

NIVELES DE METALES PESADOS EN LA POBLACIÓN ANDALUZA: COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN DE LA ZONA DE INFLUENCIA DEL ACCIDENTE MINERO DE AZNALCÓLLAR (ESTUDIO PILOTO)

Enrique Villanueva Cañadas⁽¹⁾, Antonio Pla Martínez⁽¹⁾, Antonio Hernández Jerez⁽¹⁾, Fernando Gil Hernández⁽¹⁾, Luis Fermín Capitán Vallvey⁽²⁾, Ramiro Avidad Castañeda⁽²⁾, Mario Gutiérrez-Bedmar⁽³⁾, Manuel Carnero Varo⁽³⁾, Enrique Gómez Gracia⁽³⁾, Antonio García Rodríguez⁽³⁾, Alberto Mariscal Larrubia⁽³⁾, Jorge Gómez-Aracena⁽³⁾, José Luis Martínez Vidal⁽⁴⁾, María Dolores Gil García⁽⁴⁾, Francisco Camino Durán⁽⁵⁾, Joaquín Fernández-Crehuet Navajas⁽³⁾

(1) Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Avda. de Madrid, 11. 18071-GRANADA.
Telf. 958-243546 Fax: 958-240761 Correo elec.: apla@goliat.ugr.es

(2) Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
icapitan@ugr.es

(3) Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n 29071 Málaga. crehuet@uma.es

(4) Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Almería.
jimartin@ualm.es

(5) Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Consejería de Salud. Junta de Andalucía. Sevilla.

RESUMEN

Tras el accidente de Aznalcóllar, la presencia de metales en los lodos y aguas del vertido tóxico, así como en el aire como consecuencia de los trabajos de retirada de los lodos, representó un riesgo potencial para la salud. Para determinar la posible incidencia del vertido en la población de la zona de influencia se planteó este estudio cuyo fin es, en primer lugar, establecer los niveles de metales pesados en la población andaluza ya que no existen valores de normalidad en esta población y, en segundo lugar, en la población de la zona afectada por el vertido a fin de poder hacer comparaciones y realizar una interpretación adecuada del impacto del vertido. En este trabajo presentamos los resultados del estudio piloto, necesario para conocer los intervalos entre los que fluctúan los niveles de metales pesados así como sus desviaciones respecto a los valores medios y así poder realizar un diseño experimental correcto. Los resultados del estudio piloto han permitido igualmente evaluar la metodología prevista para la selección de los participantes en el estudio, recogida de muestras, conservación y remisión de las mismas y metodología analítica.

Palabras Clave

Accidente de Aznalcóllar, metales pesados, fluidos biológicos, población expuesta, población general.

ABSTRACT

The presence of heavy metals in the muds and waters of the toxic spillage of Aznalcóllar, as well as in the air as a consequence of removal of the muds, represented a potential risk for the health. The aim of this study is to determine the potential risk of this toxic accident in the population of the Aznalcóllar

area. The first objective is to establish the levels of heavy metals in either the Andalusian population (as reference values are lacking) or in the population directly affected by the toxic accident in order to make comparisons and to carry out an appropriate interpretation of its impact. In this work we present the results of the pilot study which may establish the intervals among that the levels of heavy metals fluctuate as well as their deviations from the mean values. This allow us to perform the proper experimental design. Likewise, the results of the pilot study have allowed the evaluation of the methodology designed for the selection of the participants in the study, and analytic methodology as well as the collection of samples, conservation and further remission to the laboratory.

Keywords

Accident of Aznalcóllar, heavy metals, biological fluids, exposed population, general population.

INTRODUCCIÓN

El 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 Agrio e, inmediatamente sobre la del Guadiamar, un volumen estimado de lodos de 1.689.000 metros cúbicos. Este vertido estaba constituido por aguas ácidas (pH alrededor de 5,5) con algunos metales disueltos y gran cantidad de sólidos muy finos de tamaño inferior a 200 micras. Los metales encontrados en mayor cantidad en los lodos fueron: Zn, Pb, As y Cu aunque también se detectaron otros metales en concentraciones mucho menores (Mn, Fe, Cd, Cr, Hg, Ni).

