomarcador.

Por todo lo expuesto, y en el marco de estos antecedentes, surge la propuesta de esta investigación para la tesis, en la que se desarrollan metodologías analíticas validadas, accesibles para Uruguay, para especiación de arsénico, necesarias para

su utilización en matrices ambientales y biológicas con una gran diversidad de aplicaciones a nivel académico, científico y social.

Luego de la obtención de estas herramientas metodológicas, se planteó su aplicación a estudios poblaciones de trabajadores expuestos a CCA para su control, evaluación y seguimiento en relación a su exposición ocupacional, así como evaluar otros factores de exposición no ocupacionales.



CAPÍTULO 3:

OBJETIVOS

GENERAL

El objetivo general consiste en desarrollar herramientas analíticas, para evaluar las especies de arsénico presentes en matrices ambientales y biológicas y aplicarlas a estudios poblacionales, como alternativas a la técnica de referencia internacional (HPLC-ICP-MS), no disponible en el país y altamente costosa para estudios de rutina.

ESPECÍFICOS

- Desarrollo y validación de métodos analíticos para la determinación de especies toxicológicamente relevantes de As en orina mediante técnicas disponibles en el país (HG-AAS)
- Desarrollo y validación de métodos analíticos para la determinación de especies de As en agua mediante HG-AAS.
- Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de As total en orina mediante ET-AAS para evaluar aporte de As dietario.
- Desarrollo de una herramienta tecnológica de bajo costo para la determinación de especies de As mediante una técnica acoplada (HPLC-HG-AAS) disponible para futuras investigaciones en nuestro país.
- Biomonitorio y relevamiento de datos de trabajadores expuestos a As en plantas de tratamiento de madera con CCA con los métodos desarrollados.
- Evaluación de la incidencia de otras fuentes no ocupacionales de As en la concentración de As-U (“especies toxicológicamente relevantes”: iAs+MMA+DMA), en trabajadores de una empresa impregnadora de madera con CCA.



CAPÍTULO 4:

MÉTODOS ANALÍTICOS DESARROLLADOS

1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE AS MEDIANTE HG-AAS

1.1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

MATERIALES Y REACTIVOS

Todo el material de vidrio fue sumergido en ácido nítrico 10% v/v durante toda la noche y luego enjuagado con agua ultrapura. El agua ultrapura de (ASTM Tipo I, 18.2 MΩcm de resistividad) fue obtenida mediante un purificador Millipore Simplicity 185.

Todos los reactivos fueron de calidad analítica o superior.

Patrones de especies de arsénico:

- disolución de As (V): $999 \text{ mg L}^{-1} \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$; *Arsenic Standard for AAS*; Fluka; Lote BCBP4276V; preparado a partir de As_2O_3 de alta pureza, HNO_3 , NaOH y H_2O .
- óxido de As (III), As_2O_3 : pureza $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich; Lote 129K0039V.
- Metil arseniato disódico hexahidratado, MMA: pureza $>97,5\%$; ChemService; Lote 468-40B.
- Ácido cacodílico, DMA: pureza $\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich; BCB53595V
- Arsenobetaína: pureza $\geq 95,0\%$; Sigma-Aldrich.

Se preparó la disolución stock estándar de As(III), 1000 mg L^{-1} disolviendo una cantidad apropiada de As_2O_3 en hidróxido de sodio 2M, se neutralizó con HCl 2M y se diluyó con agua ultrapura.

Las disoluciones stock estándar de DMA, MMA y arsenobetaína, 1000 mg L^{-1} se prepararon disolviendo una cantidad apropiada en agua ultrapura. Estas disoluciones fueron preparadas mensualmente y se mantuvieron refrigeradas a 4°C ; todas las soluciones de las diferentes especies de As fueron estables bajo estas condiciones cuando se ensayaron después de un mes.

Una alícuota de las disoluciones patrón de las especies se diluyó con agua ultrapura para obtener las concentraciones apropiadas de las disoluciones patrón de trabajo.

Se prepararon disoluciones acuosas de L-cisteína (> 97%; Sigma - Aldrich) al 6% (m/v) diariamente. NaBH_4 (99%; Sigma – Aldrich) se preparó al 1% (m/v) en solución de hidróxido de sodio al 0,5% (m/v) antes de su uso.

La solución de HCl 0,1 M se preparó diluyendo volúmenes apropiados del ácido concentrado (37,8%; Fisher Scientific para análisis de trazas) en agua ultrapura.

INSTRUMENTACIÓN

Centrifugadora Sigma 2-4 con capacidad para 16 tubos de 10 mL; centrifugación hasta 39000 rpm.

Balanza analítica OHAUS Adventurer TM, capacidad máxima 210 g, apreciación 0,0001 g.

Espectrómetro de absorción atómica Varian SpectrAA 55B, todas las determinaciones analíticas se llevaron a cabo utilizando este instrumento (Figura 4.1), operado a 193,7 nm, equipado con un quemador de 10 cm (llama de aire-acetileno) y una celda de absorción de cuarzo en forma de T VGA 76/77 (Varian). La anchura de la rendija fue de 0,5 nm. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco (Varian) como fuente de luz según las recomendaciones del fabricante.



Figura 4.1 Espectrómetro de absorción atómica Varian SpectrAA 55B; módulo de flujo continuo para generación de hidruros Varian VGA 77.

Se utilizó un accesorio de sistema de flujo VGA 77 para la generación de hidruros (Figura 4.2). El agente reductor utilizado fue NaBH_4 y el reactivo ácido fue HCl. El gas portador utilizado fue nitrógeno (pureza 99,999%).

Las figuras 4.2 y 4.3 muestran un esquema del accesorio de sistema en flujo, en el cual la muestra, el ácido y el reductor son impulsados por una bomba peristáltica hacia un reactor.

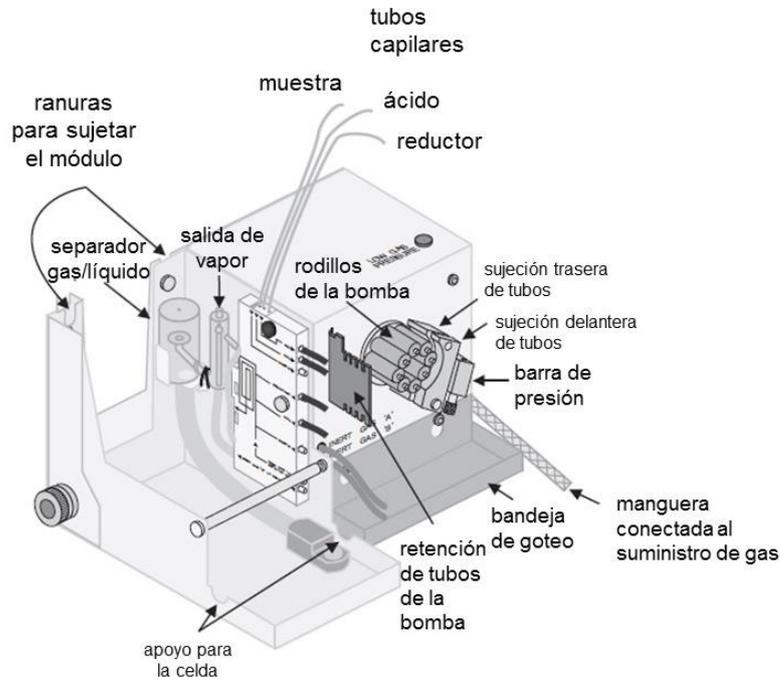


Figura 4.2 Esquema del módulo comercial VGA 77
(Adaptado de: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1047.pdf>)

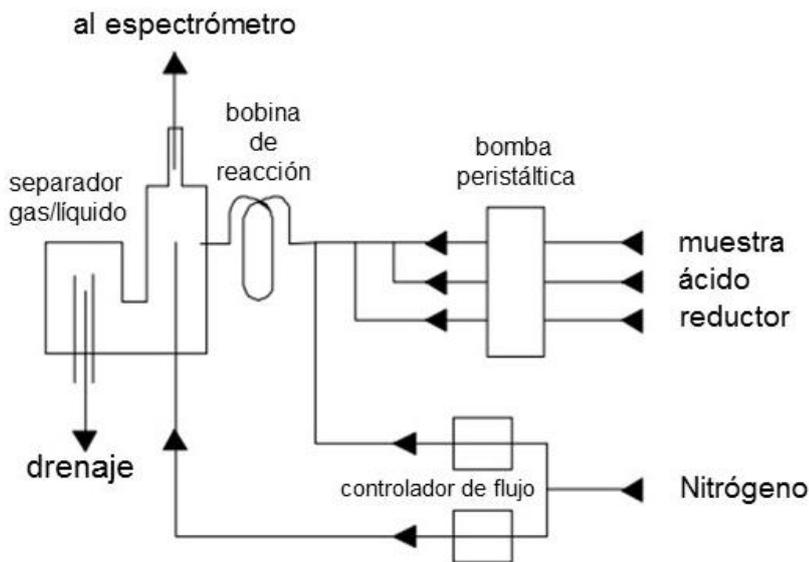


Figura 4.3 Diagrama del sistema en flujo del módulo VGA 77
(Adaptado de: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1047.pdf>)

Posteriormente se produce una separación gas-líquido en un separador de vidrio (Figura 4.4).

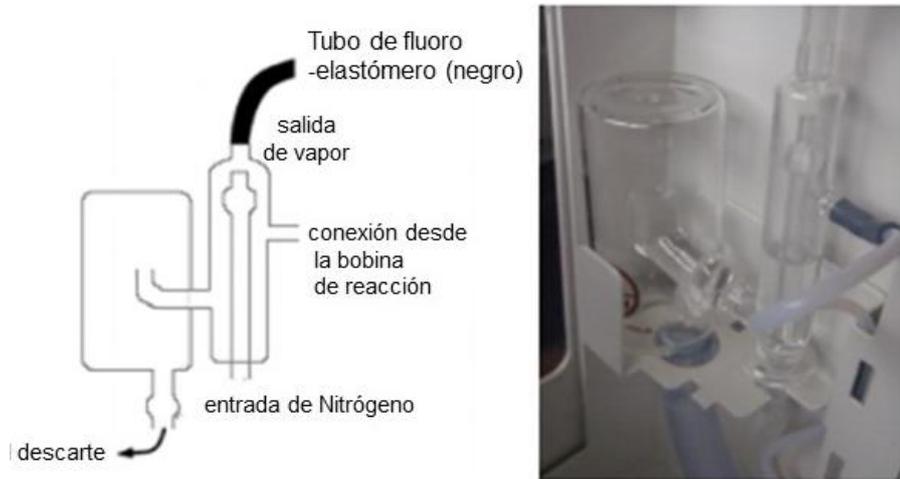


Figura 4.4 Separador gas-líquido (izquierda: esquema; derecha: foto) (Adaptado de: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1047.pdf>)

Las especies volátiles generadas son dirigidas dentro de una celda de cuarzo en forma de T (figura 4.5), la cual está alineada con el camino óptico del espectrómetro y es calentada mediante una llama.



Figura 4.5 Celda de cuarzo donde se produce la atomización. (Adaptado de: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1047.pdf>)

1.2. MÉTODO

La generación de hidruros (HG), como fue mencionado en la sección 6.3, Capítulo 1, consiste en la reacción de algunos compuestos de As con tetrahidrobórato sódico en medio ácido lo cual produce diferentes arsinas. (Dědina y Tsalev, 1995; Burguera y Burguera, 1997). Arsenito (As (III)) y arseniato (As (V)) producen AsH_3 , el MMA produce monometilarsina: CH_3AsH_2 y el DMA produce dimetilarsina: $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$ (Burguera *et al.*, 1998).

Sin embargo, la formación de estas arsinas depende del pH. Los requerimientos de pH de la reacción de reducción, indican que las especies de As deben protonarse completamente antes de que puedan reducirse a la arsina correspondiente (Howard, 1997).

Existen diferencias considerables en las sensibilidades obtenidas para la generación de hidruros de especies de iAs y As orgánico. El tipo y la concentración del ácido utilizado tienen un efecto crítico sobre la respuesta en la generación de los hidruros de arsenito, arseniato, MMA y DMA. Además, las distintas especies de As exhiben patrones de formación de hidruros y de transporte muy diferentes (Tsalev y Mandjukov, 1987). Por lo tanto, es muy difícil encontrar una concentración de ácido bajo la cual se pueda obtener la misma respuesta para todas las especies de As (Carrero *et al.*, 2001; Le *et al.*, 1994).

Con el fin de minimizar este inconveniente, varios autores reportan que las muestras pueden tratarse con compuestos que contengan un grupo tiol como es el caso de L-cisteína o tioglicerol, lo cual logra que las cuatro especies de As tengan la misma respuesta con una única óptima concentración de ácido (Carrero *et al.*, 2001; Le *et al.*, 1994; Navoni *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 1997).

El mecanismo propuesto se esquematiza en la figura 4.6 e involucra que inicialmente las especies reaccionan con L-cisteína o tioglicerol para formar los tioderivados: $\text{As}(\text{SR})_3$, $\text{CH}_3\text{As}(\text{SR})_2$ y $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{SR})$, siendo R: $-\text{CH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ para L-cisteína y $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{OH}$ para tioglicerol; estos tioderivados tienen todos al As en su estado de oxidación (III), por lo que existe una reducción de las

especies que contienen As(V); posteriormente reaccionan con NaBH₄ para producir las correspondientes arsinas (Le *et al.*, 1994).

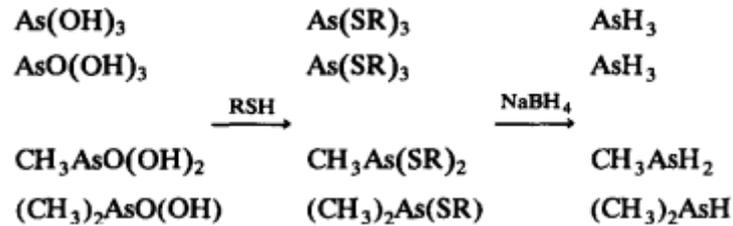


Figura 4.6 Mecanismo propuesto para la formación de hidruros para las especies de As toxicológicamente relevantes utilizando L-cisteína y tioglicerol (extraído de Le *et al.*, 1994).

1.2.1 DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE AS EN ORINA

Como fue mencionado en la introducción, la orina es la ruta principal para la excreción de iAs y sus metabolitos, lo cual representa el biomarcador de elección para evaluar la exposición reciente de los individuos expuestos.

El control biológico o biomonitoreo ocupacional, así como otras varias investigaciones se han centrado en la determinación en orina de la suma de arseniato, arsenito, DMA y MMA como un parámetro de la exposición a iAs evitando considerar la Arsenobetaína (AsB) como principal aporte de arsénico “orgánico” proveniente del consumo de ciertos alimentos, como los de origen marino, por lo cual se desaconseja el biomonitoreo ocupacional mediante la determinación de As total en orina como fue mencionado anteriormente (CDC, 2016).

Nuestro país toma las recomendaciones de ACGIH que consiste en la determinación de iAs más sus metabolitos metilados en la orina para estimar el riesgo real de exposición a iAs de trabajadores expuestos con niveles máximos aceptados de As-U de 35 µg L⁻¹ (Ordenanza N°145/009, MSP, 2009; ACGIH, 2016).

Entonces, el desafío analítico consiste en cuantificar en orina, una matriz compleja, las denominadas especies toxicológicamente relevantes (iAs + DMA + MMA), teniendo en cuenta que en esa muestra también puede estar presente la especie orgánica AsB.

Para el desarrollo y la validación del método, se utilizó como matriz, un *pool* (mezcla homogeneizada) de al menos tres muestras de orina de adultos voluntarios sanos no expuestos ocupacionalmente. Una vez validado el método se aplicó a muestras de trabajadores, cuya obtención y análisis se discute en el Capítulo 5.

La preparación de la muestra consistió en una derivatización con L-cisteína (Guo *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1994; Carrero *et al.*, 2001 y Navoni *et al.*, 2009) teniendo en cuenta que As (III), As (V) y las especies metiladas (MMA y DMA) reaccionan con L-cisteína en medio ácido, generando compuestos tioderivados que originan arsinas a velocidades similares, lo que permite cuantificar la suma de dichas especies, sin la sobreestimación o subestimación de otras especies como se explicó anteriormente.

La AsB, especie arsenical presente en alimentos marinos, no genera arsinas en las condiciones señaladas y por ende no produce una señal espectral que pueda llevar a la sobreestimación del contenido de As de importancia toxicológica (Navoni *et al.*, 2009). Así, se determinó la suma de las cuatro especies toxicológicamente relevantes (As (III) + As (V) + MMA + DMA) como lo requiere la normativa para biomonitoreo. La suma de las cuatro especies, se determinó mediante HG-AAS basada en la reducción de las mismas a arsina (AsH_3) con NaBH_4 en medio ácido (HCl).

Las concentraciones de NaBH_4 y HCl son parámetros críticos para optimizar en HG-AAS. Estas variables afectan la sensibilidad y precisión del método y dependen de la matriz. Para la optimización de estas variables se realizaron diversos experimentos.

OPTIMIZACIÓN

En este caso, el interés se encuentra dirigido por un lado hacia la obtención de las concentraciones óptimas del agente reductor (NaBH_4) y del ácido (HCl), y por otra parte a la optimización de condiciones de la reacción de pre-reducción.

En primer lugar, se evaluaron los parámetros concentración de NaBH_4 en tres niveles: 0,5; 1,0 y 1,5% (m/v) y concentración de HCl en cinco niveles: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5 M. Estos parámetros fueron evaluados utilizando un *pool* de orina de individuos sanos, tal como fuera descrito anteriormente, fortificado con $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada una de las cuatro especies toxicológicamente relevantes de As: As(III), As(V), MMA y DMA.

Tomando como base información reportada (Navoni *et al.*, 2009), la concentración de L-cisteína se fijó en 6% (m/v) y se variaron las concentraciones de NaBH₄ usando siempre una concentración de 2 M para HCl, tal como es recomendado por el fabricante del dispositivo generador de hidruros como condiciones iniciales. Posteriormente se optimizó la concentración de HCl.

La Tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos para cada especie variando la concentración de NaBH₄.

Tabla 4.1 Variación de la señal para cada especie con la concentración de NaBH₄ usando HCl 2M y L-cisteína al 6% (m/v).

NaBH ₄ (%m/v)	Señal/Concentración				RSD (%)
	As(III)	As(V)	MMA	DMA	
0,5	3236	3090	2118	2137	22,7
1,0	5034	4660	4796	4692	3,5
1,5	4170	4285	3952	3867	4,7

RSD: desviación estándar relativa (n = 5)

Para todo el trabajo, la señal analítica utilizada fue la Absorbancia tomada una vez que se estabiliza la señal, la cual alcanza una meseta 30 segundos después de que comienza a funcionar el sistema en flujo; el tiempo para el registro de la señal, se toma con cronómetro.

Para seleccionar la concentración óptima se consideró aquella que tuviera mejor precisión y la mayor relación señal/concentración para las cuatro especies, fijando entonces la concentración de NaBH₄ en 1% (m/v) en NaOH 0,5% (m/v).

Dado que existen varios reportes que sugieren que la concentración de HCl puede ser inferior a 2 M para determinaciones de As utilizando HG-AAS, se varió la concentración de HCl, manteniendo fija la concentración de NaBH₄ en el valor optimizado previamente (Guo *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1994; Carrero *et al.*, 2001 y Navoni *et al.*, 2009). Esto se consideró importante no sólo para optimizar la metodología, sino también para estar en buen acuerdo con los principios de la Química Verde.

Se ensayaron cinco niveles de concentración de ácido diluido evaluando las pendientes de calibración de las cuatro especies de As (sensibilidad). Las curvas se evaluaron en el rango de 1 a 50 µg L⁻¹.

Tabla 4.2 Pendientes de las curvas de calibración para cada especie al variar la concentración de HCl; se utiliza NaBH₄ 1% (m/v) y L-cisteína 6% (m/v).

HCl (M)	Pendiente curvas de calibración ($\mu\text{g}^{-1} \text{L}$)				RSD (%)
	As(III)	As(V)	MMA	DMA	
0,01	0,013	0,012	0,010	0,010	12,1
0,05	0,012	0,010	0,010	0,009	12,4
0,10	0,011	0,009	0,011	0,009	10,3
0,20	0,011	0,008	0,010	0,008	12,9
0,50	0,008	0,007	0,005	0,005	19,2

RSD: desviación estándar relativa (n = 5)

La Tabla 4.2 muestra los resultados obtenidos. La concentración óptima de HCl fue de 0,1 M ya que la precisión fue la mejor y la sensibilidad fue adecuada para las cuatro especies.

Se prepararon muestras fortificadas con la especie AsB a los niveles de concentración ensayados para las demás especies, obteniéndose señales del orden del blanco de calibración, por lo que se confirma que la AsB no genera hidruros, tal como se reporta en trabajos de Le *et al.* (1994), Navoni *et al.* (2009) y Chen *et al.* (2010).

Por otra parte, se evaluó el tiempo óptimo de reacción posteriormente al agregado de L-cisteína (tiempo donde ocurre la derivatización). Esta variable fue estudiada utilizando un *pool* de orina de individuos sanos, adicionado con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada una de las especies (As(V), As(III), MMA y DMA) y utilizando las concentraciones óptimas de los demás reactivos. En la figura 4.7 se observa que el tiempo mínimo para obtener la mayor Absorbancia es de 30 min. También se observa que la señal se mantiene estable por lo menos hasta los 90 minutos, tiempo más que suficiente para realizar las determinaciones analíticas.

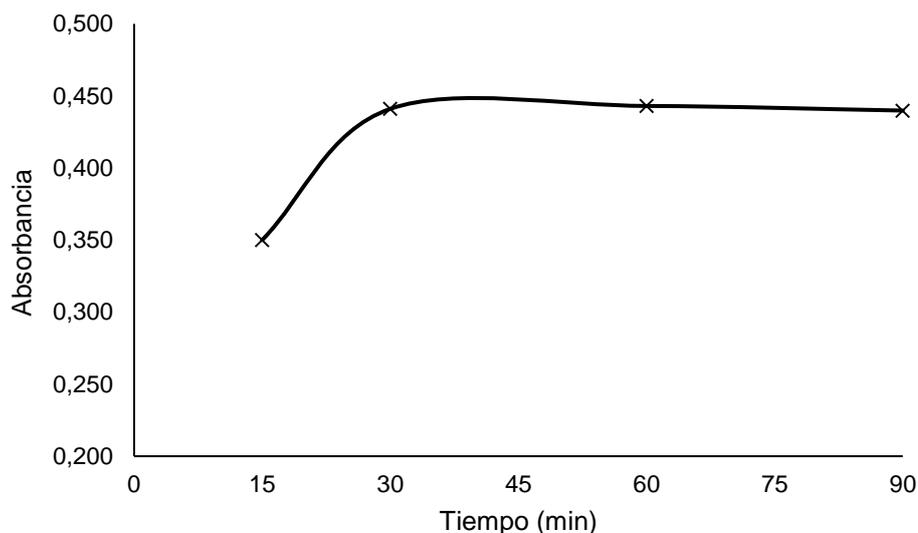


Figura 4.7 Gráfico de Absorbancia en función del tiempo de reposo luego del agregado de L-cisteína.

Luego de la optimización, las condiciones operativas se establecieron según:

- NaBH₄ 1 % (m/v) en NaOH 0.5% (m/v).
- HCl en el sistema de flujo continuo: 0,1 mol L⁻¹.
- L-cisteína 6% (m/v) (en HCl 0,08M).
- tiempo de derivatización: mínimo de 30 minutos.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

A continuación se describe el procedimiento analítico optimizado.

Las muestras de orina se descongelan, se homogeneizan y se centrifugan por 15 minutos 3500 rpm.

La curva de calibración se prepara fortificando con As (V) un *pool* de orinas recolectadas de voluntarios clínicamente sanos no expuestos al As, de modo de obtener concentraciones finales de 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 y 50,0 µg As(V) L⁻¹. También se trata una alícuota del *pool* de orina sin fortificar que constituye el “blanco de curva”.

La derivatización tanto de orinas fortificadas para la curva de calibración, el blanco de orina, como de muestras de orina, se realiza agregando 2,5 mL de solución de L-Cisteína 6% (m/v) sobre 5,0 mL de orina. Se mezcla por agitación y luego se deja

reposar a temperatura ambiente durante no menos de 30 minutos. Previamente a la determinación mediante HG-AAS, se añaden 2 gotas de octanol a todas las muestras, incluido el blanco, para evitar la formación de espuma en el dispositivo de generación de hidruros.

Los caudales óptimos a utilizar en el sistema en flujo son: 6 mL min⁻¹ para la muestra; 1,8 mL min⁻¹ para el HCl y 1,6 mL min⁻¹ para el agente reductor (NaBH₄). Estas son las condiciones recomendadas por el fabricante e indicadas en el manual y resultaron adecuadas para el trabajo. Si bien se podrían variar los flujos cambiando los tubos de la bomba, esto no resulta simple para luego trasladarlo a condiciones de rutina ya que la bomba peristáltica del instrumento comercial es de velocidad fija y se adquiere con un determinado kit de tubos.

1.2.1.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VALIDACIÓN

Una vez optimizados los parámetros críticos, se evaluaron los parámetros de desempeño más relevantes para la aplicación propuesta.

Para investigar la posible existencia de interferencias multiplicativas, se comparó la pendiente de la curva de calibración acuosa con la de la curva de adiciones estándar (Figura 4.8).

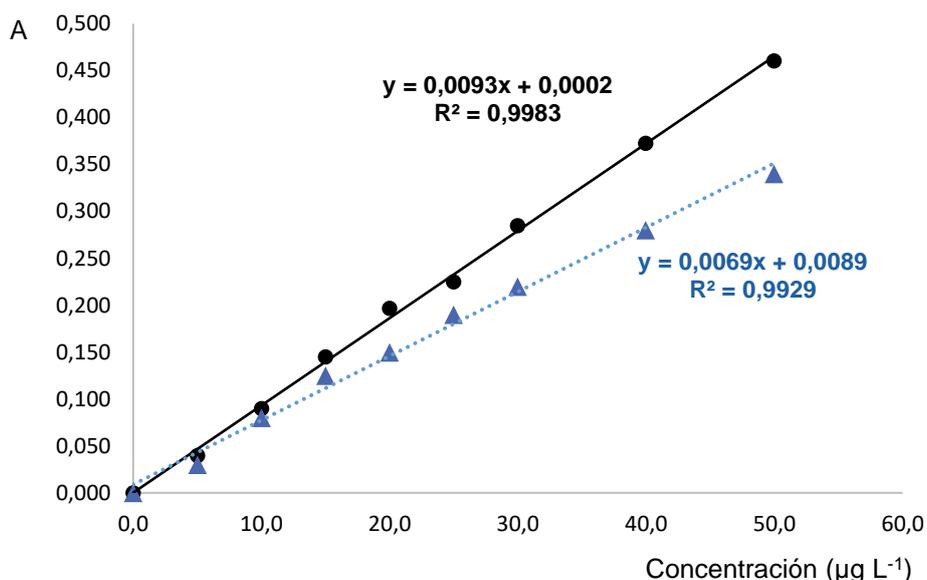


Figura 4.8 Curvas de calibración: As(V) en agua (●); As(V) en *pool* de orina (▲)

Como se observa en los gráficos de la figura 4.8, las pendientes son significativamente distintas en casi todo el rango de concentraciones para las curvas de calibración para As(V) acuosa y en orina. Por esta razón, se decidió realizar la curva de calibración en orina (“*matrix-matched standards*”). La orina utilizada para la calibración fue de adultos no expuestos, como se explicó anteriormente.

La precisión (RSD%) se estimó por repetición tanto instrumental como analítica. Para la precisión analítica, se analizaron 10 muestras de orina adicionada (*pool*). Cada muestra se midió 10 veces (para la precisión instrumental). La precisión analítica fue del 12% (expresada como RSD%), para una concentración de $15 \mu\text{g L}^{-1}$.

La repetibilidad ($n=10$) para los diferentes niveles de la curva de calibración ($5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$) se situó en el rango de 5,3% (para la concentración más alta) a 8,1% (para la más baja).

La precisión intermedia fue evaluada realizando la determinación en 5 días diferentes, sobre orinas *pool* de voluntarios sanos, adicionadas con $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada una de las cuatro especies por separado y sobre una mezcla de las cuatro especies ($5 \mu\text{g L}^{-1}$ cada una). Los resultados se resumen en la tabla 4.3

Tabla 4.3 Precisión intermedia $s_r(\%)$, ($n = 5$; 5 días diferentes) para concentraciones de las especies por separado de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ y de la suma $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada una de las especies.

As(V)	As(III)	MMA	DMA	As(V)+As(III)+MMA+DMA
9,8	6,5	8,5	4,2	8,0

Para la evaluación de la linealidad, se midieron 9 orinas fortificadas con As (V) en el rango de $0-50 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$) y los resultados de Absorbancia se representaron en función de la concentración (Figura 4.9). La función de calibración fue $A = 0,0109C + 0,0055$ ($A =$ absorbancia, $C =$ concentración en $\mu\text{g L}^{-1}$, $R^2 > 0,99$).

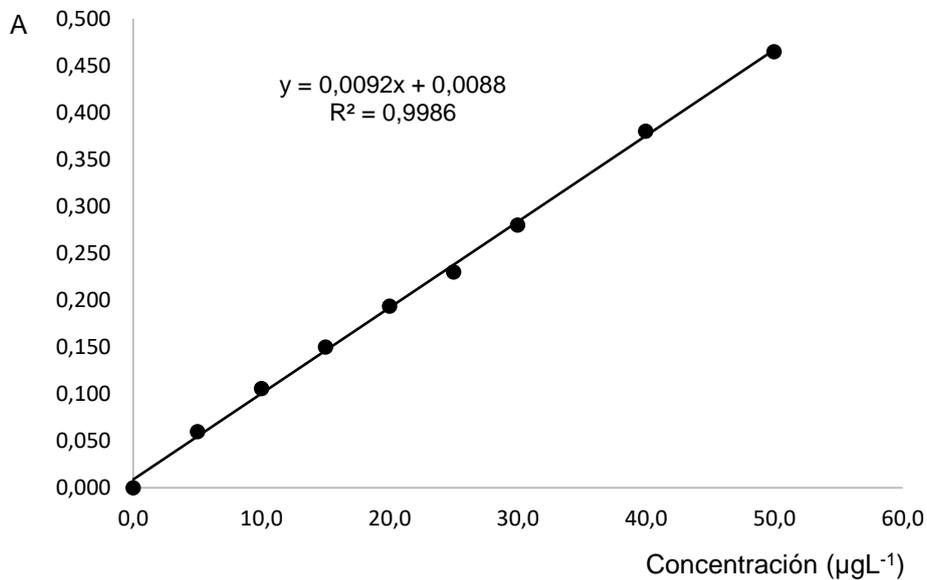


Figura 4.9. Curva de calibración del método desarrollado HG-AAS previa derivatización con L-cisteína para determinar especies toxicológicamente relevantes de As en orina

El rango lineal se estableció a partir de la concentración correspondiente al límite de cuantificación y hasta $50 \mu\text{g L}^{-1}$, confirmado mediante inspección visual y análisis de residuos.

La curva de calibración de rutina se estableció en el rango de $5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando como patrón la especie As (V), ya que no hubo diferencias significativas entre las pendientes para las otras especies (As (III), DMA y MMA). Además, se realiza un blanco de calibración utilizando el *pool* de orinas utilizado para la calibración. Este rango es adecuado ya que el límite establecido por la ACGIH (2016) para control de trabajadores expuestos es $35 \mu\text{g L}^{-1}$.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron midiendo la dispersión de las señales obtenidas de un grupo de muestras de orina de voluntarios no expuestos ($n = 10$) sin adición (blancos). Para su cálculo se consideró el criterio “3s” y “10s” respectivamente. Se aplicaron las siguientes expresiones (siendo b la pendiente de la curva de calibración):

$$LD = \frac{3 * s}{b} \quad LC = \frac{10 * s}{b}$$

En estas condiciones el LD fue 1,5 y el LC 5,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Los LD, LC y la precisión fueron similares a los reportados por Lindberg *et al.* (Lindberg *et al.*, 2007) quienes utilizan HPLC-HG-AFS, de hecho, los límites son ligeramente más bajos. Por lo tanto, no hay necesidad de utilizar tecnología costosa para alcanzar los límites de detección que se adecuan al propósito.

La veracidad fue evaluada de varias formas: realizando fortificaciones con las especies de As, comparando con una técnica independiente y también mediante el análisis de muestras de referencia adquiridas para ensayos interlaboratorios.

La fortificación de las muestras de orina blanco se realizó con cada una de las especies por separado y con mezclas de las 4 especies As(V)/As(III)/DMA/MMA a dos niveles de concentración. En cada caso, los resultados son el promedio de 10 determinaciones. Los porcentajes de recuperación para orinas fortificadas se presentan en la Tabla 4.4:

Tabla 4.4 Recuperaciones obtenidas mediante fortificación

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As(III)	As(V)	MMA	DMA	As(III) + As(V) + MMA+ DMA
20,0	100,7 \pm 6,0	91,8 \pm 3,1	97,9 \pm 8,9	88,9 \pm 4,8	100,7 \pm 9,3
30,0	87,8 \pm 7,4	103,0 \pm 8,3	100,4 \pm 10,1	113,5 \pm 7,9	91,8 \pm 11,4

Se informa promedio ($n=10$) \pm desviación estándar

Los porcentajes de recuperación obtenidos deben estar comprendidos entre un intervalo que asegure ausencia de sesgo y contaminación; este rango se estimó

mediante una prueba estadística. Esta prueba es una herramienta para establecer un rango aceptable de recuperaciones (el valor medio es 100%) teniendo en cuenta el número de muestras y la precisión en estas condiciones experimentales (Magnusson, & Örnemark, *Eurachem Guide*, 2014).

Las recuperaciones se situaron entre 87,8 y 113,5%. Estos valores se compararon con el valor nominal del 100% mediante la prueba t de Student, encontrando un valor t de 0,03 ($t(0,05;5)$ es 2,78) (Miller & Miller, 1993), por lo que se puede concluir que a un nivel de significación de 95 % no existe apartamiento significativo del 100%. El intervalo aceptable para validar una corrida, considerando la incertidumbre, se estableció en el rango de 85-115% para una fortificación realizada a un nivel de concentración para los trabajos de rutina con muestras de trabajadores y población en general (generalmente $20 \mu\text{g L}^{-1}$).

Las recuperaciones superiores al 100% están asociadas a la incertidumbre de la metodología (también la técnica de referencia, HPLC-HG-ICP-MS tiene una incertidumbre del 10% a estos niveles de concentración).

Dado que durante el tiempo de trabajo en la tesis los blancos no presentaron señales significativas, no se encontró evidencia de contaminación sistemática y los valores dentro de este rango no presentaron sesgo.

Por otra parte, se realizó una comparación de este método con la técnica considerada "*gold technique*", o sea una técnica ampliamente utilizada para este fin en la que existe consenso para considerarla una técnica de referencia para esta aplicación. Esta técnica consiste en el acople de una técnica separativa, una técnica atómica y un detector de masas (HPLC-ICP-MS) para especiación de As. Se trata de un equipamiento muy costoso para nuestro medio y a la fecha no existe ninguno funcionando en Uruguay para análisis de rutina. La comparación se realizó analizando 40 muestras (de un proyecto anterior) mediante esta técnica de referencia en el laboratorio de Karolinska Institutet, Stocolmo, Suecia y el método propuesto en esta tesis. El equipamiento de Suecia es un HPLC Agilent 1100, columna Hamilton PRP-X100 y ICPMS Agilent 7500ce.

En la Figura 4.10 se presentan los resultados de la comparación.

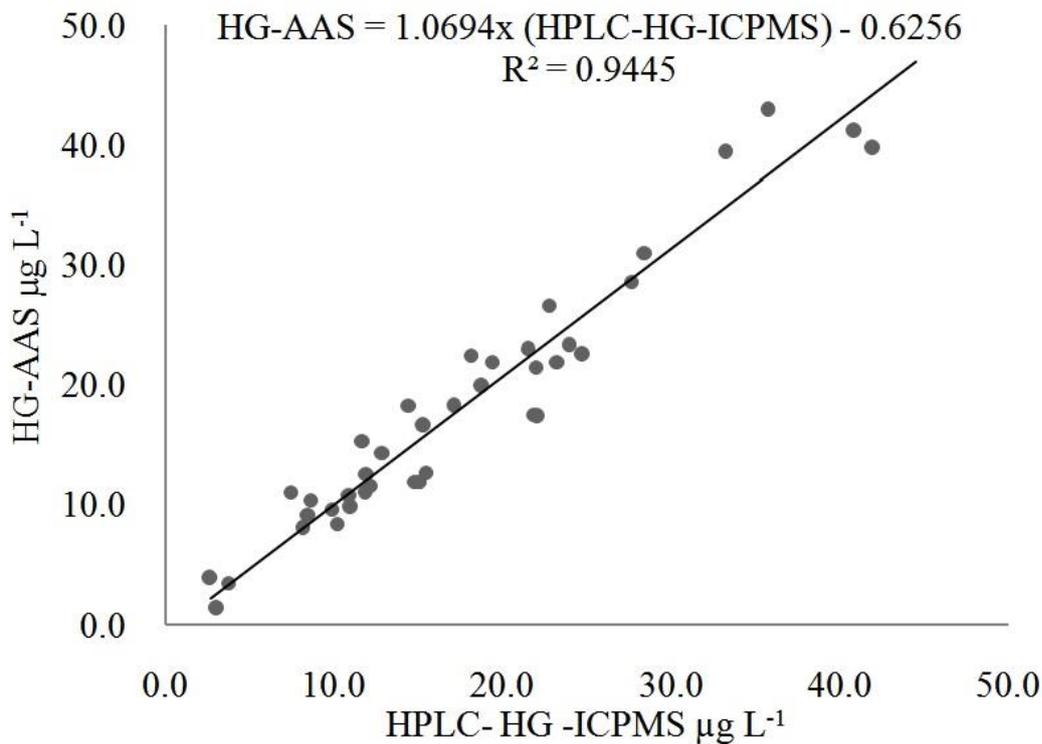


Figura 4.10 Correlación entre el método de referencia y el desarrollado.

