



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

“INVESTIGACIÓN DE ARSÉNICO EN CABELLO DE HABITANTES DE LA
LOCALIDAD DE GENERAL PICO, LA PAMPA.”

IVANA CAROLINA RODRIGUEZ

SANTA ROSA (LA PAMPA) - ARGENTINA

AÑO 2012

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, durante el periodo comprendido entre Marzo de 2010 y Abril de 2012, bajo la dirección del Dr. Darío D. Mariani y bajo la co - dirección de la MSc. María Susana Boeris.

11 / 05 / 2012

.....
Ivana Carolina RODRIGUEZ

Departamento de Química.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad Nacional de la Pampa.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por estar siempre a mi lado, y brindarme su apoyo incondicional.

A quienes dirigieron y orientaron este trabajo de tesis, Darío D. Mariani, Director y Ma. Susana Boeris, Co-directora, por su paciencia y disponibilidad, muchas gracias.

Al Departamento de Química, que me ha dado la posibilidad de completar mis estudios.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que de alguna manera han participado en mi formación y en el presente trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.El Arsénico como problema ambiental.....	3
1.1.1. Distribución.....	3
1.1.2. Arsénico en aguas.....	3
1.1.3. Fuentes de exposición al arsénico y sus derivados.....	6
1.1.4. Absorción del arsénico.....	7
1.1.5. Biomarcadores de exposición.....	8
1.1.6. Metabolismo del arsénico.....	9
1.1.7. Influencia de los factores genéticos y ambientales.....	13
1.1.8. Toxicidad del arsénico.....	14
1.2. Efectos sobre la salud en poblaciones expuestas al arsénico.....	15
1.2.1. Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE).....	15
1.2.1.1. Etiología, fisiopatogenia y epidemiología.....	15
1.2.2. Efectos tóxicos del arsénico.....	19
1.2.3. Presentación clínica del HACRE.....	19
1.2.4. Acción mutagénica.....	21
1.2.5. Toxicidad genética del arsénico.....	22
1.2.6. Interacciones en carcinogénesis.....	22
1.2.7. Neoplasias en el HACRE.....	22
1.3. El arsénico en la provincia de La Pampa.....	24
1.3.1. El agua potable en La Pampa.....	24
1.3.2. El arsénico en el agua subterránea.....	27
1.4. Metodologías analíticas para la cuantificación de arsénico.....	28
1.4.1. Método espectrofotométrico del dietil ditiocarbamato de plata.....	28
1.4.2. Espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito.....	29
1.4.3. Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros.....	29
1.4.4. Plasma inductivo acoplado a espectrometría de masa (ICP-MS).....	30

1.4.5. Espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía.....	31
1.4.6. Técnicas acopladas.....	31
1.4.7. Técnicas electroquímicas.....	33
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Instrumental y material utilizados.....	35
3.1.1. Instrumental.....	35
3.1.2. Material de Laboratorio.....	35
3.2. Método de análisis para la determinación de arsénico.....	35
3.3. Preparación de reactivos, patrones y muestras para la determinación de arsénico.....	36
3.3.1. Reactivos.....	36
3.3.2. Patrones de calibración.....	37
3.3.2.1. Modelo de calibración.....	37
3.3.3 Pretratamiento de las muestras de cabello.....	38
3.3.3.1 Mineralización.....	38
3.3.3.2. Determinación de arsénico en las muestras de cabello.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Recolección de muestras de cabello.....	39
4.2. Recta de calibración.....	39
4.3. Prueba de homocedasticidad.....	41
4.4. Límite de detección y límite de cuantificación.....	42
4.5. Resultados de muestras analizadas.....	43
5. DISCUSIÓN.....	46
6. CONCLUSIONES.....	48
7. BIBLIOGRAFIA.....	49

RESUMEN

El arsénico es un elemento que se encuentra ampliamente difundido en el ambiente. La continua exposición al arsénico inorgánico provoca un envenenamiento crónico. En la provincia de La Pampa existen amplias zonas cuyas aguas subterráneas contienen elevadas cantidades de arsénico. En el organismo humano, el arsénico es biometilado, predominantemente en el hígado, proceso fundamental en la desintoxicación. La eficiencia de la metilación depende del estado de oxidación y la dosis de arsénico; cuando existe una saturación comienza a depositarse en el cabello. Existen elementos en debate e incertidumbres asociados a la evaluación del riesgo de efectos cancerígenos y no cancerígenos para el arsénico. Cada vez más surge la pregunta de si es correcto adoptar estándares internacionales sin estudios fisiológicos y ecotóxicos previos en la población específica del lugar de que se trate. En el presente trabajo se presentan los resultados de determinaciones de arsénico efectuadas sobre muestras de cabello de pobladores de General Pico, La Pampa, población considerada bajo riesgo ya que ha consumido de manera histórica, agua de red con un contenido de arsénico de $0,110 \text{ mgL}^{-1}$, mayor a $0,010 \text{ mgL}^{-1}$, límite máximo del Código Alimentario Argentino.

El valor de arsénico promedio encontrado fue de $0,183 \text{ mg kg}^{-1}$ de cabello, por debajo de los $0,200 \text{ mg kg}^{-1}$ considerado como umbral superior en las poblaciones no expuestas a este elemento.

Palabras clave: arsenicosis, arsénico en cabellos, envenenamiento por arsénico.

ABSTRACT

Arsenic is a widely spread element in the environment. The continuous exposure to inorganic arsenic causes chronic poisoning. In the province of La Pampa there are wide zones where the underground water contains a high rate of arsenic. In human beings inorganic arsenic suffers methylation in the liver, what is considered as a detoxifying mechanism. The efficiency of the methylation depends on the oxidation state and dose, hence, when saturation is produced, it begins to accumulate in the hair. There have been

discussions and uncertainties as regards arsenic related to cancer-risk evaluations. The question more frequently raised each time is whether it is correct or not, to adopt international standards, without previous physiologic and ecotoxic studies in the specific population where it is studied. In the present work we exhibit the results of the measurements of arsenic in hair of the inhabitants of General Pico, La Pampa, population that is considered under risk because of their consumption of drinking water with arsenic levels of $0,110 \text{ mgL}^{-1}$, higher than $0,010 \text{ mgL}^{-1}$, maximum level accepted by the Código Alimentario Argentino.

The average value of arsenic in hair found was of $0,183 \text{ mg kg}^{-1}$, lower to $0,200 \text{ mg kg}^{-1}$ considered the upper threshold in unexposed populations.

Keywords: arsenic diseases, arsenic in hair, arsenic poisoning.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL ARSÉNICO COMO PROBLEMA AMBIENTAL

1.1.1. Distribución

El arsénico (As) es un metaloide que se encuentra ampliamente difundido en el ambiente, tanto en la atmósfera como en los animales, las plantas y el suelo. Fue descubierto en 1250 por Alberto Magno, aunque se cree que se empleó mucho antes como adición al bronce para dar un acabado lustroso. La palabra arsénico proviene de la palabra persa *Zarnikh*, traducida al griego como *arsenikon*, que significa “oropimente amarillo”, el nombre de uno de los minerales que contienen este elemento.

Es el vigésimo elemento en la corteza terrestre en cuanto a cantidad y se encuentra en mayor proporción en áreas geotermales, regiones volcánicas, acuitardos o niveles de arcillas intercalados en acuíferos detríticos, que contienen minerales con arsénico, y acuíferos que contienen óxidos de hierro y manganeso, que tienen una gran afinidad por el arsénico (Abernathy *et al.*, 1999; WHO, 2009).

Se encuentra libre en la naturaleza y combinado en un gran número de minerales; alrededor de unos 150 minerales contienen arsénico. Generalmente se lo encuentra en la forma pentavalente (As^{+5}). Algunos de los minerales que contienen As son: la arsenolita: As_4O_6 ; el rejalgar: S_5As_2 ; el oropimente: S_3As_2 ; la cobaltita: SAs ; también bajo la forma de arseniuros, principalmente como AsCo_2 , As_2Fe , As_3Fe_4 , AsNi (Castro, 1982).

El promedio contenido en la corteza terrestre es de 2 ppm. No obstante, la distribución es muy heterogénea, encontrándose suelos que yacen sobre depósitos de sulfuro que han llegado a evidenciar niveles de hasta 8000 ppm (Castro, 1982).

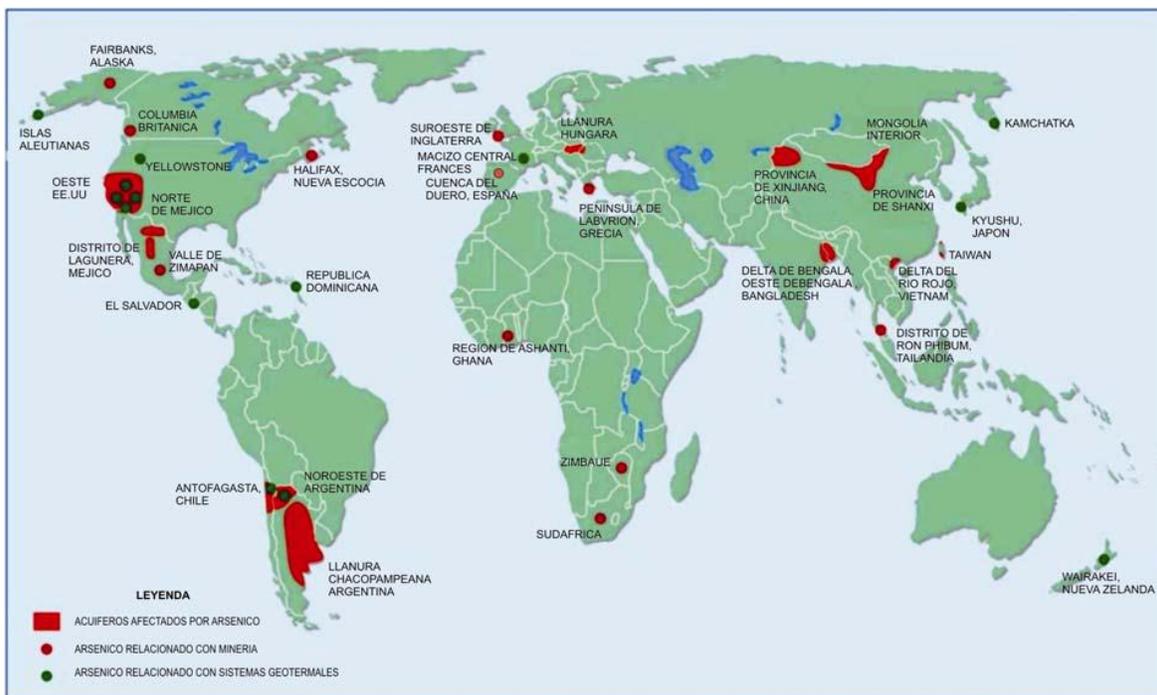
1.1.2. Arsénico en aguas

El arsénico se encuentra frecuentemente en las aguas naturales. Tanto en las aguas superficiales como en las aguas subterráneas, proviene de la disolución de minerales, la erosión y desintegración de rocas, y la deposición atmosférica en forma de aerosoles (Esparza, 2004). En el agua se puede encontrar tanto en su forma trivalente como en su forma pentavalente, según las condiciones del medio. Es muy importante destacar que la solubilidad en agua del As_2O_5 es mucho mayor que la del As_2O_3 (1500 y 37 gL^{-1} respectivamente) (WHO, 2003). Se han descubierto aguas contaminadas con As en países

como Argentina, Chile, Taiwán, Tailandia, China, India, Nepal, Vietnam, Inglaterra, España, Italia, Finlandia, USA, Ghana, Sudáfrica, Zimbabwe, Bangladesh y Australia (Figura 1), por nombrar algunos, lo que demuestra que es un problema global, y que ningún continente está libre de él (Jack *et al.*, 2003).

Suelen encontrarse los mayores niveles de arsénico en las aguas bicarbonatadas y de baja dureza, es decir con altas concentraciones de bicarbonatos y baja concentración de calcio y magnesio. Existe una mayor movilidad del arseniato en aguas con altas concentraciones de bicarbonatos y pH mayores a 7,5, debido a una disminución en la adsorción del mismo en los óxidos de hierro y aluminio presentes en los sedimentos loésicos. Por lo tanto en las aguas subterráneas pueden encontrarse altas concentraciones de arsénico sólo si las condiciones geoquímicas favorecen su disolución (Slooff *et al.*, 1990). Existe una fuerte correlación entre arsénico y flúor debida a las condiciones fisicoquímicas del agua que favorecen la migración de ambos compuestos. Las aguas superficiales habitualmente tienen bajo contenido de arsénico. La concentración de As en aguas naturales, incluyendo la del agua en mar abierto, oscila entre 1 y 2 μgL^{-1} (Hindmarsh&McCurdy, 1986; US NRC, 1999).

