

**“NIVELES DE METALES PESADOS EN LA  
POBLACIÓN ANADALUZA: COMPARACIÓN  
CON LA POBLACIÓN DE LA ZONA DE  
INFLUENCIA DEL ACCIDENTE MINERO DE  
AZNALCÓLLAR”**

Contrato de Investigación nº 2098  
Universidad de Granada – Consejería de Salud

## Investigador Principal

**Dr. Enrique Villanueva Cañadas.** Catedrático de Universidad.  
*Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría.*  
*Facultad de Medicina. Universidad de Granada.*  
*Avda. de Madrid, 11. 18071 Granada.*  
*Tfno. 958 24 35 46 Fax: 958 24 07 61*  
*Correo e: [guadalfeo40@telefonica.net](mailto:guadalfeo40@telefonica.net)*

## Equipo Investigador

**Dr. Antonio Pla Martínez.** Catedrático de Universidad  
Correo e: [apla@ugr.es](mailto:apla@ugr.es)

**Dr. Antonio Hernández Jerez.** Profesor Titular de Universidad  
Correo e: [ajerez@ugr.es](mailto:ajerez@ugr.es)

**Dr. Fernando Gil Hernández.** Profesor Titular de Universidad  
Correo e: [fgil@ugr.es](mailto:fgil@ugr.es)

**Dra. Lourdes Rodrigo Conde-Salazar.** Profesora Titular de Universidad  
Correo e: [lourdesr@ugr.es](mailto:lourdesr@ugr.es)

**D. Esperanza de Santiago Rodríguez.** Becaria a cargo del Proyecto.  
*Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría.*  
*Facultad de Medicina. **Universidad de Granada.***

**Dr. Luis Fermín Capitán Vallvey.** Catedrático de Universidad.  
Correo e: [lcapitan@ugr.es](mailto:lcapitan@ugr.es)

**Dra. M<sup>a</sup> del carmen Valencia Mirón.** Profesora Titular de Universidad

**Dra. M<sup>a</sup> Dolores Fernández Ramos.** Profesora Titular Interina

**D. Julio Ballesta Claver.** Becario a cargo del Proyecto  
*Departamento de Química Analítica.*  
*Facultad de Ciencias. **Universidad de Granada***

**D. Francisco Camino Durán**

Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Sevilla.

**D<sup>a</sup>. Virtudes Gallardo García**

Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Sevilla.

**D<sup>a</sup> Mercedes Sánchez-Lanuza Rodríguez**

Servicio Andaluz de Salud (SAS). Sevilla.

**D<sup>a</sup> Carmen Lama Herrera**

Servicio Andaluz de Salud (SAS). Sevilla.

**Dr. Joaquín Fernández-Crehuet Navajas.** Catedrático de Universidad.  
Correo e: [crehuet@uma.es](mailto:crehuet@uma.es)

**Dr. Enrique Gómez Gracia.** Profesor Titular de Universidad.  
Correo e: [eegomezgracia@uma.es](mailto:eegomezgracia@uma.es)

**Dr. Antonio García Rodríguez.** Catedrático de Universidad.  
Correo e: [antoniogrt@uma.es](mailto:antoniogrt@uma.es)

**Dr. Alberto Mariscal Larrubia.** Profesor Titular de Universidad.  
Correo e: [mariscal@uma.es](mailto:mariscal@uma.es)

**Dr. Jorge Manuel Gómez Aracena.** Profesor Asociado.

**Dr. Manuel Carnero Varo.** Profesor asociado.

**D. Mario Gutiérrez Bedmar.** Becario a cargo del Proyecto.

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.  
Facultad de Medicina. **Universidad de Málaga.***

**Dr. José Luis Martínez Vidal.** Catedrático de Universidad.

Correo e: [jlmartin@ualm.es](mailto:jlmartin@ualm.es)

**Dra. María Dolores Gil García.** Profesora Asociada.

**D<sup>a</sup>. Javier Martínez del Río.** Becario con cargo al Proyecto.

**D. Francisco Jesús Sánchez López.** Becario con cargo al Proyecto.

*Departamento de Química analítica.*

*Facultad de Ciencias. **Universidad de Almería.***

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3. METODOLOGÍA</b>	
3.1 Muestreo de la población .....	12
3.2 Sujetos de estudio .....	12
3.3 Toma de muestras .....	12
3.4 Encuesta de frecuencia alimentaria .....	13
3.5 Metodología analítica .....	16
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....	17
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	20
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 DISEÑO Y METODOLOGÍA DE MUESTREO: ALEATORIZACIÓN DE LA MUESTRTA. SELECCIÓN DE INDIVIDUOS. CITACIÓN Y MUESTREO .....	24
4.1.1. ESTUDIO PILOTO .....	24
4.1.2. ESTUDIO FINAL .....	28
4.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	32
4.2.1. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE ENSAYO .....	32
4.3. NIVELES DE METALES PESADOS .....	38
4.3.1. ESTUDIO PILOTO .....	38
4.3.2. ESTUDIO FINAL .....	39
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	57

# NIVELES DE METALES PESADOS EN LA POBLACIÓN ANDALUZA: COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN DE LA ZONA DE INFLUENCIA DEL “ACCIDENTE MINERO DE AZNALCÓLLAR”

## 1. INTRODUCCIÓN

El sábado 25 de abril de 1998 se produjo la rotura de una de las balsas de estériles de la mina de Aznalcóllar, vertiendo sobre la vega del río Agrío e, inmediatamente sobre la del Guadiamar, un volumen estimado de lodos de 1.689.000 metros cúbicos (Informe de la Consejería de Salud, 21/10/1998). Este vertido estaba constituido por aguas ácidas (pH alrededor de 5,5) con sales metálicas en disolución y gran cantidad de sólidos muy finos de tamaño inferior a 200 micras.

Los análisis iniciales realizados por la Junta de Andalucía y el CSIC pusieron de manifiesto que la composición de los lodos y sedimentos vertidos coincidía con la de los estériles del tratamiento minero presentes en la balsa de decantación. Los metales encontrados en mayor cantidad en los lodos fueron :

Zn .....	8000 g/Tonelada
Pb .....	8000 g/Tonelada
As .....	5000 g/Tonelada
Cu .....	2000 g/Tonelada

aunque también se detectaron otros metales en concentraciones mucho menores (Mn, Fe, Cd, Cr, Tl y Ni entre otros).

Como consecuencia del vertido resultó afectada toda la vega del río Guadiamar, desde la recepción del río Agrío hasta su encauzamiento y embalsamiento al norte de las marismas del Guadalquivir, en la zona del Parque Natural del Entorno de Doñana, con una superficie aproximada de 4.400 hectáreas. Los términos municipales directamente afectados por el vertido, tanto por inundación como por deposición de fangos, fueron Aznalcóllar, Sanlúcar la Mayor, Huévar, Benacazón, Pilas, Aznalcázar, Villamanrique de la Condesa y Villafranco del Guadalquivir.

Las medidas de urgencia adoptadas por la Consejería de Salud, con el objetivo básico de proteger la salud de la población de la zona afectada por el vertido, incluyeron:

1. Programa de Vigilancia Epidemiológica
2. Programas para el control sanitario de las aguas de consumo
3. Programas de control alimentario

Una de las medidas adoptadas por la Consejería de Salud fue la constitución de una "Comisión Asesora de Salud" integrada por los siguientes miembros: Ilma. Sra. *M<sup>a</sup> Antigua Escalera Urkiaga* (Directora General de Salud Pública. Consejería de Salud. Presidenta de la Comisión), Dr. *Fco. Javier García León* (Sector de Epidemiología. Consejería de Salud. Secretario de la Comisión) Prof. *Enrique Villanueva Cañadas* (Dpto. de Medicina Legal y Toxicología. Univ. de Granada), Prof. *Antonio Pla Martínez* (Dpto. de Medicina Legal y Toxicología. Univ. de Granada), Prof. *Luis Fermin Capitán Vallvey* (Dpto. de Química Analítica, Univ. de Granada), Prof. *Jose Antonio Merino Ortega* (Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Univ. de Sevilla), Prof. *José López Barneo* (Dpto. de Fisiología. Univ. de Sevilla). Posteriormente se incorporaron a dicha comisión : Prof. *Joaquín Fernández-Crehuet* (Dpto. de Medicina Preventiva. Univ. de Málaga), Prof. *José Luis Martínez Vidal* (Dpto. de Química analítica. Univ. de Almería) y D. *Francisco Camino Durán* (Jefe de Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Evaluación. Consejería de Salud. Coordinador del Grupo). Tras valorar inicialmente el impacto sanitario del vertido, la Comisión colaboró estrechamente con dicha Consejería en todos los procesos que se llevaron a cabo desde el accidente.

La valoración inicial de los posibles efectos sanitarios del accidente se realizó teniendo en cuenta varios factores, tales como:

- (a) Identificación y características de los contaminantes del vertido
- (b) Zonas y población afectadas
- (c) Riesgos sanitarios para la población humana

Tras el análisis los técnicos concluyeron que la población general de localidades cercanas a la zona afectada, no se encontraba expuesta a los contaminantes del agua o de los lodos vertidos (siempre que no hubiera ingestión de alimentos y agua contaminados, así como se prohibiese la manipulación de lodos, etc.). La única exposición a lodos, la tendrían los trabajadores que efectuaran la limpieza de la zona afectada para los cuales se establecieron ciertas normas de seguridad así como controles sanitarios previos al comienzo de su trabajo que incluían (de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Asesora de la Consejería de Salud) un estudio de los niveles en sangre y orina de los principales metales presentes en los lodos.

Si bien, a la vista de la información disponible no se constataron, en aquellos momentos, riesgos concretos para la salud de la población, con objeto de monitorizar la aparición de posibles riesgos se propuso por la Consejería de Salud un "Programa específico de Vigilancia Epidemiológica" que fue presentado el 11 de mayo de 1998.

Aunque desde el principio los técnicos de la Junta y los miembros de la Comisión Asesora de la Consejería de Salud estuvieron de acuerdo en que no había indicios para sospechar riesgos apreciables para la salud de la población, hay que destacar que desde el primer momento se alzaron numerosas voces alarmando sobre los efectos perjudiciales para la salud que podían derivarse de la contaminación por metales como consecuencia del vertido. Si bien la mayoría de las

veces no parecía existir base científica para tales predicciones, consiguieron levantar cierta preocupación social sobre este tema, especialmente teniendo en cuenta que alguno de los metales implicados está considerado como carcinógeno (Arsénico).

A la vista de los resultados que se fueron obteniendo en las distintas muestras analizadas (alimentos, agua y aire), se pudo mantener lo que se dijo en un principio sobre la inexistencia de evidencias que pudieran hacer pensar en posibles efectos negativos para la salud a corto y medio plazo.

De cualquier modo la realidad es que a pesar de las medidas de seguridad sugeridas para los trabajadores implicados en la retirada de los lodos (que fueron establecidas como obligatorias por la Consejería de Trabajo), en muchas ocasiones no fueron cumplidas por aquellos, siendo los propios miembros de la Comisión testigos de tal incumplimiento durante las visitas efectuadas a la zona.

Por otra parte, pudimos comprobar que durante la retirada de los lodos se levantaba gran cantidad de polvo –fundamentalmente debido al intenso tráfico de camiones- e igualmente durante el vaciado de las cubas en la corta de la mina se generaba una nube de polvo que podría haber contribuido a la contaminación de zonas próximas a la mina.

El análisis de metales en el aire tanto del cauce del río Guadiamar como de algunas localidades cercanas a la zona fue origen de gran controversia, debido a la divergencia entre los resultados presentados en algunos informes del CSIC y los datos de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta. Además, la interpretación que se ha hecho de dichos datos ha sido cuanto menos inadecuada y ha levantado dudas sobre la exposición real a la que haya podido estar expuesta la población de la zona.

La presencia de metales en los lodos y aguas del vertido tóxico, así como en el aire como consecuencia del trabajo de retirada de los lodos, representó un riesgo potencial para la salud. No obstante, no hay que olvidar que la toxicidad es un fenómeno complejo cuya manifestación depende de la concurrencia de numerosos factores. La toxicidad depende, de forma crítica, de la concentración del tóxico en los receptores específicos con los que interacciona y, por otra parte, la relación entre la concentración del tóxico en el ambiente y la existente en los receptores no es en absoluto simple ni directa. Así pues, podemos decir que la presencia de un tóxico en el ambiente implica un riesgo, pero para poder hablar de impregnación hay que detectar el tóxico en el organismo y para poder hablar de intoxicación ha de darse una sintomatología determinada. Es por ello que en Toxicología Laboral se definieron los llamados “Índices de Exposición Biológica” (BEI) que corresponden a las concentraciones de tóxicos en los fluidos biológicos y que permiten medir el nivel de impregnación, constituyendo un nivel de seguridad para la población expuesta. Aunque estos parámetros se han utilizado específicamente para la población laboral expuesta a sustancias tóxicas, también podrían aplicarse como criterio general para determinar el nivel de exposición de la población general en situaciones como la que nos ocupa, en el supuesto de que la población de la zona pueda haber estado expuesta a niveles excesivos o, al menos, inusuales de ciertos tóxicos. Constituyen

pues, indicadores biológicos de exposición que pueden ser utilizados en el control del estado sanitario de una población.