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 voces alertando sobre los efectos perjudiciales para la salud que podían derivarse de la contaminación por metales como consecuencia del vertido.

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. 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.

Por esta razón se propuso la realización de 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.

Antes de proceder a la selección de la muestra sobre la que se estudiarán los niveles de metales pesados en sangre y orina, es necesaria la realización de un estudio piloto para conocer los intervalos entre los que fluctúan estos niveles así como sus desviaciones respecto a los valores medios. Únicamente a partir de estos parámetros podemos realizar un diseño experimental correcto ya que la información que nos aporte 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.

Los resultados del estudio piloto han permitido, igualmente, evaluar la metodología prevista para la selección de individuos participantes en el estudio, proceso de recogida de muestras, conservación y remisión de las mismas a los laboratorios y metodología analítica. Por todo lo expuesto, este estudio piloto se hace imprescindible debido a que no se posee ningún tipo de conocimiento acerca de estos parámetros.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestreo. 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, sea 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 posee, 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 vamos a tomar 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):

$$n_h = \frac{W_h}{L} n$$

Siendo:

n_h = número de sujetos de cada estrato h .

W_h = porcentaje de la población contenida en cada estrato h .

s_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 s_h en cada estrato (ya que entre otros motivos para eso se realiza el estudio piloto), las consideramos constantes, es decir, $s_h = s$, con lo cual, la afijación de Neyman se nos queda en la siguiente fórmula, bastante más reducida:

$$n_h = \frac{W_h}{L} n = \frac{W_h}{L} n = \frac{W_h}{L} n = W_h n \frac{n}{N}$$

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: Aznalcázar: 2.754; Aznalcóllar: 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: Aznalcóllar, Sanlúcar La Mayor y Benacazón. 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):

$$n_h = \frac{W_h}{L} n$$

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

$$n_h = \frac{W_h}{L} n = \frac{W_h}{L} n = \frac{W_h}{L} n = W_h n \frac{n}{N}$$

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

-Aznalcóllar: 10 personas

-Sanlúcar la Mayor: 16 personas

-Benacazón: 4 personas

2. 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 siero (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 20º C) y posteriormente se enviaron (refrigeradas en nevera portátil) al Laboratorio de referencia.

3. Determinaciones analíticas. Las determinaciones de los distintos metales en sangre/suero y orina se hicieron de acuerdo con métodos previamente descritos (Perkin-Elmer 1978,1999; Castillo *et al.* 1987; INST, 1992) con las oportunas modificaciones.

Cadmio (Sangre total).

a) Instrumental

La medida se ha llevado a cabo en un equipo Perkin-Elmer Analyst-800 con efecto corrector Zeeman, equipado con una lámpara de

descarga sin electrodos (EDL), empleando una longitud de onda de 228.8 nm y una rendija de 0.7 nm.

Se utilizaron tubos de grafito pirolizados con plataforma integrada. Las condiciones instrumentales fueron:

- Programa del horno de grafito:

Etapa	Tª (°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

- Tiempo de integración: 4 s
 - Señal de medida: área de pico
 - Volumen de inyección del modificador de matriz mixto de Pd 0.03% y Mg(NO₃)₂ 0.02% 20 µL
 - Volumen de inyección de muestra: 20 µL

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado

A partir de una disolución estándar de 1000 µg/ml de Cd, se prepararon disoluciones patrón de concentración 1, 2 y 3 µg/L en HNO₃ al 0.2%.

c) Preparación de la muestra

Una alícuota de sangre total se diluyó 1/7 con modificador de matriz mixto de Pd 0.03% y Mg(NO₃)₂ 0.02%. Una vez agitada la muestra y transcurridos aproximadamente 15 minutos se procedió a su inyección en el tubo de grafito.

d) Cálculo y expresión de resultados

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como µg/L. El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

Arsénico (Orina).

a) Instrumental

La medida se ha llevado a cabo en un equipo Perkin-Elmer Analyst-800 acoplándole un generador de hidruros MHS-10, equipado con una lámpara de descarga sin electrodos (EDL),

empleando una longitud de onda de 196.0 nm y una rendija de 0.7 nm. La célula de cuarzo precisó calentamiento durante la medida y se utilizó como agente reductor borohidruro sódico al 3% en NaOH al 1%, previamente filtrado.