Figura 1. Distribución mundial de acuíferos con altos contenidos en arsénico.
(Modificado de Smedley y Kinniburgh, 2002)



Aunque los materiales de la geósfera no presenten grandes concentraciones de arsénico en la fase sólida, una pequeña cantidad relativa de arsénico liberado de esa fase por procesos de desorción o disolución puede elevar la concentración de arsénico en el agua por encima de $50 \mu\text{gL}^{-1}$. En este sentido se debe considerar que para que existan aguas con elevados contenidos de arsénico, no basta sólo con que tengan lugar mecanismos por los cuales éste se libere de la fase sólida, sino que además el arsénico liberado tiene que permanecer en el agua, es decir no tiene que ser transportado ni transferido a otro medio, ni tampoco se han de producir procesos de dilución por mezcla. Otra consideración que hay que tener en cuenta, es sobre la naturaleza diferente de las aguas superficiales y las aguas subterráneas: las aguas superficiales constituyen sistemas abiertos donde los factores ambientales están continuamente variando. En contraste, las aguas subterráneas se pueden considerar, en la mayoría de los casos, sistemas semicerrados, donde las condiciones pueden variar, pero de forma discontinua en el tiempo, permitiendo que el sistema solución-fase sólida pueda reequilibrarse (Smedley y Kinniburgh, 2002).

1.1.3. Fuentes de exposición al arsénico y sus derivados

La mayor parte del arsénico en las aguas y en el medio ambiente proviene de la actividad humana, estimándose que cerca del 70% del flujo del arsénico a la atmósfera tiene un origen antropogénico (Nriagu&Pacyna, 1988). Los productos generados por el hombre incluyen el arsénico metálico, As_2O_5 , As_2O_3 , $(AsO_4)_2Ca_3$, $(AsO_4)_2Pb$, compuestos arsenicales orgánicos, etc. Ellos pasan al ambiente durante su empleo como insecticidas o herbicidas, en cultivos tan variados como la vid, el algodón, verduras y tomates. También se emplean como esterilizantes de suelos, como preservantes de maderas para postes o como antiparasitarios en baños para ovejas y cabras.

Aunque el arsénico en estado puro no es tóxico, muchos compuestos orgánicos e inorgánicos de arsénico son extremadamente tóxicos y han sido utilizados como insecticidas y plaguicidas. A modo de ejemplo, el arsenito de sodio ($NaAsO_2$) es efectivo contra la langosta, el trióxido de arsénico (As_2O_3) es un potente veneno para roedores, y el arsenito de calcio $Ca_3(AsO_4)_2$ se usa como plaguicida contra el gorgojo del algodón y el escarabajo de la papa, o también como defoliante para el algodón. Los compuestos de arsénico conocidos como adamsita (cloroarsina difenilamínica) y lewisita (B-clorovinil-dicloroarsina) se utilizaron como gases venenosos a partir de la Primera Guerra Mundial.

El arsénico metálico también tiene su uso en aleaciones de plomo y cobre, en la fabricación de semiconductores de arseniuro de galio, para su uso en diodos emisores de luz y en células solares. Debido a su frecuente presencia en minerales, se producen descargas intensas al medio ambiente de arsénico en los gases de chimeneas y líquidos de descarga industrial provenientes de fundiciones de minerales, especialmente los no-ferrosos (Cu, Sn, Co, etc.). También hay emisiones de arsénico por los hornos de las usinas que queman carbón y en los hornos de productoras de vidrio que emplean el arsénico para eliminar el tinte verdoso del mismo (Castro, 1982).

Dadas las variadas fuentes, tanto naturales como antropogénicas de arsénico, no resulta extraño que exista una captación del mismo por los vegetales y animales y que este llegue al hombre a través de los alimentos. En estudios realizados en Inglaterra, se determinó que en la dieta promedio de ese país existían niveles de arsénico de $50 \mu g día^{-1}$, donde el consumo de pescado era el responsable de la casi totalidad de la ingesta, con el 94% del total. La exposición media en los adultos era de $0,02 - 0,08 \mu g kg^{-1}$ de peso por día, y la

exposición máxima, de 0.05 - 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso por día (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1999). En Estados Unidos, se encontró que la dieta promedio de los adultos contenía 53 $\mu\text{gdía}^{-1}$ de arsénico (Yost *et al.*, 1998).

Todas las aleaciones de arsénico son venenosas en altas dosis pero, a pesar de su demostrada toxicidad, el arsénico también se ha utilizado como agente terapéutico frente a diversos procesos patológicos. Este se conoce desde unos cinco siglos A.C., cuando Hipócrates recomendaba su uso para tratar los abscesos ulcerados. Posteriormente, los médicos han prescrito preparaciones de arsénico para tratar alteraciones de la piel, tuberculosis, asma y lepra. Durante la Edad Media se usaron diversos compuestos de As inorgánico como medicinas y también para producir venenos. Durante el siglo XIX la solución de Fowler se utilizó como tratamiento contra la leucemia y la dermatitis. A dosis terapéuticas, los compuestos de As se han mostrado eficaces para combatir diversas enfermedades tales como la anemia, el asma, el reumatismo, la neuralgia, el cólera, la malaria, la psoriasis y la sífilis, utilizándose también como estimulante en casos de debilidad. Sin embargo, basándose en la evidencia acumulada sobre la toxicidad y la carcinogenicidad de los compuestos de As inorgánico, muchos de sus usos médicos se han reducido (Castro, 1982).

Actualmente se está investigando el uso del As_2O_3 en la terapia contra diferentes tipos de cáncer ya que, al parecer, este compuesto es capaz de llevar el proceso de apoptosis a las células con desórdenes en su ciclo de proliferación, sin dañar las células que se encuentran en estado normal (Tonget *et al.*, 2001). En el año 2000 la FDA de Estados Unidos lo aprobó para el tratamiento de la leucemia aguda promielocítica.

1.1.4. Absorción del arsénico

Los compuestos orgánicos de arsénico como la arsenobetaína, arsenocolina, las sales de tetrametilarsonio, los arsenoazúcares y los lípidos con arsénico se encuentran fundamentalmente en organismos marinos. Además de estos compuestos, existen las formas orgánicas que tienen origen en el proceso de metabolización de los compuestos inorgánicos. Las formas más comunes son los derivados metilados conocidos como ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y óxido de trimetilarsina (TMAO) (Wildfang *et al.*, 2000; WHO, 2001).

Un factor crítico en el proceso de absorción es la liposolubilidad. Cuanto más liposoluble sea un compuesto, más fácilmente penetrará las distintas membranas biológicas que se interponen al acceso del tóxico a los sitios de acción intracelulares. Desde este punto de vista, los compuestos arsenicales orgánicos como la lewisita (de naturaleza no iónica) y los fenilarsenóxidos, por ejemplo, que son liposolubles, penetran rápidamente.

Los compuestos arsenicales inorgánicos, al contrario de las especies de arsénico orgánicas, ingresan al organismo con mayor dificultad. No obstante, pueden penetrar por inhalación, ingestión y en menor proporción, a través de la piel. La absorción de arsénico ingerido o depositado en el tracto respiratorio, es en general del 50%. Por ejemplo, en animales, se observó que un 80% del trióxido de arsénico administrado se absorbía en el intestino. Para el ácido dimetilarsínico (DMA), se vio que la absorción por pulmones era del 92% y del 66% en el tracto gastrointestinal (Marafante y Vahter, 1987).

Los compuestos arsenicales inorgánicos son bien absorbidos (80-90%) por la vía gastrointestinal, distribuidos a través del cuerpo, frecuentemente metabolizados por metilación, y excretados mayormente por orina. Los compuestos arsenicales de baja solubilidad (Ej. trióxido de arsénico, selenito de arsénico, arsenito de plomo y arsenito de galio), son absorbidos de manera menos eficiente a partir de una exposición oral.

La piel es una ruta potencial de exposición al arsénico, y la toxicidad sistemática ha sido comprobada en personas que tuvieron contacto dérmico con soluciones de arsénico inorgánico. En el aire se encuentra mayormente como trióxido de arsénico (As_2O_3). La deposición en las vías aéreas y la absorción de los arsenicales por pulmones depende del tamaño y la forma química de la partícula. El arsénico en la atmósfera está adsorbido al material particulado, y en su mayoría en partículas menores a 2 μm de diámetro (Coles *et al.*, 1979).

1.1.5. Biomarcadores de exposición

Un biomarcador es un evento o estado biológico, una señal química, celular, molecular, inmunológica, genética o fisiológica, que se puede medir en un organismo, célula o material biológico. Asimismo, lo puede ser cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en el organismo, que inflencie o prediga la incidencia o consecuencias de una enfermedad, asociado a la exposición a un agente tóxico o a una mezcla compleja.

Simplificando, los biomarcadores generan cambios medibles, ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico. Con su uso se analiza una situación más real, ya que incluye, no sólo el agente, objeto de estudio, sino también el ambiente complejo en que se encuentra.

Los biomarcadores se utilizan para detectar la existencia de una exposición y determinar sus consecuencias biológicas, detectar los estadios iniciales o intermedios de una enfermedad, realizar estudios más rápidos y precisos a nivel preclínico, relacionar la exposición individual a la historia particular de cada individuo, identificar a los individuos sensibles de una población y para fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental. Es por ello que con el uso de biomarcadores, se aumenta la probabilidad de detectar asociaciones entre posibles causas y efectos.

En seres humanos, los biomarcadores de exposición más utilizados para determinar los valores internos de arsénico, son la concentración de arsénico en orina, sangre, pelos y uñas (Morgan, 2001). Debido a que el arsénico se acumula en tejidos ricos en queratina, un buen bioindicador es su presencia en cabellos y uñas. El arsénico en la sangre sólo se usa como un biomarcador de exposición reciente, ya que es rápidamente eliminado de la circulación sanguínea. La concentración de arsénico en la orina se utiliza como una buena medida de la exposición reciente, debido a que el arsénico es rápidamente metabolizado y excretado (Kurttioet al., 1998).

1.1.6. Metabolismo del arsénico

El arsénico puede presentarse en formas químicas orgánicas e inorgánicas y existir en tres estados de oxidación: elemental (0), trivalente (+3, -3), y pentavalente (+5, -5). Las diferencias entre los distintos estados de oxidación tienen gran importancia en relación con su biodisponibilidad y su toxicidad. Además de poseer diferentes estados de oxidación, el arsénico tiene la capacidad de cambiar de un estado a otro, y de este modo es capaz de participar en una gran cantidad de reacciones químicas y biológicas, incluyendo reacciones de óxido-reducción, ácido-base, interacciones covalentes con otros metales y reacciones de metilación y desmetilación. La complejidad y las interacciones entre estas reacciones explican en parte la dificultad para comprender sus mecanismos de acción. Además, el metabolismo de este elemento es diferente para las diferentes especies e incluso entre

individuos de una misma especie, originando una gran variabilidad de respuestas frente a la exposición a este metaloide (Wildfang *et al.*, 2000; Vahter, 2002; Aposhian y Aposhian, 2006).

Cada una de las formas de arsénico posee distintas propiedades fisicoquímicas y una gran variabilidad en cuanto a su disponibilidad en el medio. El arsénico contenido en el agua (principalmente en forma inorgánica), presenta disponibilidad biológica, y los compuestos de arsénico en los alimentos (en forma orgánica e inorgánica) en su mayoría también poseen tal disponibilidad, siendo fácilmente absorbidos.

La exposición humana al arsénico inorgánico, ya sea por ingestión o por inhalación, implica la excreción en orina de una parte inorgánica y de sus dos metabolitos principales: MMA y DMA. Los compuestos inorgánicos parcialmente metilados son rápidamente excretados por la orina, así como los compuestos orgánicos finales. Por otra parte, los compuestos de arsénico orgánico encontrados en los animales marinos son moléculas muy complejas, y parecen ser bastante resistentes a los procesos de biotransformación. Es por ello que no son considerados tóxicos para el hombre, y se eliminan en su forma inicial inalterada (Morgan, 2001).

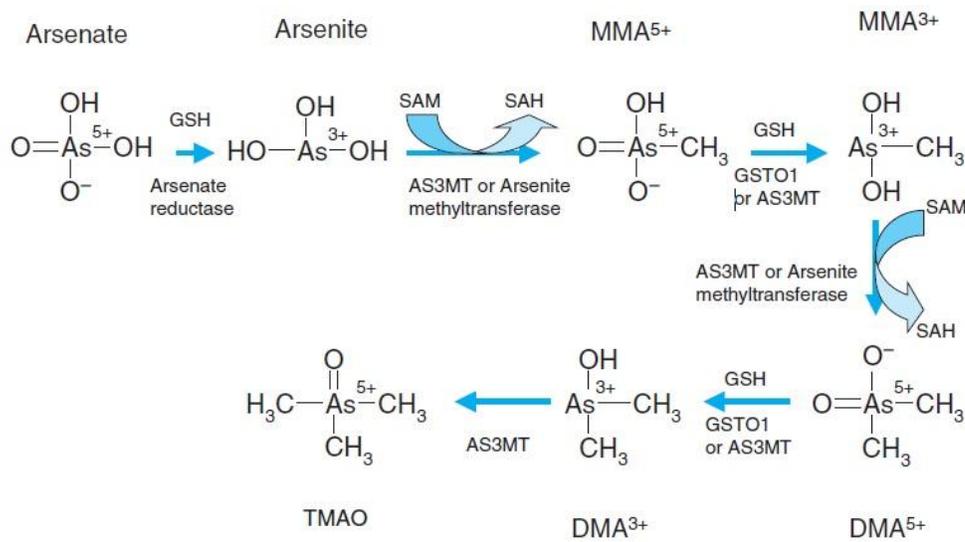
Comúnmente la metilación se consideraba como la principal ruta de detoxificación del arsénico en mamíferos. Sin embargo, existen importantes diferencias interespecíficas cualitativas y cuantitativas en este proceso, hasta el punto en que algunas especies poseen una capacidad de metilación nula o casi nula. En general, los animales excretan más DMA y menos MMA en la orina en comparación con el hombre, mientras que la cobaya, el chimpancé y algunos primates, son incapaces de metilar el arsénico (Vahter, 1999).