Por consiguiente, la determinación de los niveles de metales en sangre y orina de la población de la zona afectada puede ser interesante para establecer el nivel de exposición a que han estado sometidos en un momento determinado y predecir los posibles efectos tóxicos que de ello pudieran derivarse. Si además pudiéramos disponer de esos datos en la población general andaluza (de zonas no contaminadas) podríamos comparar la incidencia que realmente pudo tener el vertido tóxico.

Sin embargo, los datos existentes sobre niveles de metales en fluidos biológicos de la población en general son muy escasos y en el caso de la población española inexistentes. Los únicos datos que hemos encontrado se refieren a poblaciones muy concretas (grupos de personas muy particulares) y sobre algún metal en particular que no permiten generalizar. Lo que sí existen son algunos estudios que establecen la ingesta media diaria de metales y otros tóxicos, aunque en España el único estudio exhaustivo es el realizado en el País Vasco (Vigilancia de la Contaminación Química de los Alimentos en la Comunidad Autónoma del País Vasco, 1990-1995). En este tipo de estudios se obtiene información sobre la ingesta media de los distintos tóxicos que pueden contaminar los alimentos (entre ellos algunos metales tóxicos) y se compara con las ingestas medias diarias o semanales recomendadas por los diferentes organismos internacionales. Aunque nos proporciona una información indirecta sobre los posibles efectos perjudiciales que pueden derivarse para la población, es obvio que de acuerdo con las consideraciones apuntadas anteriormente sobre la complejidad del fenómeno tóxico, la estimación de la ingesta media de metales no da una idea exacta de cuál es el nivel de impregnación de la población expuesta. Tengamos en cuenta que las condiciones de exposición tanto a través del agua y alimentos como del aire pueden variar sustancialmente de unas personas a otras y así los efectos pueden dejarse notar en algunos casos concretos, en contra de las predicciones que pueden hacerse de una forma global.

Por esta razón se consideró del máximo interés realizar este estudio incluyendo, además de la población de la zona afectada por el accidente de Aznalcóllar una muestra representativa de la población de la Comunidad Autónoma de Andalucía con objeto de conocer el problema de la contaminación por metales, caso de que exista, en nuestra Comunidad y poder así comparar con la población de las zonas afectadas por el vertido, lo cual permitiría realizar una interpretación adecuada de los resultados obtenidos.

Con la información disponible, proveniente de la composición del vertido de agua y lodos, los metales pesados susceptibles de ser analizados son todos los indicados anteriormente (Zn, Pb, As, Cu, Mn, Fe, Cd, Cr, Tl, Ni). Para este estudio, que complementaba el desarrollado previamente con la Consejería de Medio Ambiente, se seleccionaron los siguientes de acuerdo con criterios de peligrosidad desde el punto de vista toxicológico y teniendo también en cuenta su presencia en el



vertido: Níquel (Ni), Manganeseo (Mn), Talio (Tl) y Cadmio (Cd). De todos ellos se determinaría su contenido total en fluidos biológicos.

## **2. OBJETIVOS**

Este estudio se enmarca dentro de las actividades de salud pública y medio ambiente que se han planificado por la Junta de Andalucía en relación con el accidente de la presa de Aznalcóllar.

El objetivo global del mismo fue realizar un estudio sobre los niveles de metales pesados en fluidos biológicos (sangre y orina) de la población andaluza en general y de la población de la zona afectada por el vertido en particular. Aunque en la zona permanecerá un sistema de vigilancia de los niveles de metales en agua, alimentos y aire, la experiencia en salud ambiental refleja que dichos sistemas, por diferentes razones, son de eficacia limitada para predecir o identificar exposición humana a metales pesados.

Cualquier trabajo de investigación, en humanos, que se realice sobre este tema debe partir necesariamente de un conocimiento objetivo, y no especulativo, de los niveles de tóxicos en la población afectada y en la población general. Desde la experiencia previa alcanzada por este grupo de trabajo integrado en la Comisión Asesora para el accidente de Aznalcóllar y a la vista no sólo de los problemas detectados, sino de las deficiencias en metodología analítica y la falta de determinada información necesaria desde el punto de vista epidemiológico, los objetivos concretos a alcanzar con este estudio fueron:

- Establecer métodos validados de análisis para la determinación de Mn, Ni y Cd en sangre total y Tl en orina empleando técnicas de Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama y cámara de grafito a fin de analizar las muestras tomadas de cada una de las citadas matrices.
- Generar documentos que contengan los Procedimientos Normalizados de Trabajo para el análisis de los metales seleccionados en las matrices citadas, usando como técnica la Espectrofotometría de Absorción Atómica de acuerdo con las normas EN 45000 y la ISO 25. Al concluir el estudio se podría obtener una ficha técnica que sirviera como método oficial de la Junta de Andalucía para el análisis de metales en fluidos biológicos.
- Determinar los niveles medios de metales en sangre y orina de la población general andaluza, lo que permitirá establecer el “nivel de impregnación”.
- Determinar los niveles de metales en sangre y orina de la población de la zona afectada por el vertido
- Tras el análisis epidemiológico de los resultados determinar (tomando como referencia los valores medios poblacionales) si la población de la zona afectada por el vertido ha sufrido una exposición diferente respecto a la población general.
- Establecer de acuerdo con lo anterior la posible existencia de riesgos a medio o largo plazo en función del “nivel de impregnación” detectado.

- Analizar, mediante una encuesta alimentaria, la posible influencia de los hábitos alimenticios en los niveles de metales pesados en la población sometida al estudio.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Muestreo de la población

1. Al no conocer los niveles de metales pesados en la población española, se propuso un estudio piloto de 60 sujetos para poder obtener los parámetros y elegir la muestra con la mayor precisión posible.

Estos 60 sujetos se escogieron de la zona cercana a Aznalcollar (30) y Málaga (30). Una vez obtenidos los parámetros se realizó el cálculo muestral.

2. Por ser una variable cuantitativa continua, utilizamos la fórmula de Levy et al (1999):

$$n = ((z^2) (s^2)) / (\text{precisión})^2$$

Donde:

Z = 1,96 si los intervalos de confianza son al 95%.

s es la desviación estándar;

precisión es el +/- del intervalo de confianza que se desee;

Por ejemplo, si la desviación estándar del arsénico es 1,52 (Zhang et al 1998) según la fórmula que aplicamos es  $n = ((z*s)/\text{precisión})^2 = ((1,96 * 1,52) / \text{precisión})^2$ .

Por tanto, el tamaño de muestra necesario para que el intervalo de confianza al 95% sea de +/- 0,06 (0,90 -1,02), necesitaríamos 2465 personas.

3. Para la selección de la muestra, se realizó un procedimiento bietápico aleatorio. En la primera etapa, se escogieron 50 municipios de entre todos los de Andalucía. Previo a ello, nuestra Comunidad Autónoma se dividió en unidades poblacionales de 1000 habitantes o fracción, según el último censo disponible 1991 y se asignó una numeración correlativa a cada una de ellas para su selección aleatoria.

En una segunda etapa se realizó una selección aleatoria de individuos dentro de cada uno de los 50 municipios anteriormente seleccionados. En cada municipio se utilizó como marco muestral, el padrón municipal (1996).

#### 3.2 Sujetos de estudio.

Individuos de edades comprendidas entre los 12 y 75 años de las poblaciones elegidas en el muestreo.

#### 3.3 Toma de muestras (encuesta de frecuencia alimentaria: circuito y procesamiento).

Para la realización de todo el trabajo de campo se contó con los recursos humanos y materiales del SAS a través de sus Distritos Sanitarios y Centros de Salud. A la población elegida de forma aleatoria se le citó en el Centro de Salud para la toma de muestras y la encuesta alimentaria. Previamente a la toma de muestras se informó al sujeto del objeto del estudio y se le solicitó su consentimiento por escrito.

Se recogieron dos tubos de sangre, por sujeto, en tubos vacutainer, uno de 10 ml y otro de 5 ml y una muestra de orina en recipiente estéril apropiado. Todas las muestras se identificaron con una etiqueta en la que figuraba el nombre de la localidad, el sexo, el grupo de edad y el código de muestreo. Estas etiquetas se le facilitaron a cada responsable del centro de salud.

Las muestras de sangre y orina se recogieron en cada centro de salud junto con la encuesta de frecuencia alimentaria y se trasladaron ese mismo día a la correspondiente Delegación Provincial de la Consejería de Salud. Allí se procedió a su centrifugación, preparación y conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente tanto los sueros como la sangre se trasladaron al laboratorio de referencia (Granada) para proceder a las determinaciones analíticas y mantenimiento de seroteca. En todo el proceso se evitó romper la cadena de frío.

Las encuestas de frecuencia alimentaria se remitieron al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Málaga para proceder a su estudio.

### **3.4 Encuesta de frecuencia alimentaria.**

A todos los sujetos del estudio se les pasó una encuesta de frecuencia alimentaria con el objeto de conocer los hábitos alimenticios del grupo e inferir la posible influencia de estos alimentos en los niveles medidos de metales. Esta encuesta consta de 41 preguntas y está basada en aquellos alimentos que aportan aproximadamente un 80% de los nutrientes que se ingieren en Andalucía (INE 1991). Es posible agregar algunos alimentos específicos de la zona que se sospeche sean fuente importante de los metales a medir. Cada ítem consta de 8 categorías, según lo aconsejado por numerosos autores (Willett 1998). Para el caso del pan y el aceite (que se miden en cantidades, porque aportan aproximadamente un 40-50% de la energía) se utilizó un Manual de Fotografías elaborado por el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Málaga y el Instituto de Nutrición de la Universidad de Granada. El formulario y la forma de abordar la entrevista se explicó en una reunión específica de todos los encuestadores, con el fin de homogeneizar procedimientos y evitar variabilidad entre ellos. La encuesta utilizada se muestra a continuación.



### Tomado de Willet : “Nutritional Epidemiology” 1998

Alimento/frecuencia	Más de 6 veces al día	4-6 veces al día	2-3 veces al día	1 vez al día	5-6 veces a la semana	2-4 veces a la semana	1 vez a la semana	1-3 veces al mes	Casi nunca
Huevos									
Ensalada mixta									
Carne de cerdo									
Carne de vacuno									
Pollo									
Rosada									
Merluza, Pescada o similar									
Pez espada									
Boquerones									
Sardinas									
Gambas o similar									
Camarones									
Cangrejos									
Mejillones									
Almejas, coquinas o similares									

### 3.5 Metodología analítica.

Los métodos analíticos utilizados en este estudio han sido completamente validados en cada laboratorio encargado del posterior análisis de muestras. Es muy habitual en muchos casos que se disponga de una abundante cantidad de datos analíticos, de los que sin embargo, se carece de la información suficiente a fin de evaluar su calidad; con lo que en realidad no sabemos si tales datos describen adecuadamente la muestra de la que queremos obtener información o si la calidad de los mismos es insuficiente por falta de exactitud, precisión, sensibilidad, etc.

La disponibilidad de criterios para evaluar la calidad de las medidas analíticas, en las que en buena medida se basa el análisis ambiental, geológico, biológico, clínico, toxicológico, etc., es esencial a fin de validar e interpretar correctamente los resultados proporcionados por el laboratorio, siendo éste uno de los objetivos básicos de este estudio. En este sentido, organizaciones internacionales tales como la ISO (International Standardization Organization) o el CEN (Comité Europeo para la Normalización) han publicado normas, de las que la serie EN 45000 así como la ISO 25, son de particular interés, en orden a asegurar la confianza en los resultados obtenidos por los laboratorios que las utilizan y se ajustan a las mismas. La metodología utilizada ha incluido los siguientes puntos:

1. Puesta a punto de métodos de análisis usando las técnicas de Espectrofotometría de Absorción Atómica antes citadas.

- Revisión Bibliográfica
- Estudio de los parámetros característicos de los métodos instrumentales
- Cálculo de factores de recuperación
- Curvas de calibrado. Estudio del efecto matriz
- Cálculo de los parámetros característicos de cada uno de los métodos analíticos (límites de detección y determinación; precisión mínima; concentración característica; exactitud e incertidumbre). Validación de los métodos.

2. Preparación de laboratorios de acuerdo con la EN 45000 e ISO 25

- Calibración de equipos
- Calibración de materiales
- Establecimiento de QC (controles de calidad)
  - Control interno: Cartas de Control; Muestras replicadas
  - Control Externo: Análisis de MRC (Materiales de referencia certificados)

3. Redacción de los Procedimientos Normalizados de Trabajo

- Objeto y fundamento
  
- Alcance (rango de concentración aplicable)



- Bibliografía y documentos de referencia
  - Experimental
    - Transporte y conservación de la muestra
    - Reactivos y disoluciones
    - Material y equipos. Verificación diaria del equipo
    - Protocolo de Análisis de muestras problema
  - Expresión de resultados. Unidades
4. Análisis de muestras problema
  5. Tratamiento y discusión de resultados

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO, RECTAS DE CALIBRADO, PARAMETROS ESTADISTICOS Y CHEQUEO DEL EQUIPO PARA LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PLOMO, ARSÉNICO, MERCURIO Y ZINC POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

#### FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS

En la técnica de cámara de grafito empleada en la determinación de cadmio, níquel y manganeso, la atomización de la muestra se realiza en un tubo cilíndrico de grafito abierto por ambos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra. El tubo es calentado transversalmente para evitar la aparición de un gradiente de temperatura en su interior durante el análisis y que puede provocar problemas durante las fases críticas de la determinación. Durante el proceso, la muestra se somete a un programa de temperaturas adecuado hasta alcanzar las condiciones en que el analito de interés pasa a ser un vapor atómico. Normalmente, la determinación se realiza por calentamiento progresivo de la muestra en tres o más etapas. El vapor atómico elemental resultante absorbe radiación a la longitud de onda característica de cada elemento, la señal del detector aumenta hasta un máximo después de unos pocos segundos de la ignición y decae rápidamente a 0 cuando los productos de la atomización salen fuera del tubo de grafito. El análisis cuantitativo se basa en medidas de altura o área de pico.