- Tiempo de integración: 10 s
 - Señal de medida: altura de pico

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado

A partir de una disolución estándar de 1000 µg/ml, se prepararon disoluciones patrón de concentración 0.5, 1, 2 y 3 µg/L en HCl al 2%.

c) Preparación de la muestra

Debido al efecto matriz existente en la orina fue necesario realizar el método de adición de patrón. A cinco frascos de reacción se les agregó a cada uno de ellos 0,5 ml de muestra de orina; posteriormente se les adicionó 0, 0.5, 1, 2 y 3 µg/L de arsénico, respectivamente, y se llevó cada uno a un volumen final de 10 ml con HCl al 2%.

d) Cálculo y expresión de resultados

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como µg/L. El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

Níquel (Sangre total).

a) Instrumental

El equipo utilizado para la determinación analítica ha sido un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin- Elmer, modelo Analyst 800 equipado con corrector de efecto Zeeman. La fuente de radiación utilizada fue una lámpara de cátodo hueco (HCL), empleando una longitud de onda de 232.0 nm y una rendija de 0.7 nm.

Los tubos de grafito usados son de pared interna pirolizada con plataforma de L'vov integrada. Las condiciones de temperatura del horno fueron:

Etapa	Temp. °C	Rampa (s)	Mantenimiento (s)	Flujo de gas interno (ml/min)
1	110	2	30	250
2	130	15	30	250
3	1100	20	20	250
4	2300	0	5	0
5	2600	1	3	250

- Tiempo de integración: 4 s
 - Procesado de la señal: Área de pico
 - Modificador de matriz: No usado.
 - Volumen de inyección de muestra: 20 µL.

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado.

A partir de un patrón certificado de 1000 mg/l de níquel, se preparó una disolución patrón de concentración 20 µg/l en HNO₃ al 0.2%. El instrumento de forma automática preparó las diluciones para obtener patrones de 2, 5 y 10 µg/l.

c) Preparación de la muestra.

Una alícuota de 1 ml de sangre total se introdujo en un vaso de digestión de cuarzo. Se adicionaron 5 ml de HNO₃ al 65% y 1 ml de H₂O₂ al 35%. Se esperaron 10 minutos una vez agitados los vasos y se sometieron las muestras a un proceso de digestión asistido por microondas con el siguiente programa de:

	Potencia inicial (W)	Tiempo (minutos)	Potencia final (W)	Veloc. Extractor
1	250	2	250	1
2	0	2	0	1
3	250	6	400	1
4	400	5	650	1
5	650	2	650	1
6	0	15	0	3

La muestra fue transferida cuantitativamente a un matraz y llevada a un volumen de 10 ml. Este extracto fue inyectado directamente en el tubo de grafito.

d) Cálculo y expresión de resultados.

El resultado instrumental se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como µg/l. El resultado del análisis se expresa como el producto del resultado instrumental por la dilución realizada (1/10) acompañado de la incertidumbre asociada al procedimiento de ensayo para la concentración encontrada.

Plomo (Sangre total)

a) Instrumental

El equipo utilizado para la determinación analítica ha sido un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, modelo

Analyst 800 equipado con corrector de efecto Zeeman. La fuente de radiación utilizada fue una lámpara de cátodo hueco (HCL), empleando una longitud de onda de 283.3 nm y una rendija de 0.7 nm.