Idealmente, ambos métodos son iguales o equivalentes cuando la ecuación para una tendencia lineal es $y = 1x$ (pendiente = 1, intersección = 0). El gráfico muestra que la correlación es buena, por lo tanto, los resultados son comparables, dentro del rango lineal de concentraciones validado ($R^2 = 0.9445$), pendiente = 1.0694 y la intersección = -0.6256. Los dos métodos resultaron ser particularmente cercanos en el rango más bajo de concentraciones.

Se realizó el test de hipótesis conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen para la recta de regresión. El valor experimental del estadístico F_{exp} fue de 1,066; siendo menor que el valor de tabla F (3,252; $F_{0,05;2;38}$). Con este resultado se aceptó la hipótesis nula, por lo cual la pendiente no difiere significativamente de 1 y la ordenada en el origen no difiere significativamente del valor 0. En la figura 4.11 se puede observar la elipse de confianza para la comparación de ambos métodos, para el nivel de confianza de 0,05. Esta elipse comprende en su interior el valor cero de ordenada en el origen y el valor 1 de pendiente, lo cual justifica que ambos métodos son comparables.

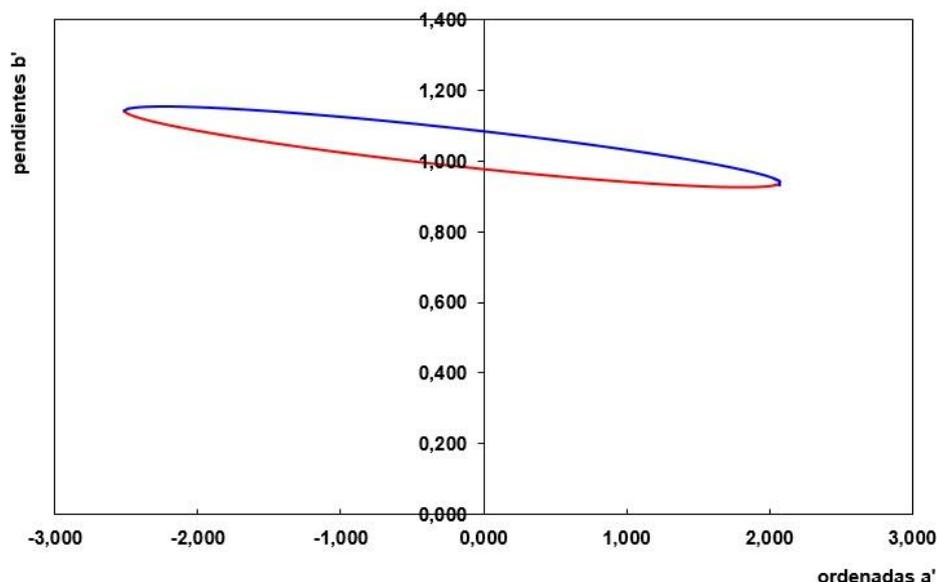


Figura 4.11 Elipse de confianza para la comparación del método HG-AAS con el método de referencia HPLC-ICP-MS

Además, se participó de varios ensayos de aptitud (Programas Interlaboratorios). Esto contribuyó a evaluar la veracidad y también la reproducibilidad del método. Este ensayo es parte del programa G-EQUAS.

El programa G-EQUAS se inicia en 1982, llevando a cabo un sistema externo de evaluación de la calidad y certificación para análisis toxicológicos ocupacionales y médico-ambientales en materiales biológicos. El esquema, la evaluación y la certificación se basan en las directrices de la Asociación Médica Alemana (Bundesärztekammer). Este esquema comprende la determinación de los parámetros toxicológicos en muestras de sangre, plasma / suero y orina del rango de concentración ocupacional y ambiental. Cerca de 200 laboratorios de más de 35 países participan regularmente en este programa (G-EQUAS, 2017).

En la primera prueba que se participó del programa G-EQUAS, en el año 2014, el valor de referencia para la muestra de orina certificada fue $29,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (rango de tolerancia: 21,2-37,4) y el valor obtenido con la metodología propuesta fue de $29,5 \pm 3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ lo que representa una recuperación respecto a la muestra de orina certificada del 100,7%.

Una vez establecido el procedimiento de rutina en el laboratorio CEQUIMTOX

se participó al término de esta tesis en 2 pruebas más con resultados que estuvieron dentro de las especificaciones de $Z_{score}=3$ (valor aceptado para adecuado desempeño del laboratorio). Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Resultados de los ensayos interlaboratorio del programa G-EQUAS.

Fecha	Referencia (niveles bajos) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tolerancia ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor informado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referencia (niveles altos) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tolerancia ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor Informado ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Nov. 2014	29,3	21,2 - 37,4	29,5 \pm 3,5	90,0	70,8 - 109,2	63,3 \pm 7,6
Nov. 2015	20,2	12,4 - 28,0	25,7 \pm 3,1	91,1	66,2 - 116,0	92,7 \pm 11,1
Mar. 2016	46,8	34,5 - 59,1	42,4 \pm 5,1	115,0	89,5 - 140,5	105,9 \pm 12,7

Se continúa participando periódicamente de estos ensayos.

Cuando se analizan muestras con niveles de As superiores a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, fuera del rango lineal de la curva de calibración, se debe modificar la alícuota de orina (menos de 5 mL), completando el volumen total a 5 mL con agua ultrapura, para obtener una concentración dentro del rango de calibración.

Los resultados de los interlaboratorios pusieron de manifiesto mayores diferencias a niveles altos que a niveles bajos. Para resolver esto, se encontró que la curva de calibración debe realizarse utilizando el mismo volumen de orina *pool*, de modo que tanto la muestra como la curva de calibración se realizan utilizando la misma dilución. Se trabaja de esta forma debido a que las pendientes de la curva de calibración se ven alteradas a diferentes diluciones y de esta forma se trata de mantener las matrices igualadas según la dilución. Este aspecto, deberá tenerse en cuenta cuando existan muestras con niveles fuera de los límites de la reglamentación.

En la Tabla 4.6 se presenta un resumen de las cifras de mérito más relevantes.

Tabla 4.6 Cifras de mérito de la validación de la determinación de As en orina mediante HG-AAS.

Parámetros	Resultado
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) (S/N=3; n=10)	1,5
LC ($\mu\text{g L}^{-1}$) (S/N=10; n=10)	5,1
Precisión intermedia (sr%, n=5)	8,0
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5 - 50
Veracidad (%; n=10)	85 -115

Para establecer criterios de aseguramiento de la calidad de las corridas en los trabajos de rutina además se realiza el control de la pendiente de la curva de calibración mediante el uso de gráficos de control.

El gráfico de control es una forma gráfica y cronológica de representar el comportamiento de una o más variables fijando límites que sean acordes con experiencias y valores especificados y previamente establecidos. Fueron propuestos por primera vez por el Dr. Walter A Shewhart (Miller & Miller, 1993).

En este caso, la variable estudiada es la pendiente de la curva de calibración. Se observan en la tabla 4.7 los valores de pendientes de 21 curvas de calibración, obtenidas durante los análisis de rutina realizados entre el año 2014 y el 2016 (análisis de muestras de los trabajadores expuestos a As).

Tabla 4.7 Control de pendientes para las curvas de calibración realizadas sobre *pool* de orinas de voluntarios sanos.

	Fecha	Pendiente ($\mu\text{g}^{-1}\text{L}$)	Ordenada	R ²
1	20150407	0,0073	0,0102	0,9749
2	20150414	0,0093	0,0074	0,9913
3	20150421	0,0089	0,0092	0,9893
4	20150430	0,0109	0,0055	0,9902
5	20150520	0,0080	0,0081	0,9931
6	20150602	0,0096	0,0008	0,9940
7	20150603	0,0088	0,0109	0,9790
8	20150610	0,0088	0,0047	0,9956
9	20150616	0,0070	0,0026	0,9966
10	20150623	0,0084	0,0073	0,9923
11	20150623	0,0103	-0,0100	0,9426
12	20150714	0,0088	0,0140	0,9867
13	20150821	0,0114	0,0121	0,9780
14	20151201	0,0088	0,0065	0,9929
15	20151202	0,0094	0,0233	0,9712
16	20151215	0,0079	0,0011	0,9952
17	20160404	0,0090	0,0220	0,9778
18	20160510	0,0084	0,0160	0,9856
19	20160610	0,0115	0,0420	0,9500
20	20160613	0,0116	0,0220	0,9845
21	20160719	0,0105	-0,0030	0,9987

En la figura 4.12 puede observarse el diagrama de Shewhart para dichas pendientes, observándose en verde, los límites de advertencia (calculados como el promedio de las pendientes $\pm 2s$) y en rojo los límites de acción (calculados como el promedio de las pendientes $\pm 3s$).

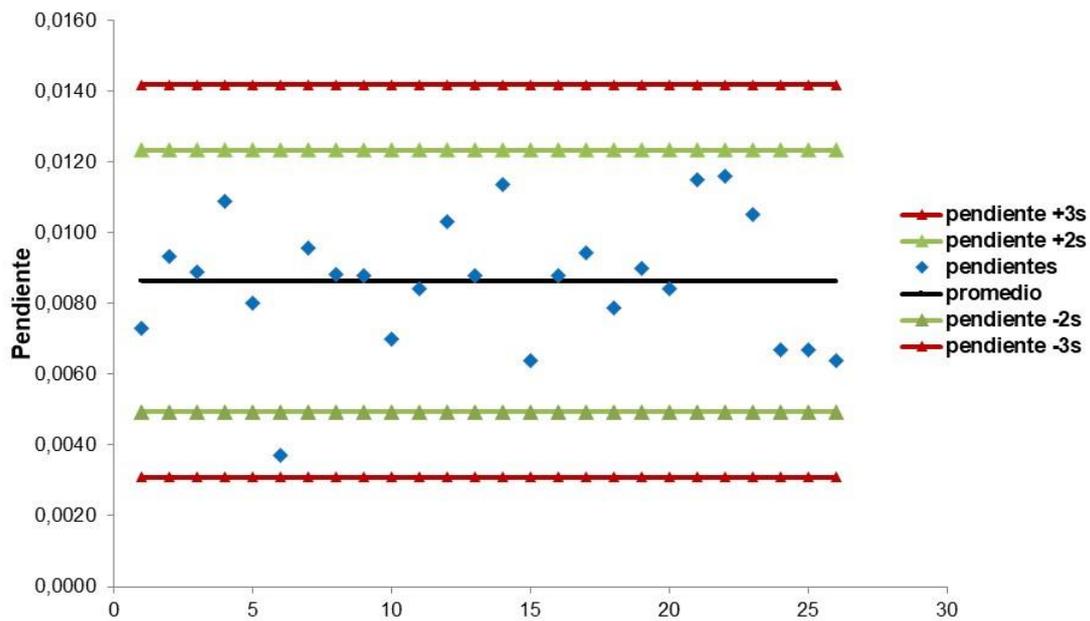


Figura 4.12 Diagrama de Shewhart para los valores de pendiente de la curva de calibración. En verde: límite de advertencia; en rojo: límite de acción

A partir de la construcción de este gráfico se puede continuar el control a futuro mientras se mantengan las mismas condiciones operativas. Cuando se detecta alguna tendencia o un punto fuera de control se tomarán las acciones correspondientes (verificación de los patrones, verificación del estado de la celda de atomización, estado de los tubos de bombeo, entre otras variables).

1.2.1.2. CONCLUSIONES PARCIALES

Se desarrolló y validó un método para la determinación de la suma de las especies toxicológicamente relevantes en orina mediante HG-AAS.

Este método validado resultó simple y adecuado para los propósitos de control. Se verificó que en las condiciones validadas la especie AsB, no se detecta, lo cual conlleva a que la toma de muestra no requerirá que los trabajadores no hayan ingerido pescado o no existirá sobreevaluación de la exposición a arsénico inorgánico como ocurre cuando se determina As total mediante otras técnicas.

El método desarrollado y validado fue transferido al sistema de gestión de calidad del CEQUIMTOX para el ofrecimiento de servicios de biomonitorio realizándose al día de hoy determinaciones analíticas para el control biológico obligatorio de población expuesta ocupacionalmente a arsénico.

1.2.2 DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE AS EN AGUA

1.2.2.1 ANTECEDENTES EN URUGUAY.

En nuestro país se han realizado trabajos multidisciplinarios con la participación de geólogos de Facultad de Ciencias y Toxicólogos y Químicos Analíticos de la Facultad de Química acerca de la presencia de As en acuíferos del Uruguay y los resultados preliminares mostraron niveles de As encima de los admitidos por la OMS ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) en diferentes acuíferos (Manganelli *et al.*, 2007; Mañay, 2010; Mañay *et al.*, 2011; Pistón *et al.*, 2012).

En la misma línea, se analizaron muestras de agua de consumo de diferentes zonas del país en un período de seis años y se determinó que el nivel de As en agua de consumo aumentó considerablemente respecto a años anteriores. Esto puede deberse a la presencia de dos fuentes de As: natural (características geológicas) y antrópica (por ejemplo, a consecuencia del aumento del uso de conservantes de madera a base de cromo, cobre y arsénico). En particular, cabe comentar que el uso del CCA está asociado a las plantaciones de árboles exóticos que se ha incentivado en nuestro país hace varios años (Dol, *et al.*, 2011).

Para la recolección de muestras de aguas en el caso del As, se recomienda la utilización de recipientes de vidrio de borosilicato o Pyrex, aunque es también posible la utilización de polipropileno.

En este caso las muestras se colocaron en frascos de polipropileno. Para la descontaminación de los mismos, se llenó cada frasco con ácido nítrico 10% v/v dejándolo en inmersión por lo menos durante 24 horas. Luego se vació y se enjuagó por lo menos cinco veces con agua destilada ultra pura. Las tapas recibieron el mismo tratamiento (Litter *et al.*, 2009).

Las muestras utilizadas para la validación de este método fueron obtenidas, con autorización, a partir de muestreos que realiza la Unidad de Análisis de Aguas de la Facultad de Química (UAA), por lo que no se participó del muestreo de las mismas ni se conoce su procedencia debido al acuerdo de confidencialidad de la Unidad. Se

trata de 30 muestras de agua potable obtenidas de distintos puntos del territorio uruguayo siguiendo el protocolo de muestreo de la Unidad que se basa en el método de la *American Public Health Association, APHA, 3113 (Metals by electrothermal atomic absorption spectrometry, APHA 22th Edition, 2012)*.

Además, 10 muestras adicionales fueron obtenidas por la autora de esta tesis, provenientes de:

- dos Termas del departamento de Salto
- aguas embotelladas a la venta en Montevideo
- agua corriente (OSE) de Facultad de Química
- de aguas embotelladas y diferentes aguas de bebida (de los dispensadores y de agua corriente (OSE)) de la planta impregnadora de CCA cuando se realizó la visita.

Las condiciones operativas optimizadas para la determinación en orina mediante HG-AAS fueron evaluadas para el análisis de las muestras de agua. El hecho de contar con único procedimiento general para las determinaciones en ambos tipos de muestras es de suma importancia en laboratorios de análisis de rutina.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

El procedimiento evaluado fue entonces el que se describe a continuación: la derivatización tanto de la curva de calibración, como de muestras de aguas, se realiza agregando 2,5 mL de solución de L-Cisteína 6% (m/v) sobre 5,0 mL de muestra. Luego de mezclar por agitación, las soluciones se mantienen a temperatura ambiente durante un tiempo no menor a 30 min. previo a la determinación mediante HG-AAS. Para estas muestras no se requiere el agregado de antiespumante.

1.2.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VALIDACIÓN

La precisión (RSD%) se estimó por repetición tanto instrumental como analítica. Para la precisión analítica, se analizaron 10 disoluciones de As(V). Cada una se midió 10 veces (para la precisión instrumental). La precisión analítica fue del 11% (expresada como RSD%), para una concentración de $15 \mu\text{g L}^{-1}$.

La repetibilidad ($n=10$) para los diferentes niveles de la curva de calibración se situó en el rango de 4,5% (para la concentración más alta $20 \mu\text{g L}^{-1}$) a 9,8% (para la concentración más baja $7 \mu\text{g L}^{-1}$).

La precisión intermedia $s_r(\%)$, ($n = 5$; 5 días diferentes) para concentraciones de las especies por separado de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ fue de 6,3% para As(V) y de 10,4% para As(III). Al evaluar de la misma forma la precisión intermedia para soluciones con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(V), el resultado fue de 7,8%.

Para la evaluación de la linealidad, se midieron disoluciones de As (V) y de As (III) hasta $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$) y los resultados se representaron en función de la concentración. La función de calibración fue $A = 0,0090C + 0,0021$ ($A =$ absorbancia, $C =$ concentración en $\mu\text{g L}^{-1}$, $R^2 > 0,99$) (figura 4.13).

La señal analítica se registra en iguales condiciones como fuera explicado en la sección 1.2.1.

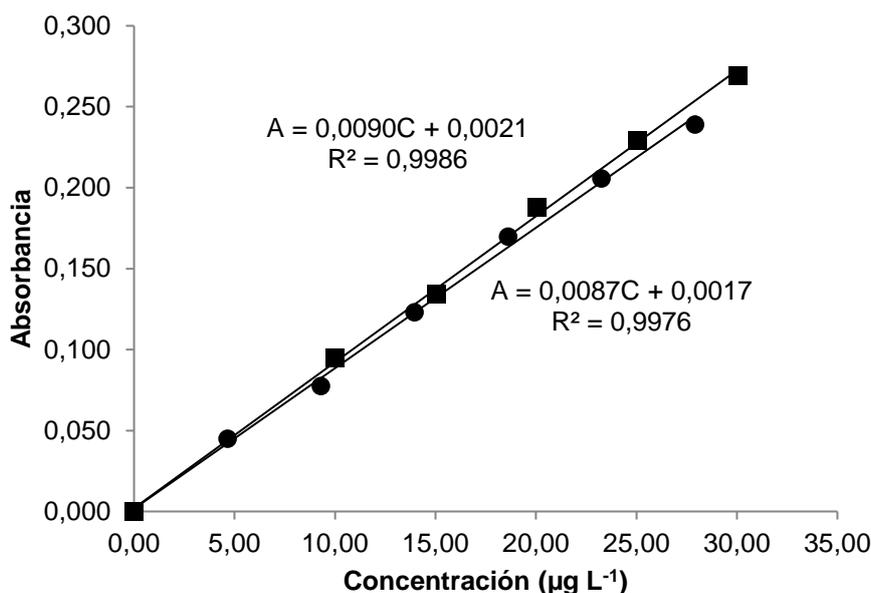


Figura 4.13 Curvas de calibración de las especies As(III) y As(V) en agua. ($A = 0,0090C + 0,0021$ corresponde a la curva de calibración de As(III) y está representado por ●; $A = 0,0087C + 0,0017$ es la curva de calibración de As(V) y los puntos están representados por ■)

El rango lineal se estableció a partir de la concentración correspondiente al límite de cuantificación y hasta $30 \mu\text{g L}^{-1}$, confirmado mediante inspección visual y análisis de residuos.

La curva de calibración se estableció en el rango de $4 - 30 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando As(V), ya que no hubo diferencias significativas entre las pendientes para As (III).

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron midiendo la dispersión las señales obtenidas del blanco. Para su cálculo se consideró el criterio “3s” y “10s” respectivamente. Se aplicaron las siguientes expresiones (siendo b la pendiente de la curva de calibración):

$$LD = \frac{3 * s}{b} \quad LC = \frac{10 * s}{b} .$$

En estas condiciones el LD fue de 1,2 y el LC de $3,9 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para la evaluación de la veracidad, se realizó una comparación de esta metodología con el método validado por la Unidad de Análisis de Aguas de Facultad de Química (UAA) que utiliza ET-AAS.

El método de la UAA determina As en aguas de consumo mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica. Se prepara una curva de calibración a partir de estándar de As(V) en agua en el rango de 0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, se utilizan tubos de grafito ELC® (Thermo Scientific™ Extended Lifetime Cuvettes y modificador de matriz: Paladio 500 mg L^{-1}).

Los tubos de grafito ELC® tienen un revestimiento pirolítico hasta 10 veces más grueso que el revestimiento estándar. Esto les confiere un rendimiento más estable y vida útil mucho más larga que los tubos comunes. Estos hornos son especialmente recomendados por el fabricante para análisis de alta intensidad con muestras complejas y para determinar elementos refractarios.

Se colocan en el tubo de grafito 20 μL de muestra y 10 μL de modificador. El programa de temperaturas utilizado se observa en la tabla 4.8

Tabla 4.8 Programas de temperatura para la determinación de As en aguas de consumo mediante ET-AAS (método de UAA).

T (°C)	Tiempo (s)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tipo de gas	Flujo
100	60	10	Argón	0,2 L/min
1300	20	150	Argón	0,2 L/min
2600	4	0	Argón	Apagado
2800	3	0	Argón	0,2 L/min

La señal analítica que se obtiene es el área integrada de la señal de absorbancia a 193,7 nm utilizando corrección de fondo Zeeman. Este método está basado en el método estándar de APHA 3113, *Metals by electrothermal atomic absorption spectrometry* (APHA 22th Edition, 2012).

En la Figura 4.14 se presentan los resultados de la comparación del método de la UAA (ET-AAS) con el método desarrollado (HG-AAS).

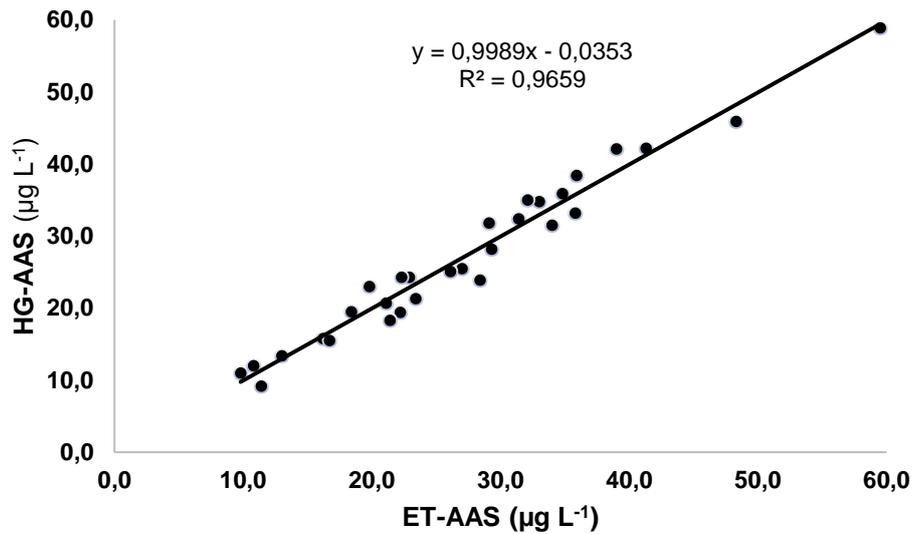


Figura 4.14 Correlación entre el método de referencia y el desarrollado. Eje x: concentración de As(III)+As(V) en $\mu\text{g L}^{-1}$ mediante ET-AAS (método validado de UAA). Eje y: concentración de As(III)+As(V) en $\mu\text{g L}^{-1}$ mediante HG-AAS.

Idealmente, ambos métodos son iguales o equivalentes cuando la ecuación para una tendencia lineal es $y = 1x$ (pendiente = 1, intersección = 0). El gráfico muestra que la correlación es buena, por lo tanto, los resultados tienen buen acuerdo, dentro del rango lineal de concentraciones validado ($R^2 = 0.9659$), pendiente = 0.9989 y la intersección = -0.0353.

Como se explicó en 1.2.1.1, se realizó el test de hipótesis conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen para la recta de regresión. El valor experimental del estadístico F_{exp} fue 0,014, siendo menor que el valor de tabla (3,340; $F_{0,05;2;30}$). Con este resultado se aceptó la hipótesis nula, lo que demuestra que la pendiente no difiere significativamente de 1 y que la ordenada en el origen no difiere significativamente del valor 0. En la figura 4.15 se puede observar la elipse de confianza para la comparación de ambos métodos, para el nivel de confianza de 0,05. Esta elipse comprende en su interior el valor cero de ordenada en el origen y el valor 1 de pendiente, lo cual justifica que ambos métodos son comparables.

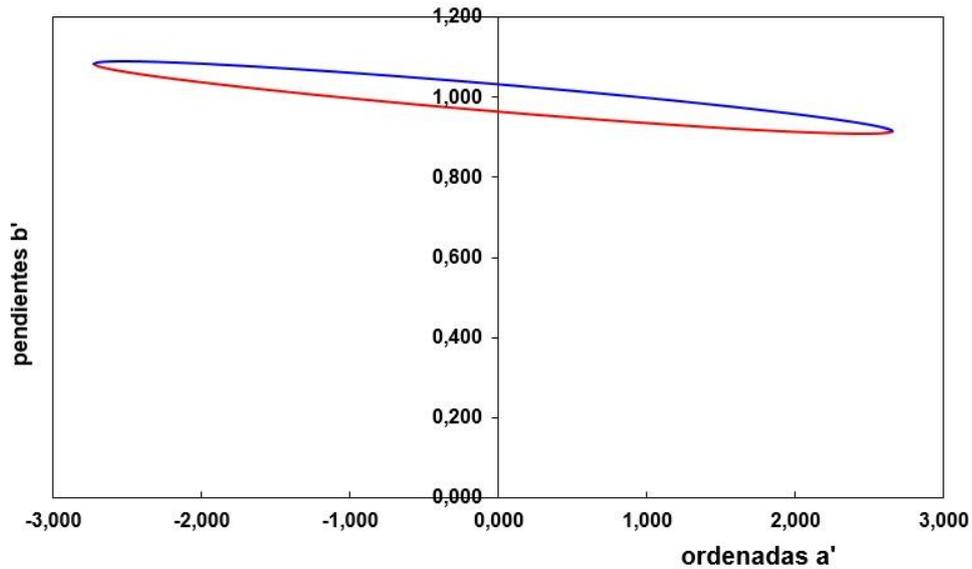


Figura 4.15 Elipse de confianza para la comparación del método HG-AAS con el método de referencia ETAAS

En la tabla 4.9 se muestra un resumen de los resultados de las principales cifras de mérito.

Tabla 4.9 Cifras de mérito para la determinación de As(III)+As(V) en muestras de agua

Parámetros	Resultado ($\mu\text{g L}^{-1}$)
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) (S/N=3; n=10)	1,2
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) (S/N=10; n=10)	3,9
Precisión intermedia (Sr%, n=5)	7,8
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4 - 30

Para el método validado de la UAA el LD es de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y el LC es de $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$. Si bien estos límites son menores que los obtenidos por el método propuesto, los mismos cumplen con la adecuación al propósito ya que el máximo admitido de As para agua de consumo por la OMS es $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y en Uruguay el límite establecido es $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Se debe considerar además, que el caso de las determinaciones con derivatización, se requiere una etapa de preparación de la muestra que introduce

variabilidad en la preparación del blanco (que se trata de igual forma que las muestras) mientras que en ET-AAS el blanco no lleva preparación (se trata de HNO₃ 0,1%).

MUESTRAS ANALIZADAS

Las 30 muestras analizadas provistas por la UAA se utilizaron para la validación del método propuesto. El resultado de su concentración es confidencial y no está disponible para su publicación.

Sí se analizaron las muestras obtenidas por la autora de la tesis: 3 muestras de agua embotellada, 3 muestras de agua de zonas termales del litoral del país y 4 muestras de agua corriente de OSE diferentes procedencias. Los resultados de dichas muestras se observan en la tabla 4.10.

Los niveles determinados en la mayoría de las muestras están por debajo del máximo admitido por la OMS, sin embargo, algunas muestras de la zona termal superaron este valor.

Tabla 4.10 Resultados de muestras de agua termales, aguas embotelladas y agua de OSE de diferentes puntos del país.

Tipo de agua	Procedencia	Resultado As(III) + As(V) (μgL^{-1})	Fecha
Termal	<u>Piscina</u> Muestra del agua de la piscina de hotel termal Departamento de Salto (Termas de Daymán)	45,1	20151016
	<u>Agua para beber</u> Muestra del agua para beber de hotel termal Departamento de Salto (Termas de Daymán)	42,0	20151016
	<u>Agua para beber</u> Muestra agua para beber hotel termal	58,9	20141111

Tipo de agua	Procedencia	Resultado As(III) + As(V) (μgL^{-1})	Fecha
Departamento de Salto (Termas de Salto Grande)			
Embotellada	Agua SALUS	ND	20141111
	Agua matutina	ND	20150714
	Agua LULI	ND	20151130
	(Tacuarembó)		
Agua corriente (OSE)	Facultad de Química	14,0	20150714
ND: No detectado			

La ubicación de los pozos termales donde se recogieron muestras, en el departamento de Salto, se observa en la figura 4.16.

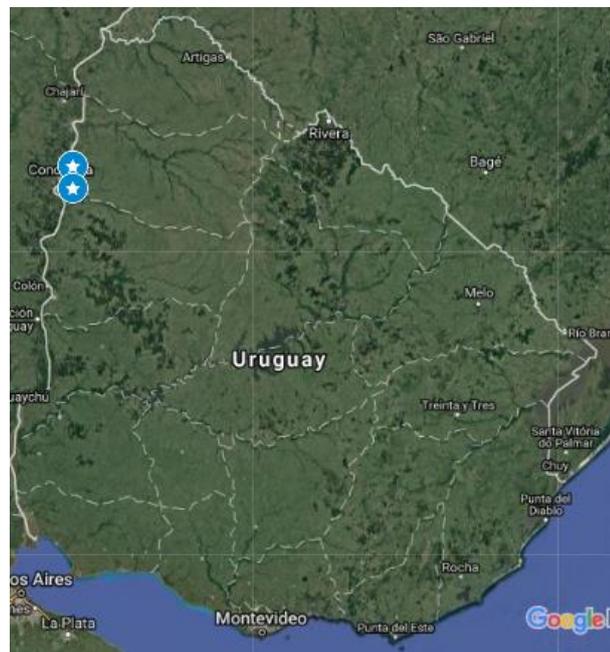


Figura 4.16 Ubicación de las zonas donde se muestrearon aguas termales. (adaptado de Google Maps <https://www.google.com/maps>)

En las aguas de los pozos termales muestreados, se encontraron niveles superiores a los $10 \mu\text{g L}^{-1}$ recomendados por la OMS. Esto abre una perspectiva de estudio a futuro sobre los niveles de As en agua de bebida en estas zonas del país.

1.2.2.3 CONCLUSIONES PARCIALES

Se desarrolló y validó un método adecuado para el propósito de la determinación de la suma de las especies de As más comúnmente encontradas en aguas embotelladas, agua corriente y aguas subterráneas, como son As(III) y As(V). Este método se realiza en las mismas condiciones operativas que cuando se analiza orina, sin la necesidad de otro equipo, lo que constituye una ventaja importante para el desempeño eficiente de laboratorios de análisis de rutina.

Si bien se han analizado pocas muestras de aguas subterráneas, se destaca que aquellas procedentes de perforaciones termales de nuestro país (Salto) presentan niveles de As superiores a los límites de OSE ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) y muy por encima de los límites objetivo de la OMS ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Esto justifica los controles sistemáticos que se están realizando en Uruguay a través de OSE y URSEA para evaluar los niveles de iAs en aguas subterráneas destinadas al consumo para estar alerta en los casos en que se comienza a detectar niveles altos en las fuentes. Así mismo, sería importante contar con estudios epidemiológicos que incluyan el monitoreo de los niveles de As en orina de los habitantes de las zonas cuya agua de consumo presente niveles de As superiores a la normativa internacional.

2. DETERMINACIÓN DE AS TOTAL EN ORINA MEDIANTE ET-AAS

2.1. ANTECEDENTES

La espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS) es ampliamente utilizada para análisis de niveles trazas de metales en muestras biológicas, ya que ofrece excelentes límites de detección con una mínima cantidad de muestra (5 – 100 μL) (Subramanian, 1996). La mayoría de los métodos para la determinación de arsénico total requieren una completa descomposición de todos los compuestos de arsénico presentes en la muestra. Esto puede conseguirse mediante una serie de procedimientos de descomposición como, por ejemplo, digestión ácida con mezclas de HNO_3 , HClO_4 y H_2SO_4 (Norin & Vahter, 1981; Campillo *et al.*, 1999) y digestión ácida asistida con microondas con $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (2:1) (Afridi *et al.*, 2009). Una estrategia reportada es, por ejemplo, el calentamiento hasta llevar la muestra a cenizas sobre una plancha a 420°C con $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y otra es la descomposición en horno de microondas con $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Sysalova y Spevackova, 2003). También se reportan diferentes estrategias de extracción: acidificando la orina con HCl y extraeyendo posteriormente las diferentes especies arsenicales con tolueno en presencia de KI e hipofosfito de sodio (Subramanian, 1989; Raźniewska *et al.*, 2004).

Sin embargo, todos los procedimientos anteriormente descritos, requieren mucho tiempo y además debido a la cantidad de pasos que llevan, pueden ser propensos tanto a la contaminación, como a la pérdida del analito. Una alternativa, es el análisis directo del fluido biológico mediante ETAAS, sin el paso previo de mineralización. En este caso, la modificación de la matriz es necesaria para permitir temperaturas de pirólisis incrementadas, y disminuir así las grandes señales de absorción no específicas procedentes de la matriz (o señales de fondo).

Las sales de níquel han sido ampliamente utilizadas como modificadores de matriz para la determinación de arsénico, aunque también se han sugerido otros productos químicos con el mismo propósito. Además, la presencia de hierro y fosfato en matrices biológicas, hace que los sistemas de corrección de fondo de arco de deuterio compensen excesivamente en líneas de resonancia de arsénico tales como

193,7 y 197,2 nm y por lo tanto se recomienda comúnmente la corrección de fondo basada en Zeeman.

Los problemas en la determinación de arsénico causados por altos niveles de fondo no se resuelven solamente con el uso de este procedimiento de corrección. En muestras de orina, debido a la existencia de cloruros (el contenido de NaCl puede ser hasta de 1%), puede ocurrir pérdida del analito, por lo tanto, es esencial añadir un modificador químico como el Ni, para estabilizar el analito durante la temperatura de atomización formando el compuesto As-Ni (Subramanian, 1996).

Algunos autores proponen que la determinación de As en matrices biológicas como la orina, el suero o la sangre puede llevarse a cabo mediante inyección directa de las muestras en el atomizador, siempre que se sometan a una simple etapa de dilución. Esta dilución contribuye a eliminar el efecto matriz.

En la misma línea de evitar la digestión previa de las muestras de orina, Nixon *et al.* (1991) utilizan el oxidante persulfato de potasio, el cual se agrega directamente al horno, para lograr la oxidación "*in situ*" de la orina mezclado con un modificador de matriz clásico, el Pd. Con el calor, la oxidación prosigue, dando como resultado la descomposición instantánea del persulfato residual en sulfato.

Campillo *et al.* (1999) proponen también el uso de modificadores que aportan una etapa de digestión "*in-situ*" de la muestra dentro del horno utilizando mezclas de peróxido de hidrógeno, ácido nítrico y una sal de níquel, junto con el uso de programas de hornos convencionales, reduciendo considerablemente la aparición de residuos carbonosos dentro del atomizador.

2.2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

REACTIVOS

Todo el material de vidrio fue sumergido en ácido nítrico 10% v/v durante toda la noche y luego enjuagado con agua ultrapura. El agua ultrapura de (ASTM Tipo I, 18.2 MΩcm de resistividad) fue obtenida mediante un purificador Millipore Simplicity 185.

Los patrones de las diferentes especies de As se describen en la sección 1.1 de este capítulo 4.

Se utilizan los siguientes modificadores:

- Pd: Se pesan 250 mg de solución stock de Pd (10000 mg L^{-1}) y se diluye a 5 g con HNO_3 0,1%. Proteger de la luz. Esta disolución de 500 mg L^{-1} es estable por 30 días.
- Ni: 5 mg de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ por mL.
- Pd- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: Se prepara mezclando una parte de una solución de Pd $6,0 \text{ g L}^{-1}$ en HNO_3 15% con una parte de una solución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 20 g L^{-1} .
- Ni- H_2O_2 - HNO_3 : 0,5% Ni; 15% H_2O_2 ; 0,65% HNO_3 .

INSTRUMENTACIÓN

Las determinaciones analíticas se realizaron utilizando un espectrómetro Thermo iCE 3000 Series (Figura 4.17).



Figura 4.17 Espectrómetro Thermo iCE 3000 Series.

Posee auto-sampler configurable por el usuario, carrusel de seis lámparas de alineación automática y tiene la opción de usar corrector Zeeman o corrección de fondo de Deuterio para un mejor rendimiento. Consta de un módulo de horno de tubo de grafito calentado transversalmente (GFS35Z) y un módulo auto-sampler (GFS33), ambos de Thermo Fisher Scientific.

La lámpara de cátodo hueco utilizada (Photron, Pty. Ltd., Victoria, Australia), fue operada a la línea analítica para la determinación de As de 193,7 nm. El espectrómetro fue controlado mediante un software específico, SOLAAR (Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido). La absorbancia integrada (área de pico) fue utilizada para evaluación de las señales y la cuantificación. Se utilizaron tubos de grafito ELC® (Thermo Scientific™ *Extended Lifetime Cuvettes*) para todas las determinaciones. Gas argón 99,999% (Linde, Montevideo, Uruguay) fue utilizado como gas de purga y protector.