El cadmio se determina por espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito en las siguientes condiciones: Longitud de onda: 228.8 nm; rendija de 0.7 nm; T<sup>a</sup> mineralización: 600/700°C; T<sup>a</sup> atomización: 1600°C; Modificadores (20 µL): Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + Pd.

El níquel se determina por espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito en las siguientes condiciones: Longitud de onda: 232.0 nm; T<sup>a</sup> mineralización: 1400 °C; T<sup>a</sup> atomización: 2400°C; Modificadores: No se utilizan modificadores.

El manganeso se determina por espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito en las siguientes condiciones: Longitud de onda: 279.5 nm; Tª mineralización: 1300 °C; Tª atomización: 1900°C; Modificadores: Pd (0.005 mg) y Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.003 mg).

La determinación de talio se lleva a cabo mediante un espectrómetro de masas con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-MS) y provisto de automuestreador. Esta técnica analítica está basada en la formación de un plasma de argón. Una chispa de alto voltaje provoca iones Ar<sup>+</sup> y electrones en las paredes del tubo más externo de la antorcha (tubos concéntricos de sílice) creando el plasma. La antorcha está rodeada por una espiral de 2-4 vueltas la cual genera una radiofrecuencia. La radiofrecuencia origina colisiones no elásticas entre Ar<sup>+</sup> y e<sup>-</sup>, dando lugar a más iones Ar<sup>+</sup>. El plasma de Ar excita los iones positivos de los átomos de la muestra para ser consecutivamente extraídos al espectrómetro de masas (MS) a través de cámaras de vacío creciente. Una vez dentro de la cámara principal, el gas es separado de los iones positivos y bombeado hacia fuera. Los iones remanentes son extraídos y enfocados hacia el cuadrupolo (donde la presión es de 10<sup>-6</sup> mbar) a través de lentes iónicas. La detección de estos iones se lleva a cabo a través de un multiplicador electrónico.

## REACTIVOS

Durante el ensayo, salvo indicación expresa en otro sentido, se han usado reactivos de grado analítico (P.A.). A no ser que se indique de otra forma, el agua será entendida como un reactivo conforme a la especificación ASTM D 1193-77 para tipo II.

- Aire, suministrado por un compresor, previamente filtrado y secado a través de un filtro intercambiable para eliminar aceites, agua y otras sustancias extrañas.
- Argón de calidad N-50.
- Acetileno de calidad N-26
- El agua utilizada es de tipo III procedente de un equipo de osmosis inversa (estación Milli-RO 12 mas Milli-Q de Millipore).

### a) Cadmio

- Acido nítrico 0.2% P.A
- Nitrato magnésico 0.03%, Paladio 3.3%.
- Disoluciones estándar de Cd de 1000 mg/L (conservadas en oscuridad a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad declarada por el fabricante).
- Disoluciones intermedias estándar de Cd de 0.01 mg/L. A partir de estas se preparan disoluciones estándar de trabajo. Se chequea periódicamente la estabilidad de estas disoluciones.

### b) Níquel y manganeso

- Acido nítrico 60% P.A., peróxido de hidrogeno 30%, agua desionizada tipo 2, de acuerdo con las normas ISO 3969.
- Nitrato magnésico (modificador de matriz).
- Disoluciones de ácido nítrico (2 + 98).
- Disoluciones estándar de Ni y Mn de 1000 mg/L (conservadas en oscuridad a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad declarada por el fabricante).
- Disoluciones intermedias estándar de Ni y Mn de 2 mg/L. A partir de éstas se preparan disoluciones estándar de trabajo. Se chequea periódicamente la estabilidad de estas disoluciones.
- Modificadores de matriz: se preparan dos modificadores de matriz de nitrato magnésico y nitrato de paladio de 10 g/L.

### c) Talio

- Disolución de bismuto
- Disolución estándar de Tl de 1000 mg/L (conservada en oscuridad a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad declarada por el fabricante).
- Disolución intermedia estándar de Tl de 5 mg/L. A partir de esta se preparan disoluciones estándar de trabajo. Se chequea periódicamente la estabilidad de estas disoluciones.

## MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin- Elmer, modelo Analyst 800.
- Lámparas de cátodo hueco para Ni y Mn y de descarga sin electrodos (EDL) para Cd Perkin Elmer.
- Espectrómetro de plasma inducido con detector de masa ICP-MS con automuestreador Hewlett Packard, 4500 series.
- Matraces aforados y pipetas graduadas de clase A de acuerdo con las normas ISO aplicables.
- Balanza analítica.
- Microondas Perkin Elmer Modelo Anton Para Multiwave.
- Tubos de grafito de calentamiento transversal (THGA).
- Compresor.
- Recirculador de aceite
- Micropipetas automáticas.
- Conos de plástico para las micropipetas y cubiletes de poliestireno para las muestras.

## CONTROLES DE CALIDAD

Se chequea el equipo en cada sesión de trabajo en relación con la observación del coeficiente de regresión de la recta de calibrado que deberá ser al menos de 0.99. El registro queda anotado en la libreta del analista.

Por otra parte se confecciona una carta de control a partir de los datos de la media de 10 medidas de una disolución preparada a partir de un material de referencia certificado y observando cada día de uso del equipo que una medida de dicha disolución quede en la zona comprendida entre  $\bar{x} \pm 3 S$ .

Se chequea la sensibilidad del instrumento utilizando una disolución patrón, comprobando que la masa característica para cada elemento no difiera en más de un 25% de la obtenida durante el proceso de validación.

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL MÉTODO.

### 1. Límite de detección y determinación

#### a) límite de detección:

El límite de detección se define como la concentración de elemento que produce el doble de la relación señal/ruido. Este límite de detección se establece midiendo la señal del blanco y una disolución patrón del analito que dé una señal triple que la del blanco.

El límite de detección se establece midiendo 10 réplicas de dos disoluciones (disolución 1 y 2) que contengan 5 y 10 veces respectivamente, la concentración que da el doble de la señal/ruido. El límite de detección se calcula a partir de las siguientes ecuaciones:

$$L_{D1} = \frac{C_1 \times 2 S_{D1}}{\bar{X}_1} \qquad L_2 = \frac{C_2 \times 2 S_{D2}}{\bar{X}_2}$$

Siendo:

- C1 y C2, concentraciones de las disoluciones 1 y 2, respectivamente.
- SD1 y SD2, desviaciones estándares de las 10 réplicas de las disoluciones 1 y 2, respectivamente.
- $\bar{X}_1$ , concentración media obtenida de las diez réplicas de la disolución 1.
- $\bar{X}_2$ , concentración media obtenida de las diez réplicas de la disolución 2.

Siendo el límite de detección:

$$LD = \frac{LD1 + LD2}{2}$$

## 2. Límite de cuantificación:

Se obtiene multiplicando el límite de detección obtenido experimentalmente en el apartado a) por tres.

## 3. Intervalo de linealidad

La linealidad se estudia sobre disoluciones del analito, preparadas según el procedimiento de ensayo, conteniendo concentraciones crecientes del mismo y estimando como rango lineal aquel en el que se cumple un coeficiente de regresión de al menos 0'99. El primer punto coincide o se sitúa por encima, según el caso, del límite de determinación del elemento.

## 4. Precisión mínima

Se determina tomando 10 lecturas de 10 disoluciones con concentraciones del analito en la zona media de la recta de calibrado. La precisión se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{S_A \times 100}{\overline{X}_A}$$

Siendo:

-  $S_A$ , la desviación estándar para la concentración en la zona media de la recta de calibrado y  $\overline{X}_A$  la concentración media obtenida de las diez réplicas de las disoluciones.

## 5. Exactitud. Comparabilidad de las medidas.

Se determina comparando los valores certificados correspondientes a un material de referencia con los encontrados tras la aplicación del procedimiento de ensayo al mismo.

El número de medidas será de 10 y a partir de ellas se calcula la media experimental, afectada por la incertidumbre del método.

Los valores obtenidos de esta forma deben ser comparables a los correspondientes al material de referencia según su certificado, de tal forma que la  $\overline{X}_{patrón}$  quede incluida dentro del intervalo de confianza.

## 6. Incertidumbre asociada a los procedimientos de ensayo.

Metodología basada en las guías ISO-EURACHEM (ASCENDENTE). Se procede teniendo en cuenta las distintas componentes que pueden contribuir, a la incertidumbre asociada al material volumétrico usado, al material de referencia

certificado, a la repetibilidad del método analítico y a la precisión intermedia del mismo. La precisión intermedia se evalúa repitiendo el análisis de una muestra testigo: a tal fin se procederá obteniendo cinco alícuotas de la muestra ya tratada, que serán conservadas y analizadas en intervalos de una semana/alícuota. Los ensayos se llevan a cabo tanto por el analista responsable como por el analista sustituto, estimándose la precisión intermedia en términos de desviación estándar.

$$U = K \cdot uc(y)$$

K, factor de probabilidad, se tomará igual a 2, correspondiente a un nivel de confianza del 95% si se tratase de una distribución normal con  $\sigma = s$ .

Siendo:

$$uc(y) = y \left( \frac{u_{pip}^2}{Vol^2} + \frac{u_{afo}^2}{Vol^2} + \frac{u_{pat}^2}{C_{pat}^2} + \frac{u_{ecu-cal}^2}{p^2} + \frac{u_{re}^2}{q^2} \right)^{1/2}$$

i) Incertidumbre asociada a la medida de la pipeta:

$$u_{pip} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3}$$

ii) Incertidumbre asociada al matraz aforado:

$$u_{afo} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3}$$

iii) Incertidumbre asociada al patrón:

$$u_{pat} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3}$$

iv) Incertidumbre asociada a la transformación de absorbancias en concentraciones:

Se calcula aplicando la ecuación característica del análisis de la regresión lineal simple:

$$U_{ecu-cal} = S_{con} = \left[ \frac{(S_{resid} / b)^2}{n} + d_c^2 (S_b / b)^2 \right]^{1/2}$$

donde:

$d_c$  es la concentración media de 3 determinaciones del metal en cuestión menos la concentración media de los patrones usados en la calibración.

$n$  es el número de patrones de calibración.

$S_{resid}$  es la desviación estándar de los residuales.

$S_b$  es la desviación estándar de la pendiente.

$b$  es la pendiente de la recta de calibrado

v) Repetibilidad:

$$u_{rep}^2 = \frac{(S_{y \cdot x} W)^2}{n}$$

vi) Precisión intermedia

$$u_{2pi} = \frac{(S_{x \cdot x} W)^2}{n}$$

donde  $W=1$  para  $n=10$ .

## 4. RESULTADOS

De acuerdo con los objetivos inicialmente propuestos y la metodología general descrita en el punto anterior, a continuación vamos a exponer los resultados obtenidos en este estudio.

### 4.1. DISEÑO Y METODOLOGIA DE MUESTREO: ALEATORIZACIÓN DE LA MUESTRA. SELECCIÓN DE INDIVIDUOS. CITACIÓN Y MUESTREO.

#### 4.1.1. ESTUDIO PILOTO

##### Diseño del muestreo

Antes de proceder a la selección de la muestra sobre la que estudiar los niveles de metales pesados en sangre y orina, fue necesaria la realización de un estudio piloto para conocer los intervalos entre los que fluctuaban estos niveles así como sus desviaciones respecto a los valores medios. Únicamente a partir de estos parámetros se puede realizar un diseño experimental correcto ya que la información que nos aporta el estudio piloto es imprescindible para estimar, por ejemplo, el tamaño de la muestra total que tomemos o la afijación de dicha muestra cuando procedamos a la estratificación. Por todo lo expuesto, este estudio piloto se hizo imprescindible debido a que no se poseía ningún tipo de conocimiento acerca de estos parámetros.

Además de la búsqueda de representatividad hay que tener en cuenta las restricciones tanto físicas como económicas inherentes a todo muestreo. En el caso de este estudio piloto, hay una serie de restricciones que merece la pena destacar:

- La selección de los individuos no puede ser totalmente aleatoria ya que las características del estudio lo impiden. Es decir, una vez establecido el número de sujetos de cada estrato, el siguiente paso es elegir a esos sujetos de entre los que vayan llegando al centro de salud correspondiente. Debido a las características del estudio ésta es la única forma de seleccionar a los sujetos ya que serán sometidos a una serie de pruebas, que hacen imposible el realizar un muestreo totalmente aleatorio sobre toda la población objeto de estudio. Esta restricción va a aparecer también en el muestreo final, pero como se verá, sólo afectará a la última etapa del muestreo y no producirá un sesgo significativo.
- El número de sujetos en la muestra piloto ha sido de 60 sujetos. Con esto se ha pretendido equilibrar la restricción económica con la obtención de parámetros representativos de la población, a efectos del diseño experimental posterior.