Los tubos de grafito usados son de pared interna pirolizada con plataforma de L'vov integrada.

Las condiciones de temperatura del horno fueron:

Etapa	Temp. °C	Rampa (s)	Mantenimiento (s)	Flujo de gas interno (ml/min)
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	800	10	20	250
4	1800	0	3	0
5	2600	1	1	250

- Tiempo de integración: 5 s
 - Procesado de la señal: Área de pico
 - Modificador matriz: 5 µl de Mg(NO₃)₂ 3·10⁻³ mg/l y 5 µl de NH₄H₂PO₄ 5·10⁻² mg/l.
 - Volumen de inyección de muestra: 20 µL.

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado.

A partir de un patrón certificado de 1000 mg/l de plomo, se preparó una disolución patrón de concentración 20 µg/l en HNO₃ al 0.2%. El instrumento de forma automática preparó las diluciones para obtener patrones de 2, 5 y 10 µg/l.

c) Preparación de la muestra.

Una alícuota de 1 ml de sangre total se introdujo en un vaso de digestión de cuarzo. Se adicionaron 5 ml de HNO₃ al 65% y 1 ml de H₂O₂ al 35%. Se esperaron 10 minutos una vez agitados los vasos y se sometieron las muestras a un proceso de digestión asistido por microondas con el siguiente programa:

	Potencia inicial (W)	Tiempo (minutos)	Potencia final (W)	Veloc. Extractor
1	250	2	250	1
2	0	2	0	1
3	250	6	400	1
4	400	5	650	1
5	650	2	650	1
6	0	15	0	3

La muestra fue transferida cuantitativamente a un matraz y llevada a un volumen de 10 ml. Este

extracto fue inyectado directamente en el tubo de grafito.

d) Cálculo y expresión de resultados.

El resultado instrumental se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como $\mu\text{g/l}$. El resultado del análisis se expresa como el producto del resultado instrumental por la dilución realizada (1/10) acompañado de la incertidumbre asociada al procedimiento de ensayo para la concentración encontrada.

Talio (orina)

a) Instrumental

Se utiliza un espectrómetro de plasma acoplado inductivamente con detector de masa provisto de automuestreador.

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado:

A partir de una disolución estándar de talio de 1000 mg/L se preparan disoluciones patrón intermedias de concentración de 0, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/L}$. Por dilución 1:10 de los patrones anteriores se preparan patrones de 0, 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ de Tl. Para ello se depositan en matraces de 50 mL, 5 mL del patrón correspondiente y se enrasa con disolución de Bi(III) (110 $\mu\text{g/L}$ en 1.1% HNO_3) que se usa como patrón interno.

c) Preparación de la muestra

Al igual que los patrones, las muestras se prepararan, depositando en matraces de 50 mL, 5 mL de la muestra y enrasando con la disolución de Bi (110 $\mu\text{g/L}$ en 1.1% HNO_3).

d) Cálculo y expresión de resultados

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como $\mu\text{g/L}$. El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

Mercurio (Orina)

a) Instrumental

Se usa un espectrofotómetro de absorción

atómica Perkin-Elmer LB1100 equipado con una lámpara de descarga y con un sistema de generación de hidruros MHS-10. Se usa una célula de cuarzo en frío y como agente reductor borohidruro sódico al 3 % en NaOH al 1%.

Los parámetros del programa son:

=253.6, Slit = 0.7 Altura de pico =1 time delay = 12s.

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado:

A partir de una disolución estándar de mercurio de 1000 mg/L se prepararon disoluciones patrón de concentración de 0, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ en mezcla de ácidos nítrico al 1,5 % y sulfúrico al 1.5%.

c) Preparación de la muestra

Se prepara tomando 1 mL de orina, depositándola en el frasco de reacción, añadiendo 9 mL de mezcla de ácidos nítrico al 1,5 % y sulfúrico al 1.5% y 5 gotas de KMnO_4 al 5%.

d) Cálculo y expresión de resultados

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como $\mu\text{g/L}$. El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

Cinc (Suero)

a) Instrumental

Se usa un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer LB1100 provisto de lámpara de cátodo hueco de cinc y llama de aire/acetileno.