2.3. MÉTODO

La orina utilizada para la calibración y la optimización de la metodología, fue de adultos no expuestos, como se explicó anteriormente; se utiliza un *pool* de dichas orinas de al menos 3 personas.

Las muestras se conservan congeladas a -10°C. Se descongelan a temperatura ambiente, se homogeneizan por agitación y se centrifugan por 15 minutos a 3500 rpm.

OPTIMIZACIÓN

Las condiciones que se optimizaron fueron: la dilución de las muestras (ya que es una de las estrategias reportadas para eliminar efecto matriz y altos fondos), el modificador y las temperaturas óptimas de secado, pirólisis y atomización.

Para optimizar las condiciones experimentales se ensayaron modificadores de matriz clásicos, como ser: Pd, Pd-Mg, Ni, además de diferentes mezclas de modificadores con oxidantes, reportados en diferentes trabajos, como: Pd-K₂S₂O₈ y Ni-H₂O₂-HNO₃.

Se realizaron las curvas de pirólisis y atomización para cada uno de los modificadores detallados anteriormente adicionando As(V) de modo de lograr una concentración de 40 µg L⁻¹ en un *pool* de 5 orinas de voluntarios no ocupacionalmente

expuestos. Se trabajó con orina sin diluir y diluciones 1:1, 1:5 y 1:10 (en HNO₃ 0.65 % (v/v) y Tritón 1 %)

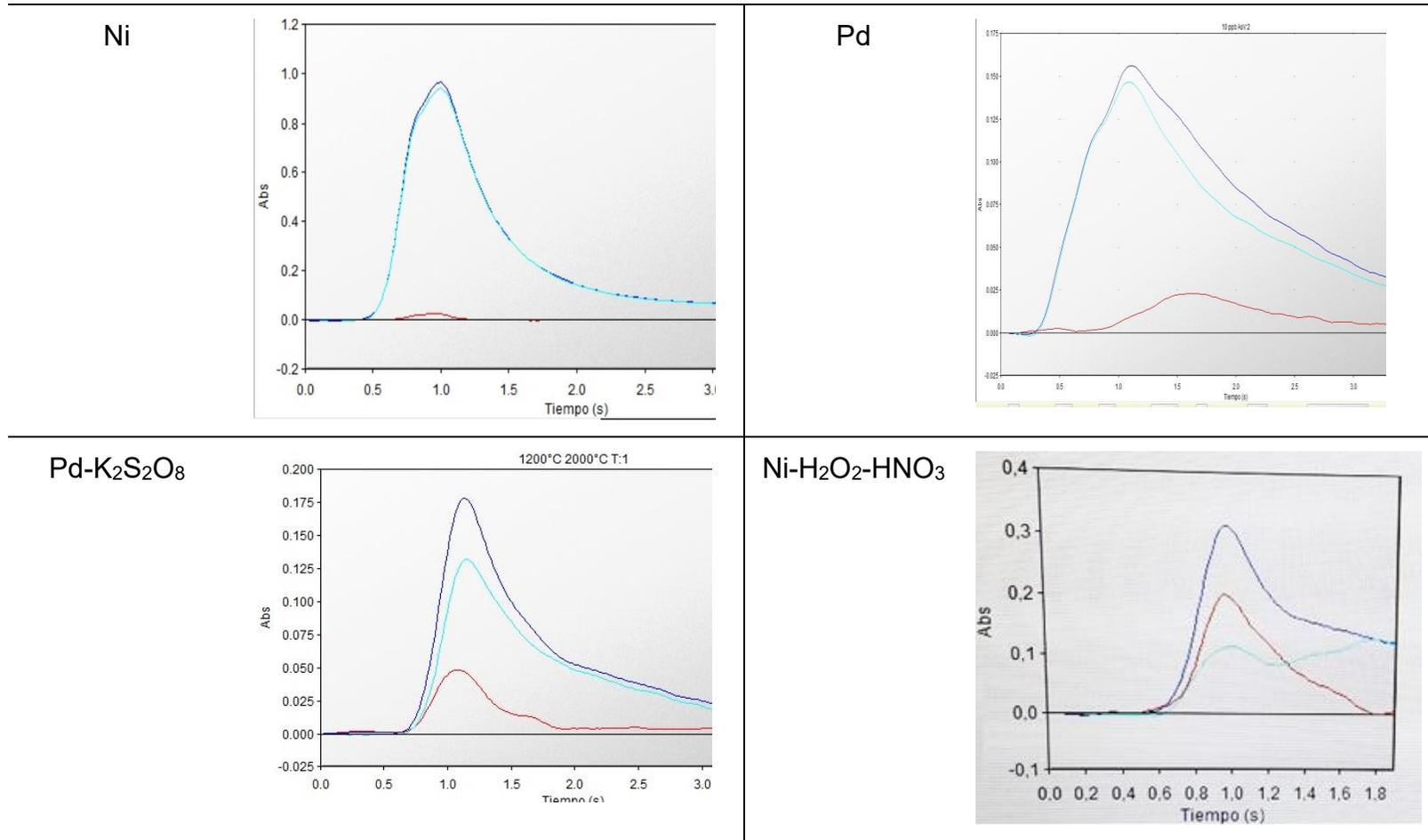
La señal analítica utilizada en esta técnica fue el área integrada.

En la tabla 4.11 se observan las señales obtenidas para los diferentes modificadores utilizando las temperaturas óptimas de pirólisis y atomización según cada modificador.

Para modificadores clásicos como Pd y Ni se observaron señales de fondo significativas, y señales corregidas de A muy bajas, lo cual se explica por la complejidad de la matriz orina. Debido a la complejidad de la matriz, y de acuerdo a lo reportado por Nixon *et al.* (1991), quienes utilizan el modificador de matriz clásico Pd mezclado con el oxidante persulfato de potasio, con el objetivo de lograr la oxidación *in situ* de la matriz, al probar este modificador, como puede observarse en la tabla 4.11 una mejora de la señal corregida y una señal de fondo más baja con respecto a las obtenidas con Pd y Ni.

La mejor relación entre señal de fondo y señal corregida, se obtuvo utilizando el modificador propuesto por Campillo *et al.* (1999), compuesto por mezclas de peróxido de hidrógeno, ácido nítrico y una sal de níquel.

Tabla 4.11 Señales obtenidas para un *pool* de orina adicionado con 25 ppb As(V) y diluido 1:1 para los diferentes modificadores ensayados. (azul: señal total; celeste: fondo; rojo: señal corregida).



En la figura 4.18 se observa la curva de calcinación y pirólisis obtenida para el modificador $\text{H}_2\text{O}_2\text{-HNO}_3\text{-Ni}$ y dilución 1:1 en HNO_3 0,65 % (v/v) y Tritón 1 %.

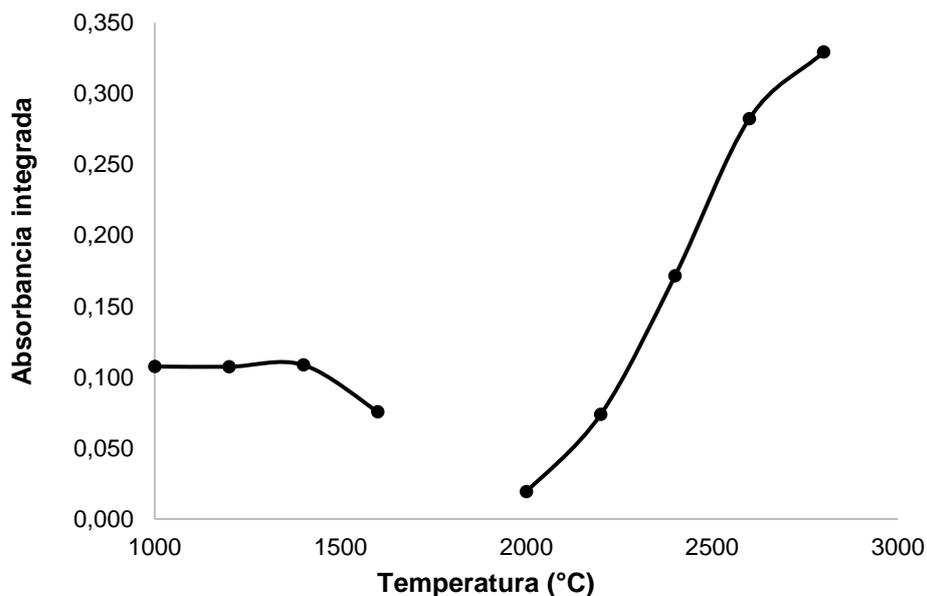


Figura 4.18 Variación de la señal analítica con las temperaturas de calcinación y atomización en presencia de 0,5% w/v Ni; 0,65% w/v HNO_3 y H_2O_2 15% w/v como modificador químico en muestra de orina diluida 1 + 1 adicionada con As(V) $40 \mu\text{gL}^{-1}$

Se colocan en el horno $10 \mu\text{L}$ de modificador y $10 \mu\text{L}$ de muestra.

Las condiciones operativas que presentaron mejores resultados se presentan en la tabla 4.12

Tabla 4.12 Condiciones operativas del horno.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Rampa (°C/s)	Flujo gas (L min ⁻¹)
95	15	4	0,2
120	20	10	0,2
1400	15	20	0,2
2800	4	0	Apagado
2900	3	0	0,2

La temperatura y el tiempo óptimos de secado fueron estudiados para que las muestras de orina estuvieran completamente secas antes de la calcinación. Las pérdidas de analito aparecen a temperaturas de calcinación mayores a 1400 °C, según se observa en la figura 4.18.

En dicha figura también se observa que la señal del analito aumenta con la temperatura de atomización, seleccionándose 2800 °C, como la temperatura óptima de atomización.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Las muestras de orina se descongelan a temperatura ambiente, luego se centrifugan, se homogeneizan y se diluyen al medio con una solución de ácido nítrico 1% v:v y Tritón 1% m/v.

Se colocan en viales en el automuestreador del equipo.

Se prepara la curva de calibración adicionando As (V) sobre *pool* de orinas diluida 1:1. Se colocan en el horno 10 µL de modificador (0,5% Ni, 15% H₂O₂, 0,65% HNO₃) y 10 µL de muestra.

Se utilizan las condiciones operativas que se presentaron en la tabla 4.12 (Tabla de temperaturas)

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VALIDACIÓN

Una vez optimizados los parámetros críticos, se evaluaron las principales cifras de mérito para validar el método desarrollado.

Para el desarrollo y la validación del método, se utilizó un *pool* de al menos tres muestras de orina de adultos voluntarios sanos no expuestos ocupacionalmente como matriz.

La curva de calibración se realiza en orina ("*matrix-matched standards*"), ya que la pendiente de la curva de calibración en agua fue significativamente diferente.

La precisión (RSD%) se estimó por repetición tanto instrumental como analítica. Para la precisión analítica, se analizaron 10 muestras de orina adicionada (*pool*). Cada muestra se midió 10 veces (para la precisión instrumental). La precisión analítica fue del 7% (expresada como RSD%), para una concentración de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La repetibilidad ($n=10$) para los diferentes niveles de la curva de calibración (5 - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) se situó en el rango de 6,7% (para la concentración más alta) a 9,0% (para la más baja).

La precisión intermedia $s_r(\%)$, ($n = 5$; 5 días diferentes) se evaluó utilizando muestras de orina adicionada con 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada una de las siguientes especies: As(III), As(V), MMA, DMA y AsB el resultado fue de 9,3 %

Para la evaluación de la linealidad, se midieron 9 orinas fortificadas con As (V) hasta 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$) y los resultados se representaron en función de la concentración (Figura 4.19). La función de calibración fue $A = 0,0014C + 0,0013$ ($A =$ área integrada, $C =$ concentración en $\mu\text{g L}^{-1}$, $R^2 > 0,99$).

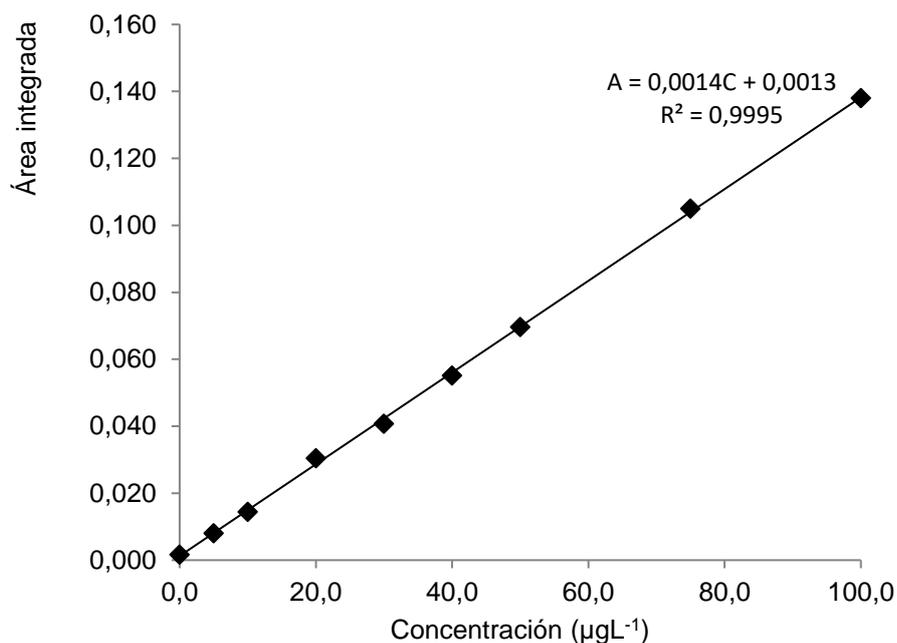


Figura 4.19 Curva de calibración para determinación de As total mediante ET-AAS.

El rango lineal se estableció a partir de la concentración correspondiente al límite de cuantificación hasta 100 µg L⁻¹, confirmado mediante inspección visual y análisis de residuos.

La curva de calibración de rutina se estableció en el rango de 5 - 100 µg L⁻¹ utilizando As (V), ya que no hubo diferencias significativas entre las pendientes para las otras especies (As (III), As(V), DMA, MMA y AsB). Además, se realizó un blanco de calibración utilizando el *pool* de orinas utilizado para la calibración.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron midiendo la dispersión las señales obtenidas de un grupo de muestras de orina de voluntarios no expuestos (n = 10) sin adición (blancos). Para su cálculo se consideró el criterio “3s” y “10s” respectivamente. Se aplicaron las siguientes expresiones (siendo b la pendiente de la curva de calibración):

$$LD = \frac{3 * s}{b} \quad LC = \frac{10 * s}{b} .$$

En estas condiciones, LD fue 1,5 y LC 4,9 µg L⁻¹.

La veracidad fue evaluada fortificando muestras de orina blanco con cada una de las diferentes especies por separado y con mezclas de las 4 especies As(V)/As(III)/DMA/MMA a diferentes niveles de concentración. Los porcentajes de recuperación para orinas fortificadas se presentan en la Tabla 4.13:

Tabla 4.13 Recuperaciones obtenidas de las muestras adicionadas

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As(III)	As(V)	MMA	DMA	AsB	As(III) + As(V) + MMA+ DMA+ AsB
25,0	89,3	99,8	102,3	112,0	95,1	102,4
50,0	91,8	100,2	88,9	97,4	103,7	98,7

Las recuperaciones se situaron entre 88,9 y 112 %. El intervalo aceptable, considerando la incertidumbre en términos de variabilidad aleatoria (RSD), se estableció en el rango de 85-115%. Dado que los blancos no produjeron señales significativas, no hay evidencia de contaminación y los valores dentro de este rango se consideran que no tienen sesgo significativo.

Se realizó una comparación de esta metodología con otra metodología considerada como la “*gold technique*” (como se mencionó en la validación de HG-AAS). La comparación se realizó analizando 18 muestras mediante esta técnica de referencia en el laboratorio de Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia y el método propuesto en esta tesis.

En la Figura 4.20 se presentan los resultados de la comparación.

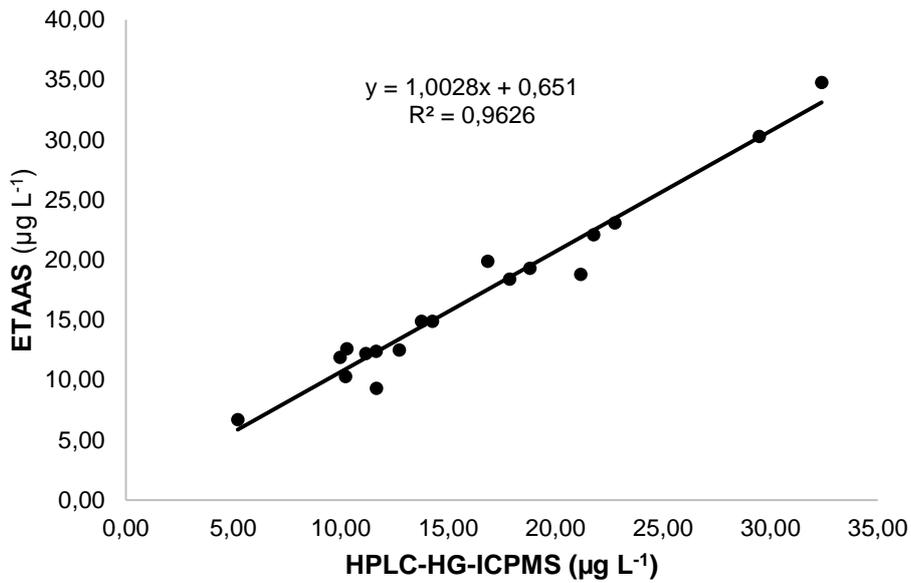


Figura 4.20 Correlación entre el método de referencia y el desarrollado.

Idealmente, ambos métodos son iguales o equivalentes cuando la ecuación para una tendencia lineal es $y = 1x$ (pendiente = 1, intersección = 0). El gráfico muestra que la correlación es buena, por lo tanto, los resultados se encontraban en buen acuerdo, dentro del rango lineal de concentraciones validado ($R^2 = 0,9626$), pendiente = 1,0028 y la intersección = 0,651.

Se realizó el test de hipótesis conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen para la recta de regresión. El valor experimental del estadístico F_{exp} fue de 2,510 siendo menor que 3,634 el cual es el valor F de tablas ($F_{0,05;2;18}$). Con este resultado se acepta la hipótesis nula, lo que quiere decir que la pendiente no difiere significativamente de 1 y que la ordenada en el origen no difiere significativamente del valor 0. En la figura 4.21 se puede observar la elipse de confianza para la comparación de ambos métodos, para el nivel de confianza de 0,05. Esta elipse comprende en su interior el valor cero de ordenada en el origen y el valor 1 de pendiente, lo cual justifica que ambos métodos son comparables.

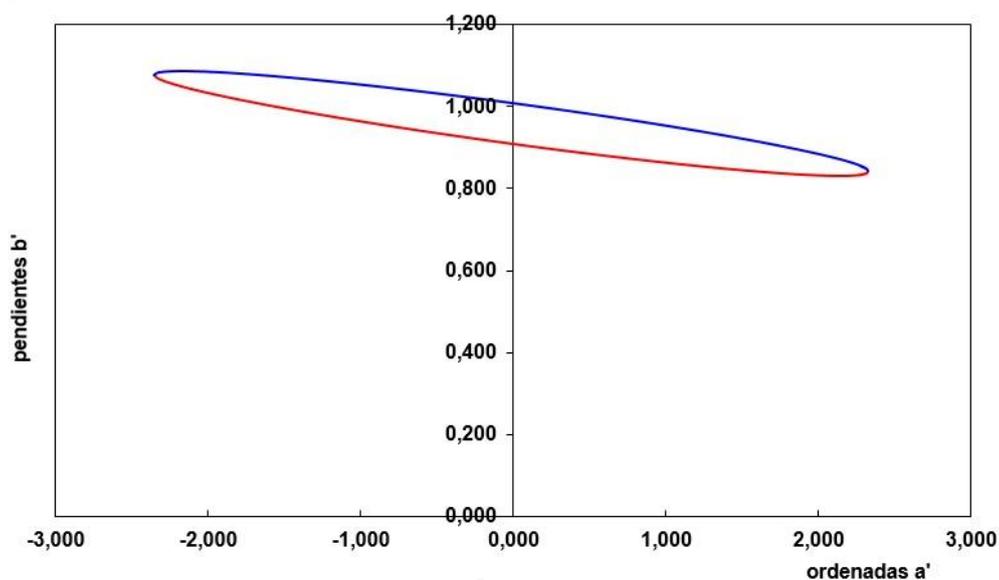


Figura 4.21 Elipse de confianza para la comparación del método ETAAS con el método de referencia HPLC-ICP-MS

En la Tabla 4.14 se resumen las cifras de mérito más relevantes.

Tabla 4.14 Cifras de mérito de la validación de la determinación de As en orina mediante ET-AAS

Parámetros	Resultado
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) (S/N=3; n=10)	1,5
LC ($\mu\text{g L}^{-1}$) (S/N=10; n=10)	4,9
Precisión intermedia (sr%, n=5)	9,3
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5 -100
Veracidad (%; n=10)	85 -115

2.5. CONCLUSIONES PARCIALES

Se validó un método para la determinación de As total en muestras de orina mediante ET-AAS.

Los resultados obtenidos son adecuados para las determinaciones de As total, ya que en base a las recomendaciones internacionales y reglamentación uruguaya: el As en orina debe ser menor a $35 \mu\text{g L}^{-1}$ para los trabajadores expuestos ocupacionalmente. Sin embargo, en el caso de que la persona hubiera ingerido días previos a la recolección de su muestra de orina pescados y/o mariscos, esto puede llevar a la sobrecuantificación de la exposición al As, ya que la metodología desarrollada cuantifica además de las especies toxicológicamente relevantes, la AsB, por lo tanto el resultado corresponde a la suma de las especies: As(III) + As(V) + MMA + DMA + AsB.

Una alternativa para que esta metodología pudiera ser utilizada de rutina para la determinación de especies toxicológicamente relevantes, sería que el trabajador no ingiriera peces ni mariscos por lo menos durante los tres días previos a la recolección de su muestra de orina, esto evitaría que en su orina se excretara la AsB, especie que como se explicó anteriormente, puede presentarse tanto en peces como en mariscos. Aun con esta recomendación puede haber una sobrestimación del valor, ya que puede ser difícil para los trabajadores recordar esta recomendación en todas sus ingestas durante tantos días previos y llevarla a cabo.

Este método es otra alternativa validada no - acoplada disponible para la determinación de las diferentes especies toxicológicamente relevantes con las limitantes referidas a los aportes dietarios en las condiciones de muestreo.

3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE AS MEDIANTE ACOPLE HPLC-HG-AAS

3.1. ANTECEDENTES

Las metodologías que se han desarrollado y validado, son de gran utilidad para analizar las especies toxicológicamente relevantes porque son capaces de cuantificar conjuntamente el As inorgánico y los productos del metabolismo de éste: el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsónico (DMA). Sin embargo, otra variante, son las técnicas para determinar las especies por separado, que consisten en el acoplamiento de un sistema separativo al sistema de detección, lo cual permite cuantificar en forma aislada, las distintas especies químicas que se forman por el metabolismo del As inorgánico en el ser humano, así como también la presencia de otras especies arsenicales. Estas técnicas son de interés adicional en la evaluación clínica de los individuos expuestos, porque se ha demostrado que la separación y diferenciación de las especies de As en la orina de individuos normales y en individuos enfermos, es importante para la evaluación de los efectos adversos de los compuestos As y poder caracterizar las variabilidades inter e intra-individuales (Hsu *et al.*, 2011).

En las técnicas acopladas o "*hyphenated techniques*" utilizadas para especiación de As, una técnica separativa está acoplada con un método de detección selectivo y sensible. El objetivo de estas técnicas es identificar y cuantificar cada una de las especies por separado. En general, se utiliza cromatografía líquida, HPLC, para separar las diferentes especies de As; luego éstas se transportan hacia un detector espectroscópico, logrando entonces identificar y cuantificar las diferentes especies (Brima *et al.*, 2006).

Se utilizan diversos modos de separación cromatográfica para el análisis de especiación de As, incluyendo intercambio aniónico, intercambio catiónico, fase reversa de pares iónicos, exclusión de iones y exclusión por tamaño (Baba *et al.*, 2014). Las columnas de intercambio de aniones, especialmente la Hamilton PRP-

X100, han sido las más utilizadas para muchas aplicaciones durante aproximadamente 20 años (Francesconi & Kuehnelt, 2004; Sur & Dunemann, 2004; Baba *et al.*, 2014). Las columnas Hamilton PRP-X100 tienen un relleno polimérico (PS-DVB: Polystyrene-divinylbezene) estable frente a valores extremos de pH (1-14), siendo su grupo activo el ion amonio (fase cuaternaria) (Sigma-Aldrich, 2017).

Como fase móvil se utiliza frecuentemente un buffer fosfato para la separación de intercambio aniónico. Para obtener tiempos de retención estables durante largos recorridos analíticos (más de 12 horas), en general se termostatiza la columna (Lindberg *et al.*, 2007).

A continuación, se presentan en la tabla 4.15 algunos ejemplos de diferentes estrategias reportadas para la separación de especies de As mediante HPLC, quedando de manifiesto la variedad de mecanismos, columnas y fases móviles posibles. etc.

Tabla 4.15 Algunos ejemplos de diferentes modos de separación cromatográfica (Especificaciones de columna y fase móvil para diferentes sistemas acoplados HPLC-HG-AAS/ HPLC-HG-AFS/HPLC-ICP-MS)

	Columna	Fase móvil	Flujo (mL min ⁻¹)	Volumen de inyección (μ L)	Temperatura de la columna (°C)	Referencia
Intercambio aniónico	Hamilton PRP-X100	A: 10mM Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O/20mM NaCl, pH 9; 4–11 min, 100% B: 50mM Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O/30mM NaCl, pH= 9	1,4	100	-	Sur <i>et al.</i> , 2004
	Hamilton PRP-X100 (250 × 4,6 mm)	20 mmol L ⁻¹ Buffer fosfato pH=6,00.	-	50	-	Marschner <i>et al.</i> , 2016
	Hamilton PRP-X110	NH ₄ H ₂ PO ₄ pH= 5,8	1	100	40	Lindberg <i>et al.</i> , 2007
	Supelco LC- SAX1 (250mm×4,6 mm, 5_μm)	Na ₂ HPO ₄ (5 mmol L ⁻¹), KH ₂ PO ₄ (50 mmol L ⁻¹), pH=5,40	3	200	20	Niedzielski, 2005
	Sigma-Aldrich Discovery HS F5 (PFP)	0,1% (v/v) ácido fórmico; 1% (v/v) metanol	1	200	Ambiente	Baba <i>et al.</i> ,

	Columna	Fase móvil	Flujo (mL min ⁻¹)	Volumen de inyección (μ L)	Temperatura de la columna (°C)	Referencia
	Dionex IonPac AS22	20 mM NH ₄ HCO ₃ pH =10,0	-	-	-	2014 Suzuki <i>et al.</i> , 2009
Intercambio catiónico	Spherisorb S SCX 120_4 mm (5 mm)	12 mmol L ⁻¹ buffer fosfato (KH ₂ PO ₄ :H ₃ PO ₄)–2,5 mmol L ⁻¹ L-cisteína pH= 3,3–3,5	1,0–1,2	100	-	Tsalev <i>et al.</i> , 2000
Par iónico	Phenomenex C18–ODS-3 (150 × 4,6 mm, 3 μ m tamaño de partícula)	4,7 mmol L ⁻¹ hidróxido de tetrabutilamonio y 2 mmol L ⁻¹ ácido malónico en 4% metanol pH= 5,85	-	50	-	Marschner <i>et al.</i> , 2016

La columna Hamilton PRP-X100 es una de las más utilizadas, pero es bastante costosa (al menos en nuestro medio). Baba *et al.* (2014) investigaron las condiciones de HPLC para el análisis de la especiación de arsénico usando una fase móvil simple, elución isocrática y columnas de pentafluorofenilo (PFP) basadas en sílice, que son menos costosas que las columnas poliméricas, tales como el PRP-X100. El PFP interactúa con analitos a través de dipolo-dipolo, transferencia de carga e interacciones de intercambio iónico (Baba *et al.*, 2014).

También la columna Dionex IonPac AS22 es otra alternativa menos costosa y aparece reportada en diferentes trabajos de especiación de As (Suzuki *et al.*, 2009) y en especificaciones del fabricante (Thermo Scientific, 2013).

Para cumplir con el objetivo de desarrollar un acople de bajo costo como herramienta tecnológica para separar especies de As en matrices como agua y orina, se trabajó en la optimización de un acople HPLC-HG-AAS. Se contaba al momento de comenzar la tesis, año 2012, con un espectrómetro de absorción atómica con el módulo para generación de hidruros y un cromatógrafo HPLC con arreglo de diodos (DAD) en el laboratorio.

En el año 2013 se postuló un proyecto a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) en el que se solicitaban fondos para la adquisición de un módulo de bombeo de HPLC, idéntico al módulo del equipo existente en el laboratorio a los efectos de poder reproducir condiciones de separación desarrolladas en ese equipo

de forma lo más parecida posible. Si bien esto no era un requisito indispensable, los módulos de la marca Shimadzu tienen la posibilidad de control tanto manual como vía software, característica que no es fácil encontrar en el mercado, y más difícil aún era encontrar un proveedor para nuestro país que vendiera solo el módulo de bombeo y el inyector. Este proyecto recibió financiación en el año 2015 y el módulo fue entregado a nuestro laboratorio recién en el año 2016.

En primer lugar, entonces, se comenzó con la optimización y puesta a punto de las condiciones de separación de especies de As en agua a niveles de partes por millón para poder utilizar el HPLC convencional con detección UV. Una vez establecidas las condiciones óptimas se esperaba reproducirlas a niveles de partes por billón, y en niveles adecuados para la aplicación propuesta, acoplando el módulo de bombeo, misma columna al módulo de generación de hidruros y así construir de forma “casera” el acople HPLC-HG-AAS.

Se dedicó bastante tiempo al estudio del uso de diferentes columnas y modos de operación hasta conseguir la separación mediante HPLC-DAD.

En esta sección se presentan los resultados y los avances en el desarrollo del acople.

3.2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

REACTIVOS

Los patrones de las diferentes especies se describen en la sección 1.1 de este capítulo 4.

Preparación de fase móvil:

- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH=5,8: se pesa una masa apropiada de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (99,5%, Merck) y se disuelve en agua para obtener una concentración final de 60 mM; se ajusta a pH = 5,8 con NaOH 1M; se filtra por vacío a través de filtro de membrana de poliamida de 0,45 μm de tamaño de poro.
- 0,1% (v/v) ácido fórmico/ 1% (v/v) metanol: se preparan las diluciones apropiadas con agua ultrapura utilizando ácido fórmico (Suprapur®, (98-

100)%, Merck) y metanol (para HPLC-PLUS gradiente, Carlo Erba) filtrando de la misma forma que para la fase móvil anteriormente descrita.

INSTRUMENTACIÓN

- Cromatógrafo HPLC Shimadzu que cuenta con varios módulos independientes interconectados: bomba (Modelo LC – 20AT), desgaseador (Modelo DGU – 20A 5), Autosampler (SIL – 20A HT), horno de Columna (CTO – 10AS VP) y detector de Arreglo de Diodos (SPD – M20A).
- Módulo de bombeo de líquidos Shimadzu (bomba HPLC e inyector HPLC para acoplar al equipo de absorción atómica; adquiridos con fondos del proyecto María Viñas FMV_3_2013_1_100439)
- Espectrómetro de absorción atómica con módulo en flujo para generación de hidruros: Varian 55B/ Varian VGA77.

Columnas:

- Dionex IonPack® AS22, 4x250 mm.
- Kinetex® PFP, 50x4.6 mm.

DESARROLLO

Tal como se mencionó, se trabajó en dos etapas. En la primera etapa se optimizaron las condiciones cromatográficas utilizando concentraciones de las diferentes especies del orden de los mg L⁻¹ utilizando sistema de detección de arreglo de diodos (DAD) del equipo HPLC. En la segunda etapa se optimizó el acople del módulo de bombeo e inyector con el espectrómetro de absorción atómica, trabajando con concentraciones de las especies del orden de los µg L⁻¹.

Para la optimización de las condiciones cromatográficas se trabajó con

concentraciones de las especies de 1 mg L^{-1} utilizando como sistema de detección el detector DAD del equipo HPLC a $\lambda=192\text{nm}$.

Se trabajó con diferentes columnas, ambas de intercambio aniónico:

- Dionex IonPack® AS22, 4x250 mm.
- Kinetex® PFP, 50x4.6 mm.

En la figura 4.22 y en la tabla 4.16 se observan el cromatograma obtenido para la columna IonPack® AS22 y los tiempos de retención para las diferentes especies. Se utilizó una fase móvil $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 6mM ajustada a un $\text{pH}=5,8$ a flujo constante de $1,5 \text{ mL/min}$. El volumen de inyección fue de $10 \mu\text{L}$.

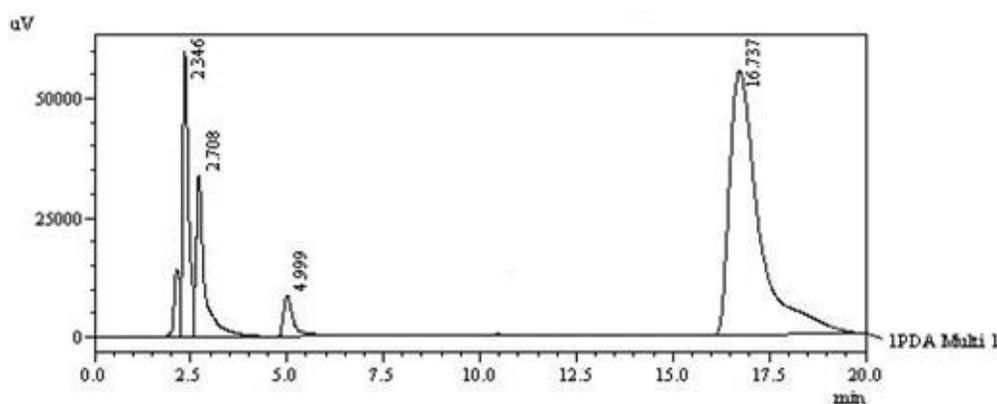


Figura 4.22 Cromatograma obtenido inyectando una mezcla de As(III), As(V), MMA y DMA; fase móvil $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en concentración 6 mM a flujo constante ($1,5 \text{ mL/min}$).

Tabla 4.16 Tiempos de retención para el cromatograma de la figura 4.22.

Especie	Tiempo de retención (min)
As(III)	2,346
DMA	2,708
MMA	4,999
As(V)	16,137

Para esta columna se ensayaron diferentes concentraciones de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

trabajando en forma isocrática y con gradientes de fase móvil, también se ensayaron diferentes gradientes de flujo, sin lograr mejorar la resolución de las especies As(III) y DMA (Figura 4.23).

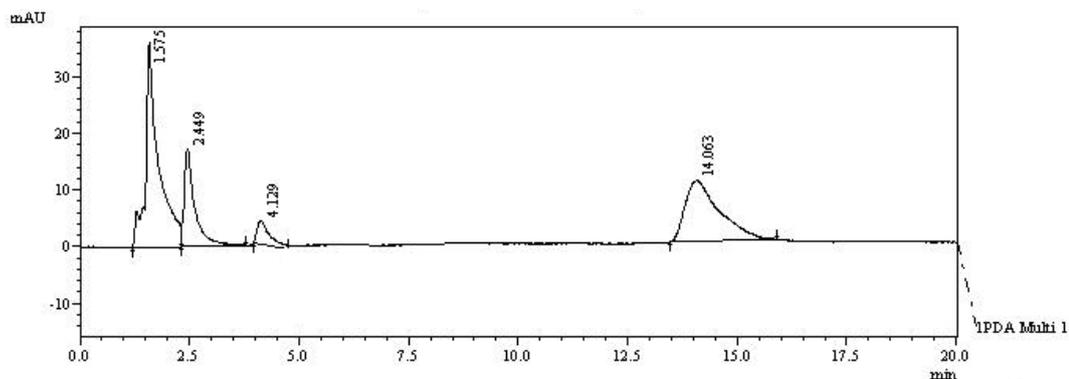


Figura 4.23 Cromatograma obtenido con solución conteniendo una mezcla de las 4 especies de As, fase móvil $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en concentración 6 mM con gradiente de flujo (Flujo 1 mL/min desde $t=0$ hasta $t=5$ y flujo 1,5 mL/min desde $t=5,5$ en adelante; $t_R(\text{As(III)})=1,575\text{min}$; $t_R(\text{DMA})=2,449\text{ min}$; $t_R(\text{MMA})=4,129\text{min}$; $t_R(\text{As(V)})=14,063\text{min}$)

En la figura 4.24 y en la tabla 4.17 se observan el cromatograma obtenido para la columna Kinetex® PFP y los tiempos de retención para las diferentes especies. Se utilizó una fase móvil: 0,1% (v/v) HCOOH , 1% (v/v) MeOH a flujo constante de 1,5 mL/min.