Pasamos a continuación a desglosar el procedimiento de muestreo que se ha seguido en este estudio piloto.

El proceso de muestreo que se ha seguido en el estudio piloto se ha diseñado de forma que para un tamaño muestral fijo: 60 individuos en total, fuese lo más representativo posible tanto para la población andaluza, como para la población de los municipios afectados. La muestra representativa de la población andaluza en el estudio piloto se ha tomado de Málaga y provincia, concretamente de Málaga capital, de Marbella y de Cártama.

Los datos poblacionales que hemos utilizado han sido obtenidos del último censo que se poseía en el momento de realizar el muestreo, correspondiente al año 1996. La población control está compuesta por los habitantes andaluces de edades comprendidas entre los 12 y los 75 años, que suponen 5.859.491 individuos. Por motivos de representatividad y de optimización de recursos, dado que la muestra que hemos tomado es pequeña (30 sujetos), nos hemos centrado únicamente en tres municipios: Málaga, Marbella y Cártama. De cada uno de ellos hemos extraído 10 sujetos, con esto estamos forzando a que la muestra piloto (a pesar de su pequeño tamaño) sea lo más representativa posible de la andaluza en lo que se refiere al hábitat de los sujetos ya que los estamos tomando de ciudad (Málaga), costa (Marbella) e interior (Cártama). Es obvio que el hábitat de un individuo es una variable a tener en cuenta en un estudio como el que nos ocupa.

La población de los municipios afectados está compuesta por los sujetos de edades comprendidas entre los 12 y los 75 años, cuya residencia sea alguno de estos municipios: Aznalcóllar, Aznalcázar, Sanlúcar La Mayor, Pilas, Huévar, Benacazón, Villamanrique de la Condesa y Villafranco del Guadalquivir.

El proceso de selección de la muestra ha sido distinto en cada una de las poblaciones (control o afectados). En la población de control la selección de la muestra se ha hecho de forma independiente en cada uno de los tres municipios: Málaga, Marbella y Cártama. En cada uno de ellos se han elegido 10 sujetos. El muestreo de estos sujetos fue estratificado en cada uno de los municipios. Esto se hizo porque poseemos información acerca de la distribución de las edades y del sexo. Por tanto, éstas serán las variables que nos servirán para proceder a la estratificación.

Cada una de las muestras se estratificó con la afijación de Neyman para minimizar la varianza con un tamaño muestral dado (Azorín y Sánchez-Crespo, 1986; Cochran, 1971; Miras, 1985; Silva Ayçaguer, 1993):

$$n_h = \frac{W_h \sigma_h}{\sum_{h=1}^L W_h \sigma_h} n$$

Siendo:  $n_h$  = número de sujetos de cada estrato  $h$ .

$$W_h = \frac{N_h}{N} = \text{porcentaje de la población contenida en cada}$$

estrato  $h$ .

$\sigma_h$  = desviación típica de la variable objeto de estudio en cada estrato h.

$n$  = tamaño de la muestra.

$N_h$  = tamaño poblacional en cada estrato

$L$  = número de estratos de la población

$N$  = tamaño de la población

Debido a que no se tenía información acerca de las desviaciones típicas de la variable objeto de estudio  $\sigma_h$  en cada estrato (ya que entre otros motivos para eso se realiza el estudio piloto), las consideramos constantes, es decir,  $\sigma_h = \sigma$ , con lo cual, a afijación de Neyman se nos queda en la siguiente fórmula, bastante más reducida:

$$n_h = \frac{W_h \sigma_h}{\sum_{h=1}^L W_h \sigma_h} n = \frac{W_h \sigma}{\sum_{h=1}^L W_h \sigma} n = \frac{W_h \sigma}{\sigma \sum_{h=1}^L W_h} n = W_h n = \frac{n}{N} N_h$$

El procedimiento de muestreo en los municipios afectados fue bietápico. En una primera etapa, se eligieron tres municipios de entre los ocho afectados. Esta elección se hizo mediante una ponderación con respecto al número de habitantes de cada municipio, es decir, si  $N_i$  es el número de habitantes del  $i$ -ésimo municipio, y  $N$  es el número total de habitantes de los ocho municipios, la probabilidad de elegir a este municipio  $i$ -ésimo sería de  $\frac{N_i}{N}$ .

El número de habitantes de los municipios afectados se muestra a continuación: Aznalcazar: 2.754; Aznalcollar: 4.750; Sanlúcar La Mayor: 8.573; Pilas: 9.136; Huévar: 1.894; Benacazón: 4.019; Villamanrique de la Condesa: 3.115; Villafranco del Guadalquivir: 5.058.

Los tres municipios elegidos de forma aleatoria (con la ponderación antes indicada) fueron: Aznalcollar, Sanlúcar La Mayor y Aznalcázar. A continuación, se procedió a realizar un muestreo estratificado sobre la población total de los tres municipios, de tal forma que esta población quedó estratificada en función de las siguientes variables:

- Edad : 12-24 ; 25-59 ; 60-75
- Sexo : hombre o mujer
- Municipio : Aznalcóllar, Aznalcázar o Sanlúcar La Mayor.

El método para la elección de la afijación, fue de nuevo el de Neyman para minimizar la varianza, con un tamaño muestral  $n$  dado (Azorín y Sánchez-Crespo, 1986; Cochran, 1971; Miras, 1985; Silva Ayçaguer, 1993):

$$n_h = \frac{W_h \sigma_h}{\sum_{h=1}^L W_h \sigma_h} n$$

De igual forma que antes, como no tenemos información acerca de las desviaciones típicas  $\sigma_h$  en cada estrato, las consideramos constantes, es decir,  $\sigma_h = \sigma$ , con lo cual, la afijación de Neyman se nos vuelve a quedar en la siguiente fórmula:

$$n_h = \frac{W_h \sigma_h}{\sum_{h=1}^L W_h \sigma_h} n = \frac{W_h \sigma}{\sum_{h=1}^L W_h \sigma} n = \frac{W_h \sigma}{\sigma \sum_{h=1}^L W_h} n = W_h n = \frac{n}{N} N_h$$

Finalmente, el muestreo nos arrojó los siguientes tamaños muestrales en cada municipio:

- Aznalcóllar: 10 personas
- Sanlúcar la Mayor: 16 personas
- Benacazón: 4 personas

### Toma de muestras

Una vez seleccionados los individuos se procedió en el Centro de Salud a extraer 2 tubos de sangre, tipo Vacutainer, uno de 10 ml para suero (con acelerador de la coagulación) y otro de 5ml con EDTA para sangre total. También se tomó una muestra de orina de 30-40 ml aproximadamente (en bote estándar). Tanto el tubo de suero, como el de sangre total y las muestras de orina se identificaron con las etiquetas preparadas a tal efecto (proporcionadas a los Centros de Salud). El número de orden de cada etiqueta se estableció de la siguiente forma: 1er dígito: Provincia (por orden alfabético, del 1 al 8); 2º y 3º dígitos: Centro de Salud de la provincia (previamente asignados); 4º y 5º dígitos: número de orden correlativo de los pacientes seleccionados en cada centro de salud (del 1 al 99). Además de esto, en el tubo se indicó con rotulador indeleble dicho número de orden. Las muestras se guardaron en frigorífico hasta el momento de su envío a la Delegación por el circuito habitual de envío de muestras desde los Centros de Salud a los Hospitales de referencia.

Una vez en el laboratorio de la Delegación Provincial, el tubo de 10 ml (tubo con acelerador de la coagulación) se centrifugó a 3000 rpm / 10 minutos para separar el suero. El sobrenadante se repartió en dos tubos limpios (tubos de polipropileno con tapón), que se identificaron con una etiqueta exactamente igual que la del tubo original. El contenido del tubo de 5 ml (sangre total) se mezcló por inversión y se repartió en dos tubos limpios (tubos de polipropileno con tapón), que se identificaron exactamente igual que el tubo original. La muestra de orina no requiere ningún tratamiento adicional. Todas las muestras, incluidas las de orina, se conservaron en congelador (a  $-20^\circ \text{C}$ ) y posteriormente se enviaron (refrigeradas en nevera portátil) al Laboratorio de referencia.

#### 4.1.2. ESTUDIO FINAL

De acuerdo con los resultados del estudio piloto se procedió a la selección de muestras para el estudio final, siguiendo la misma metodología.

A partir de los datos del estudio piloto se estimó un tamaño muestral para el estudio final de 1000 personas en la población andaluza y 1000 personas en la población de la zona afectada. Con este tamaño muestral se pueden obtener las siguientes precisiones en las estimaciones de los niveles de metales pesados:

Precisión del nivel de níquel:

Población andaluza:  $\pm 6 \mu\text{g/L}$

Poblacion afectada:  $\pm 2 \mu\text{g/L}$  (o menor)

Precisión del nivel de cadmio:

Población andaluza:  $\pm 0,02 \mu\text{g/L}$  (o menor)

Poblacion afectada:  $\pm 0,05 \mu\text{g/L}$  (o menor)

Los datos proporcionados sobre el talio (Tl) fueron insuficientes para poder realizar estimaciones (todos los valores eran iguales y  $< 6 \mu\text{g/L}$ . De ahí que para el estudio final se sustituyese el Tl por el manganeso (Mn).

Cuando se planteó la recogida de este número de muestras surgieron dificultades técnicas casi insalvables sobre todo en la zona afectada, ya que el número de muestras correspondientes a algunos centros de salud y teniendo en cuenta el número de habitantes de la población en cuestión, resultaba prácticamente imposible conseguir todas las muestras en las distintas franjas de edad y especialmente en la franja de 12-24 años. Además la infraestructura disponible en muchos de esos centros de salud no permitía la recogida y manejo de un número demasiado elevado de muestras. Es por ello que, desde una perspectiva real, hubo que reducir el número total de muestras a emplear en el estudio, quedando en principio reducidas a 800 muestras de la zona afectada y 800 muestras del resto de Andalucía. En la Tabla siguiente se muestran las precisiones alcanzables con distintos tamaños muestrales para la población afectada.

**Tabla 1. Precisiones alcanzables con distintos tamaños muestrales de la población afectada.**

Tamaño Muestral	NÍQUEL		CADMIO	
	precisión absoluta	precisión relativa	precisión absoluta	precisión relativa
1000	1,60	4,7%	0,05	4,9%
900	1,68	4,9%	0,05	5,2%
800	1,78	5,2%	0,05	5,5%
700	1,91	5,6%	0,06	5,8%
600	2,06	6,0%	0,06	6,3%
500	2,26	6,6%	0,07	6,9%
400	2,52	7,4%	0,08	7,7%
300	2,91	8,5%	0,09	8,9%

Con las consideraciones anteriores la distribución muestral quedó de la siguiente forma para la población afectada y no afectada.

**Tabla 2. Muestreo final de los municipios de la zona afectada**

MUNICIPIO	SEXO	GRUPO ETÁREO		
		12-24	25-59	60-75
Aznalcázar	Hombres	7	12	3
	Mujeres	6	12	3
Aznalcóllar	Hombres	12	20	5
	Mujeres	11	19	5
Benacazón	Hombres	10	18	4
	Mujeres	9	16	5
Carrión de los Céspedes	Hombres	3	8	3
	Mujeres	3	8	4
Huévar	Hombres	4	9	2
	Mujeres	3	8	3
Pilas	Hombres	21	39	10
	Mujeres	20	38	11
Sanlúcar la Mayor	Hombres	22	38	8
	Mujeres	20	38	9
Villamanrique de la Condesa	Hombres	7	13	3
	Mujeres	7	13	4
Hinojos	Hombres	6	13	3
	Mujeres	6	12	4

**Tabla 3. Muestreo final en la población andaluza (Zona No Afectada)**

LOCALIDAD/ZONA BÁSICA	SEXO	GRUPO ETÁREO		
		12-24	25-59	60-75
Almería	Hombres	3	7	1
<b>ALMERÍA-CENTRO</b>	Mujeres	3	7	2
Huércal-Overa	Hombres	4	8	2
<b>HUERCAL-OVERA</b>	Mujeres	4	8	3
El Ejido	Hombres	3	5	1
<b>SANTA M<sup>a</sup> DEL AGUILA</b>	Mujeres	2	5	1
Algeciras	Hombres	5	8	2
<b>ALGECIRAS-CENTRO</b>	Mujeres	4	8	2
Los Barrios	Hombres	2	4	0
<b>LOS BARRIOS</b>	Mujeres	2	3	1
Cádiz	Hombres	3	5	1
<b>CÁDIZ-LA LAGUNA</b>	Mujeres	2	5	2
Chiclana	Hombres	4	8	1
<b>CHICLANA-EL LUGAR</b>	Mujeres	4	7	2
Jerez de la F.	Hombres	2	4	1
<b>JEREZ-LA GRANJA</b>	Mujeres	2	5	1
Puerto Real	Hombres	4	8	1
<b>PUERTO REAL</b>	Mujeres	4	8	1
Sanlúcar de B.	Hombres	4	8	1
<b>SANLÚCAR-BARRIO ALTO</b>	Mujeres	4	8	2
Cabra	Hombres	3	7	2
<b>CABRA</b>	Mujeres	3	7	2
La Carlota	Hombres	2	3	1
<b>LA CARLOTA</b>	Mujeres	1	3	1
Córdoba	Hombres	4	8	2
<b>Poniente Sur</b>	Mujeres	4	9	3
Córdoba	Hombres	3	7	2
<b>Santa Rosa</b>	Mujeres	3	7	2
Montilla	Hombres	2	5	2
<b>MONTILLA</b>	Mujeres	2	5	2
Baza	Hombres	4	8	2
<b>BAZA</b>	Mujeres	4	8	3
Granada	Hombres	3	7	2
<b>Gran Capitán</b>	Mujeres	3	7	2
Granada	Hombres	3	6	1
<b>Oeste Sur</b>	Mujeres	3	7	2
Granada	Hombres	2	3	1
<b>Zaidín Centro</b>	Mujeres	2	4	1
La Zubia	Hombres	4	7	1
<b>LA ZUBIA</b>	Mujeres	3	8	1
Huelva	Hombres	4	7	2
<b>POLIGONO SAN SEBASTIAN</b>	Mujeres	3	8	2
Isla Cristina	Hombres	3	5	1
<b>ISLA CRISTINA</b>	Mujeres	2	5	1
San Juan del P.	Hombres	3	6	1
<b>CAMPIÑA NORTE</b>	Mujeres	3	5	1
Alcalá la Real	Hombres	4	8	3