La metilación de especies de arsénico inorgánico está aún en duda como un proceso de detoxificación, debido a que algunos autores han identificado una alta toxicidad en los metil arsenicales trivalentes (MMA (III)) (Styblo y Thomas, 1997; Styblo *et al.*, 2000; Petrick *et al.*, 2000).

En la figura 2 se muestra la biotransformación del arsénico. El arseniato es rápidamente reducido a arsenito por la arseniato reductasa. El arsenito es entonces secuencialmente metilado hasta la forma metilarsenato y ácido dimetilarsénico por la metiltransferasa (AS_3MT O Cyt19) o la arsenito metiltransferasa usando S-adenosilmetionina (SAM) como dador de un grupo metil. Los metabolitos intermediarios,

MMA³⁺ (Ácido MonometilArsónico) y DMA³⁺ (Ácido DimetilArsínico), son generados durante este proceso, y estos arsenicales trivalentes metilados, se creen son incluso mas tóxicos que las especies de arsénico inorgánico.

Figura 2. Biotransformación del arsénico



Durante el proceso se generan los metabolitos intermedios MMA⁺³ y DMA⁺³. En humanos, los arsenicales que son excretados por la orina están compuestos por 10-30% de arsenicales inorgánicos, 10-20% de MMA, y 55-76% de DMA (Vahter y Concha, 2001). Sin embargo, las grandes variaciones en la metilación de arsénico ocurren debido a factores tales como la edad y el sexo, y se sospecha que puedan existir polimorfismos genéticos. El metabolismo del arsénico también cambia a través del curso del embarazo. Esto se ve reflejado en la alta excreción por orina de DMA y bajos niveles urinarios de arsénico inorgánico y MMA, los cuales pueden ser tóxicos para el desarrollo del feto.

Una vez absorbido el arsénico o sus derivados, se distribuye entre los distintos compartimientos corporales. El modo de distribuirse es importante en relación a los efectos observados. Este depende del compuesto, de la especie en la que se hace la observación y del tiempo después de la administración o incorporación en que se efectúa la medida.

El arsénico se acumula en el organismo debido a la exposición crónica, y a ciertas concentraciones ocasiona afecciones como: alteraciones en la piel, con efectos secundarios

en el sistema nervioso, irritación de los órganos del aparato respiratorio, gastrointestinal y hematopoyético y acumulación en los huesos, músculos, piel, uñas y pelo; y en menor grado en el hígado y riñones.

El arsénico se excreta por vía urinaria, fecal, por el sudor, cabellos y uñas. Si bien en humanos lo hace mayoritariamente por vía urinaria. Los riñones son los órganos más importantes en la excreción ya que eliminan directamente las sustancias tóxicas de la sangre. Para que una sustancia sea eliminada por la orina, es necesario que sea soluble en agua; así, los compuestos liposolubles se tienen que biotransformar en hidrosolubles para poder ser excretados por esta vía.

Para que el arsénico comience a depositarse en el cabello, la ingesta diaria de este elemento debe superar los 0,50 mg (Buchety Roels, 1981). Pero también depende de la capacidad de detoxificación de cada individuo. El cabello puede ser considerado como una vía de excreción del arsénico, ya que una vez incorporado a él, no es biológicamente disponible. La arsenobetaína, el principal compuesto orgánico de arsénico en pescados y mariscos, menos tóxica que el arsénico inorgánico, no se acumula en el cabello (Vahteret *al.*, 1983). Esto implica que sólo el arsénico en su forma inorgánica puede ser incorporado al cabello.

Normalmente entre el 40 y el 70 % del arsénico procedente de una exposición es absorbido, metabolizado y excretado en un período de 48 horas. Entre dos y cuatro semanas después del final de la exposición, la mayor parte del arsénico que permanece en el organismo se encuentra en tejidos ricos en queratina, como la piel, el cabello y las uñas. (WHO, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

Los niveles normales de arsénico en la orina, el cabello y las uñas son $5-200 \mu\text{gL}^{-1}$, $0,8-5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ y $430-1080 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (US NRC, 1999).

No cabe duda que la dieta puede influir en las cantidades de arsénico excretado. El arsénico puede ser ingerido a través de diferentes alimentos como hortalizas, pescados, mariscos y otros alimentos procesados, que en alguna fase de su producción o preparación hayan estado en contacto con arsénico. Así, por ejemplo, los alimentos marinos pueden contener grandes cantidades de arsénico orgánico en diferentes formas y, al ser consumidos, el arsénico es eliminado rápidamente, aumentando su concentración en la orina (Buchet *et al.*, 1994).

1.1.7. Influencia de los factores genéticos y ambientales

Es evidente que la gran variabilidad en el proceso de metabolización del arsénico, que se ve reflejada en diferencias en el perfil de excreción del compuesto y de sus metabolitos, está asociada con la susceptibilidad frente a sus efectos tóxicos entre poblaciones, e incluso entre individuos de una misma población expuesta. A pesar de ello, todavía es necesario investigar sobre los posibles factores moduladores de esta variabilidad, sea de origen genético o ambiental.

La existencia de una base genética asociada al metabolismo del arsénico se ha comprobado en un estudio en el cual se demostró la existencia de un patrón de agregación familiar en la excreción de los metabolitos metilados del arsénico (Chunget *al.*, 2002). Sin embargo, el papel de los factores genéticos en el metabolismo del arsénico no está totalmente lucidado.

Por otro lado, distintos factores ambientales como el nivel de exposición, la dosis, el sexo (diferencias hormonales), la edad, el hábito de fumar y el estado nutricional, entre otros, parecen también modular la variabilidad de respuesta frente a la exposición al arsénico ya que parece que pueden alterar de manera significativa el proceso de metilación. Algunos estudios indican que la edad puede influir en el metabolismo del arsénico en humanos y que la eficiencia del proceso de metilación se puede alterar o depende de este factor. Los resultados de estos estudios sugieren que los niños, en comparación con los adultos, poseen una menor capacidad de metilación y probablemente acumulan más arsénico que los adultos, siendo por lo tanto más susceptibles a la toxicidad del arsénico y de sus metabolitos (Kurttioet *al.*, 1998; Saad y Hassanien., 2001).

Otras variables que también pueden alterar el metabolismo del arsénico están relacionadas con aspectos nutricionales. Existen numerosos factores de la dieta que influyen en la toxicidad del arsénico. En la mayoría de las áreas donde se detectan problemas graves de salud debidos a los altos niveles de arsénico, se observa una carencia nutricional en sus habitantes. Probablemente, este factor es un potenciador de los efectos tóxicos del arsénico (Tsenget *al.*, 1968).

Por lo tanto, estos distintos factores (ambientales y genéticos) influyen de manera significativa en el proceso de metabolización del arsénico y ejercen un papel esencial como moduladores de su toxicidad y la de sus metabolitos.

1.1.8. Toxicidad del arsénico

Las formas químicas y los estados de oxidación tienen gran importancia en la toxicidad del arsénico. Sin embargo, también son muy importantes otros factores como la naturaleza química y el estado físico del compuesto, la tasa de absorción celular y la tasa de eliminación, así como el estado de salud en que se encuentra el organismo expuesto (Mandal y Suzuki, 2002; Huang *et al.*, 2004).

Resultados con animales de laboratorio indican que el arsénico inorgánico trivalente es más tóxico que el pentavalente, debido a que los compuestos pentavalentes tienen menor efecto en actividades enzimáticas, pero *in vivo* estos pueden ser reducidos a compuestos trivalentes. Las formas trivalentes son capaces de formar fuertes complejos con los tioles interactuando con el grupo SH⁻ de proteínas, enzimas o cofactores, y por lo tanto inhibiendo un gran número de enzimas como por ejemplo el complejo piruvato-dehidrogenasa. Por otra parte, las formas pentavalentes son análogos del fosfato, y pueden sustituirlo de forma competitiva en reacciones endógenas como la síntesis del ATP, con la consecuente pérdida de energía (Huang *et al.*, 2004; Jones, 2007).

Al principio se creía que los compuestos inorgánicos de arsénico tenían una mayor toxicidad que los compuestos orgánicos, y que el proceso de metilación del arsénico inorgánico consistía en una detoxificación. Así, resultados *in vivo* e *in vitro* indicaban una disminución de la citotoxicidad proporcional al aumento de la cantidad de grupos metilo, que poseen una menor reactividad que los grupos oxhidrilo (Eguchi *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997; Kurttio *et al.*, 1998; Vahter, 2000).

Sin embargo, otros estudios indican que los compuestos trivalentes metilados, intermediarios en el proceso de metilación del arsénico, son los más tóxicos (Yamanaka *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2001; Hughes, 2002; Mandal y Suzuki, 2002). Así, resultados obtenidos con células humanas indican que el MMA (III) posee un mayor efecto citotóxico que el arsenito, mientras que otros compuestos de arsénico metilados como el MMA (V) y el DMA (V), son menos tóxicos que el MMA (III) o que el arsénico inorgánico (Styblo *et al.*, 2000; Petrick *et al.*, 2000). Así, hoy se considera que los compuestos arsenicales metilados que poseen arsénico trivalente son más citotóxicos, más genotóxicos y tienen mayor potencial para inhibir las actividades de algunas enzimas, en comparación con los compuestos trivalentes de arsénico inorgánicos.

La escala de toxicidad del arsénico, entonces, decrece en el siguiente orden: $\text{AsH}_3 > \text{As}^{+3}$ orgánico $> \text{As}^{+3}$ inorgánico $> \text{As}^{+5}$ inorgánico $> \text{As}^{+5}$ orgánico $>$ compuestos arsenicales y arsénico elemental. La toxicidad del As^{+3} inorgánico es 10 veces mayor que la del As^{+5} , y la dosis letal para adultos es de 1-4 mg As kg^{-1} de peso (WHO, 2001).

1.2. EFECTOS SOBRE LA SALUD EN POBLACIONES EXPUESTAS AL ARSÉNICO

1.2.1. Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE)

1.2.1.1. Etiología, fisiopatogenia y epidemiología

La actividad industrial metalúrgica en los trabajadores que operaban en fundiciones, originó los primeros casos de arsenicismo reconocidos, causados por el polvo producido en dichas operaciones. Se sumaron posteriormente otras causas ocupacionales de intoxicación crónica por arsénico, como la contaminación del agua por arsenito de sodio para el tratamiento de la sarna ovina en la provincia de Santa Cruz, Argentina; por el uso de insecticidas y fungicidas utilizados en la producción de vinos en Alemania y Francia y entre los trabajadores de fundiciones del cobre en U.S.A.

Pero además de estos casos ocasionales, aislados y controlables mediante el adecuado tratamiento de los desechos industriales, existen extensas áreas de nuestro país con aguas contaminadas con arsénico, con cifras muy por sobre las máximas aceptadas de potabilidad. Esto pone en riesgo a las poblaciones residentes de varias provincias argentinas de padecer enfermedades cardiovasculares, hepatorreales, neurológicas, respiratorias y hematopoyéticas, además de efectos teratogénicos (malformaciones congénitas), mutagénicos (que conducen a padecer diversas formas de cáncer a estas poblaciones), en localizaciones cutánea, respiratoria, digestiva y urinaria, en marcado exceso respecto de poblaciones testigo de áreas del país no afectadas por hidroarsenicismo. Fuera de nuestro país existe esta enfermedad en países americanos, europeos y asiáticos, con consecuencias semejantes.

Es necesario aclarar que la denominación "HACRE" fue propuesta originariamente por dos médicos cordobeses: Tello y Bergoglio (Tello, 1951).

Los padecimientos causados por la contaminación del agua por arsénico se conocían en la provincia de Córdoba como "enfermedad de Bell Ville", por ser esta ciudad el centro

donde mayor cantidad de enfermos fueron observados, sin identificar su causa hasta el año 1913, en que el doctor Mario Goyenechea de Rosario, comunica el hallazgo de dos casos en los que certifica la intoxicación arsenical de los mismos mediante los análisis químicos efectuados por el doctor Agustín Pusso, efectuando la primera correlación clínica - bioquímica del HACRE (Goyenechea, 1917).

En 1917, el doctor Abel Ayerza, describe exhaustivamente las características del padecimiento en sus localizaciones cutáneas y cardio-circulatorias. Posteriormente se suceden en las décadas siguientes los aportes clínicos y patológicos en nuestro país y el exterior.

El HACRE afecta amplias áreas de provincias argentinas como Santiago del Estero, Chaco, Salta, Tucumán, Córdoba, Santa Fe, San Luis, La Pampa, Buenos Aires y Río Negro (Figura 3). La extensa afectación del territorio argentino, de grado variable pero siempre por sobre los $0,05 \text{ mgL}^{-1}$, genera una población en riesgo de sufrir diversas patologías (Besuschio, 1990).