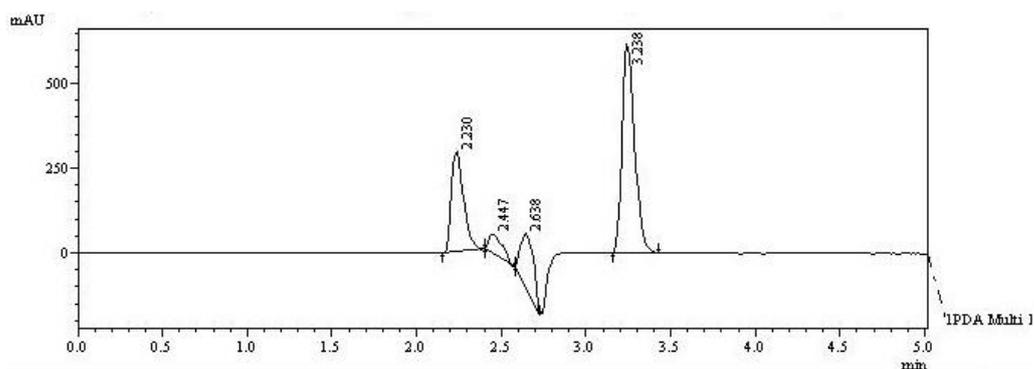


Figura 4.24 Cromatograma obtenido con solución conteniendo una mezcla de las 4 especies de As, fase móvil 0,1 % HCOOH , 1% (v/v) MeOH ; flujo constante (1,5 mL/min)

Tabla 4.17 Tiempo de retención de las cuatro especies

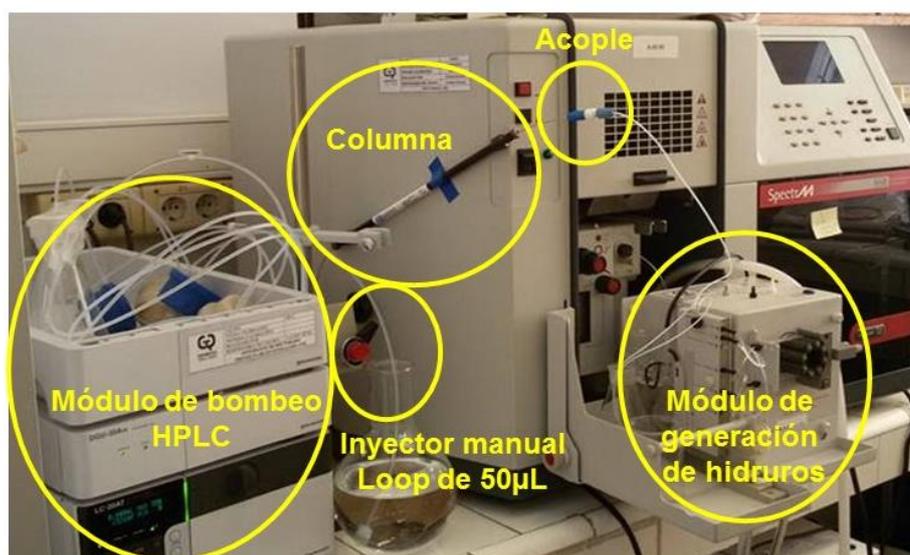
Especie	Tiempo de retención (min)
As(III)	2,230
MMA	2,447
DMA	2,638
As(V)	3,238

En estas últimas condiciones se logran resolver en forma adecuada las 4 especies de As ensayadas.

OPTIMIZACIÓN DEL ACOPLE HPLC-HG-AAS

Como se explicó antes, esto se pudo comenzar a trabajar a partir del marzo-abril del año 2016 cuando se dispuso del equipamiento.

En la figura 4.25 se observa el módulo de bombeo, el equipo HG-AAS y el acople.

**Figura 4.25** Acople del equipo HPLC con el equipo HG-AAS

La pieza de acople consiste en un conector de dos vías (Figura 4.26).

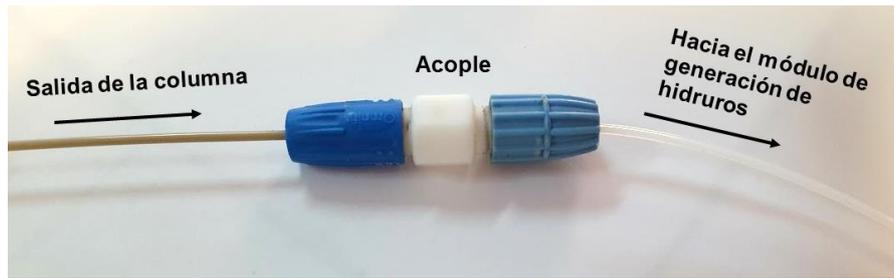


Figura 4.26 Detalle del acople de la salida de la columna del HPLC con la entrada al equipo HG-AAS

El tubo de entrada proveniente de la salida de la columna del HPLC, es de PEEK (polieter-éter-cetona) ya que se requiere utilizar tubos que resistan alta presión y el tubo de salida es un tubo Teflon® FEP (fluorinated ethylene propylene) de 0,8 mm de diámetro interno.

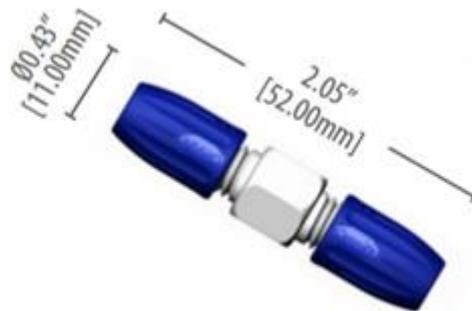


Figura 4.27 Conector de PTFE de dos vías (Omnifit®)

En la Figura 4.27 se muestra el conector de PTFE de dos vías utilizado con sus dimensiones (Omnifit®) diámetro interno 0,8 mm, resisten presión hasta 3,3 bar.

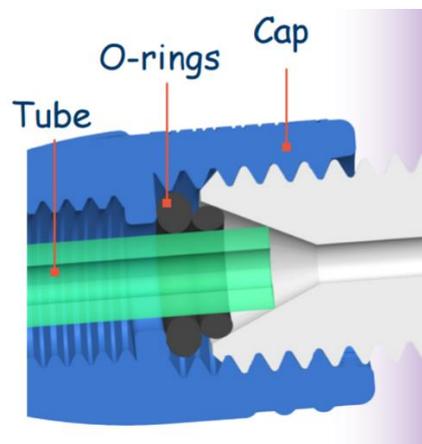


Figura 4.28 Interior del conector

Por dentro los conectores tienen un O-ring de Viton® que es un material bastante resistente a ácidos (Figura 4.28).

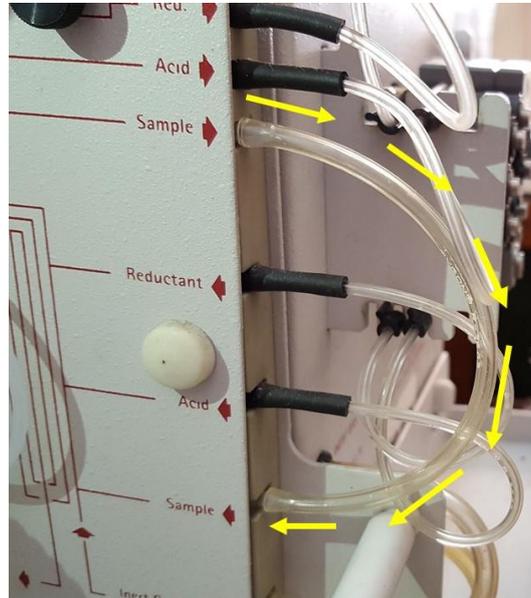


Figura 4.29 Se observa el bypass realizado para el ingreso desde la columna directamente hacia el reactor.

El *bypass* minimiza volúmenes muertos que aumentan la dispersión del flujo y por ende la dilución (figura 4.29).

Un esquema general del sistema puede observarse en la siguiente figura (Figura 4.30)

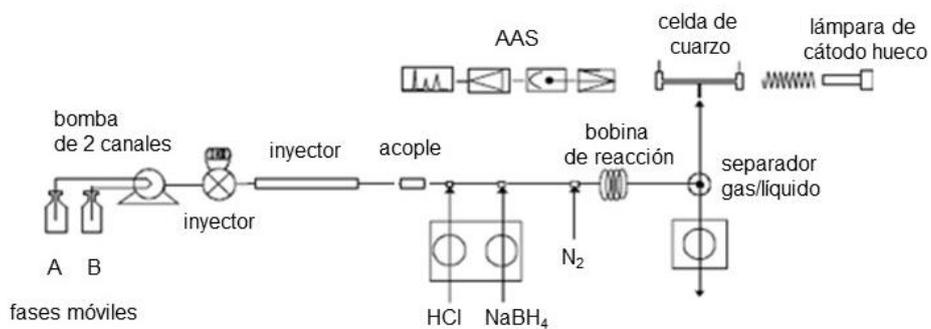


Figura 4.30 Esquema del sistema acoplado HPLC-HG-AAS

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la optimización del acople se tuvieron que tener en cuenta el flujo de salida de la columna y el flujo de entrada al módulo de generación de hidruros. Se probaron diferentes combinaciones de ambos flujos, debido a que la dificultad mayor de esta etapa fue lograr que el sistema se mantuviera estable y que no hubiera pérdidas de líquido en las uniones del acople y en la salida de la columna.

Las condiciones óptimas de flujo del HPLC fueron $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ y del HG-AAS fueron $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Inicialmente se comenzó trabajando con un *loop* de $10 \mu\text{L}$, pero luego se tuvo que cambiar a un tamaño de *loop* de $50 \mu\text{L}$ para poder obtener una señal medible en el espectrómetro de absorción atómica. Hay que considerar que hay un factor de dilución importante que se produce en el proceso cromatográfico, sumando al factor que se genera en el módulo de generación de hidruros y los volúmenes muertos del sistema.

FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

Para poner en funcionamiento el sistema acoplado, se comienza encendiendo el módulo de bombeo del HPLC y se dejar estabilizar durante al menos 30 min a un flujo constante de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. La salida de la columna de HPLC se lleva a un recipiente de descarte.

Paralelamente, se enciende el equipo HG-AAS y se estabiliza por lo menos 15 minutos. Se realiza un *bypass* descrito anteriormente, para que el recorrido del líquido a la salida del HPLC realice un recorrido menor antes de llegar a la bobina de reacción y minimizar zonas de volumen muerto.

Cuando ambos equipos están estabilizados, se detiene la bomba y se conecta la pieza del acople y se vuelve a encender la bomba. Se debe verificar que no existan pérdidas en el sistema.

Se preparan las disoluciones estándar a ensayar, las cuales se filtran por

cartuchos con membrana de 0,45 μm .

La carga del *loop* de inyección se realiza en forma manual con una microjeringa de vidrio de 10 μL (Hamilton®) y la inyección se produce por medio de una válvula de 6 puertos Rheodyne®.

Se registra la máxima señal obtenida (A) a partir de las señales transitorias generadas mediante el sistema de registro del HG-AAS.

A partir de este trabajo, sería posible completar la especiación de As en muestras de orina en un breve plazo debido a que ya se cuenta con el equipamiento, los insumos y la experiencia para continuar la optimización ya iniciada.

3.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Se logró poner en funcionamiento una herramienta tecnológica no disponible hasta el momento en el medio académico.

El acople HPLC-HG-AAS es una alternativa económica y sustentable para comenzar con trabajos de especiación de As en matrices ambientales y biológicas y poder avanzar en el conocimiento de las capacidades individuales de metabolismo de Arsénico inorgánico, que puedan asociarse al desarrollo de enfermedades derivadas de la exposición crónica a este elemento tóxico.



CAPÍTULO 5:

ESTUDIOS DE POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE EXPUESTA A AS

Resumen de contenidos:

- Revisión retrospectiva de resultados de análisis de arsénico en orina (N=212) de trabajadores de plantas de impregnación de madera con CCA, en los biomonitoreos efectuados durante tres años.
- Evaluación de los niveles de As en orina (As-U) de 35 trabajadores de una planta seleccionada, que fue visitada en noviembre de 2015, durante uno de los controles médicos semestrales y realización de encuestas individuales con el fin de analizar la contribución de aspectos ocupacionales y no ocupacionales que pueden incidir en los niveles de As-U determinados.
- Resultados de las encuestas realizadas a los trabajadores en su lugar de trabajo; evaluación estadística y discusión de los resultados.
- Evaluación de las etapas del proceso productivo de impregnación de la madera a vacío con CCA y las áreas de esta empresa categorizando los riesgos.
- Resultados y discusión de la cuantificación de As total y su comparación con los resultados de la cuantificación de las especies toxicológicamente relevantes de As con el objetivo de evaluar la contribución de especies orgánicas de As (mayoritariamente AsB) provenientes de la ingesta de productos marinos.

1. BIOMONITOREO DE TRABAJADORES EXPUESTOS (PERÍODO 2014- 2017)

1.1 ANTECEDENTES

Desde enero 2014 a enero 2017, se analizaron 212 muestras de orina de 73 trabajadores ocupacionalmente expuestos a CCA provenientes de cinco plantas de impregnación de madera de nuestro país. Dado que el biomonitoreo debe realizarse cada 6 meses, en algunos casos se analizaron muestras del mismo trabajador en diferentes fechas (Ordenanza N°145/009, MSP, 2009; ACGIH, 2016).

En cada muestra, se cuantificó el contenido de especies toxicológicamente relevantes de As en orina (As-U) así como los niveles de cromo con el fin de evaluar los riesgos para la salud según las regulaciones nacionales. Con respecto al Cu, también presente en la formulación de CCA, no está indicado para el biomonitoreo de exposición laboral por lo que no se analiza.

1.2 METODOLOGÍA: RELEVAMIENTO DE DATOS ANALÍTICOS

1.2.1 MUESTREO

Las muestras se toman, acondicionan, transportan y almacenan según el protocolo del CEQUIMTOX (E CL 16):

- en cuanto a la toma de muestra: se requiere por lo menos 4 horas de no micción, se debe utilizar frasco de primer uso (comunes para análisis clínicos) y para evitar la contaminación de la muestra, se recomienda el lavado de manos con agua y jabón, no tocar el frasco ni la tapa en su interior y descartar la primera fracción de orina; tomar un mínimo de 25 mL de orina.
- respecto al acondicionamiento y almacenamiento: deben rotularse en forma indeleble con nombre completo y cédula de identidad, y almacenarse en heladera. En caso de no ser enviada el mismo día, debe almacenarse a -5°C hasta su envío.

1.2.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

En las 212 muestras recibidas, se determinó la suma de las especies toxicológicamente relevantes según ACGIH (ACGIH, 2016) mediante la técnica de HG-AAS previa derivatización con L-cisteína según el método validado descrito en el Capítulo 4, sección 1.2.1. Las determinaciones de Cr se realizaron mediante ET-AAS según un método validado en el CEQUIMTOX. Si bien las determinaciones de Cr no forman parte de esta tesis, los resultados de estas determinaciones en las mismas muestras fueron proporcionados para la discusión.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde 2014, se constató que los resultados de la concentración de Cr en orina estuvieron muy por debajo de los límites aceptados para trabajadores expuestos ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) para el 100% de las muestras, encontrándose en el siguiente rango: ($<5,0 - 5,4$) $\mu\text{g L}^{-1}$.

Por lo tanto, en el marco de los objetivos planteados, se consideran únicamente los resultados del biomonitoreo de As-U en el período de tiempo anteriormente mencionado, a los efectos de su evaluación. El estudio retrospectivo se realizó a partir de dichos resultados, los cuales se resumen en la tabla 5.1 y su distribución se presenta en la figura 5.1.

Tabla 5.1 Resultados del biomonitoreo de trabajadores en el período 2014-2017.

	As-U ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Promedio	$11,8 \pm 1,4$
Mediana	5,9
Mínimo	$< 5,1$
Máximo	$82,5 \pm 9,9$
Número de trabajadores	73
Número de muestras	212

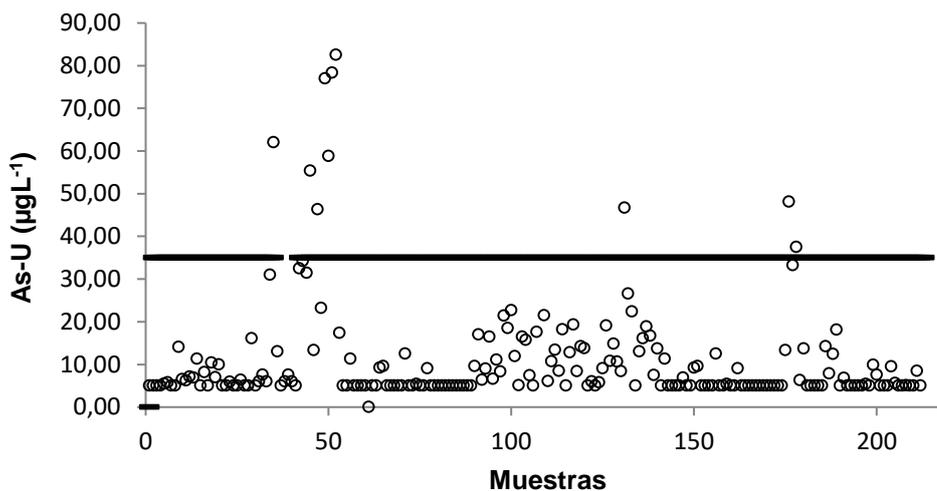


Figura 5.1 Niveles de As-U en el período estudiado. La línea negra indica el valor de referencia ($35 \mu\text{g L}^{-1}$).

En el período estudiado, el 96% de los resultados de especies toxicológicamente relevantes de As en las muestras de orina de los trabajadores, mostraron niveles más bajos de As-U que los establecidos por las regulaciones de salud ($\text{As-U} < 35 \mu\text{g L}^{-1}$). En los casos particulares de los trabajadores con niveles más altos, que fueron 9 en el período estudiado (4%), la Guía de Buenas Prácticas en impregnación de madera (2007) prevén, el retiro de los trabajadores de su lugar de trabajo durante al menos 15 días, y luego repetir el análisis sobre una nueva muestra de orina como se dijo en el Capítulo 1, Sección 5.4. Después de esta acción, como se observa en la Figura 5.2, todos ellos mostraron niveles significativamente más bajos y menores que el valor límite.

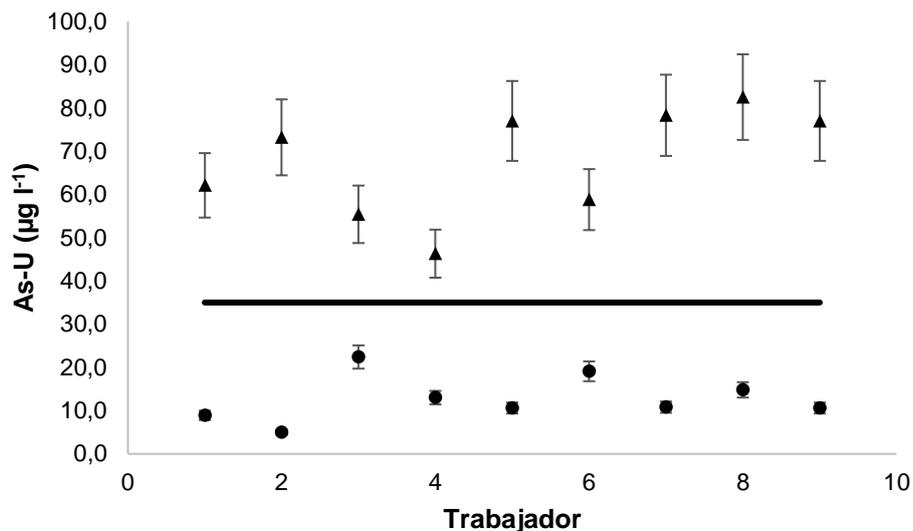


Figura 5.2 Cambio en los niveles de As-U luego del retiro de los trabajadores de su trabajo, al menos de 15 días. La línea negra indica el valor de referencia ($35 \mu\text{g L}^{-1}$); ▲: valores iniciales; ●: valores luego de la intervención

Los resultados confirman que las acciones tomadas según el protocolo establecido en las Guías con la finalidad de disminuir el riesgo de exposición fueron adecuadas: *“Si los valores están en el límite o por encima del valor de referencia: retirar al trabajador del proceso de impregnación de madera, revisar y ajustar medidas de prevención de acuerdo a las recomendaciones de esta guía, realizar evaluación médica y nueva dosificación de control en dos semanas. El trabajador volverá a sus tareas si la evaluación médica no encuentra alteraciones y los valores urinarios están por debajo de los límites de referencia”* (Guía de Buenas Prácticas, Tomo 1, 2007, pág. 20).

2. ESTUDIO PILOTO EN UNA PLANTA URUGUAYA DE IMPREGNACIÓN DE MADERA

2.1 ANTECEDENTES: PRESENTACIÓN DE LA PLANTA

En el marco de convenios de cooperación entre la Administración Nacional de Usinas y Transmisiones Eléctricas y la Universidad (UTE – UDELAR), se presentó una propuesta a las autoridades de UTE, en acuerdo con la gerencia de Salud y Seguridad Ocupacional, para la realización de una encuesta a los trabajadores de la planta de impregnación de madera ubicada en el Rincón del Bonete que en forma bianual son controlados de acuerdo a protocolos médicos y biomonitoreos que realiza la empresa. Esta propuesta fue presentada previamente a autoridades de dicha empresa y fue aprobada. Los trabajadores fueron informados y firmaron documentos de consentimiento informado por escrito para participar. El estudio también fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química en su oportunidad.

La Planta Forestal visitada está ubicada, en las inmediaciones del predio de la Represa Hidroeléctrica Dr. Gabriel Terra, Departamento de Tacuarembó (Uruguay) (figura 5.3). La visita se realizó del 25 al 27 de noviembre de 2015.

Según se menciona en el sitio web de la empresa: *“En esta planta se impregnan postes de madera con CCA. UTE produce estos postes para uso de la propia empresa sobre todo para los postes del tendido eléctrico del país y además ofrece el servicio de impregnación a terceros y vende postes ya impregnados”* (<http://www.ute.com.uy>)



Figura 5.3 Vista satelital de la planta forestal de UTE. Se observa la represa Dr. Gabriel Terra en las proximidades.

Se realizó una visita simultáneamente con la instancia de controles médicos habituales que reciben los trabajadores de la planta en su lugar de trabajo. Por lo tanto se tuvo la oportunidad de establecer contacto personal con los médicos prevencionistas, odontólogo y psicólogo, quienes realizan a los trabajadores un chequeo médico preventivo laboral previsto dentro de la política de Seguridad y Salud Ocupacional de la empresa (UTE, 2016).

Según se puede relevar la planta forestal tiene las siguientes áreas que además se pueden apreciar en el folleto de la figura 5.4:

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| 1. baños y vestuarios | 6. administración |
| 2. planta de impregnación | 7. aserradero |
| 3. postes procesados | 8. depósito/taller |
| 4. zona no conforme | 9. postes sin impregnar |
| 5. comedor | |



Figura 5.4 Folleto con las zonas de la planta de impregnación de madera de UTE (gentileza Jefe de Planta de Impregnación).

A continuación, se describe el proceso de impregnación de la forma que se realiza en la planta visitada de acuerdo a las pautas fijadas en la (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Los camiones con los postes a impregnar se reciben y son descargados en una zona específica de la planta (Figura 5.5).



Figura 5.5 Postes en la zona 9 de la planta previo a su impregnación con CCA

A los postes recibidos se les realizan controles de calidad. La madera para impregnar, debe estar limpia de restos de viruta, polvo o barro y debe tener un contenido de humedad adecuado. La humedad de la madera se mide en forma rápida con un xilohigrómetro.

Si la carga de postes no cumple los controles de calidad, puede ser rechazada, procediéndose a su traslado hacia la zona 4 (Zona no conforme)

Los postes conformes son identificados previo a su impregnación con una chapa que tiene un sistema de códigos (Figura 5.6). Esto permite realizar un seguimiento de los postes, conocer su procedencia y su fecha de impregnación, entre otros datos.



Figura 5.6 Trabajadores colocando las chapas identificatorias a cada uno de los postes, previo a la impregnación de los mismos.

La carga de postes que se va a impregnar, es movilizada con máquinas con una “garra” adecuada y son colocados sobre las vagonetas. (Figura 5.7).



Figura 5.7 Máquina cargando las vagonetas.

Las vagonetas ingresan con su carga de postes dentro del autoclave impulsadas mediante un sistema de rieles automatizado (Figura 5.8).



Figura 5.8 Vagonetas cargadas con los postes a impregnar, ingresando al autoclave.

Esta planta cuenta con dos autoclaves (Figura 5.9). Dentro de ellos es que se impregna la madera con CCA mediante los ciclos de vacío-presión-vacío descritos anteriormente.



Figura 5.9 Autoclaves

El CCA utilizado por la planta es del tipo CCA-C y es importado desde Argentina (Figura 5.10 izquierda).



Figura 5.10 Izquierda: etiqueta de una tarrina de CCA. Derecha: tarrinas almacenadas en depósito junto a la zona de los autoclaves.

Este producto se comercializa en tarrinas que son almacenadas en un depósito cercano al área de impregnación (Figura 5.10 derecha). El contenido de éstas es bombeado desde su recipiente original a los tanques que abastecen luego a los autoclaves (Figura 5.11).

En estos tanques el producto es diluido con la cantidad de agua adecuada. Las tarrinas, luego de vaciadas y enjuagadas, son depositadas en un área apartada para su disposición final.



Figura 5.11 A la izquierda se observan las cañerías colocadas dentro de la tarrina de CCA; el contenido de la misma está siendo bombeado hacia el tanque. A la derecha se observan los dos tanques con CCA diluido que abastecen los autoclaves.

Luego de que las vagonetas ingresan junto con su carga de postes dentro del autoclave, estos se cierran (Figura 5.12) y comienza el proceso de impregnación con los ciclos de vacío-presión-vacío.



Figura 5.12 Trabajadores supervisando el cierre de la puerta del autoclave.

Al lado de los autoclaves están instaladas las bombas que realizan los procesos de vacío o presión, estas bombas son controladas desde una sala contigua (Figura 5.13).



Figura 5.13 Izquierda: bombas que realizan vacío o presión según corresponda. Derecha: sala de control.

Luego del proceso de impregnación se procede a la apertura de la puerta del autoclave y la vagoneta es retirada. Los postes son descargados de la vagoneta y colocados bajo techo en la zona denominada patio de goteo, la cual está bajo techo. Existen canalizaciones en esta zona (Figura 5.14, izquierda) que recogen la solución remanente, la cual es recirculada hacia los tanques de almacenamiento de la solución de impregnación.

La carga de madera permanece en el patio de goteo unas pocas horas, hasta que la siguiente carga de madera impregnada es retirada del autoclave.

Desde el patio de goteo, la carga de madera impregnada es trasladada a la intemperie, a la zona de fijación (Figura 5.14, derecha), a la espera de ser llevada a su destino final.



Figura 5.14 Izquierda: Patio de goteo; Derecha: zona de fijación.

La planta cuenta con vestuarios que constan de tres áreas: el vestuario limpio donde se deja la ropa de calle y se coloca la ropa de trabajo limpia, la zona de ducha y la zona de vestuario sucio donde se deja la ropa de trabajo sucia. Los trabajadores tienen claramente identificado por cual puerta deben ingresar, si llegan desde sus hogares con ropa de calle o si están en su horario laboral con su ropa de trabajo (figura 5.15). Los trabajadores deben bañarse al finalizar su horario laboral. La ropa de trabajo se lava en un lavadero existente en la planta, por lo cual nunca sale del establecimiento.



Figura 5.15 Acceso a diferentes zonas del vestuario.

Los trabajadores administrativos no utilizan estos vestuarios, tienen un vestuario separado y su lugar de trabajo está alejado de la zona de impregnación (Administración, zona 6, figura 5.4).

La ropa de los trabajadores que participan del proceso de impregnación consiste en un overol de manga larga y zapatos cerrados.

Dependiendo de la etapa del proceso en la cual estén trabajando, utilizan adicionalmente, elementos de protección de manos, ojos y vías respiratorias, de acuerdo a la guía de buenas prácticas (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Durante las operaciones de descarga de la vagoneta y manipulación de las maderas recién tratadas (figura 5.16), así como para la limpieza del autoclave, tanques y pileta de contención, los trabajadores utilizan equipos de material impermeable. Durante la manipulación de los tambores, cualquier parte del sistema de impregnación o de la carga, utilizan guantes de goma con manga larga para proteger antebrazos.



Figura 5.16 Trabajadores utilizando máscara para protección respiratoria, equipo impermeable y guantes de goma.

Durante etapas del proceso donde puede haber salpicaduras oculares, utilizan gafas de protección. En aquellas operaciones en las cuales puede haber nieblas locales de CCA, por ejemplo, durante el venteo de las bombas de vacío durante la última etapa de vacío del proceso, utilizan una máscara respiratoria con un filtro adecuado.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 MUESTREO

En el lugar de trabajo se recogió una muestra de orina de cada trabajador, con 2 horas de retención como mínimo, al final de una semana de trabajo. Las muestras se recogieron en frascos para análisis de orina según el protocolo de muestreo de CEQUIMTOX (E CL 16) descrito en este capítulo, sección 1.1.

Debido a que la recolección de las muestras de orina se realiza en el lugar de trabajo, se hace especial hincapié en el lavado de manos de los trabajadores antes de tocar el frasco, para evitar la contaminación de las muestras en el momento de la recolección de las mismas.

Las muestras, identificadas, se almacenaron en un refrigerador portátil (Figura 5.17) y se entregaron en el laboratorio de CEQUIMTOX dentro de las 24 hs.



Figura 5.17 Izquierda: muestras con etiqueta identificatoria. Derecha: heladera para transporte de muestras.

2.1.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A cada una de las muestras de los trabajadores se les determinó:

- **As-U:** la cuantificación de la suma de “especies toxicológicamente relevantes de As”: As (III) + As(V) + DMA + MMA, mediante HG-AAS, según el método descrito anteriormente. (Cap. 4, sección.1.2.1)
- **As Total:** la suma de los aportes de As provenientes de As(III) + As(V) + DMA + MMA + especies de arsénico orgánico o “arsénico de los peces”, mediante ET-AAS, según método descrito anteriormente (Cap. 4, sección 2.3).
- **Cr-U** mediante ET-AAS; los resultados fueron proporcionados por el CEQUIMTOX.

2.1.3. ENCUESTA

Cada uno de los trabajadores fue encuestado personalmente por la autora de esta tesis en su lugar de trabajo luego de los controles médicos pertinentes.

Se les explicó los objetivos del estudio tendientes a evaluar otros factores de riesgo potenciales de exposición a bajos niveles de As que puedan incidir, además de la exposición laboral, en los niveles de As analizados en orina (especies toxicológicamente relevantes o As-U).

La encuesta fue desarrollada con la Dra. Nelly Mañay en base a estudios previos similares, que evalúan los parámetros que pudieran incidir en el aporte de As fuera del ámbito laboral y aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Química cuando se presentó oportunamente.

La encuesta de la figura 5.18 contenía 20 preguntas, divididas en las siguientes secciones:

- datos personales
- hábitos alimenticios (consumo de cereales, pescados, mariscos, carne de vaca, pollo)
 - consumo de agua en el hogar y en el lugar de trabajo (agua embotellada, de grifo, de pozo)
 - tareas específicas realizadas en su puesto de trabajo
 - actividades realizadas en el tiempo libre (jardinería, agricultura, carpintería, mecánica, etc.),
- tabaquismo
- consumo de alcohol.

Historia de Exposición

Participante N° _____

Expuesto Control **Datos personales**

Apellido: _____

Nombre: _____

Sexo: ____ Fecha nacimiento: _____ CI _____

Domicilio: _____ Barrio _____ Departamento _____

E-Mail: _____ Teléfono: _____

Profesión /Ocupación: _____

Donde Ud. vive, ¿hay fabricas, u otro establecimiento industrial / agrícola próximos?

Si / No

¿Cuál (es)? _____

Alimentación

Pescado S / N ¿Con qué frecuencia semanal? ____ días ¿cuando fue la ultima vez? ____ días

Mariscos S/ N ¿ Con qué frecuencia semanal? ____ días ¿cuándo fue la ultima vez? ____ días

Carnes rojas S / N ¿Con qué frecuencia semanal? ____ días

Aves (Pollo) S / N ¿Con qué frecuencia semanal? ____ días

Cereales S / N

¿Cuál es el principal cereal ? Arroz ; Polenta ; Otros

¿Con qué frecuencia semanal ? ____ días

¿Qué tipo de agua consume?

Embotellada / OSE / Pozo

¿Que tipo de agua utiliza para cocinar?

Embotellada / OSE / Pozo

Observaciones: _____

Exposición Laboral

Ocupación Actual

Empresa _____ ¿Hace cuanto tiempo? _____ años
 Puesto de Trabajo _____ ¿Hace cuanto tiempo? _____ años
 Funciones Específicas : 1) _____
 2) _____
 3) _____

¿Ud. considera que en su trabajo hay algún tipo de contaminación?

Sin Contaminación	Si/ No
Ruido	Si/ No
Productos Químicos en general	Si/ No
Metales	Si/ No
Pinturas	Si/ No
Polvo	Si/ No
Combustibles (indique cual:)	Si / No
Derivados del Carbón <input type="checkbox"/> ; Derivados del Petróleo <input type="checkbox"/>	
Otros contaminantes ¿Cuál?	Si/ No
No sabe / No contesta	Si/ No

Ocupación Previa

¿Ha realizado algún trabajo similar antes? Si / No
 ¿En que empresa? _____
 En su trabajo había algún tipo de contaminación? Si /No
 Si contestó si, indique el tipo en base al cuadro anterior _____

Tiempo libre

En su tiempo libre ¿realiza alguna de las siguientes actividades?

Jardinería u horticultura	Si /No
Carpintería o Bricolage	Si /No
Mecanica de automóviles /motos	Si /No
Pintura	Si /No
Otros	Si /No
Ninguna	Si /No

Indique que productos químicos utiliza en su tiempo libre:

Plaguicidas	Si /No
Disolventes	Si /No
Metales	Si /No
Otros	Si /No

Calefacción de su casa.

Leña	Si /No
Electrica	Si /No
Kerosene / supergas	Si /No
Otros	Si /No

Hábitos

Tabaco

Fumador	Si /No
No fumador	Si /No
Ex – fumador (mas de un año)	Si /No
Otros	Si /No

Si es fumador

¿Cuantos años hace que fuma?	
¿Cuantos cigarrillos por día?	
¿Que marcas?	
¿Fuma en el hogar?	

Si es ex_ fumador (mas de un año)

¿Cuantos años hace que dejó?	
¿Cuantos cigarrillos por día fumaba?	
¿Durante cuantos años fumó?	

Consumo de bebidas alcohólicas

¿Consumes bebidas alcohólicas durante las comidas o en su tiempo libre?	Si/ No
¿ Con que frecuencia? Todos los días <input type="checkbox"/> Fin de semana <input type="checkbox"/> Algunas ocasiones <input type="checkbox"/>	
¿Qué tipo de bebidas son las mas frecuentes? Vino <input type="checkbox"/> Cerveza <input type="checkbox"/> Whisky <input type="checkbox"/> Otras <input type="checkbox"/>	Cantidad/Día

Datos de la muestra

(a completar por el encuestador / investigador)

Participante N° _____

Expuesto

Control

Lugar _____

Fecha _____ hora _____

Muestra extraída por: _____

Muestra (indicar <input type="checkbox"/>)	Cantidad	Código
Sangre heparinizada <input type="checkbox"/>		
Suero <input type="checkbox"/>		
Orina 24 hs <input type="checkbox"/>		
Orina 1ª mañana <input type="checkbox"/>		
Cabello <input type="checkbox"/>		
Mucosa Bucal <input type="checkbox"/>		

Firmas:

Participante _____

Encuestador _____

Figura 5.18 Encuesta realizada a los trabajadores.

2.1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo a la encuesta realizada, las variables relevadas en esta investigación fueron: sexo, años de trabajo, exposición a As en el lugar de trabajo (clasificado como no expuesto, baja exposición, exposición moderada y alta exposición); percepción de los trabajadores de exposición en su lugar de trabajo (polvo, ruido, metales, disolventes, combustibles, ninguno); consumo de cereales (arroz, maíz, otros), pescado o mariscos (no, sí, frecuencia semanal, última vez (días)), carne (no, sí, frecuencia semanal); pollo (no, sí, frecuencia semanal); agua de consumo en el hogar (embotellada, grifo, pozo); agua utilizada para cocinar en el hogar (embotellada, grifo, pozo); agua de consumo en el lugar de trabajo (embotellada, grifo, pozo); jardinería (no, sí), carpintería (no; sí); mecánica (no, sí); pintura (no; sí); exposición en el tiempo libre (disolventes, pintura, pesticidas, ninguno); calefacción (combustibles, madera, electricidad), hábito de fumar (nunca fumó, ex-fumador, fumador actual); bebidas alcohólicas (todos los días, fines de semana, algunas ocasiones); tipo de bebidas alcohólicas consumidas (vino, cerveza, whisky, otros)

Se evaluaron posibles correlaciones estadísticas entre los niveles de As-U de los trabajadores y las variables previamente descritas (tales como consumo de carne, mariscos, arroz, agua, exposición, hábitos, tiempo libre).

Como la base de datos del estudio piloto consta de una población de $N = 35$, se utilizó la prueba de coeficiente de correlación de *Spearman*. El coeficiente de *Spearman* es no paramétrico, no requiere que las variables sean normales.

Se buscó la existencia de correlación, entre los niveles de As-U en orina con el resto de las variables estudiadas.

Cuando rho es 1 significa que existe una correlación positiva perfecta y cuando rho es -1 hay una correlación negativa perfecta, mientras que p determina si la correlación entre las variables es significativa, en comparación con el nivel de significación, usualmente 0,05. (Escobar *et al.*, 2012).

El coeficiente rho y el valor p (<0,05) fueron evaluados utilizando el software Stata 12® (Stata 12, 2015)

2.3. RESULTADOS

Este estudio fue destinado no solo a aplicar las metodologías desarrolladas y validadas en el transcurso del trabajo de la tesis, sino que se orientó a evaluar a una población ocupacionalmente expuesta de 35 trabajadores de la planta de impregnación de UTE, no solo por su exposición laboral, bien definida en los controles de vigilancia médica sistemática, sino para poder evaluar otros aspectos de interés que pudieran influir en los resultados obtenidos de las especies de arsénico toxicológicamente relevantes.