<b>ALCALÁ LA REAL</b>	<i>Mujeres</i>	4	8	4
Huelma	<i>Hombres</i>	2	4	2
<b>HUELMA</b>	<i>Mujeres</i>	2	4	1
Linares	<i>Hombres</i>	4	8	2
<b>LINARES B</b>	<i>Mujeres</i>	4	8	3
Porcuna	<i>Hombres</i>	1	4	2
<b>PORCUNA</b>	<i>Mujeres</i>	1	3	2
Antequera	<i>Hombres</i>	4	8	2
<b>ANTEQUERA-EL TORCAL</b>	<i>Mujeres</i>	3	7	2
Estepona	<i>Hombres</i>	4	8	2
<b>ESTEPONA</b>	<i>Mujeres</i>	4	9	2
Málaga	<i>Hombres</i>	3	6	2
<b>CENTRO (MÁLAGA-PUERTO)</b>	<i>Mujeres</i>	3	7	2
Málaga	<i>Hombres</i>	3	6	1
<b>LA LUZ</b>	<i>Mujeres</i>	2	6	2
Málaga	<i>Hombres</i>	2	3	1
<b>PALMA-PALMILLA</b>	<i>Mujeres</i>	2	3	1
San Pedro de Alcántara	<i>Hombres</i>	3	6	1
<b>SAN PEDRO DE ALCANTARA</b>	<i>Mujeres</i>	3	6	1
Vélez-Málaga	<i>Hombres</i>	2	3	1
<b>VÉLEZ-SUR</b>	<i>Mujeres</i>	1	3	1
Cabezas de S. Juan	<i>Hombres</i>	2	3	1
<b>LAS CABEZAS DE SAN JUAN</b>	<i>Mujeres</i>	2	3	1
Castilleja de la C.	<i>Hombres</i>	7	12	2
<b>CASTILLEJA DE LA CUESTA</b>	<i>Mujeres</i>	7	12	2
Dos Hermanas	<i>Hombres</i>	3	5	1
<b>DOS HERMANAS A</b>	<i>Mujeres</i>	3	5	1
El Saucejo	<i>Hombres</i>	1	3	1
<b>EL SAUCEJO</b>	<i>Mujeres</i>	1	3	1
Sevilla	<i>Hombres</i>	3	6	1
<b>ALCOSA</b>	<i>Mujeres</i>	3	6	2
Sevilla	<i>Hombres</i>	2	5	1
<b>JUAN XXIII</b>	<i>Mujeres</i>	2	5	2
Sevilla	<i>Hombres</i>	3	6	2
<b>LOS REMEDIOS</b>	<i>Mujeres</i>	3	6	2
Sevilla	<i>Hombres</i>	4	9	2
<b>MORON</b>	<i>Mujeres</i>	4	9	2
Sevilla	<i>Hombres</i>	4	9	2
<b>POLIGONO NORTE</b>	<i>Mujeres</i>	4	9	3
Sevilla	<i>Hombres</i>	2	6	1
<b>SAN PABLO</b>	<i>Mujeres</i>	2	6	2
Sevilla	<i>Hombres</i>	2	5	1
<b>TORREBLANCA</b>	<i>Mujeres</i>	2	5	1

En el estudio final, la toma de muestras se realizó tal y como se ha descrito en el Estudio Piloto, tras comprobar que el protocolo propuesto inicialmente con alguna pequeña modificación funcionaba perfectamente.

## 4.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA.

### 4.2.1 PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE ENSAYO

#### **CADMIO (sangre total)**

##### *a) Limpieza de material*

- Todo el material de vidrio utilizado en el análisis después de lavar con detergente, debe mantenerse sumergido varios minutos en ácido nítrico al 50 % (v/v) y posteriormente enjuagado con agua desionizada.

- Los tubos de grafito nuevos y los usados, tras un periodo fuera de uso, deben acondicionarse siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- Las ventanas de cuarzo de la cámara de grafito deben limpiarse periódicamente para eliminar las salpicaduras que sobre ellas se depositan.

- Los conos de plástico para las micropipetas y los cubiletes de poliestireno deben mantenerse en sus bolsas de origen hasta el momento de su uso, para evitar cualquier tipo de contaminación. Una vez usados no podrán volver a utilizarse.

##### *b) Preparación de la muestra*

Una muestra de sangre total se diluye 1/7 tomando 100 $\mu$ L de sangre total y añadiéndole 600  $\mu$ L de modificador de matriz.

Programa del horno de grafito:

Etapa	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo Rampa (s)	Tiempo Mantenimiento (s)	Flujo interno
1	100	10	5	250
2	120	5	10	250
3	600	10	10	250
4	700	10	5	250
5	1600	0	5	0
6	2600	4	6	250

##### *c) Preparación de los patrones y curva de calibrado*

A partir de las disoluciones estándar indicadas en el apartado III.e se preparan disoluciones de concentración 0.5, 1 y 1.5  $\mu$ g/L dentro del rango de linealidad.

##### *d) Cálculo y expresión del resultado de ensayo*

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa en  $\mu$ g/L.



El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

*e) Validación del método analítico.*

Límite de detección: 0.05 µg/L

Límite de cuantificación: 0.15 µg/L

Intervalo de linealidad: 0-7 µg/L

Precisión: 3.45%

Exactitud: 3.34%

Valor de Cd certificado en CRM=  $6.2 \pm 0.5$  µg/L

Valor de Cd encontrado=  $6.29 \pm 0.21$  µg/L

Incertidumbre: 2.71%

## **NIQUEL (sangre total)**

*a) Limpieza de material*

- Todo el material de vidrio utilizado en el análisis después de lavar con agua, debe mantenerse sumergido varias horas en ácido nítrico al 15 % (v/v) y posteriormente enjuagado con agua desionizada.

- Los tubos de grafito nuevos y los usados, tras un periodo fuera de uso, deben acondicionarse siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- Las ventanas de cuarzo de la cámara de grafito deben limpiarse periódicamente para eliminar las salpicaduras que sobre ellas se depositan.

- Los conos de plástico para las micropipetas y los cubiletes de poliestireno deben mantenerse en sus bolsas de origen hasta el momento de su uso, para evitar cualquier tipo de contaminación. Una vez usados no podrán volver a utilizarse.

*b) Preparación de la muestra*

De una muestra de sangre total se toman 1000 µl y se le añaden 6 ml de HNO<sub>3</sub> 65% y 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y se digieren en el horno microondas con el siguiente programa de potencia:

Potencia Inicial (W)	Tiempo (minutos)	Potencia Final (W)	Ventilador (%)
250	2:00	250	25
0	2:00	0	25
250	6:00	400	25
400	5:00	650	25
650	2:00	650	25
800	3:00	800	25
0	15:00	0	100

Una vez que la muestra se ha enfriado se vierte en un matraz de 10 mL y se añade agua desionizada hasta enrase. Una alícuota de la muestra se deposita en el equipo de E.A.A (cámara de grafito), siempre que se encuentre en condiciones para el uso si cumple los requisitos ya definidos en el apartado "CONTROLES DE CALIDAD".

*c) Preparación de los patrones y curva de calibrado*

A partir de las disoluciones estándar indicadas en el apartado III.e se preparan disoluciones dentro del rango de linealidad.

*d. Cálculo y expresión del resultado de ensayo*

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa en  $\mu\text{g/L}$ .

El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

*e. Validación del método analítico.*

Límite de detección (en matriz): 2  $\mu\text{g/L}$   
 Límite de cuantificación (en matriz): 6  $\mu\text{g/L}$   
 Intervalo de linealidad: 6-60  $\mu\text{g/L}$   
 Recuperación: 100.5%  
 Precisión: 11.5%  
 Incertidumbre (al nivel más desfavorable): 26.4%

## MANGANESO (sangre total)

### a) Limpieza de material

- Todo el material de vidrio utilizado en el análisis después de lavar con agua, debe mantenerse sumergido varias horas en ácido nítrico al 15 % (v/v) y posteriormente enjuagado con agua desionizada.

- Los tubos de grafito nuevos y los usados, tras un periodo fuera de uso, deben acondicionarse siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- Las ventanas de cuarzo de la cámara de grafito deben limpiarse periódicamente para eliminar las salpicaduras que sobre ellas se depositan.

- Los conos de plástico para las micropipetas y los cubiletes de poliestireno deben mantenerse en sus bolsas de origen hasta el momento de su uso, para evitar cualquier tipo de contaminación. Una vez usados no podrán volver a utilizarse.

### b) Preparación de la muestra

De una muestra de sangre total se toman 1000  $\mu$ l y se le añaden 6 ml de HNO<sub>3</sub> 65% y 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y se digieren en el horno microondas con el siguiente programa de potencia:

Potencia Inicial (W)	Tiempo (minutos)	Potencia Final (W)	Ventilador (%)
250	2:00	250	25
0	2:00	0	25
250	6:00	400	25
400	5:00	650	25
650	2:00	650	25
800	3:00	800	25
0	15:00	0	100

Una vez que la muestra se ha enfriado se vierte en un matraz de 10 mL y se añade agua desionizada hasta enrase. Una alícuota de la muestra se deposita en el equipo de E.A.A (cámara de grafito), siempre que se encuentre en condiciones para el uso si cumple los requisitos ya definidos en el apartado "CONTROLES DE CALIDAD".

### c) Preparación de los patrones y curva de calibrado

A partir de las disoluciones estándar indicadas en el apartado III.e se preparan disoluciones dentro del rango de linealidad.

### d) Cálculo y expresión del resultado de ensayo

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa en  $\mu$ g/L.

El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

*e) Validación del método analítico.*

Límite de detección (en matriz): 0.4 µg/L  
Límite de cuantificación (en matriz): 1.0 µg/L  
Intervalo de linealidad: 1-100 µg/L  
Recuperación: 83.1%  
Precisión: 8.3%  
Incertidumbre (al nivel más desfavorable): 34.8%

## **TALIO (Orina)**

*a) Limpieza de material*

Todo el material de vidrio utilizado en el análisis después de lavar con detergente, debe mantenerse sumergido varios minutos en ácido nítrico al 50 % (v/v) y posteriormente enjuagado con agua purificada.

*b) Preparación de la muestra*

Las muestras, se prepararan mediante una dilución 1/10. Se depositan 5 ml de orina en matraces de 50 ml enrasando con la disolución de Bi (110 µg/L en 1.1% HNO<sub>3</sub>). Obteniéndose unas concentraciones de: 0, 10, 20, 30 y 40 µg/L de TI, en 100 µg/L de Bi, 1 % en HNO<sub>3</sub>.

*c) Preparación de los patrones y curva de calibrado*

Se toman 5 matraces de 200 ml y se numeran del 0 al 4, añadiendo los ml indicados en la siguiente tabla

Nº Matraz	0	1	2	3	4
ml (TI (10 mg/L))	0	2	4	6	8
Concentración final de TI (µg/L)	0	100	200	300	400

A partir de las disoluciones estándar indicadas en el apartado 2.1 se preparan disoluciones dentro del rango de linealidad. Hacer la regresión y comprobar si  $r^2 \geq 0.999$ .

d) *Cálculo y expresión del resultado de ensayo*

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa en  $\mu\text{g/L}$  (orina de 24 h).

El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

e) *Validación del método analítico.*

Límite de detección:  $0.24 \mu\text{g/L}$

Límite de cuantificación:  $0.80 \mu\text{g/L}$

Intervalo de linealidad:  $0.3 - 600 \mu\text{g/L}$

Precisión: 5.7%

Exactitud: según la t de Student se cumple que  $1,08 < 2.262$  ( $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$ ), por lo tanto, el método se considera exacto.

Valor de TI certificado en CRM=  $10.0 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$

Valor de TI encontrado=  $9.8 \pm 0.25 \mu\text{g/L}$

Incertidumbre: 12%

En la siguiente tabla se resumen los parámetros de la validación de los métodos analíticos desarrollados.