En distintas latitudes de la Argentina se refiere la presencia de alta concentración de arsénico en sus suelos. Sin embargo, no necesariamente sus aguas de pozo provenientes de perforaciones tienen que contener concentraciones altas de arsénico. El contenido depende de la forma química del arsénico presente en el suelo y la composición del agua en cuestión. Importa en particular la alcalinidad de la misma y los contenidos en sales de calcio y magnesio. En general las aguas blandas (pobres en calcio y magnesio) y alcalinas por su riqueza en bicarbonato de sodio, son las que poseen más arsénico.

En lo referente a la napa en la que se encuentran las aguas más ricas en arsénico, tienen una variación regional, pues en algunas zonas predomina el arsénico en las aguas de la primera napa, y en cambio en otras se encuentra en las más profundas. El contenido de arsénico en aguas de la primera napa es variable, pues está influido por las lluvias y sequías, siendo por el contrario más constante en las napas profundas.

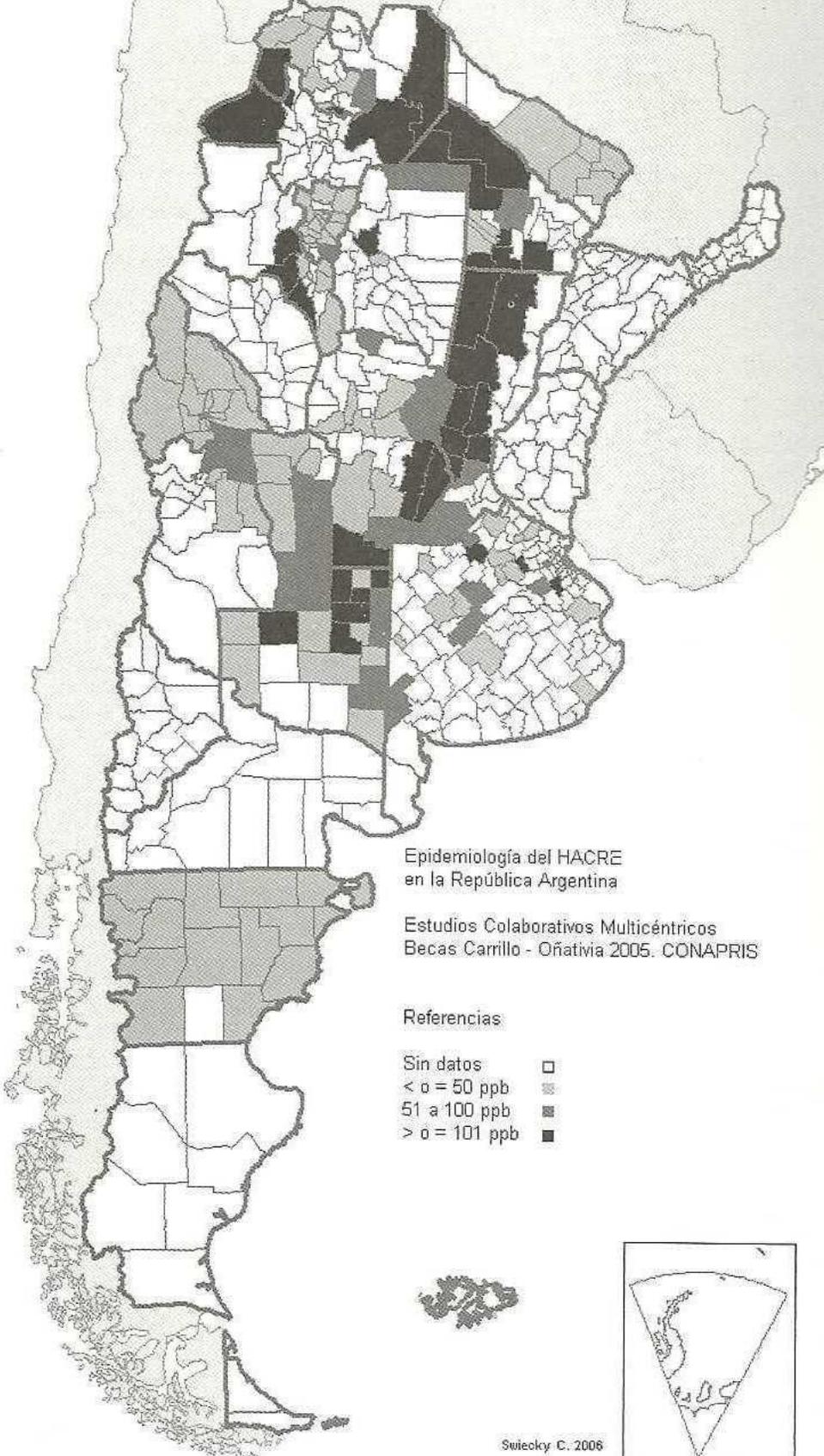
En las aguas superficiales no se suele encontrar arsénico, salvo excepciones como en los ríos de deshielo San Antonio y otros, en San Antonio de las Cobres (Salta) donde el contenido de arsénico es de 1 mg L^{-1} (Concha *et al.*, 1998).

En la provincia de Santiago del Estero se detectó una población infantil con signos de contaminación arsenical, lo cual llevó a realizar un estudio de las aguas en el recorrido

Salta-Monte Quemado (Santiago del Estero), recogiendo muestras en los colegios primarios y en pozos colectivos, obteniéndose en algunos casos valores superiores a 1 mg L^{-1} (Biagini *et al.*, 1995).

En la provincia de Salta, especialmente en la zona del llamado “Chaco Salteño”, se encontraron aguas con un alto contenido arsenical ($0,76$ a $0,80 \text{ mg L}^{-1}$) y casos clínicos de HACRE, con hiperqueratosis palmo plantar, melanodermia y neoplasias cutáneas (Sastre *et al.*, 1997).

Figura 3. Mediana histórica de As por departamento (Argentina, 2006)



1.2.2. Efectos tóxicos del arsénico

El arsénico bloquearía un cofactor de la piruvato oxidasa, el ácido láctico, además de 2-ácido glutámico oxidasa, d-aminoácido oxidasa, deshidrogenasa láctica y citocromo-oxidasa y toda enzima que posea grupos sulfhidrilos esenciales en su estructura. Deprime también el catabolismo de los lípidos al inhibir las lipasas, afectando asimismo la síntesis y oxidación de ácidos grasos y colesterol.

La competencia del ión arseniato con el ión fosfato, así como la inhibición de la fosforilación oxidativa a nivel de la cadena respiratoria sería otra de las acciones del arsénico en la patogénesis lesional.

1.2.3. Presentación clínica del HACRE

La acción del arsénico introducido en el organismo en muy pequeñas cantidades durante años, alcanza a todos los sistemas y aparatos, principalmente a la piel, donde ha sido posible la identificación histoquímica del arsénico en pacientes con hidroarsenicismo crónico, realizada por Bertola y colaboradores (1979) y existiendo igualmente previas confirmaciones en arsenicismo crónico en otras latitudes y con otras causas.

Numerosos estudios en humanos y animales han correlacionado la ingestión prolongada de arsénico y el daño tegumentario y visceral. La afectación cutánea posee en su presentación tres períodos con signos clínicos progresivos:

1) Hiperhidrosis: las palmas y plantas de pies presentan sudoración asociada a prurito, tonalidad rojiza y disestesias.

2) Hiperqueratosis: luego de un variable período de tiempo, en general después de 4 años, descrita por Wilson en 1868. Biagini (1995) señala su presentación en forma difusa o en forma localizada con subvariedades verrugosa, excavada o punctata. Las lesiones se distribuyen simétricamente afectando las palmas (Figura 4) y plantas pudiendo en ocasiones tomar el dorso de manos y con menos frecuencia el de los pies, con posibilidad de extenderse a otras zonas de la piel.

Figura 4. Hiperqueratosis palmar



Histológicamente corresponde a una lesión semejante a verruga vulgar sin cuerpos de inclusión o a nevus verrugoso apigmentado.

3) Melanodermia: que se dispone en "gotas de lluvia" o sembrado de leucodermias lenticulares. Su color varía entre gris pizarra y negro, localizada en cuello, avanzando a horquilla esternal, fosas supraclaviculares, bordes y hueco de axilas, brazos, antebrazos, y tronco invadidos por la melanodermia. En el abdomen se visualiza en la parte baja y flancos, extendiéndose a regiones inguinocrurales, esfumándose hacia los muslos. Las áreas pigmentadas normalmente (aréolas mamarias) se hiperpigmentan. No se observa en cara y mucosas.

La melanodermia arsenical resultaría de la unión de grupos sulfhidrilos de la piel y el arsénico. Con la inhibición de dichos grupos sobre la actividad de la tirosinasa, actuando esta entonces sobre la tiroxina para formar DOPA (dihidroxifenalalanina) la que se transforma por autoxidación en idolquinona, que al polimerizarse forma melanina.

La exposición al arsénico produce bandas blanca características en las uñas, como se muestra en la figura 5, llamadas Líneas de Mees, que aparecen alrededor de seis semanas después del comienzo de los síntomas por intoxicación.

Figura 5. Líneas de Mees



En 1943, Zettel reconoce el efecto nocivo del HACRE sobre el aparato cardiovascular, registrando alteraciones electrocardiográficas en soldados que lo habían ingerido en aguas de consumo, con desaparición de dichas alteraciones al cesar la exposición.

Los trastornos hepáticos como consecuencia de la ingestión de compuestos arsenicales se manifestaron experimentalmente con cirrosis hepática en conejos, esteatosis y necrosis en animales domésticos y en ratas disminución del consumo del oxígeno por la célula hepática; sugiriéndose que un aumento del nivel urinario de uroporfirina puede ser un signo precoz de exposición arsenical.

Las lesiones renales por hidroarsenicismo se han documentado a nivel experimental en ratas, registrándose alteración en lisosomas y mitocondrias en células de túbulo contorneado proximal, otros trabajos en conejos mostraron disfunción renal con disminución de la depuración ureica y aumento de creatinina sérica.

En el sistema nervioso la afectación periférica de tipo polineurítico sensitivo motor ha sido documentada, con disminución de la sensibilidad táctil térmica y dolorosa asimétrica y debilidad muscular manifestada en la marcha o al asir objetos.

En cuanto a la afectación respiratoria se destacan los aportes de Rosenberg en niños de cinco años de edad con fibrosis pulmonar difusa y presencia de lesiones vasculares.

Los efectos hematológicos corresponden a disturbios en hematopoyesis con cambios megaloblásticos y en ocasiones granulocitopenia severa con disminución de defensas e infecciones.

Los efectos teratogénicos del arsénico con presencia de malformaciones congénitas (agenesia renal, fisura palatina, microcefalia, etc.) han sido referidos en niños nacidos de madres que trabajaron durante su embarazo en fundiciones de cobre, además de otros aportes en humanos y experimentales en altas dosis.

1.2.4. Acción mutagénica

Varias experiencias han evidenciado la acción mutagénica del arsénico en microorganismos, plantas, en la *Drosophila sp.* y en células animales, induciendo aberraciones cromosómicas o divisiones celulares anormales, confirmando a la vez la evidencia epidemiológica de la acción carcinogénica del arsénico trivalente en humanos.

Los arsenicales trivalentes orgánicos e inorgánicos además de reaccionar con los grupos sulfhidrilos de un gran número de enzimas que intervienen en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs), actúan sobre la polimerasa del ADN e impiden la incorporación de grupos fosforados en los nucleótidos durante su síntesis.

1.2.5. Toxicidad genética del arsénico

La Tabla 1 muestra los efectos causados por los dos estados de oxidación del arsénico.

Tabla 1. Alteraciones producidas por efecto del As.

	Estado de Oxidación +5	Estado de Oxidación +3
Carcinogenicidad en Humanos	-	+
Mutagenicidad Procariotes-eucariotes	-	+
Reparación DNA	+	+
Efectos Cromosómicos	+	+
Transformaciones de Células	-	+

1.2.6. Interacciones en carcinogénesis

La observación clínica ha llevado a reconocer que la carcinogénesis puede ser potenciada por interacciones entre el huésped, factores químicos, agentes físicos, virus, en varias combinaciones.

Estas interacciones en el huésped experimental pueden corresponder a factores químicos como ocurre con el par selenio-arsénico. La exposición de ratones hembra al selenito en el agua de bebida (2 ppm) durante 15 meses reduce la incidencia del cáncer espontáneo de mama al 10%, comparada con la incidencia observada del 82% en los controles.

1.2.7. Neoplasias en el HACRE

Las dificultades que plantean los estudios experimentales destinados a la demostración de la acción cancerígena del arsénico tienen origen en:

1) La ocurrencia de neoplasias espontáneas en animales; 2) La alta toxicidad del arsénico que lleva a una temprana muerte a los animales; 3) El hecho de que el arsénico posee un largo periodo de latencia para la producción de neoplasia, el que usualmente sobrepasa el promedio de vida animal. Por el contrario, los estudios clínicos y epidemiológicos han aportado evidencia de causalidad para el arsénico en lesiones y neoplasia viscerales y cutáneas, pero los efectos del carcinógeno no han podido ser detectados en animales experimentales.

El cáncer cutáneo constituye una de las complicaciones más temidas. Se denomina originalmente "cáncer de Jonathan Hutchinson".