En primer lugar, los resultados de la determinación de As-U en las muestras de los 35 trabajadores se encontraron todos dentro de los valores de la normativa vigente. Pueden observarse en la Figura 5.19 en la cual los círculos representan el contenido de As-U de cada una de las muestras y la línea negra continúa representando el valor de referencia ($35 \mu\text{g L}^{-1}$)

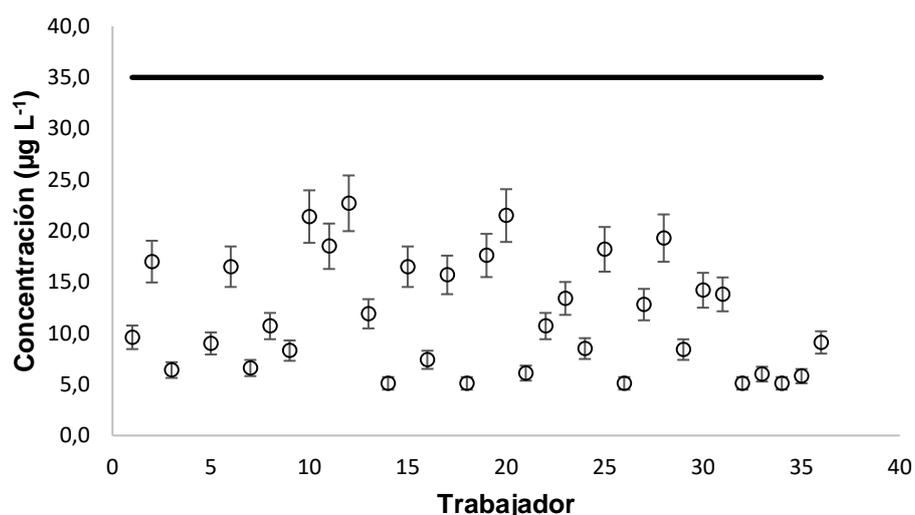


Figura 5.19 Niveles de As-U de los 35 trabajadores de la planta de impregnación de UTE correspondientes al muestreo realizado en noviembre de 2015. La línea negra indica el valor de referencia ($35 \mu\text{g L}^{-1}$).

Los resultados de la encuesta realizada a los 35 trabajadores de la planta de madera de impregnación de CCA se resumen en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Resultados de las encuestas realizadas a los trabajadores de la planta de impregnación de UTE

	Variable	Respuesta
General	cantidad de trabajadores	35
	sexo (masculino)	30
	edad (promedio, años)	41
Años de trabajo	Promedio (años)	13,5
	Máximo (años)	47
Exposición a As en el lugar de trabajo	no expuesto	4
	exposición baja	9
	exposición moderada	10
	exposición alta	12
Percepción de riesgo de exposición en el lugar de trabajo	polvo	27
	ruido	20
	productos químicos	25
	pinturas	7
	solventes	3
	combustibles	11
	ninguno	2
Dieta		
Cereales	arroz	32
	maíz	1
	otros	2
Pescado	si	29
	una vez por mes	4
	una vez cada dos semanas	5
	una vez por semana	15
	más de una vez por semana	6
Mariscos	si	4
Carne vacuna	si	34
	una a dos veces por semana	8
	tres a cinco veces por semana	16
	cinco a todos los días	6
Pollo	si	35
	una a dos veces por semana	14
	tres a cinco veces por semana	17
	cinco a todos los días	6
Agua para beber	embotellada	23
	corriente	15
	pozo	2
Agua para cocinar	embotellada	0
	corriente	33
	pozo	2
Tiempo libre		
Hobby	jardinería	13
	carpintería	12
	mecánica	7

	Variable	Respuesta
Percepción de exposición	pintura	14
	solventes	10
	pesticidas	7
	metales de soldaduras	4
Hogar		
Calefacción	leña	23
	eléctrica	24
	combustibles	4
Hábito de fumar		
	fumador actualmente	10
	ex-fumador	9
Bebidas alcohólicas		
Tipo	si	28
	todos los días	1
	fines de semana	15
	ocasionalmente	14
	vino	12
	cerveza	19
	whisky	5
otros	2	

Del análisis de los datos, se observa que de los 35 trabajadores, la mayoría eran hombres (86%). La edad promedio de los participantes fue de 41 años, mientras que la mitad tenía más de 50 años.

Es interesante destacar, que aproximadamente el 29% de los trabajadores tiene más de 35 años de experiencia en el mismo lugar de trabajo.

Al preguntarles de su percepción acerca de qué tipo de contaminación predomina en sus lugares de trabajo, la mayoría responde que está expuesto al polvo (77%), productos químicos (71%) y ruido (57%)

Consultados sobre su dieta, la mayoría de ellos consumen arroz (91%), pescado (83%), carne de vaca (97%) y todos consumen pollo (100%).

En nuestro país, el agua potable es suministrada por Obras Sanitarias del Estado. Es el organismo estatal responsable del abastecimiento de agua potable en toda la República Oriental del Uruguay, y del servicio de saneamiento en el interior del país, desde 1952 (Ley Orgánica N° 11907, 2010). En paso de los Toros y sus alrededores, donde residen todos los trabajadores de esta planta, existe suministro de

agua potable de OSE; en la planta forestal de UTE, también OSE suministra el agua, existiendo un tanque de almacenamiento en las cercanías de la represa.

La mayoría de los trabajadores beben agua embotellada (66%), pero usan agua del grifo para cocinar (94%). En su tiempo libre sólo unos pocos afirman estar expuestos a disolventes (29%), plaguicidas (20%) y materiales de soldadura (11%). Calefaccionan sus hogares principalmente con electricidad y leña. Un tercio fuma (29%) y el 80% consumen bebidas alcohólicas, especialmente cerveza en su tiempo libre, con diferentes frecuencias.

Al visitar la planta se pudo observar que los trabajadores realizaban diferentes tareas, algunos trabajaban directamente en el proceso de impregnación de madera, mientras que otros trabajaban en oficinas lejos del lugar donde se lleva a cabo el proceso de impregnación. De acuerdo a las tareas observadas y a los resultados de la encuesta, en la cual se solicitaba, entre otros aspectos, que el trabajador describiera las tareas realizadas en la planta durante su día de trabajo, se clasificó a los trabajadores según su riesgo de exposición a arsénico en diferentes categorías:

- No expuesto (directamente)
- Exposición baja
- Exposición moderada
- Exposición alta

Al procesar los datos se observa que el 34% de los trabajadores presenta una exposición de alto riesgo, 29% moderados, 26% tienen baja exposición y 11% no están directamente expuestos (Figura 5.20).

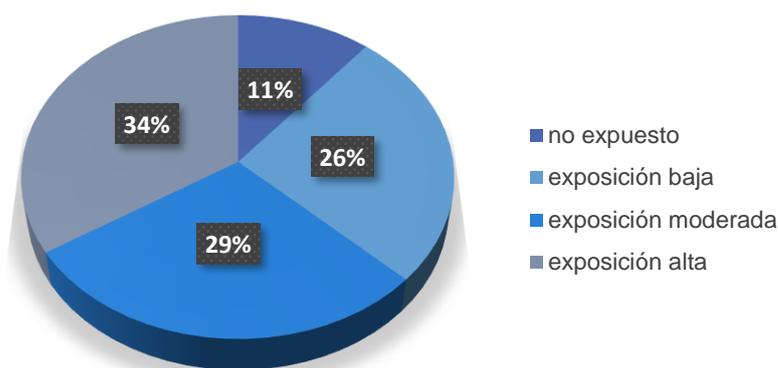


Figura 5.20 Porcentaje de trabajadores en las diferentes categorías de exposición laboral.

Las asociaciones y correlaciones estadísticas de los niveles de As-U con las variables ocupacionales y no ocupacionales descritas anteriormente (tales como consumo de carne, mariscos, arroz, agua, exposición, hábitos y ocio) se muestran en la Tabla 5.3 donde puede apreciarse el coeficiente de correlación de *Spearman*, rho y el valor de *p* para un nivel de significación de 0,05.

Tabla 5.3 Coeficientes de correlación de *Spearman* entre As-U y variables.

	Coefficiente de correlación de <i>Spearman</i> (rho)	valor <i>p</i>
Edad	-0,0966	0,5808
Sexo	0,1648	0,3441
Años de trabajo	-0,0388	0,8248
Exposición ocupacional a As (categorizada)	0,5323	0,0010*
Polvo en el lugar de trabajo	0,1687	0,3325
Ruido en el lugar de trabajo	0,4582	0,0056*
Productos químicos en el lugar de trabajo	0,2893	0,0970
Pinturas en el lugar de trabajo	0,0071	0,9678
Combustibles en el lugar de trabajo	-0,1894	0,2833
Arroz	0,2170	0,2176
Maíz	-0,1778	0,3144
Frecuencia consumo de cereales	0,1008	0,5705
Pescado	-0,0113	0,9487
Frecuencia consumo de pescado	-0,1362	0,4731
Mariscos	0,0089	0,9595
Frecuencia consumo de carne vacuna	0,1188	0,5034

	Coefficiente de correlación de Spearman (rho)	valor p
Frecuencia consumo de pollo	0,0752	0,6678
Beber agua embotellada	0,4031	0,0164*
Beber agua corriente	0,3179	0,0628
Beber agua de pozo	0,1038	0,5529
Cocinar agua corriente	-0,1038	-0,1038
Cocinar agua de pozo	0,1038	0,5529
Jardinería	0,2141	0,2168
Carpintería	0,2478	0,1512
Mecánica	0,1973	0,2709
Exposición a pinturas en tiempo libre	0,2546	0,1400
Exposición a solventes en tiempo libre	0,0502	0,7746
Exposición a pesticidas en tiempo libre	0,1417	0,4167
Exposición a metales de soldadura en tiempo libre	0,2628	0,1272
Calefacción a leña	-0,1092	0,5389
Calefacción eléctrica	0,0297	0,8677
Calefacción por combustibles	-0,0733	0,6852
Fumador actual	-0,2196	0,2050
Ex fumador	-0,0940	0,5911
Años fumando	-0,3046	0,0752
Bebidas alcohólicas	0,1417	0,4167
Frecuencia consumo bebidas alcohólicas	0,0347	0,8432
Vino	-0,0220	0,9054
Cerveza	-0,1520	0,4312
Whisky	0,1214	0,5381

*Variables que mostraron correlación estadística con un valor $p < 0.05$

De acuerdo con estos resultados, As-U correlacionó significativamente con el riesgo de exposición ocupacional ($\rho = 0,5323$; $p = 0,0010$). Aunque los valores están dentro de la normativa vigente, a mayor exposición durante las horas de trabajo, se encuentran niveles más altos de As en la orina de los trabajadores.

Los niveles de As-U también correlacionan con la percepción de los trabajadores de estar expuestos al ruido ($\rho = 0,4852$, $p = 0,0056$), hecho que está de acuerdo en que, en la zona de autoclaves es la fuente de mayor riesgo de exposición y de mayor ruido.

En cuanto a otras variables no ocupacionales como las actividades realizadas en el tiempo libre, la dieta, el agua potable, el tabaquismo y los hábitos alcohólicos

entre otros, sólo se encontró correlación estadística con el consumo de agua embotellada ($\rho = 0,4031$; $p = 0,0164$)

Con relación a los resultados de As total, en la figura 5.21 se observan que los niveles de As-U (°) y As total (□) difieren significativamente en algunos trabajadores. En especial y viendo el resultado del trabajador Nro. 2, se investigó una posible causa de esta diferencia, asignándosela a la alta ingesta de pescado previo a la toma de muestra.

Al evaluar las encuestas, el 83% ($n = 29$) de los trabajadores encuestados consume pescado habitualmente.

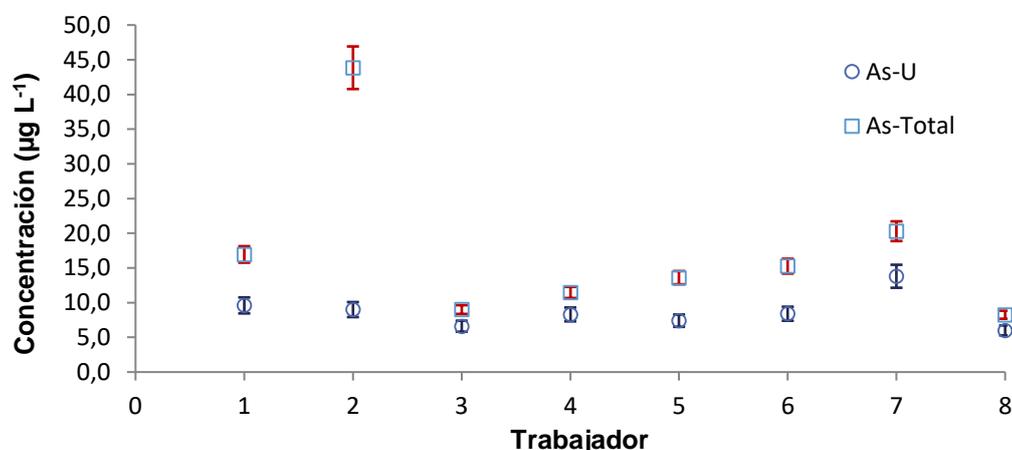


Figura 5.21 Resultados de muestras de trabajadores cuyos niveles de As-U (°) y As total (□) difieren significativamente.

Se encuentran 8 muestras cuyos resultados de As-U y de As total difieren significativamente. Los 8 trabajadores son consumidores de pescado y 6 de ellos consumieron pescado entre 1 y 7 días previos a la toma de muestra de orina; 2 trabajadores consumieron pescado más de 7 días antes.

Cabe destacar que este es un estudio con una población pequeña, que muestra como el consumo de pescado podría afectar los niveles de As-U. Sin embargo, la población de Uruguay no es gran consumidora de pescado, pero por otro lado las poblaciones del interior próximas a ríos suelen pescar como actividad recreativa y consumen lo que pescan.

Nuestros resultados son consistentes con los reportados por Cocker *et al.* (2006), en un trabajo en el que 50 trabajadores de plantas de impregnación CCA en el Reino

Unido tenían concentraciones de As inorgánico en la orina significativamente mayor que los de las personas no expuestas ocupacionalmente, pero todos estaban por debajo de los valores guía de monitoreo biológico.

En las plantas de impregnación de madera con CCA en las cuales se coloca la madera en autoclaves y se la impregna mediante ciclos de vacío-presión-vacío, existen varias operaciones riesgosas, por ejemplo, la manipulación de bidones que contengan CCA concentrado; manipulación del producto y conexiones con el circuito de alimentación del cilindro de presión; trabajar cerca de la ventilación de la bomba de vacío, que genera nieblas potencialmente contaminadas; abrir el autoclave; descargar la madera de los vagones y la manipulación de la madera recientemente tratada, así como el proceso de limpieza final (Guía de Buenas Prácticas, 2007).

Un esquema de las principales etapas de todo el proceso y los riesgos asociados se muestra en la Figura 5.22.

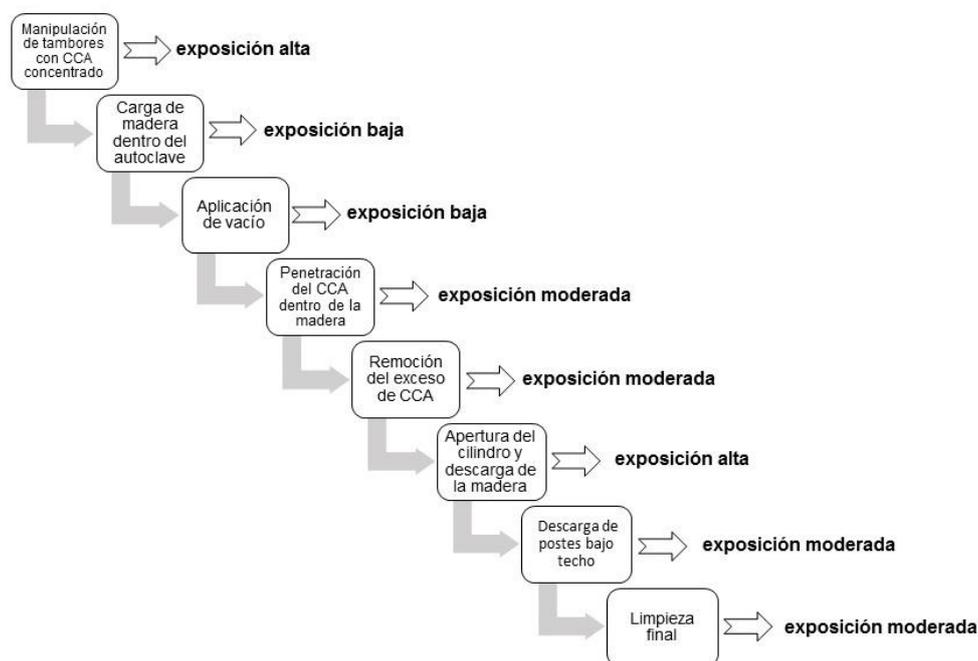


Figura 5.22 Etapas del proceso de impregnación de madera con CCA y potencial riesgo de exposición de los trabajadores.

Considerando estos resultados sería necesario fortalecer el control del uso del equipo de protección personal y la concientización sobre la seguridad de los

trabajadores, como se sugiere en la Guía de buenas prácticas en impregnación de madera (2007)

La correlación positiva entre ruidos percibidos y As-U puede deberse al hecho de que las áreas más riesgosas desde el punto de vista de la contaminación son también lugares donde los procesos de impregnación producen más ruido.

Asimismo, hubo una correlación significativa entre los trabajadores que consumieron agua embotellada y As-U. En Uruguay, ya que las regulaciones para beber agua corriente (o de OSE) indican un valor máximo admitido de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ con un valor objetivo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (recomendaciones de la OMS) mientras que las regulaciones para el As en agua embotellada establecen que el límite debería ser el mismo que el agua corriente ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) (Decreto 375/2011, 2011; UNIT, 2010). Esta correlación debe evaluarse mejor conociendo el consumo de agua diario y analizando diferentes marcas de agua embotellada. Se encontraron en algunos acuíferos uruguayos niveles altos de iAs, pero no hay información disponible sobre los resultados analíticos de los niveles de As en el agua embotellada, o al menos no se han dado a conocer hasta el momento. Como se mencionó, el agua embotellada está regulada por otras normas que la rigen sobre el suministro de agua potable y probablemente las concentraciones del "agua mineral" podrían ser más altas que las del agua de las Obras Sanitarias del Estado (OSE). Resultados de investigaciones realizadas hace algunos años sobre el agua subterránea indican que es muy importante comenzar a monitorear iAs en agua embotellada de forma sistemática (Mañay *et al.*, 2013).

Otros parámetros estudiados no presentaron correlaciones significativas, por lo que la contribución de iAs de esas fuentes podría ser descartada.

Como resultado de este relevamiento se elaboró un informe técnico que fue entregado a las autoridades de UTE como parte del acuerdo de cooperación en este proyecto. Esto constituye uno de los aportes reales de esta tesis a la sociedad y fue una instancia de vinculación muy importante con los actores involucrados en la que se tuvo la oportunidad de estar en contacto directo con los trabajadores y conocer la planta de tratamiento.

3. CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS DE POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE EXPUESTA AL AS

Hasta el alcance de nuestro conocimiento, esta es la primera revisión de resultados de biomonitoreo de especies toxicológicamente relevantes en trabajadores expuestos a CCA realizada en el Uruguay. Los resultados relevados de tres años, muestran bajos riesgos de exposición ocupacional a As ya que los resultados de As-U se encontraron por debajo de los límites recomendados en el 88 % de los trabajadores.

El 95 % de las muestras de orina tuvieron As-U por debajo de los límites recomendados por ACGIH en el período evaluado. Sólo para 9 trabajadores, As-U fue superior a $35 \mu\text{g L}^{-1}$ y después de un período de al menos 15 días, en el cual fueron retirados de sus lugares de trabajo, los niveles de As-U disminuyeron a valores por debajo del límite, lo que demuestra que estas intervenciones fueron exitosas. Esta recomendación puede aplicarse a otros trabajadores de impregnación de madera con CCA de otros países.

Como era de esperar, en la población estudiada, As-U correlacionó significativamente con los riesgos de exposición ocupacional, aunque los niveles de As-U se encontraban por debajo de los límites de la regulación en los 35 trabajadores.

De acuerdo a los resultados de As total obtenidos en estos trabajadores, se comprobó la influencia de la ingesta reciente de pescado o frutos del mar, en los niveles de arsénico total en orina por el aporte “dietario” de AsB de muy baja toxicidad. Este resultado se obtuvo en 8 de los 35 trabajadores coincidiendo con su declaración en la encuesta. Por lo anterior, resulta fundamental la indicación de arsénico inorgánico y especies toxicológicamente relevantes para la evaluación del riesgo de exposición a arsénico como lo recomienda la ACGIH y el MSP de acuerdo a sus valores límites (Ordenanza N°145/009, MSP, 2009; ACGIH, 2016).

Este aspecto confirma la necesidad de contar con las herramientas analíticas que fueron desarrolladas en esta tesis.



CAPÍTULO 6:

CONCLUSIONES GLOBALES

Con este trabajo de tesis se logró el desarrollo de una plataforma analítica con la capacidad de:

- Determinar la suma de especies de As en agua y orina mediante técnicas disponibles y accesibles en el país (HG-AAS).
- Determinar As total mediante ET-AAS como herramienta analítica complementaria para evaluar la contribución del As dietario en los niveles de As-U.
- Diseñar un acople HPLC-HG-AAS de bajo costo construido en el laboratorio para separar especies de arsénico en muestras de agua que además quedará disponible para el inicio de una nueva investigación sobre el estudio de especies de individuales de As en orina y sus efectos en la población.

Ese desarrollo analítico permitió contar con una metodología validada para realizar los asesoramientos del CEQUIMTOX, destinados al control biológico de trabajadores expuestos a CCA y gracias a la colaboración de la Gerencia de Salud y Seguridad Ocupacional de UTE, poder realizar el estudio piloto en los trabajadores de su planta de impregnación de madera con CCA, sin antecedentes en el país, siendo relevante no sólo a nivel local sino por su posible aplicación a otras poblaciones y en otros países.

De este biomonitoreo se logró observar que:

- Existe bajo riesgo de exposición ocupacional a As en las cinco empresas evaluadas ya que los resultados de As-U se encuentran por debajo de los límites recomendados en el 88% de trabajadores.
- Se detectaron trabajadores con niveles de As en orina por encima de la reglamentación lo que permitió tomar acciones para proteger su salud. Estas intervenciones resultaron exitosas.
- Este trabajo demostró la necesidad de que las empresas continúen cumpliendo con las recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera (2007).

- Se pusieron de manifiesto correlaciones interesantes entre As-U y contribuciones provenientes de la dieta o de los hábitos dentro y fuera del horario laboral.
- Esta experiencia en estudios, que antes no se habían realizado de forma conjunta con los médicos que realizan los controles en las empresas, son un aporte real realizado a partir del trabajo realizado. Estos profesionales de la salud cuentan con una evidencia para poder considerar, que ante casos de niveles altos de As-U, se debe tener en cuenta otras variables.



CAPÍTULO 7:

PERSPECTIVAS

Debido a la dificultad de reemplazar CCA por razones económicas, las autoridades uruguayas promueven el uso de buenas prácticas que consideren las recomendaciones de las organizaciones internacionales de seguridad laboral para minimizar los posibles impactos negativos sobre el medio ambiente y la salud de los trabajadores. En los últimos años, se han realizado esfuerzos para mejorar el uso de una mejor tecnología en este campo (Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera, 2007). Los resultados detallados anteriormente, muestran que estos esfuerzos fueron exitosos y que el biomonitoreo de especies toxicológicamente relevantes de As es necesario para la evaluación del riesgo ocupacional y para saber cuándo se requiere una intervención para la seguridad del trabajador.

La plataforma analítica desarrollada contribuirá con los programas que evalúan los efectos del control y prevención de la “arsenicosis” de la población expuesta, así como para su seguimiento médico. De hecho, los estudios preliminares realizados en esta tesis, en muestras de agua de diferente origen, dan una pauta inicial muy importante para poder seguir profundizando este tema por la posible exposición ambiental a este tóxico.

La OMS, establece que el arsénico en aguas subterráneas, representa una amenaza importante para la salud pública por la presencia de su forma inorgánica, que puede ocasionar efectos muy graves a la salud, incluyendo su potencial carcinógeno. El agua destinada a consumo humano, los cultivos regados y los alimentos preparados con agua contaminada, son las principales fuentes de exposición siendo el agua subterránea de mayor riesgo que los alimentos como pescados, mariscos, carnes, aves de corral, productos lácteos y cereales. En este marco surge la Geología Médica como una disciplina emergente que se ha consolidado internacionalmente para investigar como los factores geológicos, pueden incidir en los problemas de salud ambiental de las poblaciones que residen en las diferentes regiones del planeta a los efectos de entender y prevenir problemas de salud desde un abordaje multidisciplinario (Selinus, 2004; IMGa, <http://www.medicalgeology.org/>).

La Geología Médica es de reciente desarrollo en Uruguay y el presente proyecto, provee de una investigación para generar nuevos conocimientos sobre la problemática de la presencia de arsénico en Uruguay asociada a la exposición laboral, pero sentando los antecedentes para el estudio del agua subterránea utilizada para el consumo, ya sea como evidencias científicas para la prevención de riesgos a la salud de la población que la consume (Mañay, 2010).

Con respecto a los resultados en trabajadores, si bien la norma del MSP (Ordenanza N°145/009, 2009) establece los niveles de arsénico en orina, adopta las recomendaciones de ACGIH, que indican determinar las especies toxicológicamente relevantes. Como se explicó anteriormente, en caso de determinarse arsénico total en orina, es necesario modificar las condiciones para realizar los controles obligatorios a los trabajadores y consultar sobre la ingesta de pescado o frutos del mar próximo a la toma de muestra (ej. dentro de la semana de muestreo). Por lo tanto, de no contarse con una metodología que determine solamente las especies toxicológicamente relevantes, es necesario consultar a los trabajadores acerca del tipo y la cantidad de pescados y/o mariscos ingeridos porque de lo contrario, se puede “falsear” el riesgo de salud real del trabajador por la exposición laboral.

Esta investigación marca un antecedente importante para futuros estudios científicos interdisciplinarios de índole epidemiológico, destinados a evaluar por ejemplo, la susceptibilidad de la población general expuesta a arsénico a través del agua y alimentos y correlacionar los resultados de As-U con otros biomarcadores de efecto y susceptibilidad a los efectos de establecer la situación presente en la población uruguaya en torno a la exposición al As.

Con relación al desarrollo de la investigación en química analítica toxicológica, la importancia del análisis de las especies de arsénico en el campo biomédico, seguirá creciendo debido a la permanencia de exposición crónica de poblaciones en el mundo al agua contaminada por As presente en aguas subterráneas y debido a posibles aplicaciones potenciales de ciertos compuestos de As, en la terapia del cáncer como se describe en Hsu et al. (2011)

Aunque la separación cromatográfica acoplada con la detección de ICP-MS se ha utilizado predominantemente para el análisis de especiación de As en la investigación biomédica, se han emprendido algunos esfuerzos para desarrollar otros enfoques de especiación. Estos desarrollos metodológicos para la especiación, pueden dar lugar a nuevas técnicas de acoplamiento y nuevos sistemas de detección. Por lo tanto, la superación de los obstáculos planteados por los efectos a bajos niveles de As, las matrices complicadas y la alta diversidad de especies As en los especímenes biomédicos, sigue siendo un gran reto para la especiación, con el desafío del desarrollo de nuevas metodologías analíticas.

Finalmente, la importancia de los vínculos de las instituciones y la confianza en la investigación nacional son valores agregados a esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. (2016). *TLVs and BEIs*. Cincinnati, USA: Signature Publications.
- Afridi, H., Kazi, T., Kazi, N., Jamali, M., Arain, M., Sirajuddin, . . . Baig, J. (2009). Evaluation of arsenic, cobalt, copper and manganese in biological Samples of Steel mill workers by electrothermal atomic absorption Spectrometry. *Toxicology and Industrial Health*, 25, 59-69.
- Ally, M., Ransohoff, K., Sarin, K., Atwood, S., Rezaee, M., Bailey-Healy, I., . . . Beachy, P. (2016). Effects of Combined Treatment With Arsenic Trioxide and Itraconazole in Patients With Refractory Metastatic Basal Cell Carcinoma. *JAMA Dermatology*, 1-5.
- Altesor, C., Dol, I., & Knochen, M. (1994). Aplicación de técnicas estadísticas para la comprobación de la exactitud en el desarrollo de métodos analíticos farmacéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 13, 49-52.
- Amayo, K., Raab, A., Krupp, E., Gunnlaugsdottir, H., & Feldmann, J. (2013). Novel Identification of Arsenolipids Using Chemical Derivatizations in Conjunction with RP-HPLC-ICPMS/ESMS. *Analytical Chemistry*, 85, 9321-9327.
- APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (22 ed.).
- ASME, American Society of Mechanical Engineers. (2013). *Sección VIII "Pressure Vessels", del Boiler and Pressure Vessel Code (BPVC)*. Obtenido de <https://www.asme.org/>
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (Agosto de 2007). *ToxGuide™ for Arsenic*. Recuperado el 16 de febrero de 2016, de ATSDR: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1 de Octubre de 2011). *La toxicidad del Arsénico. ¿Cuál es el destino biológico del As en el cuerpo?* Recuperado el 20 de Marzo de 2017, de ATSDR: https://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/arsenic/destino_biologico.html
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2015). *ATSDR's Substance Priority List*. Recuperado el 10 de marzo de 2017, de ATSDR: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (febrero de 2016). *Addendum to the toxicological profile for Arsenic*. Recuperado el 2 de febrero de 2017, de ATSDR: https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/Arsenic_addendum.pdf
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1 de octubre de 2009). *Arsenic*

- Toxicity*. Recuperado el 10 de marzo de 2017, de ATSDR: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/arsenic/docs/arsenic.pdf>
- AWPA, American Wood Preservers' Association. (1996). *American Wood Preservers' Association Book of Standards*. Birmingham, AL.
- Azevedo, F., & Chasin, A. (2003). Capítulo 8. En *Metais: Gerenciamiento da Toxicidade*. Brasil: Atheneu Intertox.
- Baba, K., Arao, T., Yamaguchi, N., Watanabe, E., Eun, H., & Ishizaka, M. (2014). Chromatographic separation of arsenic species with with pentafluorophenyl column and application to rice. *Journal of Chromatography A*, 1354, 109-116.
- Baran, E. (1995). *Química Bioinorgánica*. Madrid: McGraw-Hill.
- Beach, L. (2010). *Methods for Environmental Samples. Application Note. Atomic Absorption*. Agilent Technologies, USA. Obtenido de <https://www.agilent.com/cs/library/applications/aa090.pdf>
- Beachy, P. (2010). *Arsenic shows promise as cancer treatment, study finds*. Obtenido de Stanford Medicine: <https://med.stanford.edu/news/all-news/2010/07/arsenic-shows-promise-as-cancer-treatment-study-finds.html>
- Brima, E., Jenkins, R., & Haris, P. (2006). Understanding arsenic metabolism through spectroscopic determination of arsenic in human urine. *Spectroscopy*, 20, 125-151.
- Bundschuh, J., Pérez Carrera, A., & Litter, M. (Edits.). (2008). *IBEROARSEN. Distribución del arsénico en las regiones ibérica e iberoamericana*. Argentina: CYTED.
- Burguera, J., Burguera, M., Rivas, C., & Carrero, P. (1998). On-line cryogenic trapping with microwave heating for the determination and speciation of arsenic by flow injection:hydride generation:atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 45, 531-542.
- Burguera, M., & Burguera, J. L. (1997). Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. 44, 1581-1604.
- Campillo, N., Viñas, P., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (1999). Determination of arsenic in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 125, 313-316.
- Carrero, P., Malavé, A., Burguera, J., Burguera, M., & Rondón, C. (2001). Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Analytica Chimica Acta*, 438, 195-204.
- Casarett, & Doull's. (2013). *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. China: McGraw-Hill Education.
- Castro de Esparza, M. (2006). International Congress on Natural Arsenic in Groundwaters of Latinamerica. En J. Bundschuh, M. Armienta, P. Bhattacharya, J. Matschullat, P. Birkle,

- & R. Rodríguez (Ed.), *The presence of arsenic in drinking water in Latin America and its effect on public health*, (págs. 3-6). México.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. (23 de Diciembre de 2016). *Biomonitoring Summary. Arsenic*. Recuperado el 2 de febrero de 2017, de Center for Disease Control and Prevention (CDC): https://www.cdc.gov/biomonitoring/Arsenic_BiomonitoringSummary.html
- Chen, G., Zhu, J., Shi, X., Ni, J., Zhong, H., Si, G., . . . Chen, Z. (1996). In Vitro Studies on Cellular and Molecular Mechanisms of Arsenic Trioxide (As₂O₃) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia: As₂O₃ Induces NB4 Cell Apoptosis With Downregulation of Bcl-2 Expression and Modulation of PML-RARdPML Proteins. *Blood*, *88*(3), 1052-1061.
- Chen, H., Brindle, I., & Le, X. (1992). Prereduction of Arsenic (V) to Arsenic (III), Enhancement of the Signal, and Reduction of Interferences by L-Cysteine in the determination of Arsenic by Hydride Generation. *Analytical Chemistry*, *64*, 667-672.
- Ciminelli, V., Gasparon, M., Ng, J., Silva, G., & Caldeira, C. (2016). Dietary arsenic exposure in Brazil: The contribution of rice and beans. *Chemosphere*, *168*, 996-1003.
- Cocker J, Morton J, Warren N, et al. (2006). *Biomonitoring for Chromium and Arsenic in Timber Treatment Plant Workers Exposed to CCA Wood Preservatives* (Vols. 50(5):517–525.). J. Ann Occup Hyg.
- CSTEE, Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. (2003). *Commission Directive 2003/2/EC of 6 January 2003 relating to restrictions on the marketing and use of arsenic (tenth adaptation to technical progress to Council Directive 76/769/EEC)*. Official Journal of the European Communities.
- Dani, S. U. (2011). The arsenic for phosphorus swap is accidental, rather than a facultative one, and the question whether arsenic is nonessential or toxic is quantitative, not a qualitative one. *Science of the Total Environment*, *409*, 4889-4890.
- Decreto 183/1982. (1982). *Prevención y control de riesgos profesionales causados por sustancias o agentes cancerígenos*. Uruguay. Recuperado el 10 de marzo de 2017, de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/183-1982>
- Decreto 375/2011. (2011). Obtenido de Ministerio de Salud Pública: http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/Decreto_375_agua_2011.pdf
- Dědina, J. (1999). *Flow methods in gas-liquid separations*. En: Sanz-Medel A. (Ed.). *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*. Ámsterdam: Elsevier Science B.V.
- Dědina, J., & Tsalev, D. (1995). *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd.
- DEFRA, Department for Environment, Food and Rural Affairs. (2003). *Consultation on the*

- transposition of the 10th adaptation to technical progress of Annex I to Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of arsenic in England.* Great Britain: Department for Environment, Food and Rural Affairs.
- Dieste, A. (2012). *Programa de promoción de exportaciones de productos de madera.* Recuperado el 2 de febrero de 2017, de :<http://www.adimau.com.uy/articulos/0>
- Dieste, A. (2015). *Capacitación para la innovación en la industria de la madera.* Recuperado el 24 de febrero de 2017, de <http://www.miem.gub.uy/documents/6511777/0/Informe%206.pdf>
- Dol, I., Pistón, M., & Delmonte, D. (2011). Arsénico en agua de consumo humano en Uruguay. *Latin American Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry.* Salvador, Brazil.
- Ellison, S., & Williams, A. (2012). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* (3rd ed.). Recuperado el 15 de marzo de 2017, de www.eurachem.org
- Environment and Climate Change Canada. (8 de julio de 2014). *Chapter B - Chromated Copper Arsenate (CCA) Wood Preservation Facilities.* Recuperado el 2 de febrero de 2017
- Escobar Mercado, M., Fernández Macías, E., & Bernardi, F. (2012). *Cuadernos Metodológicos: Análisis de datos con Stata.* Madrid: Centro de Investigaciones Sociológicas.
- Farzan, S., Chen, Y., Rees, J., Zens, M., & Karagas, M. (2015). Risk of death from cardiovascular disease associated with low-level arsenic exposure among long-term smokers in a US population-based. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 287(2), 93-97.
- Feldmann, J. (2005). What can the different current detection methods offer for element speciation? *Trends in Analytical Chemistry*, 24(3), 228-242.
- Flora, S. (2015). *Handbook of Arsenic Toxicity.* Londres: Elsevier.
- Francesconi, K., & Kuehnelt, D. (2004). Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. *Analyst*, 129, 373-395.
- Frederick , P., Kenneth, B., & Chien-Jen. (1994). Health implications of arsenic in drinking water. *Journal AWWA*, 86(9), 52-63.
- Garrod, A., Martínez, M., Pearsons, J., & Proud, A. (1999). Exposure to Preservatives Used in the Industrial Pre-treatment of Timber. *The Annals of Occupational Hygiene*, 43(8), 543-555.
- Garrod, A., Phillips, A., & Pemberton, J. (2001). Potential Exposure of Hands Inside Protective Gloves—a Summary of Data from Non-Agricultural Pesticide Surveys. *The Annals of Occupational Hygiene*, 45(1), 55-60.