**Tabla 4. Validación de los métodos analíticos**

	<b>Cadmio</b>	<b>Níquel</b>	<b>Manganeso</b>	<b>Talio</b>
<b>Límite de detección (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	0,05	2	0,4	0,24
<b>Límite de cuantificación (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	0,15	6	1	0,80
<b>Intervalo de linealidad (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	0 – 7	6 – 60	1 – 100	0,3 – 600
<b>Precisión (%)</b>	3,45	11,5	8,3	5,7
<b>Valor certificado en CRM (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	$6,2 \pm 0,5$			$10 \pm 0,5$
<b>Valor encontrado (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	$6,29 \pm 0,21$			$9,8 \pm 0,25$
<b>Incertidumbre (%)</b>	2,71	26,4	46,6	12

#### 4.3 NIVELES DE METALES PESADOS

Las determinaciones analíticas de las muestras recogidas y siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior han arrojado los siguientes resultados.

##### 4.3.1. ESTUDIO PILOTO

De acuerdo con la metodología indicada para el muestreo, la afijación de cada estrato se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. - Tamaño muestral de cada estrato en cada localidad muestreada**

	12-24 Años		25-59 Años		60-75 Años	
	Varón	Mujer	Varón	Mujer	Varón	Mujer
Málaga	1	1	3	3	1	1
Marbella	1	1	3	3	1	1
Cártama	1	1	3	3	1	1
Aznalcóllar	2	1	3	2	1	1
Sanlúcar la Mayor	3	3	4	4	1	1
Benacazón	1	1	1	1		

A partir de los resultados obtenidos en el mismo se hizo una estimación del tamaño muestral del estudio final, según las precisiones alcanzables en los distintos metales (Tabla 6). Se estimó tomar 1000 personas de la zona no afectada por el vertido (población andaluza) y 800 personas de la zona afectada.

**Tabla 6.- Precisiones estimadas para el estudio final**

	Población No Afectada (N=1000)		Población Afectada (N=800)	
	Precisión Absoluta	Precisión Relativa	Precisión Absoluta	Precisión Relativa
Plomo	1.92	2.8%	5.47	8.3%
Níquel	6.98	9.5%	1.78	5.2%
Cadmio	0.01	5.4%	0.05	5.5%
Arsénico	0.0013	5.7%	0.0008	5.3%
Mercurio	0.14	4.8%	0.16	5.8%
Cinc	9.28	1.0%	11.01	1.1%

#### 4.3.2. ESTUDIO FINAL

En tabla 7 se recogen los niveles medios de los diferentes metales estudiados tanto en la zona afectada por el vertido como al resto de Andalucía. Así mismo, se incluyen los valores de referencia en el ámbito laboral y en algunos estudios realizados en la población general.

Como puede observarse las concentraciones de Cadmio en la población de la zona afectada y la no afectada, son siempre inferiores a los valores de referencia encontrados por otros autores en población general. Además, de nuestros resultados no se desprende ningún tipo de contaminación por este metal en la población andaluza, en ninguna de las dos zonas consideradas. En todos los casos, los niveles se encuentran por debajo de los considerados como una exposición excesiva en el ámbito laboral, es decir, por encima de 5 µg/l de cadmio.

En el caso del manganeso, la media (y el rango) de los valores encontrados en nuestro estudio están en concordancia con los datos aportados por otros estudios (Baselt, 1980; ATSDR, 2000; Bader et al., 1999), aunque son ligeramente superiores a los hallados por Minoia et al. (1990) y Oberdoester et al. (1988). En cuanto a los valores de referencia en el ámbito laboral, Lauwerys (1993) propone un valor de referencia que es inferior a los valores que hemos encontrado en la población general. A nuestro entender, dicha propuesta nos parece irreal. Además, ni la ACGH ni el Instituto de Higiene y seguridad en el Trabajo han establecido un valor de referencia para el manganeso en fluidos biológicos. En definitiva, los valores medios de manganeso en la población andaluza pueden considerarse dentro de la normalidad en ambos casos (población general y población andaluza).

El níquel plantea ciertos interrogantes a la hora de interpretar los valores encontrados en la población andaluza. Lo primero que llama la atención es la falta de valores de referencia tanto a nivel general como en el ámbito laboral. Los pocos datos existentes corresponden a suero o plasma, como los indicados en la tabla 7. Templeton et al (1994) en una revisión sobre valores de referencia de níquel en suero, plasma, sangre y orina destacan el hecho de que existen pocos estudios de niveles de níquel en sangre total, por lo que el contenido de este metal sigue siendo incierto. Según refiere Baselt (1980), los valores en sangre serían aproximadamente el doble que en suero. Admitiendo esta relación entre la concentración de níquel en suero y sangre total, y de acuerdo con los valores de Ni en suero encontrados por Schaller et al. (1994), nuestros resultados estarían en consonancia con los referidos por dicho autor.

De cualquier forma lo más destacable en este caso es la ausencia de valores de referencia en sangre total de población general española. Por tanto, dada la escasez de datos disponibles, los resultados que aportamos en nuestro estudio pueden suponer una importante aportación.

Aunque no hemos encontrado diferencias entre nuestros datos y los disponible en la bibliografía, hemos observado en algún caso diferencias estadísticamente significativas en algún caso entre los niveles en la zona afectada y

la zona no afectada (resto de Andalucía). De la misma forma, también hemos encontrado diferencias entre provincias, por lo que a continuación se hace un análisis detallado de los resultados obtenidos para cada metal teniendo en cuenta posibles factores que pudieran influir (edad, sexo, índice de masa corporal, tabaco, alcohol, dieta).



**Tabla 7. Niveles medios de metales en sangre y valores de referencia.**

<b>METAL</b>	<b>ZONA NO AFECTADA</b>	<b>ZONA AFECTADA</b>	<b>VALOR DE REFERENCIA LABORAL</b>	<b>VALORES DE REFERENCIA EN POBLACION GENERAL</b>
<b>CADMIO</b> ( $\mu\text{g/L}$ ) sangre total	<b>0,142</b>  (0,128-0,157)	<b>0,187</b>  (0,161-0,217)	<b>&gt;5 <math>\mu\text{g/L}</math></b> , exposición excesiva [2]	<b>1,58-3,82 <math>\mu\text{g/L}</math></b> , en 371 mujeres, Japón [1] <b>1-4 <math>\mu\text{g/L}</math></b> , en adultos sanos [2] <b>0,3-1,2 <math>\mu\text{g/L}</math></b> (no fumadores) ; <b>0,6-3,9 <math>\mu\text{g/L}</math></b> (fumadores) [3] <b>1 <math>\mu\text{g/L}</math></b> (no fumadores, adultos) [4] <b>0,1-1,7 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [5] <b>0,7 <math>\mu\text{g/L}</math></b> (valor medio, no fumadores) [6]
<b>NÍQUEL</b> ( $\mu\text{g / L}$ ) sangre total	<b>11,748</b>  (11,097-12,438)	<b>13,563</b>  (12,582-14,619)	---	<b>0,6-7,5 <math>\mu\text{g/L}</math></b> (en suero) [7] <b>1,3-3,3 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [5] sangre = suero x 2 [2]
<b>MANGANESO</b> ( $\mu\text{g / L}$ ) sangre total	<b>13,153</b>  (12,642-13,685)	<b>13,469</b>  (12,767-14,209)	<b>&lt; 10 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [11]	<b>3,9-15 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [2] <b>4-14 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [8] <b>2,6-15,1 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [9] <b>7,1-10,5 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [5] <b>7-12 <math>\mu\text{g/L}</math></b> [10]

[1]. Ikeda M, Watanabe T, Zhang ZW, Moon CS, Shimbo S. The integrity of the liver among people environmentally exposed to cadmium at various levels. *Int Arch Occup Environ Health* 69, 379-385, 1997.

[2] Baselt, RC. *Biological Monitoring Methods for Industrial Chemicals*. Biomedical Publications. Davis, California. 1980.

[3] Laboratory Corporation of America. Holdings and Lexi, Comp. Inc. ([www.labcorp.com/datasets](http://www.labcorp.com/datasets))

[4] Ewers V, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int Arch Occup Environ Health* 72, 255-260. 1999

[5] Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P et al. Trace element reference values in tissues from inhabitants of European Community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Tot Environ* 95, 89, 1990.

[6] Staessen J, Yeoman N, Fletcher A et al. Blood cadmium in London civil servants. *Int J Epidemiol*, 19, 362, 1990.

[7] Schaller KH et al. Nickel. *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*. HG Seiler et al. (eds.) Marcel Dekker, New York, 505-518 (1994)

[8] ATSDR. Toxicological Profile for Manganese, 2000.

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

[10] Oberdoester G, Cherian G. Manganese. En: *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Rochester Series on Environmental Toxicity. Th Clarkson, L Friberg, G Nordberg, P Sager (eds). Plenum Press, New York, 1988.

[11] Lauwerys R, Hoet P. *Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring*. 2<sup>nd</sup> ed. Lewis Publishers, Boca Raton, 1993.

## **ANÁLISIS DEL NÍQUEL**

La tabla 8 muestra los niveles medios de níquel, ajustados por consumo de tabaco y alcohol en la población andaluza (sin incluir la población de la zona afectada para evitar posibles sesgos). Como se observa, las diferencias entre los niveles de níquel entre fumadores y también entre bebedores no son estadísticamente significativas, aunque estos niveles son mayores en no fumadores y no bebedores. A pesar de estos datos, en el modelo multivariante, ajustaremos por alcohol y tabaco ya que las significaciones ( $p=0,12$  en el caso del alcohol y  $p=0,20$  en el caso del tabaco) lo permiten.

**Tabla 8.- Niveles medios de níquel ( $\mu\text{g/L}$ ) entre fumadores/ no fumadores y bebedores/ no bebedores en población andaluza (zona no afectada).**

	No	Sí	Significación
<b>Alcohol</b>	12,280	11,229	0,157
<b>Tabaco</b>	12,083	11,067	0,201

Con respecto al sexo (tabla 9) se puede observar que los niveles de níquel son similares entre hombres y mujeres, no encontrándose tampoco diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 9.- Niveles medios de níquel ( $\mu\text{g/L}$ ) en población andaluza (zona no afectada) ajustados por sexo.**

	Varón	Mujer	Significación
<b>Sexo</b>	11,531	11,989	0,541

En la tabla 10 se aprecia que no existe correlación entre los niveles de níquel y la edad ni tampoco entre el IMC (Índice de Masa Corporal) y los niveles de níquel.

**Tabla 10.- Correlación entre niveles de níquel ( $\mu\text{g/L}$ ) y edad e IMC en población andaluza (zona no afectada).**

	Coefficiente Correlación Pearson	Significación
<b>Edad</b>	0,042	0,341
<b>IMC</b>	0,012	0,781

Tras el análisis multivariante (regresión lineal múltiple) en la tabla 11 observamos que los niveles medios de níquel, ajustados por los factores de confusión: edad, sexo, alcohol y tabaco, son mayores en la zona afectada que en la zona no afectada, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 11.- Niveles medios de Níquel ( $\mu\text{g/L}$ ) ajustados por edad, sexo, alcohol y tabaco**

Niveles medios de Níquel Ajustados por Edad, Sexo, Alcohol y Tabaco	No Afectada	Afectada	Significación	Nivel máximo permitido
		11,748		13,563
IC(95%)	11,097 - 12,438	12,582 – 14,619		

En la tabla 12 se recogen los niveles medios de níquel en cada una de las provincias andaluzas ajustados mediante análisis multivariante (regresión lineal múltiple) y controlando por los mismos factores de confusión. Los valores más elevados corresponden a la provincia de Sevilla, mientras que los menores se encuentran en la provincia de Huelva.

**Tabla 12.- Niveles medios de Níquel ( $\mu\text{g/L}$ ) en cada una de las provincias de Andalucía (zona no afectada) ajustados por edad, sexo, alcohol y tabaco.**

Niveles Medios por provincias ajustados por edad, sexo alcohol y tabaco.				
Provincia	Media (Geométrica)	Límite Inferior	Límite Superior	N
Almería	10.807	8.684	13.449	41
Cádiz	12.798	10.829	15.125	70
Córdoba	11.006	8.407	14.410	27
Granada	12.801	10.772	15.211	66
Huelva	8.170	6.690	9.978	49
Jaén	10.858	8.791	13.411	44
Málaga	11.791	10.592	13.125	171
Sevilla	15.274	12.691	18.383	57

Al comparar los niveles medios que hemos encontrado entre las diferentes provincias, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre:

- Sevilla y Almería, Córdoba, Huelva ( $p < 0,001$ ), Jaén y Málaga ( $p < 0,05$ ).
- Huelva y Málaga, Granada y Cádiz ( $p < 0,05$ ).

Para estudiar la posible relación de los niveles de níquel con la ingesta de algunos alimentos, se han estudiado las correlaciones entre los niveles de níquel y la frecuencia de consumo de los alimentos. Dado que la variable que recoge la

frecuencia de ingesta es ordinal, se ha usado el coeficiente de correlación de Spearman tanto con el níquel como con el resto de los metales analizados en este informe. Los resultados que se muestran en la tabla 13, corresponden a la muestra de la población andaluza (zona no afectada).