En 1938, Argüello, Tello y DezaCenget presentan un trabajo sobre 323 casos de cáncer cutáneo, de los cuales 39 fueron relacionados con el arsénico, afectando prioritariamente áreas de la piel no expuestas a radiaciones solares. En otras latitudes, Yeh, How y Lin (1968) sobre una población de 40.421 habitantes de la costa sudoeste de Taiwán expuesta a aguas contaminadas, hallaron en el 18,45% manifestaciones cutáneas de arsenicismo crónico y entre ellas 428 casos de cánceres. El porcentaje de prevalencia de cáncer fue de 10,59% y se incrementa netamente con la edad. El 10% de las personas de 60 años se encontraban afectadas de cáncer cutáneo. Es interesante que nuevamente estos investigadores hallaran que el 74,46% de los carcinomas cutáneos ocurrieron en áreas cubiertas del cuerpo, siendo además la multiplicidad lesional una característica de la neoplasia arsenical.

El proceso evolutivo del cáncer de piel (carcinoma epidermoide) comienza con alteraciones madurativas del epitelio: hiperqueratosis, acantosis, atrofia del epitelio, hasta llegar a la atipia manifiesta como hiperplasia atípica de la capa basal. A partir de estas lesiones de atipia inicial restringida a un sector del epitelio, el proceso afecta a todo su espesor, manifestando a su vez clínicamente la lesión de tipo Bowen correspondiente a carcinoma *in situ* epidérmico.

Tello (1951), observó que las neoplasias malignas viscerales frecuentemente aparecían posteriormente a una neoplasia cutánea. Cita asimismo que de 436 casos de cáncer de piel examinados, 280 se observaron en localizaciones cutáneas cubiertas por la vestimenta.

Garzón y Tello (1950) establecieron que "en algunos casos, posteriormente a la ingestión de arsénico, se observaron localizaciones de cáncer en diversos órganos sin la presencia previa de cáncer cutáneo".

En cuanto a aportes referentes a la correlación hidroarsenicismo/cáncer visceral debemos mencionar un exhaustivo trabajo sobre "Fuentes de exposición y efectos biológicos del arsénico" efectuado por la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer de Lyon (IARC, 1980), en el que se expresa que existen evidencias suficientes para reconocer la relación entre exposición al arsénico inorgánico y cáncer de pulmón, piel, hígado y otros órganos.

Asimismo, A.H. Smith y colaboradores, de la Universidad de California, Berkeley, (1992) establecen que en los Estados Unidos de América existen más de 350.000 personas que consumen agua con un contenido de más de 50 ug L⁻¹ y más de 2,5 millones con consumo de agua con más de 25 ug L⁻¹. Si se considera, de acuerdo a los hallazgos de Taiwán, donde se estableció la relación entre riesgo de padecer cáncer y concentración de arsénico inorgánico, en las aguas de 50 ug L⁻¹ el riesgo hallado para morir por cáncer de hígado, pulmón, riñón o vejiga fue de 13 por 1.000 personas.

Las neoplasias halladas como resultado de la acción del arsénico ocurrieron sobre la edad de 30 años (piel, aparato urinario, tubo digestivo).

1.3. EL ARSÉNICO EN LA PROVINCIA DE LA PAMPA

1.3.1. El agua potable en la provincia de La Pampa

Actualmente la cobertura en el servicio de abastecimiento de agua potable en la provincia de la Pampa es del orden del 90%, lo cual significa que unos 270.000 habitantes tienen acceso al agua potable por red pública. Este porcentaje (superior a la media nacional que se ubica por debajo del 80%) es aún más importante si se considera el número de localidades, por cuanto puede decirse que en La Pampa no hay ninguna que no tenga acceso al agua potable (Administración Provincial del Agua, 2011).

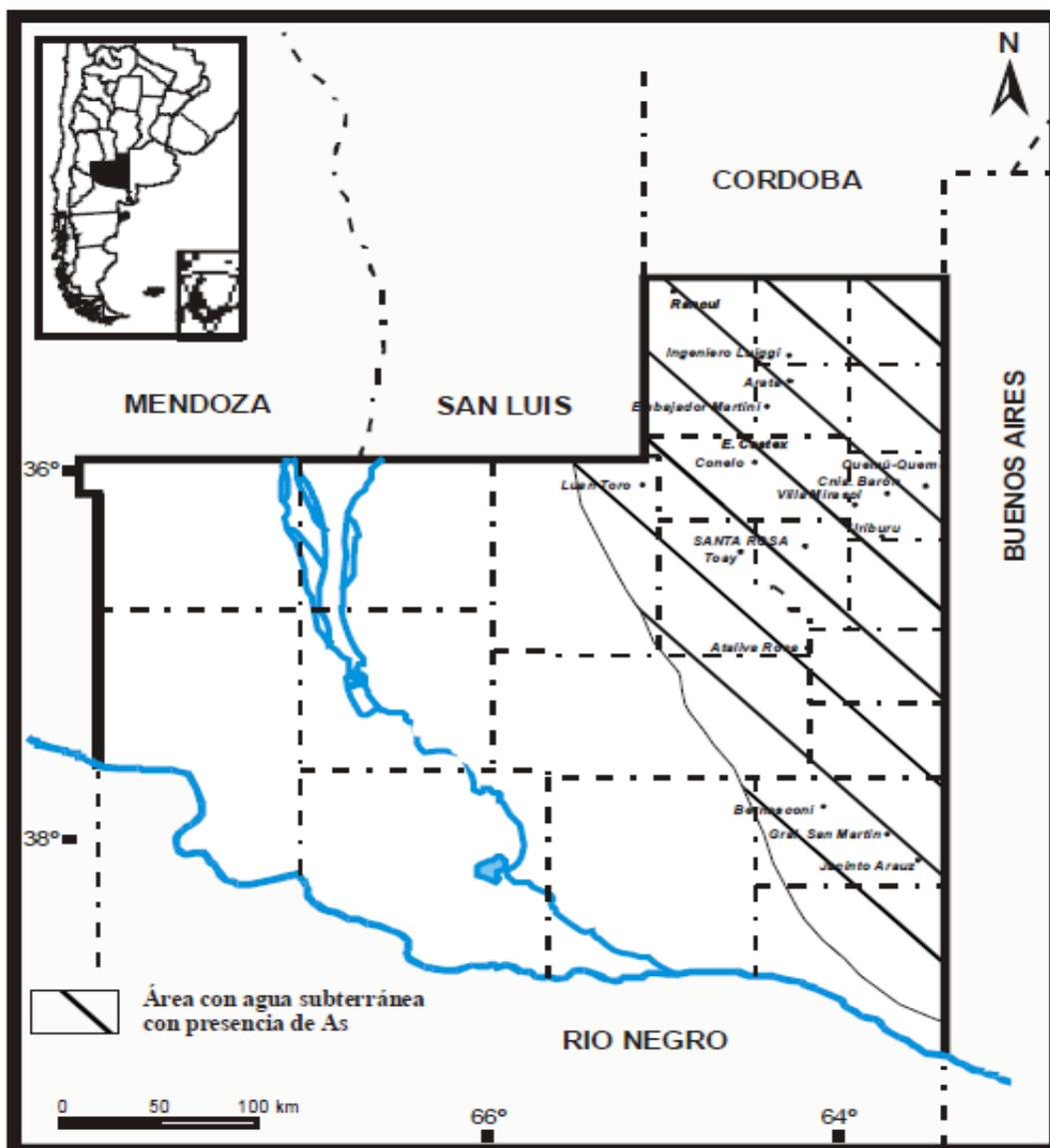
De acuerdo a los datos suministrados por la Dirección de Estadísticas y Censos de La Pampa (2011), a la fecha la población total provincial se estima en aproximadamente 300.000 habitantes, con 277.497 urbanos, de los cuales Santa Rosa tiene alrededor de

100.000 y General Pico alrededor de 50.000, lo que implica que más de la mitad de la población urbana habita en estas dos ciudades. Confirmándose así la tendencia nacional a la concentración en los centros más poblados, determinando un total de 258.072 conexiones, que representa un porcentaje de cobertura cercano al 93%, mientras que el resto habita en el sector rural, dependiendo también casi exclusivamente de estos acuíferos.

La explotación se encuentra sumamente restringida por el contenido de los elementos arsénico, flúor y vanadio. Representa un alto grado de complejidad poder delimitar zonas con distintos valores, ya que su comportamiento es distinto según se lo considere en su distribución horizontal o vertical.

Es importante destacar que son numerosas las áreas que sobresalen del resto por su elevado contenido en arsénico, todas ellas ubicadas en el sector centro-este de la provincia concordantes con la misma región hídrica del oeste de Buenos Aires, sur de Córdoba y sureste de San Luís y análogas con la presencia del Acuífero Pampeano. En la figura 6 se observa la zona de la provincia de La Pampa donde se hallan las mayores concentraciones de arsénico en el agua subterránea. (Schulzet *et al.*, 2002)

Figura 6. Regiones de La Pampa de aguas con alto contenido de As.



No obstante, el arsénico también se presenta en menores cantidades en otras zonas y departamentos de la provincia, coexistiendo con sectores acuíferos portadores de aguas de muy buena calidad, fundamentalmente aquellas ligadas a áreas arenosas, de médanos o de recarga, de donde se extrae el agua para los servicios de provisión. En aquellos casos que las poblaciones no tienen la posibilidad de tener agua de buena calidad, cuentan con plantas de tratamiento por el sistema de ósmosis inversa para consumo humano.

Los sistemas de saneamiento, agua potable y cloacas, son en la actualidad importantes reflejos del grado de desarrollo de una sociedad y la falta de estos trae aparejados

importantes problemas que derivan en enfermedades de origen hídrico, de allí la importancia de la participación comunitaria.

La prestación de los servicios de provisión de agua la hacen las cooperativas en más del 80% de los casos, y los Municipios y Comisiones de Fomento al resto de la población. La calidad del agua que se consume es un dato de enorme significación, dado que es muy frecuente la presencia en exceso de flúor y arsénico en los acuíferos disponibles para su explotación.

1.3.2. El arsénico en el agua subterránea

El comportamiento generalmente errático del arsénico demuestra la complejidad extrema sobre la determinación de su presencia y su predicción. Existen serias dificultades para relacionar las variaciones de las concentraciones de estos elementos con los restantes iones mayoritarios en el agua, debido a la anarquía de patrones de distribución en los acuíferos.

Si se tiene en cuenta la roca base que da origen a los sedimentos que forman el acuífero del cual se extraerá agua, es lógico suponer que pueda contener minerales con cantidades importantes de arsénico y además que potencialmente puedan ser liberados al flujo subterráneo (Schulzet *al.*, 2005).

Se conoce que las variables principales que definen el mayor o menor grado de interacción del arsénico con el medio sólido son: el pH, la solubilidad de minerales portadores de arsénico y la composición de las soluciones percolantes.

El contenido de arsénico en las aguas subterráneas, a pesar de ser una incógnita, presenta íntima relación con los contenidos de flúor, y de comportamiento inverso con la dureza debida al calcio y magnesio.

Por otra parte, la presencia de arsénico en aguas subterráneas obedecería, según hipótesis desarrollada en forma parcial por Kraynov (1980), al concepto de equilibrio parcial o local, el cual indica "...que un sistema que regionalmente se encuentra en desequilibrio (como es el caso de varios acuíferos de nuestra provincia), puede ser dividido o sectorizado en varias partes menores o celdas que cumplen con la condición de equilibrio químico en un momento dado. Estas zonas mas pequeñas que se encuentran en equilibrio local, no están en equilibrio entre sí, lo que reflejaría el estado de desequilibrio general del sistema hidroquímico mayor". Esta situación podría explicar, en alguna manera, la

condición que presentan distintos sectores del acuífero alojados en el pampeano, que si bien sedimentológicamente homogéneo, posee variaciones significativas en la concentración de arsénico a muy poca distancia y a las mismas profundidades.

Por lo expuesto, no resulta para nada sencillo, ni geoquímica ni hidrogeoquímicamente, establecer los mecanismos que gobiernan el aporte de sales por parte de los sedimentos que conforman la zona no saturada (ZNS) y la zona saturada (ZS), ni el tiempo de contacto entre el agua y el material que la contiene.

1.4 MÉTODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO

Existen varias metodologías para la determinación de arsénico, con diferente sensibilidad.

1.4.1 Método espectrofotométrico del dietil ditiocarbamato de plata

Este método ha sido muy usado debido al bajo costo instrumental requerido y a su buena sensibilidad. El mismo, descrito en la norma ISO 6595:1982, consta de una reducción del arsénico pentavalente con el fin de tener todas las especies como arsénico trivalente. Esta reducción se lleva a cabo con ioduro de potasio, ácido clorhídrico y cloruro estannoso. Con el medio acidificado y el agregado de zinc metálico, se logra la generación de hidruros, los cuales van a reaccionar con la especie As^{+3} , para dar arsina. Dicha arsina, es captada por el reactivo dietil ditiocarbamato de plata en piridina, el cual en presencia de arsénico vira del color amarillo al rojo. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de arsénico presente en la muestra.

La medida se realiza por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Finalmente, con una recta de calibración de patrones de arsénico, se realiza el cálculo de la concentración del mismo.

Se puede determinar el arsénico en un rango de 5 a 200 μg de $As L^{-1}$ y, por dilución, mayores concentraciones de arsénico. La técnica permite límites de detección en el rango de $\mu g L^{-1}$ con una instrumentación relativamente sencilla. El límite de detección está entre 1 y 10 $\mu g L^{-1}$ (Wong *et al.*, 2000).