Los parámetros del programa son:

=213.9 Slit = 0.7 Altura de pico =1 time delay = 2s.

b) Preparación de los patrones y curva de calibrado:

A partir de una disolución estándar de cinc de 1000 mg/L se preparan disoluciones patrón de

Tabla 1. Tamaño muestral de cada estrato en cada localidad muestreada

Table 1. Sample size of each age category for every town assessed

	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		

Tabla 2. Niveles de metales pesados en cada una de las poblaciones estudiadas

Table 2. Heavy metal levels from the different populations studied

	Población	N	Media	Desviación típica	Significación (t-Student)
Nivel de plomo en sangre total (microgramos por litro)	No Afectada	30	67,73	30,924	0,89
	Afectada	27	65,60	78,884	
Nivel de níquel en sangre total (microgramos por litro)	No Afectada	30	73,77	112,577	0,071
	Afectada	27	34,31	25,750	
Nivel de cadmio en sangre total (microgramos por litro)	No Afectada	30	0,270	0,237	< 0,0001
	Afectada	27	1	0,789	
Nivel de arsénico en orina (microgramos por mililitro)	No Afectada	30	0,023	0,021	0,127
	Afectada	27	0,016	0,012	
Nivel de mercurio en orina (microgramos por litro)	No Afectada	30	2,856	2,195	0,937
	Afectada	25	2,808	2,366	
Nivel de cinc en suero (microgramos por litro)	No Afectada	30	955,01	149,753	0,088
	Afectada	27	1026,04	158,886	

concentración de 0, 50, 100, 200 y 400 mg/L. empleando glicerol al 5% para ajustar la viscosidad de los patrones a la del suero.

c) Preparación de la muestra

Se hace una dilución 1:5 de cada muestra de suero tomando 600L de suero y 2400L de agua bidestilada.

d) Cálculo y expresión de resultados

El resultado se obtiene por interpolación en la recta de calibrado y se expresa como g/L. El resultado del análisis se expresa asociando la incertidumbre del procedimiento a la concentración encontrada.

4.- Pruebas y software estadístico. El tratamiento estadístico de los datos se ha realizado con el programa SPSS 10.0 para

windows. Se ha utilizado el test de la t de Student para comparar los niveles medios de metales pesados entre las dos poblaciones objeto de estudio: afectada por el vertido y no afectada. Para comparar los niveles medios por sexo se ha utilizado el test de la U de Mann-Whitney ya que el reducido tamaño muestral de los estratos hacía necesaria una prueba no paramétrica. Por el mismo motivo, la comparación de niveles de metales pesados en los distintos grupos de edades se ha realizado a través de la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

De acuerdo con la metodología indicada para el muestreo, en el apartado de Material y Métodos, la afijación de cada estrato se muestra en la Tabla 1.

Tabla 3. Niveles de metales pesados por sexos en la Población No Afectada

	Población	N	Media	Significación (U de M-W)
Nivel de plomo en sangre total (microgramos por litro)	Hombre	15	75,060	0,191
	Mujer	15	60,407	
Nivel de níquel en sangre total (microgramos por litro)	Hombre	15	40,893	0,272
	Mujer	15	106,640	
Nivel de cadmio en sangre total (microgramos por litro)	Hombre	15	0,344	0,164
	Mujer	15	0,196	
Nivel de arsénico en orina (microgramos por mililitro)	Hombre	15	0,021	0,917
	Mujer	15	0,025	
Nivel de mercurio en orina (microgramos por litro)	Hombre	15	2,900	0,545
	Mujer	15	2,813	
Nivel de cinc en suero (microgramos por litro)	Hombre	15	983,993	0,429
	Mujer	15	926,027	