- G-EQUAS, The German External Quality Assessment Scheme. (2017). Recuperado el 10 de marzo de 2017, de <http://www.g-equas.de/default.htm>
- Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera Tomo 1: Seguridad y Salud Ocupacional. (2007). Uruguay: Cooperación Técnica MERCOSUR (SGT6) ; GTZ. Recuperado el 10 de marzo de 2017, de http://catalogo.latu.org.uy/doc_n
- Guía de Buenas Prácticas en Impregnación de Madera Tomo 2: Gestión Ambiental y Producción más Limpia. (2007). Uruguay: Cooperación Técnica MERCOSUR (SGT6); GTZ. Recuperado el 10 de marzo de 2017, de http://catalogo.latu.org.uy/doc_num.php?explnum_id=2090
- Guo, T., Baasner, J., & Tsalev, D. (1997). Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 3, 313-318.
- Hernández-Zavala, A., Matoušek, T., Drobna, Z., Paul, D., Walton, F., Adair, B., . . . Stýblo, M. (2008). Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 342-351.
- Howard, A. (1997). (Boro)Hydride Techniques in Trace Element Speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 267-272.
- Howard, A., & Salou, C. (1996). Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydride AAS determination of dissolved arsenic species. *Analytica Chimica Acta*, 333(1-2), 89-86.
- Hsu, K., Sun, C., & Huang, Y. (2011). Arsenic speciation in biomedical sciences: Recent advances and applications. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 27, 382-389.
- Hughes, M. F. (2006). Biomarkers of Exposure: A Case Study with Inorganic Arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 114(11), 1790-1796.
- Hughes, M. F., Beck, D. B., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological Sciences*, 123(2), 305-332. Obtenido de TOXICOLOGICAL SCIENCES.
- IARC. International Agency for Research of Cancer. (19 de mayo de 2017). *Agents Classified by the IARC monographs*. Recuperado el 2 de junio de 2017, de IARC: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- Inczédy, J., Lengyel, T., & Ure, A. (1998). *International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules*. Oxford: IUPAC-Blackwell Science.
- International Medical Geology Association (IMGA). (7 de Mayo de 2017). Obtenido de <http://www.medicalgeology.org/>

- ISO 3534-1. (1993). *Statistics - Vocabulary and Symbols - Part 1: Probability and general statistical terms*. Ginebra, Suiza.: Organización Internacional de Normalización.
- Iwai T, C. K. (2016). *Arsenic speciation and cadmium determination in Tobacco leaves, ash and smoke* . Anal Sci.
- Kim, J., Aftab, B., Tang , J., Kim, D., Lee, A., Rezaee, M., . . . Beachy, P. (2013). Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell*, 23, 23-34.
- Laborda, F. B. (2002). *Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over?* Obtenido de Spectrochimica Acta Part B.
- Lai, V., Sun, Y., Ting, E., Cullen, W., & Reimer, K. (2004). Arsenic speciation in human urine: are we all the same? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 297-306.
- Le, X., Cullen, W., & Kenneth, J. (1994). Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 285, 277-285.
- Ley Orgánica N° 11907. (2010). Recuperado el 20 de marzo de 2017, de http://www.ose.com.uy/descargas/documentos/leyes/ley_organica_nro_11907.pdf
- Lindberg, A., Goessler, W., Nermell, B., & Vahter, M. (2007). Evaluation of the three most commonly used analytical methods for determination of inorganic arsenic and its metabolites in urine. *Toxicology Letters*, 310-318.
- Litter, M., Armienta, M., & Farías, S. (Edits.). (2009). *IBEROARSEN. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. Argentina: CYTED.
- Litter, M., Sancha, A., & Ingallinella, A. (Edits.). (2010). *IBEROARSEN. Tecnologías económicas para el abatimiento de arsénico en aguas*. Argentina: CYTED.
- Lu, P., & Zhu, C. (2011). Arsenic Eh–pH diagrams at 25°C and 1 bar. *Environmental Earth Sciences*, 62(8), 1673-1683.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Recuperado el 15 de marzo de 2017, de <http://www.eurachem.org>
- Mandel, J., & Linnig, F. (1957). Study of Accuracy in Chemical Analysis Using Linear Calibration Curves. *Analytical Chemistry*, 29, 743-749.
- Manganelli, A., Goso, C., Guerequiz, R., Fernández Turiel, J., García Vallés, M., Gimeno, D., & Pérez, C. (2007). Groundwater arsenic distribution in South-western Uruguay. *Environmental Geology*, 53, 827-834.
- Mañay, N. (2010). Developing Medical Geology in Uruguay: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 1963-1969.
- Mañay, N. (2011). En *Rojas Martini, M. Toxicología Ambiental y ocupacional*. Universidad de

Carabobo.

- Mañay, N., Goso, C., Pistón, M., Fernández-Turiel, J., García Vallés, M., Rejas, M., & Guerequiz, R. (2013). Groundwater arsenic content in Raigón aquifer system (San José, Uruguay). *Revista de la Sociedad Uruguaya de Geología*, 18, 20-38.
- Mañay, N., Pistón, M., & Goso, C. (2011). Facing arsenic environmental and health issues with a medical geology approach. *4th International Conference on Medical Geology GeoMed2011*. Italy. Obtenido de http://www.cprm.gov.br/publique/media/geologia_medica/bari_italia/79.pdf
- Marschner, K., Musil, S., & Dědina, J. (2016). Achieving 100% Efficient Postcolumn Hydride Generation for As Speciation Analysis by Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 88(7), 4041-4047.
- Marsh, J. (1836). Account of a Method of Separating Small Quantities of Arsenic from Substances with which it may be mixed. *Edinburgh New Philosophical Journal*(21), 229-236.
- Matoušek, T., Hernández-Zavala, A., Svoboda, M., Langrová, L., Adair, B., Drobná, Z., . . . Dědina, J. (2008). Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-AAS with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta Part B* , 63, 396-406.
- Mesmer, R., & Jolly, W. (1962). The Hydrolysis of Aqueous Hydroborate. *Inorganic Chemistry*, 1(3), 608-612.
- Miller, J., & Miller, J. (1993). *Estadística para Química Analítica* (2da. ed.). Addison-Wesley Iberoamericana.
- Miller, J., & Miller, J. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (5th ed.). Pearson.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (mayo de 2015). *Regiones agropecuarias del Uruguay*. Recuperado el 24 de febrero de 2017, de <http://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/regiones/Regiones2015.pdf>
- MSDS, Material Safety Data Sheet. (2009). *Chromated Copper Arsenate (CCA) Treating Solution*. Obtenido de <http://permatreatlumber.com/wp-content/uploads/2015/09/CCA-Treating-Solution-08-25-09.pdf>
- Musil, S., Matoušek, T., Currier, J., Stýblo, M., & Dědina, J. (2014). Speciation Analysis of Arsenic by Selective Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Fluorescence Spectrometry with Flame-in-Gas-Shield Atomizer: Achieving Extremely Low Detection Limits with Inexpensive Instrumentation. *Analytical Chemistry*, 86(20), 10422-10428.
- Navoni, J., Olivera, N., & Villaamil, E. (2009). Optimización y validación metodológica de la

- cuantificación de arsénico por inyección en flujo-generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA) previa derivatización con L-cisteína. *Acta Toxicológica Argentina*, 17(2), 48-54.
- Neil, C., Yang, Y., Schupp, D., & Jun, Y. (2014). Water chemistry impacts on arsenic mobilization from arsenopyrite dissolution and secondary mineral precipitation: implications for managed aquifer recharge. *Environmental Science and Technology*, 48, 4395-4405.
- Ng, J. G. (2005). Environmental Contamination of Arsenic and its Toxicological Impact on Humans. *Environmental Chemistry*, 2(3), 146-160.
- Niedzielski, P. (2005). The new concept of hyphenated analytical system: Simultaneous determination of inorganic arsenic(III), arsenic(V), selenium(IV) and selenium(VI) by high performance liquid chromatography–hydride generation–(fast sequential) atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 551, 199-206.
- Nixon, D., Mussmann, G., Eckda, S., & Moyer, T. (1991). Total Arsenic in Urine: Palladium-Persulfate vs Nickel as a Matrix Modifier for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*, 37(9), 1575-1579.
- Norin, H., & Vahter, M. (1981). A rapid method for the selective analysis of total urinary metabolites of inorganic arsenic. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 7, 38-44.
- Norton, G., Rafiqul Islam, M., Deacon, C., Zhao, F., Stroud, J., Mc Grath, S., . . . Meharg, A. (2009). Identification of Low Inorganic and Total Grain Arsenic Rice Cultivars from Bangladesh. *Environmental Science & Technology*, 43, 6070-6075.
- NRC, National Research Council. (1999). *Arsenic in Drinking Water*. Washington, DC.: National Academy Press.
- Official Journal of the European Communities. (6 de enero de 2003). *Commission Directive 2003/2/EC of 6 January 2003 relating to restrictions on the marketing and use of arsenic*. Recuperado el 2 de febrero de 2017, de Official Journal of the European Communities.: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:004:0009:0011:EN:PDF>
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2001). *Environmental Health Criteria 224. Arsenic and arsenic compounds*. Recuperado el 4 de febrero de 2017, de OMS: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_224/en/
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2010). *Exposure to arsenic; a mayor public health concern*. Recuperado el 2 de Febrero de 2017, de OMS: <http://www.who.int/ipcs/features/arsenic.pdf?ua=1>
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2016). *Arsenic. Fact sheet*. Recuperado el 2 de

- Febrero de 2017, de OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>
- Ordenanza N°145/009, Ministerio de Salud Pública. (2009). Vigilancia sanitaria de trabajadores expuestos a factores de riesgo laborales. Uruguay. Obtenido de <http://www.msp.gub.uy/marco-normativo/ordenanza-n%C2%B0145009-de-13-de-marzo-de-2009-vigilancia-sanitaria-de-trabajadores>
- Pistón, M., Silva, J., Pérez-Zambra, R., Dol, I., & Knochen, M. (2012). Automated method for the determination of total arsenic and selenium in natural and drinking water by HG-AAS. *Environmental Geochemistry and Health*, 34, 273-278.
- Pitzalis, E., Marcherpa, M., Onor, M., & D'Ulivo. (2009). Mechanisms involved in stannane generation by aqueous tetrahydroborate (III). Role of acidity and L- cysteine. *Spectrochimica Acta Part B*, 309-314.
- Qiu, D. (1995). Recent advances in fundamental studies of hydride generation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 14(2), 76-82.
- Ramesh, K., & Riyazuddin, P. (2005). Mechanism of Volatile Hydride Formation and Their Atomization in Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Sciences*, 21(12), 1401-1410.
- Ramírez, A. (2013). Exposición ocupacional y ambiental al arsénico. Actualización bibliográfica para investigación científica. *Anales de la Facultad de Medicina*, 74(3), 237-247. Recuperado el 10 de marzo de 2017, de <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v74i3.2642>
- Ramis Ramos, G., & García Álvarez-Coque, M. (2001). *Quimiometría*. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.
- Raźniewska, G., Trzcinka-Ochocka, M., & Gazewski, A. (2004). Determination of total inorganic arsenic metabolites in urine. *Acta Toxicologica*, 12(2), 137-144.
- Rojas Martini, M. (2013). *Toxicología ambiental y ocupacional*. Colombia: Universidad del Rosario Editorial UR.
- Schmeisser, E., Goessler, W., Kienzl, N., & Francesconi, K. (2005). Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. *Analyst*, 130, 948-955.
- Sekeres, M. A. (2007). New Data with Arsenic Trioxide in Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 8(1), 7-12.
- Selinus O, A. B. (2004). *Essentials of Medical Geology, Impacts of the Environment on Public Health*. Elsevier.
- Sigma-Aldrich. (2017). *Hamilton PRP-X100 HPLC Column*. Recuperado el 20 de mayo de 2017, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/82020u?lang=en®ion=UY>

- Sigrist, M., & Beldoménico, H. (2004). Determination of inorganic arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with variable sodium tetrahydroborate concentrations. *Spectrochimica Acta Part B*, 59, 1041-1045.
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2009). *Principios de análisis instrumental*. Ediciones Paraninfo S. A.
- Smedley, P., & Kinniburgh, D. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17, 517-568.
- Smedley, P., & Kinniburgh, D. (2005). Arsenic in Groundwater and The Environment. En O. Sellinus, B. Alloway, J. Centeno, R. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, & P. Smedley , *Essentials for Medical Geology. Impacts of the Natural Environment on Public Health* (pág. 812). Elsevier Academic Press.
- Smith, R. (21 de julio de 2016). *Arsenic: A Murderous History*. Recuperado el 5 de febrero de 2017, de The Dartmouth Toxic Metals Superfund Research Program: <http://www.dartmouth.edu/~toxmetal/arsenic/history.html>
- Soignet, S., Maslak, P., Wang, Z., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L., . . . Warrell, R. (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *The New England Journal of Medicine*, 339(19).
- Stata 12. (2015). *Data analysis and Statistical Software*, Stata Corp LLC.
- Subramanian, K. (1989). Determination of arsenic in urine by graphite platform furnace atomization atomic absorption spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 89, 311-315.
- Subramanian, K. (1996). Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part B*, 51, 291-319.
- Sur, R., & Dunemann, L. (2004). Method for the determination of five toxicologically relevant arsenic species in human urine by liquid chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 807, 169-176.
- Suzuki, Y., Shimoda, Y., Endo, Y., Hata, A., Yamanaka, K., & Endo, G. (2009). Speciation Analysis of Arsenic Compounds in Healthy Human Urine by HPLC-ICP-MS for the Evaluation of the Occupational Inorganic Arsenic Exposure. *Epidemiology*, 20(6), 154-155.
- Svoboda, M., Kratzer, J., Vobecký, M., & Dědina, J. (2015). A miniaturized cryogenic trap design for collection of arsanes. *Spectrochimica Acta Part B*, 46-51.
- Sysalova, J., & Spevackova, V. (2003). A Study of Sample Mineralization Methods for Arsenic Analysis of Blood and Urine by Hydride Generation and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Central European Journal of Chemistry*, 2, 108-120.

- Takahashi, M.A., Pfenninger, K., & Wong, L. (1983). Urinary Arsenic, Chromium, and Copper Levels in Workers Exposed to Arsenic-Based Wood Preservatives. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 38(4).
- Templeton, D., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., Van Leeuwen, H., & Łobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1453-1470.
- Terlecka, E. (2005). Arsenic speciation analysis in water samples: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 107, 259-284.
- Thermo Scientific. (2013). *Column Product Manual Dionex IonPac AS22 and Dionex IonPac AS22-Fast*. Recuperado el 15 de abril de 2017, de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-065119-IC-IonPac-AS22-Fast-Man065119-EN.pdf>
- Thomas, D., & Bradham, K. (2016). Role of complex organic arsenicals in food in aggregate exposure to arsenic. *Journal of Environmental Sciences*, 49, 86-96.
- Thomson, M., Ellison, S., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. International Union of Pure and Applied Chemistry. Technical Report. *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
- Tsalev, D. L., & Mandjukov, P. B. (1987). Electrothermal Atomisation Atomic Absorption Spectrometric Determination of Inorganic and Methylated Arsenic after Pre-concentration by Hydride Generation and Trapping the Hydrides in a Cerium(IV) - Iodide Absorbing Solution. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2, 135-141.
- Tsalev, D. L., Sperling, M., & Welz, B. (2000). Flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometric study of the automated on-line pre-reduction of arsenate, methylarsonate and dimethylarsinate and high-performance liquid chromatographic separation of their L-cysteine complexes. *Talanta*, 51, 1059-1068.
- Tseng, C. (2007). Arsenic Methylation, Urinary Arsenic Metabolites and Human Diseases: Current Perspective. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 25(1), 1-22.
- UNIT, Instituto Uruguayo de Normas Técnicas. (2010). *Norma de agua potable 833:2008*. Obtenido de http://www.ose.com.uy/descargas/Clientes/Reglamentos/unit_833_2008_.pdf
- Ure, A., & Davidson, C. (2002). *Chemical Speciation in the Environment*. Blakwell Science Ltd.
- Uruguay XXI. (febrero de 2017). *Investment opportunities forestry sector*. . Recuperado el 24 de febrero de 2017, de <http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp->

- content/uploads/sites/9/2017/03/Forestry-Industry_Uruguay-XXI_2017.pdf
- US EPA, United States Environmental Protection Agency. (2008). *Reregistration Eligibility Decision for Chromated Arsenicals*. Recuperado el 21 de marzo de 2017, de US EPA: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/cca_red.pdf
- US EPA, United States Environmental Protection Agency. (1988). *Special Report on Ingested Inorganic Arsenic. Skin Cancer. Nutritional Essentiality. EPA/625/3-87/013*. Risk Assessment Forum, Washington DC.
- US EPA, United States Environmental Protection Agency. (9 de enero de 2003). *Response to requests to cancel certain Chromated Copper Arsenate (CCA) wood preservative products and amendments to terminate certain uses of other CCA products. Fed Regist.* Recuperado el 2 de febrero de 2017, de US EPA: <https://federalregister.gov/a/03-8372>
- US EPA, United States Environmental Protection Agency. (2007). *Advisory on EPA's Assessments of Carcinogenic Effects of Organic and Inorganic Arsenic: A report of the U.S. EPA Science Advisory Board. EPA-SAB-07-008*.
- US EPA, United States Environmental Protection Agency. (2016). *Overview of Wood Preservative Chemicals*. Recuperado el 2 de febrero de 2017, de United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) [Internet]. Overview of Wood Preservative Chemicals. 2016 May <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/overview-wood-preservative-chemicals-0>.
- US FDA, Food and Drug Administration. (1987). *Quality Management Systems – Process Validation, edition 2*.
- UTE, Administración Nacional de Usinas y Trasmisiones Eléctricas. (2016). *Política de Seguridad y Salud Ocupacional*. Recuperado el 20 de marzo de 2017, de <http://portal.ute.com.uy/institucional/seguridad-y-salud-ocupacional>
- Uthus, E. (1992). Evidence for arsenic essentiality. *Environmental Geochemistry and Health*, 14, 55-58.
- Vahter, M. (2001). Role of Metabolism in Arsenic Toxicity. *Pharmacology & Toxicology*, 89, 1-5.
- Valcárcel, M., & Gómez Hens, A. (2003). *Hibridación instrumental en técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Reverté.
- Vessman, J., Stefan, R., Van Staden, J., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D., & Fajgelj, A. (2001). Selectivity in Analytical Chemistry. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations 2001. *Pure and Applied Chemistry*, 73(8), 1381.
- VIM, Centro Español de Metrología. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales y términos asociados*. doi:JCGM 200:2012

- Watanabe, T., & Hirano, S. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, *87*, 969-979.
- Welch, A., Westjohn, D., Helsel, D., & Wanty, R. (2000). Arsenic in ground water of the United States: occurrence and geochemistry. *Ground Water*, *38*, 589-604.
- Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic Absorption Spectrometry*. New York: Wiley.

TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICADOS

a. Proceedings

Se publicaron dos resúmenes extendidos en un libro dedicado a la situación del arsénico en el mundo.

Advances on the analytical development of feasible techniques and validated methods for the determination of arsenic metabolites in urine in Uruguay; V. Bühl, C. Álvarez, M. H. Torre, M. Pistón, N. Mañay; Arsenic Research and Global Sustainability, Proceedings of the Sixth International Congress on Arsenic in the Environment (As2016), June 19-23, 2016, Stockholm, Sweden.

In book: Arsenic Research and Global Sustainability, pp.404-405

Challenges on the surveillance of arsenic exposed workers in Uruguay; N. Mañay, V. Bühl, C. Álvarez, M. Pistón; Arsenic Research and Global Sustainability, Proceedings of the Sixth International Congress on Arsenic in the Environment

(As2016), June 19-23, 2016, Stockholm, Sweden.

In book: Arsenic Research and Global Sustainability, pp.414-415

b. Artículo referado:

Se publicó un trabajo en una revista internacional referada y se ha enviado para evaluación un segundo trabajo.

Development of a Simple Method for the Determination of Toxicologically Relevant Species of Arsenic in Urine Using HG-AAS

V. Bühl, C. Álvarez, K. Kordas, M. Pistón, N. Mañay

Journal of Environment Pollution and Human Health, 2015, Vol. 3, No. 2, 46-51

<http://pubs.sciepub.com/jephh/3/2/4/index.html> (acceso 26/6/2017).

Biomonitoring of arsenic in woodworkers exposed to CCA and evaluation of other nonoccupational sources in Uruguay. Valery Bühl; María Cristina

Álvarez; María H. Torre; Mariela Pistón; Nelly Mañay. Enviado el 10 de marzo de 2017 para su evaluación al *International Journal of Occupational and Environmental Health*. A la fecha (28/06/2017) el status es: *Required Reviews Completed*.

Taylor & Francis International Journal of Occupational and Environmental Health Editorial Manager
 Role: Author Username: vbuhl
 HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submissions Being Processed for Author Valery Bühl

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Authorship	Initial Date Submitted	Current Status
View Submission	OEH654	Biomonitoring of arsenic in woodworkers exposed to CCA and evaluation of other non-occupational sources in Uruguay	Other Author	10 Mar 2017	Required Reviews Completed

c. Presentaciones en eventos:

Se presentaron diez trabajos en eventos científicos, tres de ellos fueron expuestos en forma oral.

Avances en la optimización de un método rápido de screening de especies toxicológicamente relevantes de As y As total en orina mediante HG-AAS. Alvarez C., Pistón M., Clavijo G., Iaquina F., Bühl V., Mañay N. 3º Encontro Brasileiro sobre Especiação Química- EspeQ Bento Goncalvez, Brasil. Noviembre 2012

Development of a simple method for screening toxicologically relevant Arsenic species in water and urine by HG-AAS for routine analysis in Uruguay Mañay, Nelly, Alvarez, Cristina, Pistón, Mariela, Bühl, Valery and Martínez, Gabriela.

The 5th International Conference on Medical Geology. Arlington, Virginia, Estados Unidos. 25–29 August 2013.

Desarrollo de una metodología para tamización de especies toxicológicamente relevantes de arsénico en agua y orina Álvarez Cristina, Pistón Mariela, Bühl Valery, Martínez Gabriela, Mañay Nelly.

XIV Congreso Latinoamericano de Toxicología Clínica y Seguridad Química. Guayaquil, Ecuador. 17 al 19 de octubre de 2013.

Especiación de arsénico en agua y orina; desarrollo de una metodología de screening para análisis de rutina. Valery Bühl, Mariela Pistón, Cristina Álvarez, Gabriela Martínez, Nelly Mañay. 3er Encuentro Nacional de Ciencias Químicas. ENAQUI. Montevideo, Uruguay. 4 al 6 de noviembre de 2013.

Arsenic environmental and toxicological issues in Uruguay: a medical geology approach” Mañay, N.; Pistón, M.; Álvarez, C.; Bühl, Valery; Goso, César. 1st Latin American Congress of Clinical and Laboratory Toxicology, 27 al 30 de abril de 2014, Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Presentación oral: **Desarrollo y validación de metodologías analíticas acopladas y no acopladas para especiación de arsénico en matrices ambientales y biológicas** V. Bühl, C. Álvarez, M. Pistón, M. H. Torre, N. Mañay CUARTO ENCUENTRO NACIONAL DE QUÍMICA, Complejo Cultural Torre de las Telecomunicaciones de ANTEL, 4-6 de noviembre de 2015, Montevideo, Uruguay.

Presentación oral: **Determinación de arsénico en orina: desarrollo de una metodología de screening para el análisis de rutina mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ET-AAS)** Bühl, Valery; Álvarez, Cristina; Pistón, Mariela; Mañay, Nelly, 3er Congreso Uruguayo de Química Analítica, 6-9 octubre 2014, Montevideo, Uruguay.

<http://www.cuqa.com.uy/cuqa.libro.resumenes.pdf> (acceso 26/6/2017).

Advances on the analytical development of feasible techniques and validated methods for the determination of arsenic metabolites in urine in Uruguay;

V. Bühl, C. Álvarez, M. H. Torre, M. Pistón, N. Mañay; Sixth International Congress on Arsenic in the Environment (As2016), June 19-23, 2016, Stockholm, Sweden.

Challenges on the surveillance of arsenic exposed workers in Uruguay;

N. Mañay, V. Bühl, C. Álvarez, M. Pistón; Sixth International Congress on Arsenic in the Environment (As2016), June 19-23, 2016, Stockholm, Sweden.

Presentación oral: **Biomonitoreo de trabajadores expuestos: desarrollo de un método para la evaluación de especies de arsénico urinario**

Bühl, Valery; Álvarez, Cristina; Pistón, Mariela; Torre, María H.; Mañay, Nelly; 4to. Congreso Uruguayo de Química Analítica, 25-28 de setiembre 2016, Montevideo, Uruguay.

<https://drive.google.com/file/d/0B0NvnN-NIh3EZ0s2X3JDYU56dEk/view>
(acceso 26/6/2017).

d. Documentos de trabajo:

Se generaron dos documentos de trabajo, un procedimiento para el laboratorio CEQUIMTOX y un informe técnico para el médico a cargo en el monitoreo de trabajadores en la empresa impregnadora de CCA evaluada.

Procedimiento de Laboratorio P LB 52 y documentos asociados P LB 53 y F LB 12 en el marco de su Sistema de Gestión de Calidad ISO 9001/2008 del CEQUIMTOX.

e. Proyectos financiados

Se accedió a un proyecto financiado en la convocatoria concursable de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) del año 2013.

Título: Desarrollo y validación de metodologías analíticas acopladas y no acopladas para Especiación de arsénico en matrices ambientales y biológicas como técnicas alternativas al HPLC-ICP-MS no disponible en Uruguay.

Financiado por Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Fondo María Viñas, 2014 (FMV_3_2013_1_100439)

Arsenic Research and Global Sustainability

As 2016

Editors

Prosun Bhattacharya, Marie Vahter, Jerker Jarsjö,
Jurate Kumpiene, Arslan Ahmad, Charlotte Sparrenbom, Gunnar Jacks,
Marinus Eric Donselaar, Jochen Bundschuh, Ravi Naidu

ARSENIC IN THE ENVIRONMENT

PROCEEDINGS

 **CRC Press**
Taylor & Francis Group
A BALASERA BOOK



Arsenic in the Environment – Proceedings

Series Editors

Jochen Bundschuh

Deputy Vice-Chancellor's Office (Research and Innovation) & Faculty of Health, Engineering and Sciences, University of Southern Queensland, Toowoomba, Queensland, Australia

KTH-International Groundwater Arsenic Research Group, Department of Sustainable Development, Environmental Sciences and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

Prosun Bhattacharya

KTH-International Groundwater Arsenic Research Group, Department of Sustainable Development, Environmental Science and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

International Center for Applied Climate Science, University of Southern Queensland, Toowoomba, Queensland, Australia

ISSN: 2154-6568

PROCEEDINGS OF THE 6TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ARSENIC IN THE ENVIRONMENT,
STOCKHOLM, SWEDEN, 19–23 JUNE 2016

Arsenic Research and Global Sustainability

As 2016

Editors

Prosun Bhattacharya

*KTH-International Groundwater Arsenic Research Group, Department of Sustainable Development, Environmental Sciences and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden
International Center for Applied Climate Science, University of Southern Queensland, Toowoomba, Queensland, Australia*

Marie Vahter

Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Jerker Jarsjö

*Department of Physical Geography and Quaternary Geology, Stockholm University, Stockholm, Sweden
Bolin Centre for Climate Research, Stockholm University, Stockholm, Sweden*

Jurate Kumpiene

Waste Science & Technology, Department of Civil, Environmental and Natural Resources Engineering, Luleå University of Technology, Luleå, Sweden

Arslan Ahmad

KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, The Netherlands

Charlotte Sparrenbom

Department Geology, Quaternary Sciences, Lund University, Lund, Sweden

Gunnar Jacks

KTH-International Groundwater Arsenic Research Group, Department of Sustainable Development, Environmental Sciences and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

Marinus Eric Donselaar

Department of Geoscience and Engineering, Delft Univ. of Technology, Delft, The Netherlands

Jochen Bundschuh

*Faculty of Health, Engineering and Sciences, The University of Southern Queensland, Toowoomba, Australia
KTH-International Groundwater Arsenic Research Group, Department of Sustainable Development, Environmental Sciences and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*

Ravi Naidu

Global Centre for Environmental Remediation (GCER), Faculty of Science & Information Technology, The University of Newcastle, Callaghan, NSW, Australia

Research Centre for Contamination Assessment and Remediation of the Environment (CRC CARE), University of Newcastle, Newcastle, New South Wales, Australia



CRC Press

Taylor & Francis Group

Boca Raton London New York Leiden

CRC Press is an imprint of the
Taylor & Francis Group, an informa business

A BALKEMA BOOK

46	Assessment of arsenic exposure among the residents living along the Mekong River in Cambodia <i>S. Himeno, C. Tohmori, D. Sumi, H. Miyataka & S. Sthiannopkao</i>	390
	Arsenic exposure and metabolism among women in Bolivia <i>J. Gardon, N. Tirado, K. Broberg & M. Vahter</i>	392
	Arsenic exposure and methylation efficiency during pregnancy and birth size <i>F. Harari, K. Broberg, M. Vahter & E. Casimiro</i>	394
51	Factors influencing arsenic metabolism in children <i>H. Skróder Löveborn, M. Kippler, Y. Lu, S. Ahmed, R. Raqib, D. Kuehnelt & M. Vahter</i>	397
	AS3MT: Mechanism <i>B.P. Rosen, H. Dong & J.J. Li</i>	400
54	AS3MT: Inhibitors <i>B.P. Rosen, H. Dong, C. Packianathan & M. Madegowda</i>	402
57	Advances on the analytical development of feasible techniques and validated methods for the determination of arsenic metabolites in urine in Uruguay <i>V. Bühl, C. Álvarez, M.H. Torre, M. Pistón & N. Mañay</i>	404
59	A modified creatinine adjustment method to improve urinary biomonitoring of exposure to arsenic in drinking water <i>D.R.S. Middleton, M.J. Watts, T. Fletcher & D.A. Polya</i>	406
61	The ACGIH Biological Exposure Index for urinary arsenic: To adjust for urinary creatinine or not? <i>G.P. Kew, J.E. Myers & B.D. Johnson</i>	409
63	Rapid health risk assessment of discharge of tailings water containing elevated level of arsenic and other metals <i>J.C. Ng, S. Muthusamy & P. Jagals</i>	411
	Challenges on the surveillance of arsenic exposed workers in Uruguay <i>N. Mañay, V. Bühl, C. Alvarez & M. Pistón</i>	414
65	Mineral nutrients and toxicants in Bangladesh groundwater—do we need a holistic approach to water quality? <i>M.A. Hoque & A.P. Butler</i>	416
68	Groundwater and blood samples assessment for arsenic toxicity in rural population of Darbhanga district of Bihar, India <i>S. Abhinav, S. Navin, S.K. Verma, R. Kumar, M. Ali, A. Kumar & A.K. Ghosh</i>	419
70	Assessing the impact of arsenic in groundwater on public health <i>J.-H. Chung, J.-D. Park & K.-M. Lim</i>	421
73		
	<i>3.3 Biomarkers of health effects</i>	
76	Metabolomics of arsenic exposure: The Man vs. the mouse <i>M. Stýblo, R.C. Fry, M.C. Huang, E. Martin, C. Douillet, Z. Drobná, M.A. Mendez, C. González-Horta, B. Sánchez-Ramírez, M.L. Ballinas-Casarrubias, L.M. Del Razo & G.G. García-Vargas</i>	425
78		
80	Arsenite and its metabolite, methylarsonite, inhibit calcium influx during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets <i>M.C. Huang, C. Douillet & M. Stýblo</i>	428
82		
	Assessment of cytogenetic damage among a cohort of children exposed to arsenic through drinking tubewell water in West Bengal, India <i>A.K. Bandyopadhyay, A.K. Giri & S. Adak</i>	430
87	Pro-atherogenic effects of arsenic and the protective potential of selenium and high-selenium lentils <i>R.M. Krohn, M. Lemaire, K.K. Mann & J.E.G. Smits</i>	432

Advances on the analytical development of feasible techniques and validated methods for the determination of arsenic metabolites in urine in Uruguay

V. Bühl¹, C. Álvarez², M.H. Torre³, M. Pistón¹ & N. Mañay²

¹Analytical Chemistry. DEC, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

²Toxicology. DEC, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

³Inorganic Chemistry. DEC, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

ABSTRACT: Exposure to arsenic (As) is considered a serious environmental public health problem in many countries, but in Uruguay has only been considered in occupational health. The aim of this work is to present the advances of the analytical development of feasible methodologies for the determination of toxicologically relevant species of As in both occupationally exposed and non-exposed populations, as an alternative for more expensive techniques such as HPLC-HG-ICPMS. These analytical methodologies are useful to have the scientific evidence of population exposure to low doses of arsenic in Uruguay in order to prevent long-term health effects and establish a basis for the development of new scientific research.

1 INTRODUCTION

Exposure to arsenic (As) is considered a serious environmental public health problem in many countries, but in Uruguay has only been considered in occupational health, although this element may be widespread in the environment and its inorganic species may have adverse effects on human health even at low levels of exposure.

In the Faculty of Chemistry in Uruguay, we are developing analytical technologies to assess and control exposure to toxic arsenic species in vulnerable populations. We also have background research and collaboration with national, regional and international leaders in this field (Mañay *et al.*, 2014).

In our country, there are no background studies on arsenic exposure, and the current legislation only takes into account the regular biomonitoring of arsenic in exposed workers. However, the risk of exposure in relation to all other non-occupational variables is not evaluated.

Thus we are now developing a multidisciplinary research project which aims to deepen the knowledge about the different factors that can affect arsenic toxicology, metabolism and speciation in relation to levels of inorganic As and methylated metabolites in urine as well as the assessment of the occupational and natural sources along with other environmental parameters and individual, including genotoxicity.

In this project's framework, we present the advances of the analytical development of feasi-

ble techniques and validated methods to fill the gap of the "inorganic arsenic methylation challenges". This will provide analytical tools in order to further understand about the impact of As on exposed Uruguayan workers population health and the possible correlations of arsenic exposure not only in their workplace but also owing to the natural environmental exposure.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Determination of toxicologically relevant species of arsenic in urine using HG-AAS

Sample preparation consisted of a derivation with L-cysteine of arsenic species. This method is based on the fact that As(III) + As(V) and the methylated species (MMA + DMA) react with L-cysteine in acid medium, generating thioderived compounds that originate arsines at similar velocities, which allows quantification of the total amount without overestimating or underestimating other species. Thus sum of the four toxicologically relevant species is determined (As(III) + As(V) + MMA + DMA), being this sum essentially the 'hydride-reactive fraction'. To determine the sum of the four species, hydride generation technique based on the reduction of them to arsine (AsH₃) with NaBH₄ in acid medium (HCl) was used. This methodology was validated and published in a previous work (Bühl *et al.*, 2015).

2.2 Hyphenated technique: HPLC-HGAAS

The separation conditions of As (III), As (V), DMA and MMA species were optimized on a conventional Shimadzu HPLC with UV diode array arrangement detector. The working conditions were as follows: $\lambda = 193.7$ nm, anion exchange column: Kinetex® PFP, 150 x 4.6 mm, mobile phase: 0.1% (v/v) HCOOH containing 1% (v/v) MeOH. Once the optimizations conditions were achieved, a separate pump module with manual control (Shimadzu) was coupled to the atomic absorption spectrometer (SpectrAA 55B Varian) with HG-AAS detection. The above mentioned mobile phase was used for the separation and for hydride generation the eluent from the column was mixed with 1% NaBH₄ and 3M HCl for subsequent determination.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Determination of toxicologically relevant species of arsenic in urine using HG-AAS

A comparison between the validated methodology with the one considered as "gold technique" was made. The "gold technique" involves the coupling of a separation technique, an atomic emission technique and a mass detector (HPLC-ICPMS) for As speciation. This hyphenated instrumentation is very expensive and it is not yet available for routine analysis in Uruguay.

The comparison was performed analyzing 40 samples (from a previous project) by HPLC-ICPMS in the laboratory of Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden and using the proposed method. The obtained results using both approaches appear to be statistically equal in the lowest range of exposure, from 5 to 40 $\mu\text{g/L}$ which is adequate for monitoring purposes according the regulations (Bühl *et al.*, 2015).

The validated method was applied for toxicological analysis in urine samples from exposed workers to arsenic to comply with international recommendations (ACGIH) risk prevention health effects.

3.2 Hyphenated technique: HPLC-HG-AAS

Under the optimized conditions described in 2.2 using conventional HPLC-UV, it is possible to evaluate the separation performance at ppm levels of As species. Figure 1 shows a chromatogram obtained in these conditions. The four species were separate in the following order: t: 2.230 min. - As(III), t: 2.447 min. - MMA, t: 2.638 min. DMA, t: 3.238 min As(V). But ppm levels are not adequate for the proposed objectives.

The coupled system developed in our laboratory (HPLC-HG-AAS) using the same conditions than with the conventional HPLC-UV was applied for the determination of As(III) and As(V) at ppb

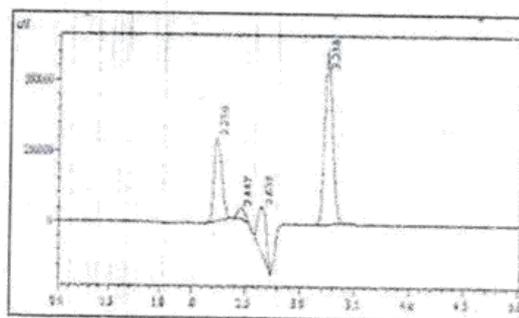


Figure 1. Chromatogram obtained using HPLC-UV detection prior to couple the pump and column to the HG-AAS system.

levels. The total run lasts 5 min with good separation of the inorganic species. The methodology is in development stage for the determinations in urine.