Las interferencias en el método se producen por las siguientes especies: cromo, cobalto, cobre, mercurio, molibdeno, níquel, platino, plata y selenio; pero sólo en altas

concentraciones. El antimonio también forma un complejo coloreado con absorción máxima a 510 nm., por lo que puede interferir en la determinación de arsénico. Debido a que las concentraciones de estos compuestos en aguas son muy bajas, no supone que interfieran de manera significativa en el método.

1.4.2 Espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito.

El principio del método, se basa en la absorción de luz por parte de un elemento en estado atómico. La longitud de onda a la cual la luz es absorbida es específica de cada elemento ($\lambda = 193,7$ nm para el As), siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presentes. Involucra fundamentalmente 2 procesos: la atomización de la muestra y la absorción de radiación proveniente de una fuente conformada por átomos libres.

El tratamiento de la muestra hasta la atomización consta de las siguientes etapas:

1. Desolvatación: la muestra inyectada (2-20 μ L) en el horno de grafito es sometida a una temperatura algo inferior al punto de ebullición del solvente (80-180 °C). Aquí se evaporan el solvente y los componentes volátiles de la matriz.
2. Calcinación o incineración: en esta etapa, la temperatura es elevada para eliminar la materia orgánica (350-1300 °C).
3. Atomización: en esta etapa, el horno es calentado rápidamente, de manera de pasar al analito al estado atómico (1800-2800 °C).

Usualmente se agrega una cuarta etapa para limpieza del horno a alrededor de 3000 °C.

Cuanto mejor sea la separación de elementos concomitantes del analito antes de la atomización, la determinación estará más libre de interferencias. La eficiencia de la separación depende de la volatilidad del elemento en comparación con los concomitantes. (Litter M.I. *et al.* 2009).

1.4.3 Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros.

La técnica de absorción atómica con generación de hidruros permite cuantificar en el orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ o partes por billón (ppb), niveles ultratrazas de elementos como As, Se, Hg, Sn, Sb, Ge, Bi y Te, que tienen la propiedad de formar el hidruro correspondiente.

La muestra disuelta en ácido diluido se mezcla con un agente reductor, tal como una solución de cinc y ácido clorhídrico, cloruro de estaño (SnCl_2) o borohidruro de sodio (NaBH_2). Esta reacción produce H atómico que reacciona con el As, Se, Hg, Sn, Pb, Sb, Ge, Bi y Te en la solución para formar hidruros volátiles. El borohidruro de sodio es el reductor más utilizado.

Los hidruros volátiles como la arsina (AsH_3) son arrastrados por un gas portador como nitrógeno a una celda de cuarzo, que es calentada por una llama de aire-acetileno a una temperatura optimizada para producir a atomización del analito.

Cuando los gases pasan a través de este tubo calentado, ocurre una descomposición térmica, e liberan los átomos el elemento. Al pasar la luz emitida por la lámpara a través del conjunto de átomos, la absorción crece a medida que éstos se producen, llega a un máximo y cae al consumirse el analito y agotarse los átomos de la celda de absorción.

La cuantificación del analito se realiza mediante un gráfico de señal vs concentración. Se puede registrar el máximo de absorción, que corresponde a la altura de pico, o el área bajo la curva, para relacionarlas con la concentración del analito a través de una recta de calibración. (Litter M.I. *et al.* 2009).

1.4.4 Plasma inductivo acoplado a espectrometría de masa (ICP-MS).

Hoy en día, el ICP-MS se ha consolidado como una técnica estándar en diversos laboratorios de prestigio para análisis de control rutinarios de, por ejemplo, aguas, suelos, alimentos, muestras clínicas, y otras. Este tipo de instrumento resulta ideal para medir concentraciones muy bajas de metales pesados como As, Se, Cd, Pb y Hg.

El método describe la determinación de trazas de arsénico por espectrometría de plasma inductivamente acoplado con detector de masas. La muestra es introducida por nebulización neumática a través de una cámara de premezclado al plasma. El aerosol de la muestra es llevado al centro del plasma de argón de alta temperatura donde la muestra es atomizada e ionizada para producir una nube de iones cargados positivamente. Los iones son extraídos, identificados y cuantificados mediante un analizador de masas cuadrupolar, que puede barrer todo el rango de masas y realizar un análisis multielemental. Las cuentas obtenidas para un ion concreto se comparan con la recta de calibración para obtener la concentración del elemento en la muestra. Las interferencias isobáricas y

poliatómicas potenciales se corrigen mediante ecuaciones de interferencias basadas en la abundancia isotópica natural. El uso de estándar interno compensa las interferencias físicas como: viscosidad, tensión superficial y efecto carga en el proceso de transporte de la muestra al plasma y la transferencia de iones al espectrómetro de masas. (Litter M.I. *et al.* 2009).

1.4.5 Espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía

Para la determinación del contenido de arsénico total en una muestra de agua con un contenido arsenical en el rango de los $\mu\text{g As L}^{-1}$, se debe considerar una etapa inicial de preconcentración que permita ubicar la concentración del analito dentro del rango de cuantificación del espectrómetro. Esto se consigue evaporando un volumen conocido de la muestra problema sobre un film de Mylar que contenga una cantidad fija de un patrón interno. Finalmente, se realiza la lectura directa de la concentración de arsénico total en la muestra mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía (EDXRF) utilizando la línea $K\alpha$ del As.

1.4.6 Técnicas acopladas.

El acoplamiento de técnicas separativas, entre ellas la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), asociadas a sistemas de detección específicos, como los mencionados anteriormente, hacen posible la determinación de especies arsenicales tanto orgánicas como inorgánicas, haciendo posibles los estudios de especiación.

A continuación se describen las técnicas acopladas comúnmente utilizadas para la determinación de especies arsenicales orgánicas e inorgánicas:

- *Cromatografía líquida de alta resolución asociada a espectroscopía de emisión mediante plasma inductivo de argón (HPLC-HG-ICP-OES)*: a través de esta técnica es posible la evaluación de especies arsenicales, pero los límites de detección son sólo compatibles con altos niveles del/de los analito/s a determinar. (Litter M.I. *et al.* 2009).

- *Cromatografía líquida de alta resolución asociada a generación de hidruros espectroscopía de emisión mediante plasma inductivo de argón (HPLC-HGICP-OES)*: asociando estas técnicas a la generación de hidruros se obtienen niveles de detección menores, llegando a incrementarse las señales hasta en dos órdenes de magnitud.

- *Cromatografía gaseosa acoplada a generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica (HG-GC-AAS) y Cromatografía gaseosa-trampa fría-acoplada a espectroscopía de absorción atómica (HG-CT-GC-AAS)*: técnicas económicas, con alto poder de detección y aplicables a la determinación de especies arsenicales orgánicas e inorgánicas a niveles de ultratrazas, utilizadas por laboratorios de investigación y aún no disponibles comercialmente. (Litter M.I. *et al.* 2009).
- *Cromatografía líquida de alta resolución asociada a generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica (HPLC-HG-AFS)*: técnica con límites de detección excelentes, adecuada para determinación de especies arsenicales a niveles de ultratrazas, versátil y de costo de operación razonable. (Litter M.I. *et al.* 2009).
- *Cromatografía líquida de alta resolución asociada a generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica (HPLC-HG-AAS)*: la técnica más difundida para estudios de especiación por su simplicidad, bajo costo, facilidad de operación y límites de detección adecuados para determinación a niveles de trazas. (Litter M.I. *et al.* 2009).
- *Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a plasma inductivo y espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS)*: técnica ampliamente utilizada para la determinación de especies arsenicales inorgánicas y orgánicas a nivel de ultratrazas en matrices acuosas, ambientales, alimentarias y biológicas. Su costo es muy elevado.
- *Cromatografía líquida de alta resolución asociada a generación de hidruros-plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas (HPLC-HG-ICPMS)*: provee las ventajas del HPLC-ICP-MS con mejores límites de detección debido a la generación de compuestos volátiles. La separación y detección son excelentes para especies arsenicales volátiles. (Litter M.I. *et al.* 2009).
- *Cromatografía líquida de alta resolución asociada a plasma inductivamente acoplado espectrometría de masas con “ionización electrospray” (HPLC-ES-MS) y Cromatografía líquida de alta resolución asociada a plasma inductivamente acoplado –detección por doble masa con “electrospray” (HPLC-ES-MS-MS)*: se usan crecientemente para confirmar la identificación de las especies y proveer información estructural sobre nuevos compuestos. La cuantificación es difícil, y es imprescindible contar con analistas altamente entrenados. (Litter M.I. *et al.* 2009).

1.4.7 Técnicas electroquímicas

En el análisis voltamétrico se mide la intensidad de corriente que atraviesa un electrodo por aplicación de una diferencia de potencial. Las diferentes técnicas voltamétricas se distinguen, esencialmente, por la diferente forma de variación del potencial aplicado. Se puede decir que la evolución introducida en el tipo de modulación de la forma del potencial ha resultado de una investigación constante dirigida a alcanzar límites de detección cada vez menores, no debiendo olvidarse que las técnicas voltamétricas más avanzadas, con utilización de formas más complejas de modulación de potencial, están asociadas, en general, a límites de detección más bajos.

El método voltamétrico de análisis químico se basa en la interpretación de las curvas intensidad de corriente-potencial, i vs. E , resultantes de la electroreducción o electrooxidación de las especies en solución. (Litter M.I. *et al.* 2009).

Entre las técnicas electroquímicas más comunes, se puede mencionar la voltamperometría diferencial de pulsos, voltamperometría de redisolución anódica, la voltametría cíclica, etc.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En la provincia de La Pampa existen amplias zonas, especialmente en los departamentos Conelo y Hucal, cuyas aguas subterráneas contienen elevadas cantidades de arsénico. Las normas provinciales establecen un nivel máximo de $0,180 \text{ mgL}^{-1}$ de este elemento en las aguas para consumo humano, mientras la U.S. EPA establece $0,050 \text{ mgL}^{-1}$ y tanto el Código Alimentario Argentino como la OMS y la Comunidad Económica Europea lo han fijado en $0,010 \text{ mgL}^{-1}$. Existen elementos en debate e incertidumbres asociados a la evaluación del riesgo de efectos cancerígenos y no cancerígenos para el arsénico. Si bien todos los compuestos de arsénico son tóxicos, la toxicidad varía según el estado de oxidación en el que se encuentre el elemento.

El arsénico es biometilado en forma parcial, predominantemente en el hígado, a ácido metilarsónico y ácido dimetilarsínico. La eficiencia de la metilación depende de la dosis de arsénico y cuando la ingesta supera los 0,50 mg diarios comienza a depositarse en el cabello.

Por ello, la hipótesis de trabajo fue que el proceso de detoxificación podría ser diferente para los individuos de la población en estudio, del efectuado por los de la población afectada en Taiwán, de donde se extrapolaron los límites internacionales actuales. También podremos cotejar los resultados del contenido en arsénico en cabellos de individuos de distintas edades y sexos. Además, los datos con relación a la acumulación del arsénico en cabellos en seres humanos que consumen agua con ese elemento en concentraciones menores o iguales a $0,180 \text{ mgL}^{-1}$ son escasos en todo el mundo y no se han registrado hasta el momento para la provincia de La Pampa. Finalmente, la muy escasa detección de casos de arsenicismo en la provincia y en particular en la localidad de General Pico, así como de cáncer de piel, pese a tener aguas con arsénico, hace esperar que nuestra hipótesis se verifique.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Instrumental y materiales utilizados

3.1.1 Instrumental

- Balanza Analítica Mettler, modelo H20.
- Purificador de agua EASYpure II UV/UF, modelo D8611.
- Espectrofotómetro Metrolab 1600 UV-V.
- Digestor de Microondas Multiware 3000, AntonPaar.

3.1.2 Material de Laboratorio

- Equipos para determinación de arsénico tipo IVA.
- Balones Kjeldahl de vidrio borosilicato de 500 mL de capacidad
- Frascos Erlenmeyer de 300 mL.
- Probetas de 25 mL.
- Pipetas volumétricas doble aforo de 1 mL; 2 mL; 3 mL; 5 mL y 10 mL.
- Pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- Frascos volumétricos de 50 mL, 100 mL y 1000 mL.
- Varillas de vidrio.
- Mecheros.
- Baño de arena.