**Tabla 13.- Correlaciones (Spearman) entre los niveles de Níquel en la población andaluza (zona no afectada) y la frecuencia de ingesta de alimentos.**

		Ni
<b>Ingesta de leche diaria en cc</b>	Coeficiente de correlación	-0,02762771
	Sig. (bilateral)	0,52762073
	N	525
<b>Ingesta de pan diaria en gr</b>	Coeficiente de correlación	0,07114775
	Sig. (bilateral)	0,10344474
	N	525
<b>Ingesta de azúcar diaria en gr</b>	Coeficiente de correlación	-0,02572231
	Sig. (bilateral)	0,55648893
	N	525
<b>HUEVOS</b>	Coeficiente de correlación	0,03229517
	Sig. (bilateral)	0,4606984
	N	524
<b>ENSALMIX</b>	Coeficiente de correlación	-0,0120045
	Sig. (bilateral)	0,78396988
	N	524
<b>CERDO</b>	Coeficiente de correlación	-0,02041773
	Sig. (bilateral)	0,64098954
	N	524
<b>VACUNO</b>	Coeficiente de correlación	-0,00199137
	Sig. (bilateral)	0,96372819
	N	524
<b>POLLO</b>	Coeficiente de correlación	0,0772194
	Sig. (bilateral)	0,07738756
	N	524
<b>ROSADA</b>	Coeficiente de correlación	0,01374179
	Sig. (bilateral)	0,75365198
	N	524
<b>MERLUZA</b>	Coeficiente de correlación	0,04851717
	Sig. (bilateral)	0,26759869
	N	524
<b>PEZESPAD</b>	Coeficiente de correlación	0,01044114
	Sig. (bilateral)	0,81153649
	N	524
<b>BOQUERON</b>	Coeficiente de correlación	0,03834836
	Sig. (bilateral)	0,38099745
	N	524
<b>SARDINAS</b>	Coeficiente de correlación	0,05545611

	Sig. (bilateral)	0,20501505
	N	524
<b>GAMBAS</b>	Coeficiente de correlación	0,0659111
	Sig. (bilateral)	0,13185944
	N	524
<b>CAMARON</b>	Coeficiente de correlación	-0,03005743
	Sig. (bilateral)	0,49236131
	N	524
<b>CANGREJO</b>	Coeficiente de correlación	0,03522268
	Sig. (bilateral)	0,42104587
	N	524
<b>MEJILLON</b>	Coeficiente de correlación	-0,02434337
	Sig. (bilateral)	0,5782131
	N	524
<b>ALMEJAS</b>	Coeficiente de correlación	0,02849925
	Sig. (bilateral)	0,51507747
	N	524

Como podemos observar, no hemos encontrado ninguna correlación entre los niveles de níquel y la frecuencia de ingesta de los alimentos estudiados, aunque se observan indicios de correlación significativa ( $p= 0,077$ ) en el caso del pollo, pues el consumo del mismo parece asociarse a niveles más altos de níquel.

## **ANÁLISIS DEL MANGANESO**

La tabla 14 muestra la relación entre los niveles medios de manganeso ajustados y el consumo de tabaco y alcohol en la población andaluza. No hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre los niveles de manganeso y estas variables. En el caso del tabaco ( $p = 0,171$ ) lo tendremos en cuenta en el modelo multivariante y ajustaremos por dicha variable.

**Tabla 14.- Niveles medios de manganeso ( $\mu\text{g/L}$ ) entre fumadores/ no fumadores y bebedores/ no bebedores en población andaluza (zona no afectada).**

	No	Si	Significación
Alcohol	13,427	12,810	0,217
Tabaco	13,350	12,614	0,171

En la tabla 15 podemos ver que existen diferencias en los niveles de manganeso entre hombres y mujeres de la población andaluza, siendo las mujeres las que presentan unos niveles más altos.

**Tabla 15.- Niveles medios de manganeso ( $\mu\text{g/L}$ ) en población andaluza (zona no afectada) ajustados por sexo.**

	Varón	Mujer	Significación
Sexo	12,634	13,640	0,045

No hemos encontrado correlación entre los niveles de manganeso por edad, y por el Índice de Masa Corporal (Tabla 16).

**Tabla 16.- Correlación entre niveles de manganeso ( $\mu\text{g/L}$ ) y edad e IMC en población andaluza (zona no afectada).**

	Coefficiente Correlación Pearson	Significación
Edad	-0,035	0,436
BMI	-0,060	0,185

Mediante el análisis multivariante (regresión lineal múltiple) en la tabla 17 observamos que aunque los niveles medios de manganeso, ajustados por los factores de confusión (edad, sexo, tabaco e IMC) son ligeramente superiores en la zona afectada, esta diferencia dista mucho de ser estadísticamente significativa.

**Tabla 17.- Niveles medios de Manganeso ( $\mu\text{g/L}$ ) ajustados por edad, sexo, tabaco e IMC**

Niveles Medios de Manganeso Ajustados por Edad, Sexo, Tabaco e IMC	No Afectada	Afectada	Significación	Nivel máximo permitido
		13,153		
IC(95%)	12,642 - 13,685	12,767 - 14,209	0,485	Ver Tabla 7

En la tabla 18 podemos ver la distribución de los niveles de manganeso en las distintas provincias andaluzas, expresados como valores medios ajustados mediante análisis multivariante (regresión lineal múltiple). Se observa dispersión y variabilidad entre provincias, siendo las provincias de Córdoba y Granada las que presentan valores más elevados, superando con mucho a los valores encontrados en la zona afectada. Sevilla es la provincia que presenta unos niveles más bajos de manganeso.

**Tabla 18- Niveles medios de manganeso ( $\mu\text{g/L}$ ) por provincias andaluzas (zona no afectada) ajustados por edad, sexo, tabaco e IMC**

Niveles Medios por provincias ajustados por edad, sexo, tabaco y IMC				
Provincia	Media (Geométrica)	Límite Inferior	Límite Superior	N
Almería	13.577	12.059	15.285	41
Cádiz	14.876	13.602	16.269	71
Córdoba	15.500	13.587	17.682	33
Granada	16.137	14.693	17.723	65
Huelva	11.530	10.339	12.858	48
Jaén	15.197	13.553	17.039	44
Málaga	12.861	12.062	13.714	139
Sevilla	8.327	7.528	9.211	56

Al comparar por provincias se observan diferencias estadísticamente significativas entre:

- Sevilla y el resto de las provincias andaluzas ( $p < 0,001$ );
- Huelva y el resto de provincias salvo Málaga ( $p > 0,05$ ).

Por último, en la tabla 19, mostramos las correlaciones entre los niveles de manganeso y la frecuencia de ingesta de alimentos en la muestra de la población andaluza (zona no afectada).

**Tabla 19.- Correlaciones (Spearman) entre los niveles de Manganeso en la población andaluza (zona no afectada) y la frecuencia de ingesta de alimentos.**



		Mn
<b>Ingesta de leche diaria en cc</b>	Coeficiente de correlación	0,11201066
	Sig. (bilateral)	0,01177489
	N	505
<b>Ingesta de pan diaria en gr</b>	Coeficiente de correlación	-0,10731977
	Sig. (bilateral)	0,01583453
	N	505
<b>Ingesta de azúcar diaria en gr</b>	Coeficiente de correlación	0,06010582
	Sig. (bilateral)	0,17747103
	N	505
<b>HUEVOS</b>	Coeficiente de correlación	0,00346676
	Sig. (bilateral)	0,93811792
	N	504
<b>ENSALMIX</b>	Coeficiente de correlación	0,1042742
	Sig. (bilateral)	0,01920521
	N	504
<b>CERDO</b>	Coeficiente de correlación	0,02198353
	Sig. (bilateral)	0,62246263
	N	504
<b>VACUNO</b>	Coeficiente de correlación	-0,01504017
	Sig. (bilateral)	0,73624384
	N	504
<b>POLLO</b>	Coeficiente de correlación	0,04973844
	Sig. (bilateral)	0,26504648
	N	504
<b>ROSADA</b>	Coeficiente de correlación	0,00286418
	Sig. (bilateral)	0,94885784
	N	504
<b>MERLUZA</b>	Coeficiente de correlación	-0,01070631
	Sig. (bilateral)	0,81051159
	N	504
<b>PEZESPADA</b>	Coeficiente de correlación	-0,07154632
	Sig. (bilateral)	0,10865256
	N	504
<b>BOQUERON</b>	Coeficiente de correlación	0,01160173
	Sig. (bilateral)	0,7950024
	N	504
<b>SARDINAS</b>	Coeficiente de correlación	-0,02015526
	Sig. (bilateral)	0,65169632
	N	504
<b>GAMBAS</b>	Coeficiente de correlación	-0,01966789
	Sig. (bilateral)	0,65958273
	N	504
<b>CAMARON</b>	Coeficiente de correlación	-0,08347697
	Sig. (bilateral)	0,06111403
	N	504
<b>CANGREJO</b>	Coeficiente de correlación	0,02407922

	Sig. (bilateral)	0,58967078
	N	504
<b>MEJILLON</b>	Coeficiente de correlación	-0,04673121
	Sig. (bilateral)	0,29506254
	N	504
<b>ALMEJAS</b>	Coeficiente de correlación	0,00296704
	Sig. (bilateral)	0,94702387
	N	504
*	La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).	
**	La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).	

Como se observa en la tabla, existe una correlación inversa entre la ingesta de pan y los niveles de manganeso y directa entre dichos niveles y la frecuencia de consumo de ensalada mixta. Asimismo, se observan indicios de correlación inversa con la ingesta del camarón, pues el consumo del mismo parece asociarse a niveles más bajos de manganeso.

Con objeto de corregir el posible efecto de estos alimentos sobre el manganeso, en la siguiente tabla se muestran los niveles medios de este metal ajustados, además de por las variables mostradas en la tabla 18, por ingesta de pan y de ensalada mixta.

**Tabla 20. Niveles medios de manganeso ( $\mu\text{g/L}$ ) por provincias ajustados por edad, sexo, tabaco, IMC, ingesta de pan y de ensalada mixta en la población andaluza (zona no afectada).**

<b>Niveles Medios por provincias ajustados por edad, sexo, tabaco, IMC, ingesta de pan y de ensalada mixta</b>	
<b>Provincia</b>	<b>Media (Geométrica)</b>
<b>Almería</b>	13,445
<b>Cádiz</b>	14,982
<b>Córdoba</b>	15,312
<b>Granada</b>	15,907
<b>Huelva</b>	11,595
<b>Jaén</b>	15,258
<b>Málaga</b>	12,905
<b>Sevilla</b>	8,446

Los niveles medios calculados en este modelo no se diferencian sustancialmente de los obtenidos en el modelo anterior, manteniéndose las mismas diferencias significativas en la comparación por provincias.

## **ANÁLISIS DEL CADMIO**

La tabla 21 muestra los niveles medios de cadmio ajustados por consumo de tabaco y alcohol en la población andaluza (sin incluir la población de la zona afectada para evitar posibles sesgos). Se puede apreciar una fuerte relación entre el alcohol y los niveles de cadmio, siendo mayores los niveles entre los bebedores. Más fuerte aún es la relación observada entre los niveles de cadmio y el tabaco, siendo los niveles de cadmio en fumadores casi seis veces superiores a los niveles de no fumadores. Esta diferencia es muy significativa y puede deberse al hecho de que el tabaco constituye un aporte conocido de cadmio. En el caso del alcohol, la explicación más probable es que estos individuos son, a su vez, en su mayoría fumadores, lo cual podría distorsionar el resultado.

**Tabla 21.- Niveles medios de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) entre fumadores/ no fumadores y bebedores/ no bebedores en población andaluza (zona no afectada).**

	No	Sí	Significación
<b>Alcohol</b>	0,117	0,383	0,002
<b>Tabaco</b>	0,083	0,462	<0,001

En la tabla 22 encontramos que los niveles de cadmio entre hombres y mujeres no presentan diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 22.- Niveles medios de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) en población andaluza (zona no afectada) ajustando por sexo .**

	Varón	Mujer	Significación
<b>Sexo</b>	0,131	0,147	0,352

No se observa correlación entre la edad y el cadmio (tabla 23). La relación entre los niveles de cadmio y el IMC podemos decir que es prácticamente nula.

**Tabla 23.- Correlación entre niveles de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) y edad e IMC en población andaluza (zona no afectada).**

	Coefficiente Correlación Pearson	Significación
<b>Edad</b>	0,057	0,175
<b>BMI</b>	0,001	0,981

En la tabla 24 se muestran los niveles medios de cadmio ajustados por edad, sexo, alcohol y tabaco mediante modelo de regresión lineal múltiple. Estos valores son significativamente superiores en la población afectada por el vertido.

**Tabla 24.- Niveles medios de cadmio ajustados por edad, sexo, alcohol y tabaco ( $\mu\text{g/L}$ )**

Niveles Medios de Cadmio Ajustados por Edad, Sexo, Alcohol y Tabaco	No Afectada	Afectada	Significación	Nivel máximo permitido
	0,142	0,187		0,001
IC (95%)	0,128 - 0,157	0,161 - 0,217		

La población de la zona afectada presenta niveles más altos de Cadmio, lo cual podría estar relacionado con una posible contaminación ambiental, secundaria o no al vertido, y en consonancia con el carácter acumulativo de este metal. De todas formas, los niveles absolutos se encuentran dentro de la normalidad (ver Tabla 7), lo cual permite descartar cualquier posible incidencia desde el punto de vista sanitario.