Table 3. Heavy metal levels from the non-affected area adjusted by gender

Tabla 4. Niveles de metales pesados por sexos en la Población Afectada

	Población	N	Media	Significación (U de M-W)
Nivel de plomo en sangre total (microgramos por litro)	Hombre	13	76,015	0,883
	Mujer	14	55,921	
Nivel de níquel en sangre total (microgramos por litro)	Hombre	13	29,869	0,698
	Mujer	14	38,443	
Nivel de cadmio en sangre total (microgramos por litro)	Hombre	13	1,076	0,942
	Mujer	14	0,926	
Nivel de arsénico en orina (microgramos por mililitro)	Hombre	13	0,017	0,497
	Mujer	14	0,014	
Nivel de mercurio en orina (microgramos por litro)	Hombre	13	3,208	0,604
	Mujer	12	2,375	
Nivel de cinc en suero (microgramos por litro)	Hombre	13	1106,608	0,010
	Mujer	14	951,229	

Table 4. Heavy metal levels from the exposed area adjusted by gender

Tabla 5. Niveles de metales pesados por edades en cada una de las poblaciones

Table 5. Heavy metal levels from all individuals studied adjusted by age

	Población	Grupos de edad			Significación (K - W)
		12 - 24	25 - 59	60 - 75	
Nivel de plomo en sangre total (microgramos por litro)	No Afectada	42,370	68,680	90,270	0,170
	Afectada	116,800	43,830	26,570	0,050
Nivel de níquel en sangre total (microgramos por litro)	No Afectada	33,330	83,130	86,120	0,710
	Afectada	31,870	37,860	27,400	0,910
Nivel de cadmio en sangre total (microgramos por litro)	No Afectada	0,230	0,300	0,230	0,350
	Afectada	1,050	1,050	0,710	0,700
Nivel de arsénico en orina (microgramos por mililitro)	No Afectada	0,028	0,021	0,021	0,810
	Afectada	0,011	0,017	0,021	0,073
Nivel de mercurio en orina (microgramos por litro)	No Afectada	2,080	3,370	2,080	0,280
	Afectada	1,500	2,850	6,570	0,025
Nivel de cinc en suero (microgramos por litro)	No Afectada	899,450	955,820	1008,150	0,400
	Afectada	1131,600	987,450	923,600	0,044

	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%

Tabla 6. Precisiones estimadas para el estudio final

Table 6. Estimation of precisions to set up the number of individuals to be included in the final study.

Tras realizar los análisis de las muestras obtenidas tanto de la población andaluza como de la zona afectada por el vertido, se procedió a la tabulación y el análisis estadístico de los datos. En la Tabla 2 se muestran los niveles medios de cada uno de los metales estudiados, tanto en la zona afectada por el vertido como en la zona no afectada, y la significación estadística de esta diferencia mediante la prueba t de Student. Al estratificar por sexo y por zona (afectada/ no afectada) se obtuvieron los resultados que se muestran en las Tablas 3 y 4 para los niveles medios de metales pesados.

Por último, en la Tabla 5 se muestran los niveles medios de metales pesados estratificados por grupo de edad y por zona.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La concentración de plomo en sangre encontrados tanto en la población afectada (66 µg/l) como no afectada (68 µg/l) se encuentran dentro de lo que podría considerarse rango de normalidad y son valores similares a los encontrados por otros autores como Zimova *et al*, 2001 (25 µg/l ± 15) y Khan *et al*, 2001 (79 µg/l).

La concentración de níquel en sangre total encontrada en nuestro estudio en la población afectada es algo mayor que la de la población no afectada (34 vs 26 µg/l, p = 0.071). Se han realizado pocos estudios sobre níquel en sangre total, por lo que aún no ha sido posible establecer niveles de referencia o rangos de normalidad (Templeton *et al*, 1994).

Los niveles de zinc en suero del presente estudio han sido 955 µg/l en la población afectada y 1026 µg/l en la no afectada,

diferencias que están al borde de la significación estadística. Las concentraciones son del mismo orden que las publicadas por Barany *et al* 2002, que encuentran una concentración de 990 µg/l.