4 CONCLUSIONS

Economic and feasible analytical tools for the determination of the main metabolites to assess arsenic human exposure were developed and validated. The proposed methods has proven to be an alternative for more expensive techniques, such as HPLC-HG-ICP-MS, used for arsenic speciation in urine. These analytical methodologies are useful since through them we will have the scientific evidence of population exposure to low doses of arsenic in Uruguay in order to prevent long-term health effects and establish a basis for the development of new scientific research.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research that gives rise to the results, received funding from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII FMV_3_2013_1_100439), PEDECIBA-Química.

REFERENCES

- ACGIH, 2014. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH
- Bühl, V., Álvarez, C., Kordas, K., Pistón, M. and Mañay, N. 2015. Development of a simple method for the determination of toxicologically relevant species of arsenic in urine using HG-AAS. *Journal of Environment Pollution and Human Health* 3(2): 46-51.
- Mañay, N., Pistón, M. and Goso, C. 2014. Arsenic environmental and health issues in Uruguay: A multidisciplinary approach. In: M.I. Litter, H.B. Nicolli, M. Meichtry, N. Quici, J. Bundschuh, P. Bhattacharya and R. Naidu (Eds.) "One Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914-2014) As 2014". CRC Press/Taylor and Francis, 485-487.

Challenges on the surveillance of arsenic exposed workers in Uruguay

N. Mañay¹, V. Bühl², C. Alvarez¹ & M. Pistón²

¹Toxicology. DEC, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

²Analytical Chemistry. DEC, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

ABSTRACT: Urinary arsenic level is the most common biomarker for assessing human exposure risks at workplaces and it is necessary to quantify inorganic arsenic species in urine and its methylated metabolites (arsenate + arsenite + DMA + MMA). Reference limits in Uruguay are less than 35 µg/L of the sum of inorganic arsenic (iAs) and its metabolites in urine measured at end of a workweek. Regular controls are performed to comply with national regulations. However, other sources of arsenic exposure besides that from workplaces such as food or drinking water and other non-occupational variables have not been taken into account in the development of toxic effects of arsenic and no background data is available. In this work some related biomonitoring studies and research focused on workers exposed to arsenic in the industries of wood preservation in Uruguay are presented.

1 INTRODUCTION

Urinary arsenic (As) level is the most common biomarker for assessing human exposure risks at workplaces. It is necessary to quantify inorganic arsenic (iAs) species in urine and its methylated metabolites (arsenate + arsenite + DMA + MMA), for biomonitoring assessment and risk management of workers' As exposure in order to prevent adverse effects or medical interventions. Reference limits in Uruguay are regulated by a law adopting those recommended by ACGIH (< 35 µg/L) which considers the sum of iAs and its metabolites in urine-measured at end of a workweek. This issue has represented a major analytical challenge in Uruguay since the determination of the sum of these toxicological relevant species of As were determined using an alternative method. This method was developed using Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) because HPLC-ICPMS is not available for routine analysis (Bühl *et al.*, 2015).

However, other sources of As exposure besides that from workplaces such as food or drinking water and other non-occupational variables have not been taken into account in the development of toxic effects of As and no background data is available.

Our analytical toxicology research group is currently developing a multidisciplinary project. The aim is to establish relationships among observed effects, levels of As species in urine and the influence of non-occupational As exposure in workers along with other environmental parameters and

individual susceptibility, including genotoxicity. The final results will be of great importance to prevent long-term health effects exposures to low doses of As.

In this work some related biomonitoring studies and research focused on workers exposed to As in the industries of wood preservation in Uruguay are presented.

2 METHODS/EXPERIMENTAL

2.1 Arsenic occupational exposed workers in Uruguay: Current situation

In Uruguay most industries use Chromated Copper Arsenate (CCA) as wood preservative (solution 60%). The mixture can be expressed as Cr, Cu and As oxides (28.5% Cr₂O₃, 11.1% CuO and 20.4% As₂O₅). This product is registered as a pesticide, with a restricted use, and the only available formulation is an aqueous solution. This formulation minimizes the risk of contamination in case that an accident occurs during the transport of the product to the plant, but industries devoted to wood preservation in our country increased its use, leading to a higher risk for workers. The processes carried out in these industries and occupational exposure are reviewed.

2.2 Arsenic biomonitoring

Urine samples from workers presumably exposed to As, in different workplaces are periodically analyzed in our Laboratory, for toxicologically relevant

species in order to assess health risks according to national regulations. Results of this routine biomonitoring, in a period of two years, were statistically assessed.

2.3 New challenges

Several of ongoing research studies to assess the incidence of low levels of As on exposed workers health and their correlations with different associate parameters focused on toxicological aspects, are presented.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Exposed workers

There are over a dozen industries in Uruguay that perform wood preservation with CCA. Many of them have modern plants for the impregnation process. However some of these tasks are still manually made for some particular wooden parts (those of small size), with consequent health risks of workers exposure to As.

3.2 Arsenic biomonitoring

176 urine samples were analyzed for the last two years for biomonitoring purposes. The sum of toxicologically relevant species of As (iAs +MMA+DMA) were determined using HG-AAS (Bühl *et al.*, 2015). The results are summarized in Table 1.

Only 16 exposed workers showed higher levels than those established by regulations (As-Urine < 35 µg/L), although half of the population have rates over 5 µg/L. The average result of this routine biomonitoring was 10 µg/L (range 5–82 µg/L). Those workers with high levels of As were taken away from the workplace for at least 15 days, and then the analysis was repeated; all of them showed lower levels after this action.

Table 1. Analytical results of urinary As during the last two years for biomonitoring purposes.

	As-Urine (µg/L) Sum of iAs+DMA+MMA
Number of samples	176
Detection Limit (HG-AAS)	1.5
Quantification Limit	5.1
Mean value	10.2 ± 1.2
Minimum value	< 5.1
Maximum value	82.5 ± 9.9

3.3 New challenges

Besides this routine biomonitoring to As exposed workers, the possible factors which may influence on As urine levels and develop adverse effects are being assessed.

Our pilot study is taking special attention on potential occupational factors that are considered together with known or suspected exposure to other chemical or physical agents at work, home or leisure activities. For this purpose, we are processing surveys done to a target group of exposed workers asking about characteristics of particular dietary issues, seafood, rice and tap water consumption, among others. Correlations between time/duration of exposure, and habits, lifestyles, and medical/family history of each worker will be studied. Urine, blood and mouth cells are also being taken for further studies as biomarkers to determine other possible effects and establish correlations with low levels of As exposure. Nutrition factors and water resources also will be taken into account

4 CONCLUSIONS

The results of an ongoing research were reviewed. These results will highlight the impact on health and the consequences of As exposure in exposed workers in their working place and natural environment, considering the influence of other factors that affect the development of adverse effects caused by this element. No background information is available in our country and these As issues have been underestimated until now.

This research will contribute to provide scientific evidence to prevent long-term health effects exposures to low doses of As.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research that gives rise to the results, received funding from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII FMV_3_2013_1_100439), PEDECIBA-Química.

REFERENCE

- Bühl, V., Álvarez, C., Kordas, K., Pistón, M. and Mañay, N. 2015. Development of a simple method for the determination of toxicologically relevant species of arsenic in urine using HG-AAS. *Journal of Environmental Pollution and Human Health* 3(2): 46–51.

Development of a Simple Method for the Determination of Toxicologically Relevant Species of Arsenic in Urine Using HG-AAS

Valery Bühl², Cristina Álvarez¹, Katarzyna Kordas³, Mariela Pistón^{2,*}, Nelly Mañay^{1,*}

¹Center of Specialized Chemical Toxicology (CEQUIMTOX) Toxicology Area, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³School of Social and Community Medicine, University of Bristol, Bristol, United Kingdom

*Corresponding author: mpiston@fq.edu.uy, nmanay@fq.edu.uy

Received June 27, 2015; Revised July 26, 2015; Accepted July 28, 2015

Abstract Humans are exposed to arsenic (As) in the environment, in both organic and inorganic forms, and it has been widely demonstrated that the inorganic arsenic species (arsenate and arsenite) are the main toxic ones being drinking water one of the main sources of exposure worldwide. Urinary arsenic level is the recommended biomarker for assessing human exposure risks. Absorbed inorganic arsenic is metabolized to mono- and dimethylated arsenic compounds (MMA and DMA) prior to its excretion in urine. In this work, a simple procedure for the determination of toxicologically relevant arsenic species in urine (sum of As(III), As(V), MMA and DMA) using Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) was developed in order to obtain a feasible and self-sustainable technology for analysis and epidemiological studies when other expensive techniques are not available. Sample preparation was based on the derivation of arsenic species with L-cysteine. The limit of detection was $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$, linearity up to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ and analytical precision was 12 % (relative standard deviation, RSD %, $n=10$). Trueness was evaluated using spiked urine samples as well as a reference material. The range of acceptance for recoveries was established in 85-115% by means of a *t*-test at the 95% significance level. Recoveries for the four As species from spiked urine samples were in the range 87.8-113.5 %. The recovery from a reference material was 100.7%. The comparison between the HG-AAS and high performance liquid chromatography-hydride generation-coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-HG-ICPMS), considered as a gold standard technique, showed good agreement ($R^2 = 0.94$) for forty urine samples. The figures of merit were adequate for the determination of relevant species of As for biomonitoring purposes according to international regulations and it can be postulated as an alternative to more expensive techniques.

Keywords: arsenic, urine, toxicologically relevant species of arsenic, HG-AAS

Cite This Article: Valery Bühl, Cristina Álvarez, Katarzyna Kordas, Mariela Pistón, and Nelly Mañay, "Development of a Simple Method for the Determination of Toxicologically Relevant Species of Arsenic in Urine Using HG-AAS." *Journal of Environment Pollution and Human Health*, vol. 3, no. 2 (2015): 46-51. doi: 10.12691/jephh-3-2-4.

1. Introduction

Arsenic has been considered as a typical example of a "poison" in human toxicology but it has been widely demonstrated that the inorganic arsenic species (arsenate and arsenite) are the main toxic ones, having shown to be carcinogens [1] while the organic natural species (arsenobetaine, arsenocholine, arsenoribosides, etc.), present in seafood, are almost harmless to humans. Thus, the identification of specific arsenic species plays an important role in the interpretation of adverse effects and biological mechanisms of action in humans [2,3,4].

Inorganic arsenic exposure through underground water has been responsible for the development of severe adverse effects on exposed populations in many regions

worldwide, including several countries in Latin America. In South America, Argentina, Brazil and Chile are examples of world-famous naturally arsenic contaminated water, while in Uruguay this problem has not yet been evaluated systematically [5,6,7,8,9]. Then, it is necessary to develop systematic studies to assess population's chronic exposure to inorganic arsenic through drinking water and other sources, for regular biomonitoring of occupationally exposed workers.

Inorganic arsenic can be easily absorbed in the gastrointestinal tract at a rate between 40 and 100%. Ingested inorganic arsenic is absorbed by the tissues and is metabolized to mono- and dimethylated arsenic compounds (MMA and DMA) prior to its excretion in urine. The harmful effects of inorganic arsenic may be affected by intra- and inter-individual differences in the processes of methylation [4,10,11].

Urinary arsenic level is the most common biomarker for assessing human exposure risks. There is a very clear need to properly quantify inorganic arsenic species in urine and its methylated metabolites, for the assessment and management of human environmental arsenic exposure in order to prevent and control the arsenicosis of exposed population, as well as for remediation and medical interventions [11]. This represents a major analytical challenge for developing countries because total urinary arsenic measurement, most commonly performed in these countries, assesses the combined exposure from all routes of exposure and all species of arsenic, including organic arsenic contribution from seafood consumption. Therefore, total urinary arsenic measurements may over-estimate arsenic exposure in populations with high seafood consumption [12,13].

Occupational monitoring and research studies have focused on the sum of inorganic-related species (arsenate + arsenite + DMA + MMA) as a measure of inorganic arsenic exposure. Reference values for the sum of inorganic arsenic and its metabolites in urine recommended for occupationally exposed workers are less than $35 \mu\text{g L}^{-1}$ measured at end of a workweek [14]. For general population, conclusions from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 data indicate that a urine sample of $\text{As} < 20 \mu\text{g L}^{-1}$ is likely to have little contribution from organic arsenic species [15].

Atomic Spectrometry (AS) is the technique used to determine total arsenic at trace levels, and Atomic Fluorescence Spectrometry (AFS) or Atomic Emission Spectrometry coupled to a mass detector (ICPMS) [16,17,18,19] are frequently used. The latter is very expensive, whereas AFS is not common in routine laboratories. For total As determination, Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry (ET-AAS) is widely used [20]. For As speciation ICPMS coupled to HPLC is required, while for the determination of the species that generate hydrides (As(III), As(V), DMA and MMA) Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) can be used [19,21]. HG-AAS is preferable to ET-AAS because it provides separation of the analyte from the matrix, reducing the effects of several interferences [16,22]. For better detection limits, HG can be also coupled to HPLC-ICPMS [23]. This instrumentation is very expensive and it is not yet available for analysis in Uruguay.

The aim of this work was the development of a simple procedure for the determination of toxicologically relevant arsenic species in urine (sum of As(III), As(V), MMA and DMA) using HG-AAS, in order to obtain a feasible and self-sustainable technology for analysis and epidemiological studies, according to international recommendations and national regulations. This method can be postulated as an alternative to expensive gold standard techniques such as HPLC-ICPMS or HPLC-HG-ICPMS, since we demonstrate that the results are statistically comparable.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

All glassware was soaked overnight in 10% (v/v) nitric acid (HNO_3) and then rinsed with purified water. Purified

water was obtained from a Millipore Simplicity 185 (ASTM type I, $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistivity). All reagents were of analytical-reagent grade or better.

Arsenic standards: As (V) 1000 mg L^{-1} (Fluka), Disodium methyl arsenate hexahydrate (MMA, > 97.5%, Chem Service), As(III)-oxide (Sigma-Aldrich), cacodylic acid (DMA, >99%, Sigma-Aldrich), L -Cysteine (>97%, Sigma-Aldrich) and Sodium tetrahydroborate (NaBH_4 , 99%, Sigma-Aldrich).

The stock solutions of As(III), MMA, and DMA were prepared monthly and kept refrigerated at 4°C . All arsenic (species) solutions were stable under these conditions when tested after 1 month.

The As(III) stock standard solution 1000 mg L^{-1} was prepared by dissolving an appropriate amount of As(III)-oxide in 5mL of sodium hydroxide 2M, neutralized with HCl 2M and diluting with purified water.

DMA and MMA stock standard solutions 1000 mg L^{-1} were prepared by dissolving an appropriate amount in purified water.

An aliquot of those solutions was diluted with water to give the appropriate concentrations of working standard solutions.

Aqueous solutions of L-cysteine 6% (w/v) was prepared fresh daily. NaBH_4 1% (w/v) in 0.5% (w/v) sodium hydroxide solution was prepared prior to use.

The hydrochloric acid solution (HCl) 0.1 M was prepared by diluting appropriate volumes of concentrated hydrochloric acid (37.8%, Fisher Scientific) in purified water.

2.2. Instrumentation

All measurements were carried out using a Varian SpectrAA 55B atomic absorption spectrometer, operated at 193.7 nm, fitted with a 10-cm burner (air-acetylene flame) and a T-shaped quartz absorption cell VGA 76/77 (Varian). The slit width was 0.5 nm. A hollow cathode lamp (Varian) was used as light source as recommended by the manufacturer.

A flow system accessory VGA-77 was used for the hydride generation. The reductant agent was NaBH_4 and the acid reagent was HCl. Nitrogen was the carrier gas.

2.3. Methods

2.3.1. Sample Preparation

For the development and validation of the methodology, a pool of at least three urine samples from healthy occupationally non-exposed volunteer adults was used.

Sample preparation consisted of a derivation with L-cysteine of arsenic species. This method is based on the fact that As(III) + As(V) and the methylated species (MMA + DMA) reacted with L-cysteine in acid medium, generating tioderivated compounds that originate arsines at similar velocities, which allows quantification of the total amount without overestimating or underestimating of other species. Thus sum of the four toxicologically relevant species is determined (As(III) + As(V) + MMA + DMA), being this sum essentially the 'hydride-reactive' fraction [24,25,26,27,28]. To determine the sum of the four species, hydride generation technique based on the reduction of them to arsine (AsH_3) with NaBH_4 in acid medium (HCl) was used.

The concentrations of NaBH_4 and HCl are critical parameters to optimize in HG-AAS. These variables affect the sensibility and precision of the method and they depend on the matrix.

2.3.2. Analytical Procedure

The analytical procedure presented bellow was validated according to Eurachem Guide for method validation [29].

Two intermediate standard solutions (10 mg L^{-1} and 0.05 mg L^{-1}) were prepared daily by dilution of the As(V) 1000 mg L^{-1} stock solution with purified water. The As(V) calibration curve was prepared by accurately measuring 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 mL of the intermediate standard solution of As(V) (0.05 mgL^{-1}), followed by the addition of urine to a final volume of 10 mL. The final As(V) concentrations were 5.0, 10.0, 25.0 and $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$.

For the derivation step, 2.5 mL of L-cysteine (6% w/v) were added to 5 mL of the samples and standards (prepared with fresh urine as explained above). The mixture was stirred for 2 minutes to homogenize and then left to stand at room temperature for 30 minutes. Afterwards 2 drops of octanol were added to the solution in order to prevent foaming in the hydride generation device; the measurements were carried out using this solution. The obtained signal corresponds to total As (III) content in the sample (or standard) generated from the 'hydride-reactive' fraction ($\text{As(III)} + \text{As(V)} + \text{MMA} + \text{DMA}$).

When samples with As levels higher than $50 \mu\text{g L}^{-1}$ are analyzed, the aliquot of urine must be modified (less than 5 mL) in order to obtain a concentration within the calibration range.

2.3.3. Comparison of Analytical Techniques

Using the validated methodology, the sum of $\text{As(III)} + \text{As(V)} + \text{MMA} + \text{DMA}$ was determined in urine samples and the results were compared with those obtained with a well-reported technique as HPLC-HG-ICP-MS for As speciation (gold standard technique).

This comparative assay was performed in urine samples obtained in previous research studies on Uruguayan children. The aim of the source study was to examine the effects of low-level arsenic exposure on cognition of first-grade children. The overall study methodology is available elsewhere [30].

First morning urine samples were collected in screw-top cups. To decrease potential contamination of the sample from the receptacle, each cup was rinsed repeatedly with 10% HNO_3 and deionized water before distribution to families for data collection.

For the aims of that study, urine samples were analyzed in Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden where urinary arsenic species were measured by HPLC-HG-ICPMS (Agilent 7500cs, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) [31,32].

Control remaining urine samples were kept frozen at -20°C in 10 mL plastic tubes in the Center of Specialized Chemical Toxicology (CEQUIMTOX), Faculty of Chemistry, Montevideo, Uruguay, for further uses as children's parents had approved in their respective informed consent. The validated HG-AAS methodology was applied for the determination of the sum of

$\text{As(III)} + \text{As(V)} + \text{MMA} + \text{DMA}$ in 40 of those archived urine samples and compared with the results obtained in the Laboratory from Sweden.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of the Hydride Generation Conditions

Optimal conditions for hydride generation were established. The evaluated parameters were concentration of the reductant agent (NaBH_4) in three levels 0.5, 1.0 and 1.5% (w/v), and concentration of acid (HCl) in five levels: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 M. These parameters were studied using a urine sample fortified with $20 \mu\text{g L}^{-1}$ of each of the four arsenical species tested.

Based on information published in the literature [27] the L-cysteine concentration was fixed in 6% (w/v), since it was reported to be adequate for this application and the NaBH_4 varied using a concentration of 2 M for HCl as recommended by the manufacturer of the hydride generator device. Table 1 shows the results obtained for each species when the variable was NaBH_4 concentration.

Table 1. Signal variation for each species with the concentration of NaBH_4 using HCl 2M and L-cysteine 6% (w/v). RSD: relative standard deviation (n=5)

NaBH_4 (% w/v)	Absorbance/Concentration				RSD (%)
	As(III)	As(V)	MMA	DMA	
0.5	3236	3090	2118	2137	22.7
1.0	5034	4660	4796	4692	3.5
1.5	4170	4285	3952	3867	4.7

The optimum condition was selected considering the better precision and the highest radio signal to concentration for the four species. Thus, the concentration for NaBH_4 was fixed in 1% (w/v) in NaOH 0.5% (w/v).

Since it is reported that the concentration of HCl can be less than 2 M for As determinations using HG-AAS, with the optimum NaBH_4 concentration fixed the HCl concentration was varied [25,26,27,28]. This is important not only to optimize the experiment but also to be in good agreement with the Green Chemistry principles.

Five levels of diluted acid were tested evaluating the slopes of calibration of the four As species (analytical sensitivity). The curves were in the range of 1 to $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Table 2 shows the results obtained. The optimum concentration of HCl was 0.1 M since the precision was the best and the analytical sensitive was adequate for the four species.

Table 2. Variation of the slopes of calibration for each species with the concentration of HCl , using NaBH_4 1% (w/v) and L-cysteine 6% (w/v). RSD: relative standard deviation (n=5)

HCl (M)	As(III)	As(V)	MMA	DMA	RSD (%)
0.01	0.013	0.012	0.010	0.010	12.1
0.05	0.012	0.010	0.011	0.009	12.4
0.10	0.011	0.009	0.010	0.009	10.3
0.20	0.011	0.008	0.010	0.008	12.9
0.50	0.008	0.007	0.005	0.005	19.2

The optimum flow rates were 6 mL min^{-1} for the sample, 1.8 mL min^{-1} for the HCl and 1.6 mL min^{-1} for the

reductant agent (NaBH_4). These are the conditions recommended by the manufacturer and indicated in the manual.

3.2. Validation

Once the critical parameters were optimized, the main figures of merit were evaluated in order to validate the developed method.

To investigate the possible existence of multiplicative interferences the slope of the calibration curve in water was compared with that of the standard additions curve by means of statistical hypothesis testing [33]. It was found that the slopes were significantly different, suggesting the existence of such interferences.

For this reason, it was decided that the calibration curve would be made in urine (standard addition method). The urine used for calibration was from non-exposed adults, as explained above (urine pool).

For the evaluation of linearity, 6 urines fortified with As(V) in the range 0–50 $\mu\text{g L}^{-1}$ were measured ($n=5$) and the results were plotted as a function of the concentration. Analytical curve was $A = 0.0109C + 0.0087$ (A = absorbance, C = concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$, $R^2 > 0.99$). Linear range was established from the concentration corresponding to the quantification limit up to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, confirmed by visual inspection of the plot and analysis of residuals.

Routine calibration curve was thus established in the range 5 - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ using As(V), since there were no significant differences between the slopes for the other species (As(III), DMA and MMA) so the results can be expressed as As(V). In addition, the urine pool used for calibration (without As addition) must be measured as a blank. This range is adequate for screening analysis and control purposes since the regulation indicates that the sum of inorganic arsenic and its metabolites (MMA and DMA) in urine recommended for occupationally exposed workers should be less than 35 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Detection (LOD, 3σ) and quantification (LOQ, 10σ) limits were estimated by measuring the dispersion of a pool of urine samples from non-exposed voluntaries ($n=10$) without As addition (blanks) signals and referring the measurements to the calibration curve. In these conditions, LOD was 1.5 and LOQ 5.1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Precision (RSD %) was estimated by both instrumental and analytical repetition. For analytical precision, 10 samples of spiked urine (pool) were analyzed. Each sample was measured 10 times (for instrumental precision). The analytical precision was 12 % (expressed as RSD %), for a concentration of 15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Repeatability ($n=10$) for the various levels of a calibration curve (5 -50 $\mu\text{g L}^{-1}$) was in the range 5.3% (for the highest concentration) to 8.1% (for the lowest one).

LOD, LOQ and precision were similar than those reported by Lindberg et al. using HPLC-HG-AFS expressed as As(V), in fact the limits are slightly lower [23]. Therefore, there is no need to use expensive technology to achieve detection limits that fit for the purpose.

Trueness was evaluated as recovery from the analysis of a reference material provided by the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) for proficiency testing and coded "Intercomparison programme 54:2014 for toxicological analysis in biological materials", as well as from analysis of spiked samples [34].

The reference value for this sample was 29.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (tolerance range: 21.2-37.4) and the obtained value using the proposed methodology was $29.5 \pm 3.5 \mu\text{g L}^{-1}$ which represents a recovery of the 100.7 %.

Urine samples ($n=10$) were spiked with As(III), As(V), DMA and MMA individually in two concentration levels (20 and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$) and also spiked with the four species combined in each sample at the same concentration levels.

All the standards and samples were processed as described in section 2.3.2.

Table 3 shows the results obtained expressed as recovery percentage calculated as $100 \times [\text{found} / \text{added}]$.

Table 3. Recoveries obtained for spiked samples

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As(III)	As(V)	MMA	DMA	As(III)+ As(V) + MMA + DMA
20.0	100.7	91.8	97.9	88.9	100.7
30.0	87.8	103.0	100.4	113.5	91.8

The obtained recoveries percentages must be between an interval that ensures no bias and no contamination, this range was estimated using a statistical test. This test is a tool to establish an acceptable range of recoveries (the mean value is 100%) considering the number of samples and the precision in these experimental conditions [29].

Recoveries were in the range 87.8-113.5%. These values were compared with the nominal value of 100% by means of the Student's t -test, finding a t -value of 0.03 ($t(0.05,5)$ is 2.78) [33], so it may be concluded that at the 95% significance level recoveries do not differ significantly from 100%, and the trueness of the method is ensured. The acceptable interval, considering the uncertainty, was established in the range 85-115%. Recoveries higher than 100% are associated to the normal uncertainty of the methodology (also the gold standard technique has a normal uncertainty of 10% at these levels of concentration).

Since the blanks have no significant signals, there is no evidence of contamination and values within this range have no bias.

3.2. Comparison of Analytical Techniques

The proposed method was applied to analyze 40 samples as described in section 2.3.3 and the results compared with the gold standard technique HPLC-HG-ICPMS. The As levels informed correspond to the sum of As toxicologically relevant species in urine (As(III)+As(V)+MMA+DMA).

In Figure 1, shows the results obtained comparing the two techniques, and their correlation. Ideally, both methods are equal or equivalent when the equation for a linear tendency is $y = 1x$ (slope = 1, intercept = 0).

The graphic shows that the correlation was adequate, so both results were in good agreement, within the validated concentration range ($R^2=0.9445$), slope=1.0694 and

intercept= -0.6256. The two methods appear to be particularly close at the lower range of exposure.

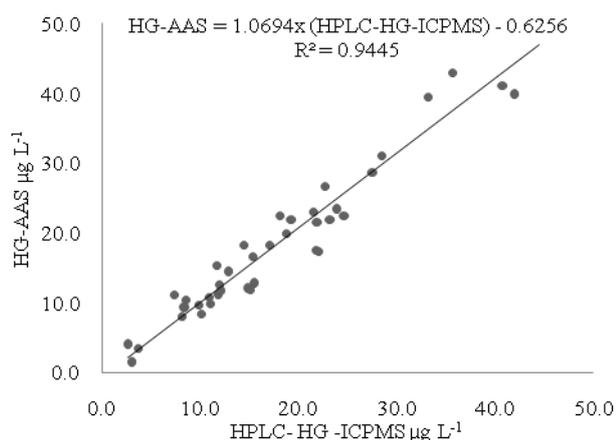


Figure 1. Comparison of the results obtained using HG-AAS vs HPLC-HG-ICPMS in urine (n=40).

The obtained regression coefficient and equation are in accordance with those reported by Lindberg *et al.* [23] and in our case; the intercept is lower than the detection limit, which means a better agreement between the compared methods.

Considering the variability of the matrix, we can conclude that the developed method is comparable to the HPLC-HG-ICPMS and adequate for screening and biomonitoring, among other purposes.

This proposed method using HG-AAS resulted accurate for this biological matrix and has proven to be an alternative for more expensive techniques as HPLC-HG-ICPMS, used for arsenic speciation in urine.

4. Conclusions

A simple and fast methodology for the determination of relevant toxic species of arsenic in urine using HG-AAS technique was developed and validated.

This methodology can be used in several applications: a) as a first approach in the assessment of general population's chronic exposure and its health impacts, b) as an advisory service to the scientific and environmental health communities, c) for future research and for systematic population surveillance and d) for biomonitoring of exposed workers.

Based on the results of this study, protocols for analysis can be established using an economic analytical tool for the determination of inorganic arsenic biomarker.

These protocols are necessary for health prevention in arsenic occupationally exposed workers, for biomonitoring arsenic environmentally exposed general population and for clinical diagnosis, medical controls and risk assessment not only in Uruguay but also in other countries.

The developed method can be used to provide baseline arsenic urine levels for physicians and public health officials to determine whether people have been exposed to higher levels of arsenic than are found in the general population. This data can also help scientists to plan and conduct research on exposure and health effects in developing countries that do not have the gold standard techniques available.

In light of the current knowledge on the toxicity of arsenic species, the proposed method has significant advantages over the determination of total arsenic which included both inorganic and organic arsenic species and it is a very good alternative analytical option for the determination of relevant toxicological As species.

Therefore, this newly method has clear applications in Uruguay and other countries in the region, as well as other low-income countries.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Grant ANII; FMV_3_2013_1_100439), PEDECIBA - Química, UdelaR - Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) and National Institute of Health (NIH ES019949, PI: Kordas) for their financial support, and also Dr. Elena Queirolo and Mónica Daleiro from the Catholic University of Uruguay.

References

- [1] Momoyo Sakuma, A, Mello De Capitani, E. and Tiglea, Pin, *Metais: Gerenciamento da Toxicidade*, Atheneu Intertox, San Pablo, Brazil, 2003.
- [2] Akter, K.F., Owens, G., Davey, D.E. and Naidu, R., "Arsenic speciation and toxicity in biological systems", *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 184, 97-149, 2005.
- [3] *ATSDR, Arsenic Toxicological Profile*, 2007. [Online] Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf> [Accessed June 11, 2015].
- [4] Mañay, N. *Arsénico y Cadmio*. In *Toxicología ambiental y ocupacional*. Rojas, M. M. (Ed.) Editorial Universidad de Rosario; Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Bogotá, 2013, 257.
- [5] WHO, *Arsenic in drinking water*, 2001. [Online] Available: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic/en/ [Accessed June 11, 2015].
- [6] Smedley, P. and Kinniburgh, D., *Essentials of Medical Geology, Impacts of the Natural Environment on Public Health*, edited by Sellinus, O., Alloway, B., Centeno, J., Finkelman, R., Fuge, R., Lindh, U. and Smedley, P., Elsevier Academic Press, Burlington, USA, 2005.
- [7] Centeno, J.A., Tseng, C.H., Van der Voet, G.B. and Finkelman, R.B., "Global Impacts of Geogenic Arsenic: A Medical Geology Research Case", *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(1), 78-81, February 2007.
- [8] Castro de Esparza, M.L., "Arsénico en el agua de bebida de América Latina y su efecto en la salud pública.", *International Congress Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America*, Mexico City, CEPIS/OPS, Hojas de divulgación técnica, (95), 1-8, Dec. 2004. [Online] Available: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/cd51/arsenico-agua.pdf> [Accessed June 11, 2015].
- [9] Mañay, N., Pistón, M., Goso, C. "Arsenic environmental and health issues in Uruguay: A multidisciplinary approach. In: One Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914-2014)" in *International, 5th International Congress on Arsenic in the Environment (As 2014)*, CRC Press Taylor and Francis Group, 145-153.
- [10] Tseng, C.H., "A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(3), 338-350, March 2009.
- [11] Ng, J.C., "Environmental Contamination of Arsenic and its Toxicological Impact on Humans", *Environmental Chemistry*, 2 (3), 146-160, 2005.
- [12] Kales, S.N., Huyck, K.L. and Goldman, R.H., "Elevated urine arsenic: Un-specified results lead to unnecessary concern and further evaluations", *Journal of Analytical Toxicology*, 30 (2), 80-85, March 2006.

- [13] ATSDR, *Agency for toxic substances and disease registry, Case Studies in Environmental Medicine*. [Online] Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/arsenic/docs/arsenic.pdf>. [Accessed June 11, 2015].
- [14] ACGIH, *TLVs and BEIs*, Signature Publications, Cincinnati, USA, 2010.
- [15] CDC, *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*, Centers for Disease Control and Prevention, 2009. [Online] Available: <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf> [Accessed June 11, 2015].
- [16] Welz, B. and Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Willey-VCH, Weinheim, 1999.
- [17] Zheng, J., Kosmus, W., Pichler-Semmelrock, F. and Köck, M., "Arsenic speciation in human urine reference materials using high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 13(3), 150-156, 1999.
- [18] Brima, E.I., Haris, P.I., Jenkins, R.O., Polya, D.A., Gault, A.G. and Harrington, C.F., "Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216 (1), 122-130, June 2006.
- [19] Rivera-Núñez, Z., Meliker, J.R., Linder, A.M. and Nriagu, J.O. "Reliability of spot urine samples in assessing arsenic exposure", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213 (4), 259-264, July 2010.
- [20] Michon, J., Deluchat, V., Al Shukry, R., Dagot, C. and Bollinger, J.C., "Optimization of a GFAAS method for determination of total inorganic arsenic in drinking water", *Talanta* 71(1), 479-485, January 2007.
- [21] Dedina, J. and Tsalev, D.L., *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, Willey, Chichester, 1995.
- [22] Pistón, M., Silva, J., Perez-Zambra, R., Dol, I. and Knochen, M., "Automated method for the determination of total arsenic and selenium in natural and drinking water by HG-AAS", *Environmental Geochemistry and Health*, 34(2), 273-278, April 2012.
- [23] Lindberg, A., Goessler, W., Grandér, M., Nermell, B., Vahter, M. "Evaluation of the three most commonly used analytical methods for determination of inorganic arsenic and its metabolites in urine", *Toxicology Letters*, 168, 310-318, November 2006.
- [24] Rivera-Núñez, Z., Meliker, J. R., Linder, A. M., Nriagua, J. O. "Reliability of spot urine samples in assessing arsenic exposure", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213 259-264, March 2010.
- [25] Guo, T., Maasner, J., Tsalev, D. "Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, 349 (1-3), 313-318, August 1997.
- [26] Le, X.C., Cullen, W., Reimer, K. "Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absorption spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, 285 (3), 277-285, January 1994.
- [27] Carrero, P., Malavé, A., Burguera, J., Burguera, M., Rondón, C., "Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: Investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines", *Analytica Chimica Acta*, 438 (1-2), 195-204, July 2001.
- [28] Navoni, J.A., Olivera, N. M., Villaamil, E. C., "Cuantificación de arsénico por inyección en flujo-generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA) previa derivatización con L-cisteína. Validación y comparación intermetodológica utilizando dos técnicas de referencia", *Acta Toxicológica Argentina* 18(2), 48-54, December 2009.
- [29] Magnusson, B., Örnemark, U. (eds.) "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics", (2nd ed.) [Online] Available: <http://www.eurachem.org> [Accessed June 24, 2015].
- [30] Aditi, R., Queirolo, E., Peregalli F., Mañay, N., Martínez, G., Kordas, K. "Association of blood lead levels with urinary F2-8 α isoprostane and 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine concentrations in first-grade Uruguayan children", *Environmental Research* 140, 127-135, July 2015.
- [31] Gardner, R., J. Hamadani, M. Grandér, F. Tofail, B. Nermell, B. Palm, M. Kippler and M. Vahter, "Persistent exposure to arsenic via drinking water in rural Bangladesh despite major mitigation efforts." *Am J Public Health*, 101(1), 333-338, December 2011.
- [32] Li, L., E. C. Ekstrom, W. Goessler, B. Lonnerdal, B. Nermell, M. Yunus, A. Rahman, S. El Arifeen, L. A. Persson and M. Vahter, "Nutritional status has marginal influence on the metabolism of inorganic arsenic in pregnant Bangladeshi women." *Environ Health Perspect* 116(3), 315-321, March 2008.
- [33] Miller, J. N. & Miller, J.C. (1993). "Estadística para Química Analítica". (2nd ed.), Addison-Wesley Iberoamerican S.A. Wilmington, 1993.
- [34] The German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS). For Analyses in Biological Materials [Online] Available: <http://www.g-equas.de/info.htm> [Accessed June 24, 2015].

Avances en la optimización de un método rápido de *screening* de especies toxicológicamente relevantes de As y As total en orina mediante HG-AAS

Cristina Alvarez^a, Mariela Pistón^b, Giovanna Clavijo^a, Fiorella Laquinta^a, Valery Bühl^b, Nelly Mañay^a
nmanoy@fq.edu.uy

^aCátedra de Toxicología e Higiene Ambiental, Facultad de Química.