En la Tabla 25 podemos ver la distribución de los niveles de cadmio en las distintas provincias andaluzas expresados como valores medios ajustados mediante análisis multivariante (regresión lineal múltiple). Se observa una gran variabilidad y, en especial, unos valores muy elevados para la provincia de Granada.

**Tabla 25.- Niveles medios de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) por provincias andaluzas (zona no afectada) ajustados por edad, sexo, tabaco e IMC**

Niveles Medios por provincias ajustados por edad, sexo, tabaco y alcohol				
Provincia	Media (Geométrica)	Límite Inferior	Límite Superior	N
Almería	0.103	0.072	0.147	42
Cádiz	0.089	0.068	0.117	73
Córdoba	0.081	0.055	0.120	35
Granada	0.263	0.200	0.347	70
Huelva	0.170	0.126	0.231	58
Jaén	0.125	0.093	0.169	59
Málaga	0.171	0.144	0.205	171
Sevilla	0.101	0.075	0.136	59

Las comparaciones de estos niveles medios entre las provincias arrojaron diferencias significativas entre:

- Granada y todas las provincias excepto Huelva ( $p < 0,05$ ),
- Málaga y todas las provincias salvo Huelva y Jaén ( $p < 0,05$ )
- Huelva y todas las provincias salvo Granada, Jaén y Málaga ( $p < 0,05$ ).

Por último, en la Tabla 26 se muestran las correlaciones entre los niveles de cadmio y la frecuencia de ingesta de alimentos. Los datos corresponden a la muestra de la población andaluza (zona no afectada). Se observa que existen correlaciones positivas y muy significativas entre los niveles de cadmio y la ingesta de pescados y mariscos en general así como con el consumo de ensalada mixta.

Destacan, en particular los resultados obtenidos para la rosada ( $r = 0,206$ ;  $p < 0,001$ ) y para el camarón ( $r = 0,124$ ;  $p = 0,003$ ).

**Tabla 26.- Correlaciones (Spearman) entre los niveles de Cadmio en la población andaluza (zona no afectada) y la frecuencia de ingesta de alimentos.**

		<b>Cd</b>
<b>Ingesta de leche diaria en cc</b>	Coeficiente de correlación	-0,05336021
	Sig. (bilateral)	0,20454788
	N	567
<b>Ingesta de pan diaria en gr</b>	Coeficiente de correlación	-0,03936984
	Sig. (bilateral)	0,34939715
	N	567
<b>Ingesta de azúcar diaria en gr</b>	Coeficiente de correlación	0,0431533
	Sig. (bilateral)	0,30500171
	N	567
<b>HUEVOS</b>	Coeficiente de correlación	-0,04330166
	Sig. (bilateral)	0,3037692
	N	566
<b>ENSALMIX</b>	Coeficiente de correlación	0,10457137
	Sig. (bilateral)	0,01280455
	N	566
<b>CERDO</b>	Coeficiente de correlación	0,03689193
	Sig. (bilateral)	0,38100564
	N	566
<b>VACUNO</b>	Coeficiente de correlación	0,00162982
	Sig. (bilateral)	0,96913838
	N	566
<b>POLLO</b>	Coeficiente de correlación	0,02651364
	Sig. (bilateral)	0,52902466
	N	566
<b>ROSADA</b>	Coeficiente de correlación	0,20570818
	Sig. (bilateral)	1E-06
	N	566
<b>MERLUZA</b>	Coeficiente de correlación	-0,01414395
	Sig. (bilateral)	0,73704571
	N	566
<b>PEZESPAD</b>	Coeficiente de correlación	-0,02967324
	Sig. (bilateral)	0,48109445
	N	566
<b>BOQUERON</b>	Coeficiente de correlación	0,06947698
	Sig. (bilateral)	0,09868723
	N	566
<b>SARDINAS</b>	Coeficiente de correlación	0,09360364
	Sig. (bilateral)	0,02595602
	N	566
<b>GAMBAS</b>	Coeficiente de correlación	0,10351853
	Sig. (bilateral)	0,01374106

	N	566
<b>CAMARON</b>	Coeficiente de correlación	0,12388086
	Sig. (bilateral)	0,00315639
	N	566
<b>CANGREJO</b>	Coeficiente de correlación	0,10904089
	Sig. (bilateral)	0,00942679
	N	566
<b>MEJILLON</b>	Coeficiente de correlación	0,08075266
	Sig. (bilateral)	0,05485082
	N	566
<b>ALMEJAS</b>	Coeficiente de correlación	0,00315925
	Sig. (bilateral)	0,94021869
	N	566
*	La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).	
**	La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).	

Al igual que en el caso del manganeso, para corregir el posible efecto de estos alimentos en los niveles de cadmio, en la siguiente tabla se muestran los niveles medios de dicho metal ajustados, además de por las variables mostradas en la tabla 25, por ingesta de ensalada mixta, rosada, sardinas, gambas, camarones y cangrejos.

**Tabla 27.- Niveles medios de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) por provincias ajustados por edad, sexo, tabaco, IMC e ingesta de diversos alimentos en la población andaluza (zona no afectada).**

<b>Niveles Medios por provincias ajustados por edad, sexo, tabaco, IMC, ingesta de ensalada mixta, rosada, sardinas, gambas, camarones y cangrejos</b>	
<b>Provincia</b>	<b>Media (Geométrica)</b>
<b>Almería</b>	0,107
<b>Cádiz</b>	0,092
<b>Córdoba</b>	0,074
<b>Granada</b>	0,247
<b>Huelva</b>	0,181
<b>Jaén</b>	0,124
<b>Málaga</b>	0,170
<b>Sevilla</b>	0,106

Los niveles medios calculados son similares a los obtenidos en el modelo anterior, manteniéndose el rango en cuanto a niveles más altos o más bajos entre provincias. Las diferencias significativas entre provincias tampoco se alteran en este modelo.

## 5. CONCLUSIONES

Hay que destacar el hecho de que este estudio representa el primer trabajo de estas características que se ha hecho en nuestra Comunidad Autónoma y, según nuestra información, no existe tampoco ninguno a nivel nacional. Por otra parte, los trabajos recogidos en la bibliografía no están basados en un número tan elevado de muestras, por lo que queda clara la trascendencia de los resultados obtenidos en nuestro estudio a la hora de establecer unos niveles de referencia para trabajos futuros. Fue precisamente, la escasez de datos sobre los niveles de metales pesados en fluidos biológicos de la población general uno de los pilares básicos en que se apoyó este proyecto.

De acuerdo con los objetivos inicialmente propuestos y los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han establecido métodos validados de análisis para la determinación de cadmio (Cd), níquel (Ni) y manganeso (Mn) en sangre total empleando técnicas de espectrofotometría de absorción atómica, así como de talio (Tl) en orina mediante espectrometría de masas con inducción de plasma (ICP). Esto ha permitido realizar las determinaciones con garantías analíticas de calidad.
- Se han redactado los procedimientos normalizados de trabajo para análisis de cadmio, níquel y manganeso en sangre total y de talio en orina, de acuerdo con las normas EN 45000 e ISO 25.
- La población general andaluza presenta unos “niveles de impregnación” de cadmio, níquel y manganeso que, en todos los casos, se encuentran dentro de la normalidad en comparación con los datos publicados tanto para población general como laboral.
- En la población de la zona afectada por el vertido los resultados obtenidos se sitúan, en todos los casos, por debajo de los valores de referencia, al igual que ocurre con la población general (zona no afectada). No existen evidencias de que el vertido haya tenido incidencia sobre la población de la zona afectada.
- Aunque los niveles más altos de cadmio y níquel en la población afectada por el vertido con relación a los de la zona no afectada, podrían sugerir una exposición diferente entre dichas poblaciones, los datos disponibles no permiten establecer una relación de causalidad. Estas diferencias podrían estar también relacionadas con otros factores, básicamente derivados de la contaminación ambiental y/o de la dieta.

- Con los niveles medios de cadmio, níquel y manganeso en sangre obtenidos en este estudio se puede descartar la existencia de posibles riesgos a medio/largo plazo para la población de la zona afectada, ya que en ningún caso se superan los valores de referencia conocidos.
- El análisis de los datos de la encuesta alimentaria realizada en este estudio muestra asociaciones entre las concentraciones de cadmio y manganeso y la ingesta de algunos alimentos. En el caso del cadmio se ha observado una correlación positiva con la ingesta de ensalada mixta, rosada, sardinas, gambas, camarón y cangrejo. Con relación a los niveles de manganeso en sangre se ha observado una correlación positiva con la ingesta de leche y ensalada mixta y negativa con la ingesta de pan. No obstante, estos datos no nos permiten establecer una asociación causal.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

AA Winlab Analysis Systems. Atomic Spectrometry. Troubleshooting. Perkin Elmer 1998.

Analyst 800. Atomic Absorption Spectrometer. User Guide Perkin Elmer 1998.

Analytical Methods. Atomic Absorption Spectrometer. Perkin Elmer 1996.

Annual Book of ASTM Standards. Part 31, Easton (USA), 1980.

ATSDR. Toxicological Profile for Manganese, 2000.

Azorín F., Sánchez-Crespo J.L. (1986), Métodos y aplicaciones del muestreo. Alianza Universidad textos, Alianza editorial.

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

Barany E, Bergdhal IA, Bratteby LE, Lundh T, Samuelson G, SchutzA, Skerfving S, Oskarsson A (2002). Trace elements in whole blood and serum from Swedish adolescents. *Sci Total Environ*. 286(1-3), 129-41.

Barwiz VJ y Ellison SL. (1998) Protocol for uncertainty evaluation from validation data. VAM report No. LGC/VAM/1998/088. MILLESTONE LGC 2000.

Baselt RC. Biological Monitoring Methods for Industrial Chemicals. Biomedical Publications. Davis. California. 1980

Burner System Atomic Spectrometry. User Guide Perkin Elmer 1999.

Castillo JR, Concha I, Martínez C (1987). Determination of intracellular and total cadmium in human blood and cadmium in serum by electrothermal atomic absorption spectroscopy. *Atomic Spectroscopy* 8(6), 172-173.

Cochran W.G. (1971), Técnicas de muestreo. Compañía editorial continental.

Ewers V, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int Arch Occup Environ Health* 72, 255-260. 1999

Gómez Aracena J, García Rodríguez A, García Mulero L, Carnero Varo M, Pinedo Sánchez A, Fernández-Crehuet Navajas J. Las principales fuentes nutritivas en la Comunidad Andaluza. En: *Perspectivas de la alimentación actual*. Servicio Andaluz de Salud, Pozoblanco, 1991.

Gómez Aracena J, Montellano Delgado MA, García Mulero L, Llopis González J. Manual de fotografías para encuestas de alimentación. Escuela de Nutrición, Universidad de Granada, ISBN 84-338-1637-3. 1992.

Gómez Aracena J. La encuesta alimentaria como instrumento de evaluación del estado nutritivo de la comunidad. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 1990.

Grupo de Investigación sobre Aznalcollar, 2000. Resultados preliminares proyecto de investigación. Mecanografiado

Ikeda M, Watanabe T, Zhang ZW, Moon CS, Shimbo S (1997). The integrity of the liver among people environmentally exposed to cadmium at various levels. *Int Arch Occup Environ Health*. 69(6), 379-85.

Laboratory Corporation of America. Holdings and Lexi, Comp. Inc. ([www.labcorp.com/datasets](http://www.labcorp.com/datasets))

Lauwerys RR, Hoet P. Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring. Lewis Publishers. Boca Raton. Florida. 1993.

Levy PS, Lemeshow S. Sampling of Populations: Methods and Applications. Wiley Series in Probability and Statistics. Survey Methodology Section. 3ªed. N.York: John Wiley & Sons, 1999

Manual de Instrucciones Analyst 800 (Horno de grafito). Perkin-Elmer (1999)

Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernández-Rodríguez JC, Salvini S, Willett WC. Development and validation of a food questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* 1993;22:512-9.

Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P et al. Trace element reference values in tissues from inhabitants of European Community.I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Tot Environ* 95, 89, 1990

Miras J. (1985), Elementos de muestreo para poblaciones finitas, INE.

Moreiras Tuni O, Cuadrado Vives C. Ingesta de contaminantes (metales pesados) vía dieta total del Conjunto Nacional y Comunidades Autónomas: nuevo enfoque. *Rev Clin Esp* 1993;193:76-81.

Oberdoester G, Cherian G. Manganese. En: *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Rochester Series on Environmental Toxicity. Th Clarkson, L Friberg, G Nordberg, P Sager (eds). Plenum Press, New York, 1988

Schaller KH et al. Nickel. *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*. HG Seiler et al. (eds.) Marcel Dekker, New York, 505-518 (1994)

Silva Ayçaguer L.C. (1993), Muestreo para la investigación en ciencias de la salud, Editorial Díaz Santos.

Staessen J, Yeoman N, Fletcher A et al. Blood cadmium in London civil servants. *Int J Epidemiol*, 19, 362, 1990.

Templeton DM, Sunderman FW, Herber RF (1994). Tentative reference values for nickel concentrations in serum, plasma, blood and urine: evaluation according to the TRACY protocol. *Sci Total Environ*. 148(2-3), 243-51.

WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva, 1995.

Willett W. Nutritional epidemiology. 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 1998.