La concentración de cadmio en sangre total que hemos encontrado ha sido de 0.27 µg/l en la población no afectada y 1.0 µg/l en la no afectada, diferencias que son estadísticamente significativas. Los datos disponibles en la literatura científica se refieren a suero, donde la concentración de referencia es de 1.6 a 3.8 µg/l (Ikeda *et al*, 1997), por lo que en principio no se puede hacer una adecuada interpretación de nuestros resultados.

Los niveles de arsénico en orina encontrados en el presente estudio son de 0.023 µg/l en la población no afectada y 0.016 en la afectada, diferencias que no son estadísticamente significativas. Se consideran niveles normales los situados por debajo de 10 µg/l, aunque el rango de normalidad podría abarcar desde 5 a 50 µg/l (Concha, 2001). Por tanto, se puede decir que los datos de la población estudiada están dentro de la normalidad.

Por último, los niveles de mercurio en orina encontrados en nuestro estudio en la población afectada son de 2.86 µg/l en la población no afectada y de 2.81 en la afectada, diferencias que no son estadísticamente significativas. Estos valores son asimismo normales a la vista de los datos publicados por otros autores en población general, como por ejemplo 3.83 µg/l ± 2.45 (Khordi-Mood *et al*, 2001).

Con respecto a los niveles medios de metales pesados en la población andaluza (Tabla 2), podemos apreciar que, salvo en el caso del níquel, son ligeramente superiores en la población afectada por el vertido, siendo esta

diferencia estadísticamente significativa únicamente en el cadmio ($p < 0,0001$).

En la comparación entre sexos (Tabla 3), en la zona no afectada por el vertido no se aprecian diferencias significativas en los niveles de metales pesados entre hombres y mujeres, mientras que en la zona afectada (Tabla 4) los niveles de cinc son superiores en hombres ($p = 0,01$).

En la población no afectada se aprecian niveles de metales pesados inferiores en mujeres, salvo en el caso del níquel y del arsénico, mientras que en la población afectada únicamente los niveles de níquel son superiores en mujeres.

Con relación a la estratificación por grupos de edades (Tabla 5), en la población no afectada no se han encontrado diferencias significativas entre los grupos etáreos en ningún metal. Por el contrario, en la población afectada si se han encontrado diferencias significativas. En el plomo ($p=0,05$) los niveles mayores corresponden a las edades más tempranas. Con el mercurio ($p=0,025$) ocurre a la inversa, las personas mayores presentan niveles más elevados. Por último, podemos apreciar que las personas de menor edad tienen asociados niveles medios de cinc más elevados ($p=0,044$).

A través de los resultados aportados se estimó el tamaño muestral del estudio final, según las precisiones alcanzables en los distintos metales. Se decidió tomar 1000 personas de la zona no afectada por el vertido (población andaluza) y 800 personas de la zona afectada. Las estimaciones de estas precisiones se muestran en la tabla 6.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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.

Concha Quezada G (2001). Metabolism of inorganic arsenic and biomarkers of exposure. Doctoral Thesis. Institute of Environmental Medicine. Stockholm.

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.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INST, 1992). Determinación de plomo en sangre-Método cámara de grafito. Espectrofotometría de Absorción Atómica. MTA/MB-011/R92.

Khordi-Mood M, Sarraf-Shirazi AR, Balali-Mood M (2001). Urinary mercury excretion following amalgam filling in children. *J Toxicol Clin Toxicol.* 39(7), 701-5.

Perkin-Elmer (1978) Manual de Instrucciones MHS-10 (Generación de Hidruros).

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

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

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

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.

Zimova M, Duris M, Spevackova V, Melichercik J, Lepsi P, Tesakova B, Knotek P, Kubinova R, Ronen Y (2001). *Int J Occup Med Environ Health.* 14(3), 231-4.