3.2 Método de análisis para la determinación de arsénico

En la presente tesina, se eligió el Procedimiento Normalizado de Operación para la Determinación de Arsénico por el Método del Dietilditiocarbamato de Plata. La sensibilidad y el rango de concentraciones que permite la técnica son apropiados para los valores estimados en las muestras. (Wong *et al.*, 2000)

3.3 Preparación de reactivos, patrones y muestras para la determinación de arsénico.

3.3.1 Reactivos

- Dietilditiocarbamato de plata (DDCAg) al 0.5 %: se pesaron 0.5 g y se llevo a volumen de 100 ml en matraz aforado, con Piridina. Se conservo en frasco color ámbar
- Trióxido de Arsénico p.a.
 - a) Solución Madre: se pesaron 1.32 g de As_2O_3 . Se disolvieron en 10 mL de agua destilada que contenía 4 g de NaOH, y se llevo a volumen de 1000 mL con agua ultrapura. 1 mL = 1.0 mg As
 - b) Solución Intermedia: se diluyeron 5 ml de Solución Madre en un matraz aforado de 500 ml con agua ultrapura. 1 mL = 0.01 mg As
 - c) Solución Patrón: se diluyeron 10 mL de Solución Intermedia en un matraz aforado de 100 mL con agua ultrapura. 1 mL = 0.001 mg As = 1 ppm
- Acetona p.a.
- Hidróxido de Sodio al 1%: se peso 1 g de NaOH y se llevo a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura.
- Ácido nítrico concentrado 65% p.a.
- Ácido clorhídrico concentrado 36,5 - 38% p.a.
- Ácido sulfúrico concentrado 95-97% p.a.
- Ácido perclórico 70% p.a.
- Granallas de cinc.
- Solución de ioduro de potasio al 15%: se disuelven 15 g en 100 mL de agua ultrapura. Se conserva en frasco color ámbar.
- Solución de cloruro estannoso: se disuelven 40 g de $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ libre de arsénico en 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y se lleva a volumen de 1000 ml con agua ultrapura.
- Acetato de Plomo. Solución saturada de acetato de plomo: se pesan 30 gramos y se llevan a volumen final de 100 ml con agua ultrapura.
- Piridina p.a.
- Agua ultrapura.

3.3.2 Patrones de calibración

Se colocaron alícuotas de la solución patrón en balones Kjeldahl, de modo que se cubrió el rango de concentraciones de As deseado, como se muestra en la tabla 1. Se efectuó la mineralización por medio de una oxidación por vía húmeda, agregando a cada uno 35 mL de HNO₃, 4 mL de H₂SO₄ y 1 mL de HClO₄, a fin de utilizar las mismas condiciones de análisis que en las muestras reales. También se realizó un blanco de reactivo utilizando 1 mL de agua destilada.

El calentamiento se realizó mediante mecheros de gas colocando los balones sobre baño de arena. A medida que transcurría la oxidación se observó una abundante producción de vapores nitrosos de color pardo rojizo, y una disminución paulatina de volumen inicial. El tratamiento se siguió hasta eliminar el exceso de oxidante, manifestado por la producción franca de densos humos blancos de SO₃. Se dejó enfriar y se lavó 3 veces con 10 mL de agua destilada, calentando para concentrar el volumen a aproximadamente 5 mL cada vez.

Tabla 1: Esquema para la preparación de los patrones de calibración.

Patrón	Solución patrón de As ₂ O ₃ 1mL = 0,001mg As	Concentración final (ug L ⁻¹)
0	0	0
1	0.25	10
2	0.75	30
3	1.25	50
4	1.50	60
5	2.00	80
6	2.50	100
7	3.00	120
8	4.00	160
9	5.00	200

3.3.2.1 Modelo de calibración.

Se retomaron cada una de las soluciones, patrones y blanco, mineralizadas y se llevaron a 25 mL con agua. A cada una se le agregó 1 mL de solución de KI y 10 mL de HCl concentrado, y se dejó reposar por 2 minutos. A continuación se agregaron 0.5 mL de solución SnCl₂ y se dejó reposar por otros 15 minutos.

Se prepararon los tubos intermedios con algodón embebidos en la solución de acetato de plomo, y se colocaron 3 mL de la solución piridínica de DDCAg en cada dispositivo de absorción.

Una vez pasados los 15 minutos se agregaron 3 g de Zn en cada erlemeyer que contenían los patrones, y se acopló inmediatamente el tubo vertical y el dispositivo de absorción.

Se dejó desprender hidrogeno durante 45 minutos. En presencia de Arsina el DDCAg vira del amarillo inicial al color rojo, el cual será mas intenso a mayor concentración de As.

Una vez finalizado el burbujeo, se procedió a efectuar la lectura espectrofotométrica a 540 nm y se obtuvo la recta de calibración utilizada como modelo para la cuantificación de As en las muestras reales.

3.3.3 Pretratamiento de las muestras de cabello

Antes de la mineralización de las muestras de cabello, cada una se trató con acetona anhidra, con agitación, tantas veces como fuera necesario hasta que la misma se presentara límpida e incolora. Posteriormente se hizo un lavado suave con NaOH al 1% y por último se lavó con abundante agua destilada hasta eliminar todo resto alcalino. Se secó en estufa a 100° - 105°C. Se conservó en desecador hasta su pesada en balanza de precisión, en cantidad de aproximadamente un gramo por muestra.

3.3.3.1 Mineralización

Se efectuó la mineralización de las muestras de manera idéntica a lo realizado con los patrones de calibración. Preparando también, un blanco de reactivos.

3.3.3.2 Determinación de arsénico en las muestras de cabello

La determinación de As en las soluciones mineralizadas de cabellos se realizó de igual manera que en los patrones de calibración, leyéndose finalmente la absorbancia a 540 nm.

4. RESULTADOS

4.1. Recolección de muestras de cabello

Los sujetos de estudio fueron habitantes de la ciudad de General Pico, La Pampa, Argentina. La toma de muestras se realizó en peluquerías de dicha localidad. Se tuvo la precaución de tomar muestras de cabellos recién cortados para evitar cualquier tipo de contaminación entre individuos. Las muestras obtenidas se conservaron en sobres de papel, para luego ser tratadas en el laboratorio.

4.2 Recta de calibración

Las primeras determinaciones realizadas para construir la recta de calibración se efectuaron siguiendo el procedimiento detallado en el ítem 3.3.2, obteniéndose una ecuación de la recta $y = 0,0017x - 0,0019$ y un $R^2 = 0,9877$.

Posteriormente se construyó la recta de calibración sin realizar el tratamiento de digestión ácida a las distintas alícuotas de los patrones, obteniéndose así el modelo de calibración que se utilizó para predecir las concentraciones de As en las muestras. La ecuación de esta recta es $y = 0,002x - 0,002$ con un $R^2 = 0,9898$, lo que no difiere significativamente de los parámetros obtenidos en la primer recta. De esta manera se consiguió reducir el gasto de los ácidos necesarios para el proceso de digestión, y el tiempo de trabajo.

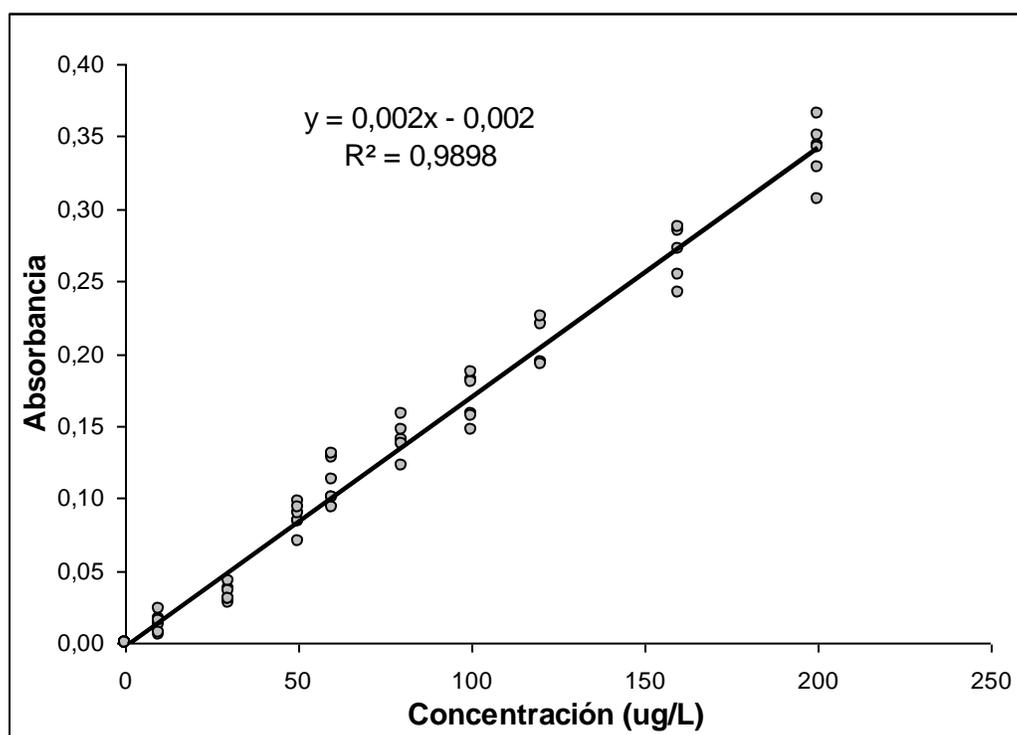
En la tabla 2 se muestran las absorbancias medidas de los patrones, en diferentes fechas, pudiéndose observar la reproducibilidad del método.

Tabla 2: Absorbancias obtenidas de los patrones de la recta de calibración.

Patrón	Concentración µg/L	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Señal 4	Señal 5	Señal 6
1	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	10,00	0,006	0,017	0,013	0,023	0,007	0,015
3	30,00	0,037	0,027	0,043	0,036	0,030	0,030
4	50,00	0,084	0,070	0,084	0,097	0,089	0,093
5	60,00	0,113	0,101	0,093	0,100	0,128	0,131
6	80,00	0,138	0,140	0,123	0,138	0,158	0,147
7	100,00	0,158	0,147	0,157	0,181	0,180	0,187
8	120,00	0,194	0,193	0,228	0,254	0,22	0,225
9	160,00	0,272	0,242	0,254	0,286	0,284	0,287
10	200,00	0,366	0,306	0,329	0,343	0,342	0,350

En la figura 7 se muestra la recta de regresión lineal ajustada de As obtenida con los resultados del análisis de los patrones.

Figura 7: Recta de regresión lineal para la calibración de As



El test de linealidad de bondad de ajuste es significativo con un nivel de confianza del 95%: $F_0 = 2,13$ ($p = 0,052$). Hay evidencia estadística que el ajuste es aceptable.

En la tabla 3 se resumen los parámetros de la regresión lineal:

Tabla 3: Parámetros de la regresión lineal

Pendiente ($b \pm S_b$)	$0,002 \pm 3,27 \times 10^{-5}$
Ordenada al origen ($a \pm S_a$)	$-0,002 \pm 0,003$
N° de valores en x	10
N° totales de datos (n)	60
Media de x	81
Media de y	0,138
Desvío estándar de los residuos ($S_{y/x}$)	0,016
Coefficiente de regresión	0,9898

El bajo valor de $S_{y/x}$ obtenido es una medida de la precisión del método analítico propuesto.

4.3 Prueba de homocedasticidad

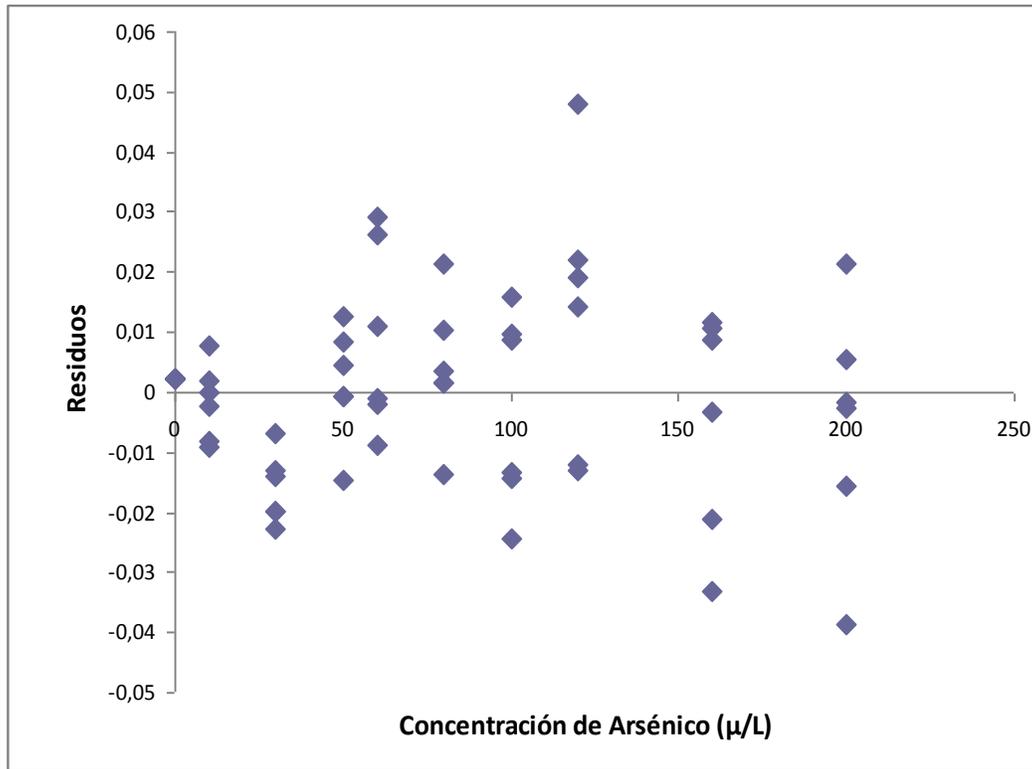
En la tabla 4 se observan los valores de las medias y las varianzas de la variable dependiente (absorbancia) correspondientes a cada patrón de arsénico.