^bCátedra de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

La exposición a arsénico (As) se produce como resultado de la inhalación de polvo y los humos en el lugar de trabajo y/o la ingestión de agua contaminada con arsénico y alimentos. Las especies de arsénico inorgánico (iAs) son las principalmente tóxicas y cancerígenas, con los efectos más graves observados en los seres humanos, por lo que la especiación de arsénico urinario proporciona información esencial para el control biológico de exposición y evaluación del riesgo. En Uruguay, la exposición laboral al As, está siendo controlada recientemente, para evaluar sistemáticamente los riesgos de la salud de los trabajadores. Como consecuencia, existe una necesidad de desarrollar herramientas de análisis para evaluar los niveles de As total y su especiación en la orina, ya que se adopta la determinación de iAs junto a sus metabolitos metilados en orina (MMA y DMA) como indicador biológico para diferenciarlo del As proveniente de la dieta (As-Bet). La técnica de ICP-MS no está aún disponible en Uruguay, por lo que se propone desarrollar y optimizar un método simple y rápido de *screening* para evaluar As total e iAs en orina mediante detección con HG-AAS. Para la determinación de As total se propone tratar la muestra con $K_2S_2O_8$ y H_2SO_4 , calentando a ebullición lenta hasta que el volumen se reduzca a la mitad; a continuación se realiza una reducción del As con KI/HCl. Luego de centrifugar, el sobrenadante se destina a las mediciones (se agregan 3 gotas de octanol como antiespumante). Las determinaciones analíticas de As se realizan utilizando un sistema comercial en flujo para la generación de hidruros (Varian VGA77/Varian 55B) con detección mediante espectrometría de absorción atómica con flama. Para evaluar la eficiencia del método para la determinación de As total, se realizaron adiciones a las muestras de orina del metabolito metilado que se encuentra como mayoritario en orina (DMA) obteniéndose recuperaciones próximas al 70% (se evaluaron calibraciones con patrones de DMA acuosos y en orina). Este resultado es muy promisorio para continuar en el camino de la optimización de las condiciones experimentales del método propuesto para la determinación de As total en forma veraz (aún deben evaluarse MMA y As-Bet). La veracidad para la determinación de iAs se evaluó con adiciones de iAs (+5) e iAs (+3) sobre muestras de orina y calibración directa con patrones de iAs (+5) e iAs (+3) obteniéndose recuperaciones en el rango 90-110% para ambas especies (realizando la etapa de reducción a muestras y patrones con HCl y KI para el caso de As (+5)). El límite de detección obtenido fue $0.31 \mu\text{gL}^{-1}$, la precisión expresada como RSD < 5%. Los valores máximos admitidos de As son: < $35 \mu\text{gL}^{-1}$ para trabajadores expuestos (ACGIH-BE1[®]) y $10\text{-}20 \mu\text{gL}^{-1}$ para la población en general (ATSDR, As Tox-Profile), no especificándose si se trata de As total o iAs. Los resultados preliminares indican que el método propuesto para determinación de As total e iAs en muestras de orina sería adecuado como método de *screening* para evaluar la exposición según la normativa internacional y nacional. Se continúa trabajando en la validación completa de este método.

The 5th International Conference on Medical Geology

And

The 2nd Symposium on Advances in Geospatial Technologies for Health

Hosted by

The Geological Society of America's Geology and Health Division

Sponsored by

The International Medical Geology Association

With

The United States Geological Survey

The University of Texas at Dallas

U.S. National Science Foundation

Abstracts



Abstracts to be presented at the meeting of the
5th International Conference on Medical Geology
Arlington, Virginia, USA
25–29 August 2013



1-8 **BTH 8** Mañay, Nelly

DEVELOPMENT OF A SIMPLE METHOD FOR SCREENING TOXICOLOGICALLY RELEVANT ARSENIC (AS) SPECIES IN WATER AND URINE BY HG-AAS FOR ROUTINE ANALYSIS IN URUGUAY

MAÑAY, Nelly¹, ALVAREZ, Cristina¹, PISTÓN, Mariela², BUHL, Valery², and MARTINEZ, Gabriela¹, (1) Specialized Center of Chemical Toxicology (CEQUIMTOX), Faculty of Chemistry, University of the Republic, Gral. Flores 2124, Montevideo, 11800, Uruguay, nmanay@fq.edu.uy, (2) Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Republic, Gral. Flores 2124, Montevideo, 11800, Uruguay

Recently, environmental and occupational exposure to As is being controlled in Uruguay. Total As in drinking water supplied for general population is being periodically assessed, and exposure workers biomonitoring is mandatory. Consequently, there is a need to develop analytical tools evaluate levels of total As and its toxicologically relevant species in drinking water and urine.

The ICP-MS technique is not yet available in Uruguay for routine determinations, so the aim was to develop and optimize simple and fast analytical methods to determine total As and iAs species in water and to determine iAs as well as its methylated metabolites (MMA and DMA) in urine as a biomarker, to differentiate from dietary As (As-Bet) by HG-AAS detection, for routine applications.

After optimization of sample treatment (digestion with $K_2S_2O_8/H_2SO_4$ and reduction with KI), analytical determinations were performed using a commercial system for flow hydride generation (Varian VGA77/Varian 55B) and flame atomic absorption spectrometry detection. Recovery (9–115%) was evaluated by spiking samples with As(III) and As(V). The detection limit obtained was $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$, the precision is <5% expressed as RSD. The quantification limit was $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$.

The obtained results are adequate to drinking water limits of WHO < $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and to urine, considering the international recommendations and Uruguayan regulations: As-Urine < $35 \mu\text{g L}^{-1}$ for occupational exposed workers (ACGIH-BE10) and $10\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$ for general population according (ATSDR, As Tox-Profile).

Analytical methods are being also optimized for the separation of urinary species, using high performance liquid chromatography, coupled with flow atomic hydride generation and atomic absorption spectrophotometry (HPLC–HG–AAS)

In sum, simple methodologies for routine monitoring of toxicologically relevant species of As in drinking water (iAs, As(III), As(V)) and in urine (iAs+DMA+MMA) were optimized using hydride generation flame atomic absorption spectrometry (HG-AAS) and are suitable for environmental epidemiological studies, biomonitoring, and risk assessment in Uruguay.



**Memorias
XIV Congreso
Latinoamericano
de Toxicología
Clínica y
Seguridad
Química**

Octubre 25

2013

ALATOX

Asociación
Latinoamericana de
Toxicología

Editor:
Dr. Jorge Luis Gaibor Carpio

Memorias

XIV Congreso

Latinoamericano

Toxicología Clínica y

Seguridad Química



Editor: Dr. Jorge Luis Gaibor Carpio

Editor

Dr. Jorge Luis Gaibor Carpio
Pediatra-Toxicólogo

Vicepresidente de la Asociación Latinoamericana de
Toxicología, ALATOX.
Guayaquil - Ecuador

ISBN: 978-9942-13-450-9

Aval Académico del XIV Congreso Latinoamericano de
Toxicología Clínica y Seguridad Química.

Universidad Católica Santiago de Guayaquil
Ministerio de Salud Pública del Ecuador
Guayaquil, 2013

5.- DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA TAMIZACIÓN DE ESPECIES TOXICOLÓGICAMENTE RELEVANTES DE ARSÉNICO EN AGUA Y ORINA

AUTOR(ES): Álvarez Cristina, Pistón Mariela, Bühl Valery, Martínez Gabriela, Mañay Nelly
Facultad de Química, Universidad de la República (U de la R), Montevideo - Uruguay
calvarez@fq.edu.uy

OBJETIVO

La exposición ambiental y ocupacional a arsénico (As) está siendo actualmente controlada en Uruguay. El As que se suministra a la población general en el agua potable se está evaluando periódicamente, y el control de los trabajadores expuestos es obligatorio. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar herramientas analíticas para evaluar en agua potable y orina los niveles de As total y sus especies toxicológicamente relevantes.

Una de las técnicas analíticas más utilizadas (ICP-MS) no está disponible en Uruguay. El objetivo fue desarrollar y optimizar métodos analíticos sencillos y rápidos para determinar As (III) y As (V) en agua y As (III), As (V), así como los metabolitos metilados mayoritarios (MMA y DMA) en la orina como biomarcadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la metodología se realizó sobre una mezcla de muestras de orina (primera de la mañana) de voluntarios, trabajadores de nuestra institución, no expuestos laboralmente. Las muestras de agua utilizadas provienen de la red de abastecimiento de agua potable de nuestra ciudad. Después optimizar el tratamiento de la muestra (digestión con $K_2S_2O_8/H_2SO_4$ y reducción con KI/HCl), se realizaron las determinaciones analíticas mediante detección con espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS), utilizando un equipo Varian VGA77/Varian 55B.

RESULTADOS

Para la orina, el límite de detección obtenido fue de $0,3 \mu gL^{-1}$ (3s), el límite de cuantificación fue de $1,0 \mu gL^{-1}$ (10s) y la precisión fue mejor que 5% expresada como RSD. La veracidad se evaluó mediante la adición de As (III), As (V) y DMA a las muestras, obteniéndose un intervalo de recuperaciones entre 90 y 115% para As inorgánico y 70% para DMA.

En el caso del agua, las cifras de mérito obtenidas fueron: límite de detección $0,08 \mu gL^{-1}$ (3s), límite de cuantificación $0,26 \mu gL^{-1}$ (10s), precisión mejor que 4% expresada como RSD, veracidad 95% calculada a partir de un ensayo interlaboratorios.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son adecuados para el control de agua de consumo humano, considerando la recomendación de la OMS ($<10 \mu gL^{-1}$) [1]. Lo mismo sucede en el caso de la orina, teniendo en cuenta las recomendaciones internacionales y la reglamentación nacional: As orina

$<35 \mu\text{gL}^{-1}$ para los trabajadores expuestos ocupacionalmente [2] y $10\text{-}20 \mu\text{gL}^{-1}$ para la población en general [3].

Se está optimizando además la separación de especies urinarias utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), para posteriormente acoplar a HG-AAS (HPLC-HG-AAS).

En conclusión, las metodologías de tamización para el control rutinario de las especies toxicológicamente relevantes de As en el agua potable y en la orina se optimizaron mediante los métodos mencionados (separación y cuantificación de las especies) y son adecuados para los estudios epidemiológicos, ambientales, control biológico, y la evaluación del riesgo.

REFERENCIAS

1) Organización Mundial de la Salud (OMS). *Arsenic In Drinking Water*. <https://apps.who.int/inf-fs/en/fact210.html>. Acceso: Agosto 2013.

2) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). *TLVs and BEIs - Based on the Documentations for Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents: Biological Exposure Indices* (2012)

3) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Arsenic*. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>. Acceso: Agosto 2013.

Bóhl, Valery⁽¹⁾; Álvarez, Cristina⁽²⁾; Pistón, Mariela⁽²⁾; Martínez, Gabriela⁽²⁾; Mañay, Nelly⁽²⁾

⁽¹⁾ Química Analítica
⁽²⁾ Centro Especializado de Toxicología Química (CEQUIMTOX)
 Departamento Estrella Campos
 Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar)
 Montevideo, Uruguay
 vbh@fq.edu.uy

INTRODUCCIÓN

La exposición ambiental y ocupacional a arsénico (As) está siendo actualmente controlada en Uruguay. El As que se suministra a la población general en el agua potable se está evaluando periódicamente, y el control de los trabajadores expuestos es obligatorio. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar herramientas analíticas para evaluar en agua potable y orina los niveles de As total y sus especies toxicológicamente relevantes.

Una de las técnicas analíticas más utilizadas (ICP-MS) no está disponible en Uruguay. El objetivo fue desarrollar y optimizar métodos analíticos sencillos y rápidos para determinar As (III) y As (V) en agua y As (III), As (V), así como los metabolitos metilados mayoritarios (MMA y DMA) en la orina como biomarcadores.

OBJETIVOS

- 1) Desarrollo y optimización de un método simple para la determinación de As total y iAs en agua y el tamizaje de las especies toxicológicamente relevantes en orina (MMA and DMA) con detección mediante HG-AAS para análisis de rutina.
- 2) Separación de las especies toxicológicamente relevantes: iAs - MMA - DMA en orina mediante técnicas de HPLC-DAD para acoplar posteriormente a técnicas con límites de detección adecuados según las reglamentaciones vigentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

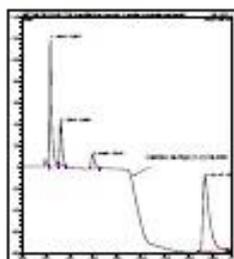
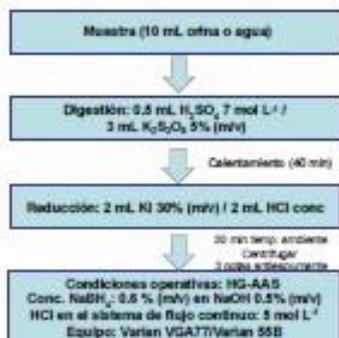
El desarrollo de la metodología se realizó sobre una mezcla de muestras de orina (primera de la mañana) de voluntarios, trabajadores de nuestra institución, no expuestos laboralmente. Las muestras de agua utilizadas provienen de la red de abastecimiento de agua potable de nuestra ciudad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la orina, el límite de detección obtenido fue de $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (3s), el límite de cuantificación fue de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ (10s) y la precisión fue mejor que 5% (RSD%).

La veracidad se evaluó mediante la adición de As (III), As (V) y DMA a las muestras, obteniéndose un intervalo de recuperaciones entre 90 y 115% para iAs y 70% para DMA.

En el caso del agua, las cifras de mérito obtenidas fueron: límite de detección $0.08 \mu\text{g L}^{-1}$ (3s), límite de cuantificación $0.26 \mu\text{g L}^{-1}$ (10s), precisión mejor que 4% (RSD%), veracidad 95% evaluada a partir de un ensayo interlaboratorios.



Para la separación de As (III), As (V), DMA y MMA se utilizó un equipo HPLC Dionex Ultimate 3000 con detector UV/visible ($\lambda=194\text{nm}$), columna de intercambio iónico Dionex IonPack® AS22, 4x250 mm., Fase Móvil: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{H}_2\text{O}$, pH=5.8

Los resultados obtenidos son adecuados para el control de agua de consumo humano, considerando la recomendación de la OMS ($<10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Lo mismo sucede en el caso de la orina, teniendo en cuenta las recomendaciones internacionales y la reglamentación nacional: As orina $<35 \mu\text{g L}^{-1}$ para los trabajadores expuestos ocupacionalmente y $10\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$ para la población en general.

CONCLUSIÓN

Las metodologías de tamizaje para el control rutinario de las especies toxicológicamente relevantes de As en el agua potable y en la orina se optimizaron y las cifras de mérito indican que son adecuadas para los estudios epidemiológicos, ambientales, control biológico, y la evaluación del riesgo.

Agradecimientos: FEDECIBA-Química

Arsenic environmental and toxicological issues in Uruguay: A Medical Geology Approach

N. Mañay¹, M. Pistón², C. Álvarez¹, V. Bühl², C. Goso³

¹Cátedra de Toxicología, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República (UDELAR), Montevideo, Uruguay

²Química Analítica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República (UDELAR), Montevideo, Uruguay

³Departamento de Evolución de Cuencas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UDELAR), Montevideo, Uruguay

INTRODUCTION

Medical Geology is a developing environmental-health discipline in Uruguay since 2005, and arsenic (As) exposure is one of its major subjects of interest.

Geogenic As in groundwater has been recently studied in different aquifers of the country. In Uruguay the As maximum acceptable limit value for the official water provider is 20 µg/L.

On the other hand, As exposure at the workplace is now being taken into account to systematically assess workers' health risks.

The international recommendations and Uruguayan regulations for urine are: As-Urine < 35 µg/L for occupationally exposed workers and 10-20 µg/L for general population, expressed as inorganic As plus its methylated urine species.

Therefore, there is a special need for conducting research studies on arsenic and to develop available analytical tools to assess As levels and its speciation in water and in urine of general population and exposed workers for law-abiding.

AIMS

A review of several of the ongoing research studies that have been developed focusing on As geological, analytical and toxicological aspects in Uruguay is presented.

As analytical and speciation methodologies

- An analytical method to determine total As and iAs species in water as well as the methylated metabolites (MMA and DMA) in urine using Atomic Absorption Spectrometry with Hydride Generation (HG-AAS) was validated.

- The separation of the toxicologically relevant species iAs - MMA - DMA, was performed by means of HPLC-DAD to find the optimal operating conditions and thereafter acoplate with HG-AAS.

- To evaluate the efficiency of the method, standard additions were made in urine, and the recoveries obtained were close to 70%, which was considered adequate for a screening methodology.

- For urine, the detection limit obtained was 0.3 µg/L, with a precision <5% expressed as RSD. The quantification limit was 1.0 µg/L.

Presence of geogenic As in groundwater

- Uruguayan groundwater uses are mainly agriculture, drinking, domestic and thermal touristic.

- The reviewed studies were performed in sedimentary aquifers sampled from 2007 on. The hydrochemical characterization (major and trace elements) was carried out by both ICP-OES and ICP-MS.

- The average concentration of total As in the Raigón Aquifer System was 14.1 µg/L (max. 24.19 µg/L). Out of 37 samples, only six showed concentrations below 10 µg/L of As. The rocks in the south of the country were mainly composed of granitic and gneissic suites which do not contain arsenic. A few sediments were analyzed in this region, and several anomalous As values out of the expected average (> 7 mg/kg), were found.

- This allow us to postulate a tentative anthropogenic origin. Probably, the most significant anthropogenic source of arsenic in this region is from cumulative applications of arsenical pesticides and herbicides used for decades by farmers.

Unexposed and exposed population

- Urine samples from workers presumably exposed to As in different worksites, were periodically analyzed for toxicologically relevant species in order to assess health risks according to national regulations.

- About 100 samples from non-exposed population were analyzed.

- None of the samples analyzed showed levels above those established by regulations (As-Urine < 35 µg/L).

- The average of the results of biological monitoring of the unexposed population was 3.1 µg/L (range 0.3 - 18.8 µg/L).



Acknowledgements

To DINACYT/PDT - MEC (Uruguay), to Comisión Sectorial de Investigación Científica UDELAR (Uruguay), to Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Spain) and to National Institute of Environmental Health Science (NIEHS, USA).

CONCLUSIONS

- The reviewed studies and those that are being conducted show the current status of the problem of As in Uruguay which still have not been addressed as a priority health and environmental issue in the country.

- Therefore, it is important to continue developing Medical Geology with systematic studies to assess population's chronic exposure to inorganic As through drinking water, food and workplaces, focusing on children health impacts at As low levels.

- This approach in developing As research has been very successful in creating scopes of discussion among researchers and professionals from geosciences and biosciences, to study such a relevant environmental and health topic in Uruguay.

CUARTO ENCUENTRO NACIONAL DE QUÍMICA

4-6 de noviembre de 2015

Complejo Cultural Torre de las Telecomunicaciones de ANTEL

Libro de Resúmenes

Financian:



Auspician:



El Encuentro Nacional de Química, organizado bianualmente desde 2009 por PEDECIBA Química y con el apoyo de la Facultad de Química, es la reunión académica más importante y amplia de la disciplina en el Uruguay.

Este Cuarto encuentro ha consolidado la importante convocatoria del evento, con más de 370 participantes inscriptos distribuidos en forma proporcional entre investigadores, estudiantes de posgrado y estudiantes de grado.

Se expondrán en forma oral 30 presentaciones: 3 Conferencias Invitadas de investigadores extranjeros, 11 Conferencias Invitadas de investigadores nacionales y 16 Presentaciones invitadas de estudiantes de posgrado avanzados de PEDECIBA Química, junto a más de 200 pósters. Los trabajos de investigación presentados abarcan todas las áreas de la química incluyendo investigación fundamental y aplicada, educación y difusión de la disciplina.

Por primera vez además, el ENAQUI ha convocado una importante concurrencia de participantes extranjeros provenientes de Brasil, encaminándose a convertirse en un Encuentro de alcance Regional.

Deseamos desde ya que este Encuentro resulte de provecho a todos los participantes y que sirva de motivación para que los futuros encuentros continúen superándose en número y calidad de presentaciones y participantes del país, la región y porqué no, de todo el mundo hispanohablante.

En nombre del Comité Organizador y Científico, el PEDECIBA Química y la Facultad de Química les damos una muy calurosa bienvenida.

CUARTO ENCUENTRO NACIONAL DE QUÍMICA

4-6 de noviembre de 2015

Complejo Cultural Torre de las Telecomunicaciones de ANTEL

Comité Organizador y Científico:

Dra. Laura Franco Fraguas, Presidente

Dra. Alicia Cuevas

Dr. Eduardo Dellacassa

Dra. Daniela Gamenara

Lic. Larissa Gioia

Dra. Paula González

Dra. Alejandra Rodríguez

Dr. Leopoldo Suescun

Desarrollo y validación de metodologías analíticas acopladas y no acopladas para especiación de arsénico en matrices ambientales y biológicas

Valery Bühl¹, Cristina Álvarez², Mariela Pistón¹, María H. Torre³, Nelly Mañay²

1- Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 2- CEQUIMTOX, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 3- Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

vbuhl@fq.edu.uy

El Arsénico (As) puede estar presente en un amplio rango de concentraciones en el aire, agua, suelos, vegetales y animales, en distintos estados de oxidación (-III, 0, III, V) y en formas inorgánicas y orgánicas. Su presencia en el ambiente puede provenir tanto de fuentes naturales como de actividades antropogénicas (minería, fundición de metales, o de su uso en fórmulas de pesticidas y conservantes de la madera). En Uruguay es obligatorio el control biológico (biomonitoreo) de trabajadores expuestos a As mediante el análisis de orina. Debido a la diferente toxicidad que presentan las especies de As, se requiere desarrollar herramientas analíticas tanto para evaluar los niveles de As total como sus especies toxicológicamente relevantes: As(III), As(V), DMA (ácido dimetilarsínico) y MMA (ácido monometilarsónico).

Una de las técnicas analíticas recomendadas para especiación de As [1] utiliza un equipo de cromatografía líquida de alta presión acoplado a espectrometría atómica con plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (HPLC-ICPMS). Esta tecnología, altamente costosa, no está disponible en Uruguay para análisis de rutina, por lo que el objetivo es desarrollar y optimizar métodos analíticos sencillos y rápidos para determinar las especies mencionadas en agua y orina.

Se realizó la validación de metodologías no acopladas para determinar As (III) y As (V) en agua y As (III), As (V), MMA y DMA en orina mediante espectrometría atómica con generación de hidruros (HG-AAS) [2]. Las cifras de mérito obtenidas fueron: límite de detección 0,08 μgL^{-1} para agua y 1,5 μgL^{-1} para orina (3s), precisión mejor que 4% para agua y 12 % para orina (RSD), veracidad 95% para agua y 100,7% para orina, calculada a partir de ensayos interlaboratorios.

Los resultados obtenidos para muestras de agua indican que este método es adecuado para el control de las mismas, teniendo en cuenta que el valor máximo recomendado por la OMS es de $<10 \mu\text{gL}^{-1}$. En el caso de la orina, los resultados obtenidos también muestran que el método elegido es adecuado para las determinaciones de las especies toxicológicamente relevantes de As, considerando que las recomendaciones internacionales y la reglamentación uruguaya indican que la suma de especies inorgánicas de As en orina deber ser menor a 35 μgL^{-1} para los trabajadores expuestos ocupacionalmente y 10-20 μgL^{-1} para la población en general. Por otra parte se está trabajando en la separación de las especies mediante HPLC. Se han optimizado las condiciones de separación y se realizará un acople HPLC-HG-AAS utilizando una interfase construida en el laboratorio de la Facultad de Química.

Al momento, se cuenta con metodologías no acopladas validadas para determinación de las especies toxicológicamente relevantes de As, lo que combinado con la separación cromatográfica constituirá una herramienta analítica acoplada para el análisis de aguas y orina de la población afectada disponible en el país para evaluación toxicológica de As.

Agradecimientos: ANII- Fondo María Viñas FMV_3_2013_1_100439; PEDECIBA-Química.

[1] Lindberg, A.; Goessler, W.; Grandér, M. et al., *Toxicol Lett*, 2006,168, 310–318. [2] Brima, E.I.; Haris, P.I.; Jenkins, R.O. et al., *Toxicol Appl Pharm*, 2006, 1, 122-130.



Libro de resúmenes del
3er Congreso Uruguayo de Química Analítica
6 al 9 de octubre de 2014
Montevideo – Uruguay

Octubre 2014, Montevideo, Uruguay

ISBN: 978-9974-0-1136-6

Editores:

C. Alvarez, I. Dol, M. Pistón, I.Viera

O TOX 01

Determinación de arsénico en orina: Desarrollo de una metodología de *screening* para el análisis de rutina mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica (ET-AAS)

Bühl, Valery²; Alvarez, Cristina¹; Pistón, Mariela²; Mañay, Nelly¹

¹ CEQUIMTOX. Toxicología, Departamento Estrella Campos. Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
vbuhl@fq.edu.uy

En Uruguay el biomonitorio de trabajadores expuestos a arsénico (As) mediante su análisis en orina es obligatorio para el control de exposición. Debido a la diferente toxicidad que presentan las especies arsenicales, es necesario desarrollar herramientas analíticas locales, para evaluar los niveles de As total y sus especies toxicológicamente relevantes en esta matriz. Una de las técnicas analíticas recomendadas para especiación (HPLC-ICP-MS) no está disponible en Uruguay para estos fines, por lo que el objetivo fue desarrollar y optimizar métodos analíticos sencillos y rápidos para determinar As (III), As (V) y los metabolitos metilados mayoritarios (MMA y DMA) en la orina, mediante detección con espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica (ET-AAS). El consumo de alimentos marinos es poco frecuente en Uruguay por lo que la contribución de As no tóxico, proveniente del pescado (arsenobetaina), en la orina humana, puede no representar un valor significativo.

El análisis del perfil urinario del As puede proporcionar un índice de la capacidad de metilación de los individuos expuestos. Los estudios que actualmente evalúan la asociación entre los perfiles urinarios y enfermedades humanas miden principalmente el arsenato y arsenito inorgánico así como los dos metabolitos metilados mayoritarios en orina, el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsónico (DMA) menos tóxico.

Las determinaciones analíticas se realizaron con un equipo Thermo iCE 3000 Series, con corrección de fondo Zeeman. Se evaluó la efectividad de tres modificadores de matriz: Pd, Ni y Pd-K₂S₂O₈ obteniéndose los mejores resultados con este último, preparado mezclando partes iguales de una solución de Pd 6,0 gL⁻¹ en ácido nítrico (15 % v:v) y de una solución acuosa de persulfato de potasio 20 gL⁻¹. La estrategia en ese caso consistió en combinar la digestión "in situ" con K₂S₂O₈ de la orina diluida (1:5) y el uso de Pd como modificador de matriz clásico [1]. Las condiciones operativas se presentan en la siguiente tabla:

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Rampa (°C/s)	Flujo gas (L min ⁻¹)
100	10	10	0,2
200	30	35	0,2
1200	15	20	0,2
1800	4	0	Apagado
1900	3	0	0,2

Las muestras de orina utilizadas fueron diluidas 1:5 con ácido nítrico 1% v:v y Tritón 1% m:v.

El límite de detección obtenido fue de 0,6 µgL⁻¹, el límite de cuantificación fue de 2,0 µgL⁻¹ y la precisión fue mejor que 6% expresada como RSD. La metodología presenta un rango lineal hasta 100 µgL⁻¹. Se adicionaron muestras de orina de población no expuesta con las diferentes especies toxicológicamente relevantes obteniéndose recuperaciones en el rango de 80 a 130 %.

Los resultados obtenidos son adecuados para las determinaciones de las especies toxicológicamente relevantes de As en orina, ya que en base a las recomendaciones internacionales y reglamentación

uruguaya: As orina $<35 \mu\text{gL}^{-1}$ para los trabajadores expuestos ocupacionalmente [2] y $10\text{-}20 \mu\text{gL}^{-1}$ para la población en general [3].

[1] Nixon DE, Mussmann, GV, Eckdahl, SJ, Moyer, TP. Total arsenic in urine: Palladium-persulfate vs nickel as a matrix modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry"; *Clin Chem*; 1991; 37; 1575-1579.

[2] American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), TLVs© and BEIs©, 2011.

[3] American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Ed, 1998, 3114 A.

Agradecimientos: Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Proyecto Fondo María Viñas, FMV_3_2013_1_100439



Libro de resúmenes del
4º Congreso Uruguayo de Química Analítica
25 al 29 de setiembre de 2016
Montevideo – Uruguay

Setiembre 2016, Montevideo, Uruguay

ISBN: 978-9974-0-1404-6

Editores:

C. Álvarez, I. Dol, M. Pistón, I.Viera

O TOX 03

Biomonitoreo de trabajadores expuestos: desarrollo de un método para la evaluación de especies de arsénico urinario

Bühl, Valery¹; Álvarez, Cristina²; Pistón, Mariela¹; Torre, María H.³; Mañay, Nelly²

1- Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

2- CEQUIMTOX, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

3-Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

En Uruguay existen más de 25 plantas de impregnación de madera con CCA, una mezcla de óxidos de cromo (Cr), cobre (Cu) y arsénico (As) constituida por 28,5% de CrO₃, 11,1% de CuO y 20,4% de As₂O₅ en disolución al 60%; este producto está registrado como pesticida. Se importan anualmente en nuestro país alrededor de 500 toneladas de CCA. El proceso de impregnación, se realiza en general, mediante un sistema cerrado de autoclavado.

El control biológico de los trabajadores expuestos a As es obligatorio en Uruguay. La vía de eliminación del As es a través de sus metabolitos en orina. El As-I o arsénico inorgánico (+3 o +5) se biotransforma metilándose y eliminándose mayoritariamente como arsenito, arsenato, ácidos monometilarsónico (MMA) y dimetilarsínico (DMA). Estos metabolitos aparecen en la orina en plazos cortos luego de la exposición y decaen en pocos días luego de cesar la exposición.

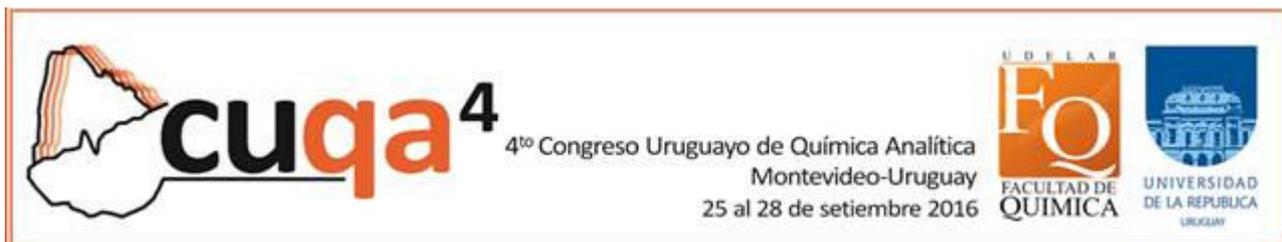
Las recomendaciones internacionales y la reglamentación uruguaya indican la determinación de la suma de metabolitos derivados del As-I en orina (As (+3), As (+5), MMA y DMA) para el biomonitoreo. Dichas especies derivadas del metabolismo del As-I, se denominan especies toxicológicamente relevantes y su valor sumado en orina, debe ser menor a 35 µg L⁻¹ para los trabajadores ocupacionalmente expuestos y se estima en 10-20 µg L⁻¹ para la población en general. El resultado refleja la exposición a As-I de los 3 a 5 días anteriores.

Se realizó el desarrollo y la validación de una metodología para determinar As (+3), As (+5), MMA y DMA en orina mediante espectrometría atómica con generación de hidruros (HG-AAS). Se trabajó con un espectrómetro Varian VGA77/Varian 55B, para la generación de hidruros se utilizó NaBH₄ 1% (m/v) en NaOH 0,5%, HCl 0,1 mol L⁻¹, L-cisteína 6% (m/v, en HCl 0,08 mol L⁻¹).

Las cifras de mérito obtenidas fueron: límite de detección 1,5 µg L⁻¹ (3s), precisión mejor que 12 % (expresada como RSD), veracidad 100,7%, evaluada a partir de ensayos interlaboratorios.

Se realizó una comparación de esta metodología validada realizando las determinaciones mediante cromatografía líquida de alta presión, emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo acoplado a detección de masas (HPLC-ICPMS) para especiación de As, se trata de un equipamiento muy costoso para nuestro medio para determinaciones rutinarias. La comparación se realizó analizando 40 muestras mediante esta técnica de referencia en el laboratorio de Karolinska Institutet, Stockholm, de Suecia y el método propuesto, obteniéndose una correlación de 0,944 hasta 50 µg L⁻¹ [1]

Los resultados obtenidos mostraron que este método es adecuado para las determinaciones de las especies toxicológicamente relevantes de As y es aplicado en muestras de orina de trabajadores expuestos a arsénico en sus diferentes puestos de trabajo, a los efectos cumplir con las recomendaciones internacionales (ACGIH [2]) en prevención de riesgos a la salud y para tomar las medidas correctivas si así se requiere.



Referencias

[1] Bühl, V., Álvarez, C., Kordas, K., Pistón, M., Mañay, N. Development of a Simple Method for the Determination of Toxicologically Relevant Species of Arsenic in Urine Using HG-AAS. Journal of Environment Pollution and Human Health. 2015; Vol. 3; No. 2; 46-51.

[2] ACGIH, 2014. Threshold limits values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH.

Agradecimientos: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII- Fondo María Viñas FMV_3_2013_1_100439); PEDECIBA- Química.

Código de la Propuesta: FMV_3_2013_1_100439

Convocatoria: Proyecto de investigación Aplicada Fondo Maria Viñas - Jóvenes Investigadores. - 2013

Título del Proyecto (Español)

Desarrollo y validación de metodologías analíticas acopladas y no acopladas para especiación de arsénico en matrices ambientales y biológicas como técnicas alternativas al HPLC-ICP-MS no disponible en Uruguay

Resumen Publicable (Español)

La exposición crónica al arsénico a través del agua es uno de los problemas sanitarios más extendidos en el mundo y afecta a más de cien millones de personas. Sus principales manifestaciones tóxicas son a nivel dermatológico, evolucionando hacia patologías más graves que pueden relacionarse a distintos tipos de cáncer en piel y en órganos internos.

La toxicidad del arsénico depende de la especie química, siendo mucho más tóxicas las especies inorgánicas generalmente presentes en el agua subterránea.

La necesidad del análisis y especiación de arsénico es crucial para conocer la calidad del agua y en el monitoreo biológico de la población, a través de la especiación del arsénico urinario a los efectos de evaluar el riesgo de la población expuesta. La determinación de arsénico en formas inorgánicas u orgánicas y aún en sus diferentes estados de oxidación, proporciona información de fundamental importancia de su toxicidad.

EVALUACIÓN DE INFORME FINAL PROYECTOS I+D

Pauta para la evaluación de Informes de Cierre de Proyectos de Investigación

Código Proyecto	FMV_3_2013_1_100439
Título del Proyecto	Desarrollo y validación de metodologías analíticas acopladas y no acopladas para especiación de arsénico en matrices ambientales y biológicas como técnicas alternativas al HPLC-ICP-MS no disponible en Uruguay
Responsable Científico	BÜHL PADIAL Valery

PARTE I. Valoración general sobre la ejecución técnica del proyecto

<p>Indicar si a su parecer el proyecto ha logrado un adecuado nivel de cumplimiento de los objetivos planteados y de los resultados y/o productos esperados.</p> <p>En caso contrario, evaluar si las justificaciones planteadas son pertinentes.</p>
<p>Sí, se ha alcanzado un buen nivel de cumplimiento de los objetivos. Sólo uno de ellos no fue completamente alcanzado y se explica que el retraso se debió a demoras en la importación e instalación de uno de los equipos que se compraron con los fondos del proyecto.</p>
<p>Resumir los logros destacados del proyecto y evaluar las contribuciones que se informan en producción bibliográfica y técnica y formación de recursos humanos en relación con la propuesta original.</p>
<p>El principal logro se centra en la aplicación de los resultados a través de servicios ofrecidos por la propia unidad de investigación de la Facultad de Química, representada en el Centro Especializado en Química Toxicológica (CEQUIMTOX). Se expresa que “la tecnología desarrollada y validada para la determinación de especies de arsénico toxicológicamente relevantes fue transferida al Sistema de Gestión de Calidad del CEQUIMTOX para su ofrecimiento de servicios de biomonitorio realizándose al día de hoy determinaciones analíticas para el control biológico obligatorio de población expuesta ocupacionalmente al arsénico”.</p> <p>La responsable del proyecto hizo avances significativos en su Tesis Doctoral. También participó un estudiante de grado.</p> <p>Del trabajo han surgido presentaciones en congresos, dos de las cuales fueron incluidas en un libro, y también una publicación.</p>

Explicitar fortalezas y debilidades del proyecto y, si corresponde, realizar sugerencias para el equipo de investigación en cuanto a aspectos a mejorar o posibles caminos a seguir, incluyendo aplicaciones productivas y/o sociales.

El proyecto parece haber avanzado de manera adecuada y, esencialmente, el tema parece concluido.

PARTE II. Proyección preliminar de aplicabilidad

El Responsable Científico ¿en qué nivel de aplicabilidad ubicó su proyecto?

No se incluyó este ítem en el formulario.

¿En términos generales acuerda Ud. con esa evaluación? Marque la opción que corresponda.

- I. Sí
- II. No
- III. Parcialmente

En caso de no estar de acuerdo total o parcialmente: ¿en qué categoría de las disponibles en el informe de cierre ubicaría Ud. al proyecto?

Si la categoría final es I, de por finalizado el módulo, muchas gracias. Si es diferente de I:
¿Entiende que la continuidad inmediata del proyecto podría generar valor social o productivo a través de la aplicación de sus resultados en algún ámbito? Marque la opción que corresponda.

- I. Sí, seguramente.
- II. Tengo algunas dudas.
- III. No. ***(Responda la siguiente pregunta, y de por finalizado el módulo, muchas gracias)***

En caso que en la pregunta anterior haya seleccionado III, especifique.

En su opinión, ¿cuál de los siguientes apoyos es más adecuado para impulsar la continuidad del proyecto en esa dirección? Marque la opción que corresponda.

“Orientación para formular un nuevo proyecto...

- I. Orientación para formular un nuevo proyecto en Instrumentos ANII de I+D
- II. ...en Instrumentos ANII de Innovación
- III. ...en Instrumentos ANII de I+i
- IV. ...en Instrumentos extra ANII
- V. Otro tipo de apoyo, específico, diseñado a medida
- VI. Ningún apoyo. Es mejor esperar

Puede sugerir el instrumento o tipo de apoyo que considere más adecuado u otras sugerencias.

Mi impresión es que el tema está concluido y que los resultados ya están siendo aplicados.