Tabla 4: Medias y varianzas dependientes de la recta de calibración

Patrón	Concentración As $\mu\text{g/L}$	n	Media (y)	Varianza (y)	Y predicho
1	0,00	6	0,000	0,00000	-0,002
2	10,00	6	0,014	0,00004	0,015
3	30,00	6	0,034	0,00003	0,050
4	50,00	6	0,086	0,00009	0,085
5	60,00	6	0,111	0,00025	0,102
6	80,00	6	0,141	0,00013	0,137
7	100,00	6	0,168	0,00027	0,171
8	120,00	6	0,219	0,00053	0,206
9	160,00	6	0,271	0,00036	0,275
10	200,00	6	0,339	0,00041	0,345

En la figura 8 se observa la distribución de residuos de y respecto de la concentración de los patrones. El gráfico muestra que los datos son heterocedásticos porque los residuos no se distribuyen aleatoriamente

Figura 8: Residuos de y respecto de la concentración de los patrones.



Otra manera sencilla de probar que los datos son heterocedásticos, es realizar una prueba F, calculando el cociente entre la varianza_(y) del patrón de 10 µg/L y la varianza_(y) del patrón de 200 µg/L

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_{200}^2}{S_{10}^2}$$

$$F_{\text{calculado}} = \frac{0,00041}{0,00004} = 10,14$$

Se comparó con el valor crítico de F para $\alpha = 0,05$ (ensayo de dos lados), siendo éste $F_{(0,05;5;5)} = 7,15$. Por lo tanto, al ser F crítico menor que el F calculado, se confirma que los datos son heterocedásticos.

4.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección (LOD) es la mínima concentración detectable por el método de manera confiable. Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a una señal igual al valor de la ordenada al origen más 3 veces el desvío estándar de la regresión

$$\text{Señal LOD} = a + 3 S_{y/x}$$

$$\text{Señal LOD} = -0,002 + 3 \times 0,016 = 0,046$$

Reemplazando este valor y en la ecuación de la recta:

$$y = 0,002 x - 0,002$$

$$0,046 = 0,002 x - 0,002$$

$$\text{LOD} = 24 \mu\text{g L}^{-1}$$

El límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a una señal igual al valor de la ordenada al origen más 10 veces el desvío estándar de la regresión:

$$\text{Señal LOQ} = a + 10 S_{y/x}$$

$$\text{Señal LOQ} = -0,002 + 10 \times 0,016 = 0,158$$

Reemplazando este valor y en la ecuación de la recta:

$$y = 0,002 x - 0,002$$

$$0,158 = 0,002 x - 0,002$$

$$\text{LOQ} = 80 \mu\text{g L}^{-1}$$

Este resultado indica que el LOQ real del método utilizado, supera el LOQ teórico según bibliografía. Este es un aspecto sumamente importante a tener en cuenta, ya que los LOQ publicados no siempre se condicen con la realidad experimental y sumado a ello, que el LOQ teórico se encuentra por encima de límite máximo permitido para la cuantificación de As en agua potable según la OMS.

4.5 Resultados de las muestras analizadas

En la tabla 5 se detalla sexo, edad y resultados obtenidos del análisis de las muestras de cabello analizadas.

Tabla 5: resultados obtenidos en las muestras de cabello.

Muestra	Sexo	Edad (años)	Concentración de As ($\mu\text{g/L}$)	Muestra	Sexo	Edad (años)	Concentración de As ($\mu\text{g/L}$)
1	M	53	ND	36	M	21	ND
2	F	78	ND	37	F	22	ND
3	F	49	ND	38	F	8	ND
4	F	29	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$	39	F	34	ND
5	M	23	ND	40	F	10	ND
6	F	53	ND	41	F	38	ND
7	F	57	ND	42	F	32	ND
8	F	60	ND	43	F	44	ND
9	F	52	ND	44	F	37	ND
10	F	11	ND	45	F	13	ND
11	F	43	ND	46	F	12	ND
12	F	35	ND	47	F	43	ND
13	F	7	ND	48	F	48	ND
14	M	45	ND	49	M	43	ND
15	F	40	ND	50	M	62	ND
16	F	10	ND	51	M	62	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$
17	M	6	ND	52	M	66	ND
18	M	16	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$	53	M	64	ND
19	M	2	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$	54	M	8	ND
20	F	12	ND	55	M	27	ND
21	F	25	ND	56	F	42	ND
22	M	25	ND	57	F	67	ND
23	F	24	ND	58	M	11	ND
24	M	30	ND	59	M	11	ND
25	M	25	ND	60	F	46	ND
26	M	42	ND	61	F	61	ND
27	F	50	ND	62	M	38	ND
28	F	50	ND	63	F	46	ND
29	F	20	ND	64	M	8	ND
30	M	20	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$	65	M	14	ND
31	F	48	ND	66	F	40	ND
32	F	37	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$	67	M	70	ND
33	F	26	ND	68	M	40	ND
34	F	80	<80 $\mu\text{g L}^{-1}$	69	M	60	ND
35	F	37	ND	70	F	15	ND

Si bien no es posible informar concentraciones por debajo del LOQ, a los fines de poder evaluar la contaminación de As en la población de estudio, en la tabla 6 se detallan

las muestras con As positivo y se indican las correspondientes concentraciones: sólo el 10% de las mismas mostraron valores por encima del LOD, pero ninguna de ellas supera el valor del LOQ. Se calculó el rango de concentraciones aproximado de As en las muestras mencionadas, obteniéndose valores entre 0,3 a 1,0 mg de As por kg de pelo.

Tabla 6: Muestras que superan el LOD del método.

Muestra	Concentración de As (µg/L)	Concentración de As (mg/kg de pelo)
4	26,22	0,30
18	24,00	0,60
19	40,67	1,02
30	26,78	0,52
32	33,44	0,50
34	45,11	0,92
51	30,67	0,76

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de 70 muestras, distribuidos por sexo y edad.

Tabla 7: Distribución de las muestras según sexo, edad y promedio de la concentración de As en cabello.

Edades (años)	Sexo		Promedio (mg As/kg de pelo)
	F	M	
Hasta 20	-	3	0,71
21-45	2	-	0,40
> 45	1	1	0,84
Total edades	3	4	0,65

De un total de setenta (70) muestras analizadas, de las cuales cuarenta y tres (43) son femeninos y veintisiete (27) masculinos, solamente en siete (7) de ellas se logro detectar As, con una tendencia por sexo mayor hacia los hombres, con mayor presencia de As en hombres jóvenes y mujeres de edad intermedia

5. DISCUSIÓN

El promedio de la concentración de As encontrada en el agua de red, analizada en forma mensual durante veinticuatro meses fue de $0,110 \text{ mgL}^{-1}$, con un valor mínimo de $0,084 \text{ mgL}^{-1}$, y un máximo de $0,117 \text{ mgL}^{-1}$, en concordancia con el trabajo de Meduset *al.* (2005). Estos datos fueron obtenidos de los análisis realizados anteriormente como parte del proyecto “Investigación de arsénico en cabello de habitantes de zonas bajo riesgo de la provincia de La Pampa”, proyecto acreditado N° 77 de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLPam.

En personas no expuestas al arsénico, los valores de este elemento en cabellos oscilan entre $0,02$ y $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ (Valentine *et. al.*, 1979; Rogers et al., 1997; Kurttioet *al.*, 1998), en tanto que en general los niveles de arsénico en los cabellos suelen ser inferiores a 1 mg kg^{-1} . El promedio de As encontrado en los 7 individuos en los cual fue posible detectar este elemento, es de $0,65 \text{ mgkg}^{-1}$ de pelo.

Según estudios hechos en otras comunidades con similares valores de arsénico en agua de bebida, como por ejemplo $0,100 \text{ mg L}^{-1}$, estos se correspondían con un valor de aproximadamente $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$ en cabello (Valentine *et al.*, 1979). En un estudio hecho en Australia, para valores de aproximadamente $0,048 \text{ mgL}^{-1}$ en el agua de bebida, se encontraron en cabello valores promedio superiores a $5,00 \text{ mg kg}^{-1}$ (Hinwoodet *al.*, 2003), y más recientemente, en niños menores de diez años en Pakistán, para valores de arsénico en agua de entre $0,030$ y $0,100 \text{ mg L}^{-1}$, se obtuvieron valores de arsénico en cabello de entre $1,25$ y $3,63 \text{ mg kg}^{-1}$ (Kaziet *al.*, 2010).

De la comparación con los resultados de arsénico en cabello obtenidos en otros lugares del mundo en relación con el nivel de arsénico del agua consumida, vemos que la acumulación de este elemento en el organismo es muy dispar, lo que podría deberse la susceptibilidad al As de los individuos estudiados, debido a características de cada metabolismo, asociado con la cantidad de agua promedio consumida por las diferentes poblaciones en base a costumbres y condiciones climáticas. Por ello coincidimos con lo que expresaran Vahteret *al.* (1995), y Hernández *et al.* (2005) respecto a que deben tenerse en cuenta las características regionales de la población antes de establecer un umbral de tolerancia.

Al comparar los valores para los distintos sexos, se encontró una diferencia significativa entre el valor promedio de las muestras del sexo masculino ($0,72 \text{ mg kg}^{-1}$) y el de las del sexo femenino ($0,57 \text{ mg kg}^{-1}$). Esto coincide con lo expresado por Del Razo *et al.* (1995) y Hopenhayn-Richet *al.* (1996), quienes midieron MMA y DMA en ambos sexos, y concluyeron que las mujeres detoxifican el arsénico mediante biometilación en forma más eficiente que los varones, aunque no pudieron explicar el motivo.

En cuanto a los valores por edades, el grupo de personas menores de veinte años y los mayores de cuarenta y cinco, fueron los que presentaron mayor concentración de As en cabellos. En coincidencia con lo expuesto por Saadet *al.* (2001) referente a que niños y adolescentes acumulan más el arsénico que los adultos, posiblemente porque su mecanismo de detoxificación aún no está completamente desarrollado o debido a que presentan mayor consumo de agua en comparación a las personas adultas. En el caso de las dos muestras de mayores de 45, corresponden a personas de 62 años con $0,76 \text{ mg As kg}^{-1}$ pelo, y 80 años con $0,92 \text{ mg As kg}^{-1}$ pelo, lo que estaría indicando una acumulación de As en el tiempo

Según Buchetet *al.* (1981) la cantidad de arsénico que se acumula en el cabello depende de la capacidad de detoxificación del organismo humano, y este comenzaría a depositarse en él cuando se supera un umbral, próximo a $0,500 \text{ mg}$ diarios. Si consideramos que el agua de General Pico contenía una concentración promedio de $0,110 \text{ mgL}^{-1}$, y que en estas latitudes una persona consume alrededor de dos litros de agua por día, el consumo promedio diario habría sido de $0,220 \text{ mg}$, lejos todavía del mencionado umbral.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos inferir que la concentración de $0,110 \text{ mg L}^{-1}$ de arsénico en el agua de bebida, no ha sido suficiente para producir efectos acumulativos detectables en cabello dentro de la población bajo estudio, ya que dicha acumulación mostró valores muy inferiores a los de comunidades estudiadas previamente por investigadores en otros países, donde era frecuente observar personas afectadas.

El 10% de los individuos de la localidad de General Pico superaron el valor umbral de $0,200 \text{ mg kg}^{-1}$. Esto indicaría que el arsénico presente en el agua de bebida de esta localidad pampeana, ($0,110 \text{ mg L}^{-1}$) produciría efectos detectables en una pequeña cantidad de la población, en valores inferiores a los $0,800 - 5,000 \text{ mg kg}^{-1}$ publicados como normales por la US NRC (1999).

Estos resultados también apoyan la hipótesis de que antes de adoptar un valor máximo de arsénico basado en estándares internacionales, deberían hacerse estudios fisiológicos y ecotóxicos de la población a la cual será aplicado.

Además, se halló que los individuos masculinos de menor franja etaria, son más susceptibles a acumular As en comparación a los de mayor edad, lo cual se halla en concordancia con los datos bibliográficos consultados.

Por último, si tenemos en cuenta los estudios de José Alberto Castro (1982), según los cuales se requiere una acumulación total mínima de 10 g de arsénico consumidas a través del agua para producir cáncer de piel, dado el valor de arsénico del agua de red de General Pico ($0,110 \text{ mg L}^{-1}$) suponiendo un consumo personal medio de dos litros de agua por día, aunque el organismo no eliminara nada del arsénico ingerido, se requeriría más de ciento veinte años para alcanzar el umbral de 10 gramos necesarios para producir cáncer de piel.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abernathy, C.O., Lie Y.P., Longfellow D., Aposhian H.V., Beck B., Goyer R., Menzer R., Rossan C., Thompson and M. Waalkes** (1999). Arsenic health effects, mechanisms of action and research issues. *Environ. Health Perspect.*, 107(7): 593-597.
- Administración Provincial del Agua de La Pampa** (2011). (<http://www.apalapampa.gov.ar>)
- Aposhian H.V. and M.M. Aposhian**(2006). Arsenic toxicology: five questions. *Chem. Res. Toxicol.*, 19: 1-15.
- Argüello A. R., DezaCenguet D. y E.E. Tello** (1938). *Anales del VI Congreso Nacional de Medicina*. Córdoba, Argentina.
- Ayerza A.** (1917). Arsenicismo regional endémico (keratodermia y melanodermia combinadas). *Bol. Acad. Nac. Med.*, Buenos Aires, 1, 11.
- Bertola V. G. de, Biagini R. E., Martín A. y J. E. Mosquera** (1966). Localización histoquímica del arsénico en piel de pacientes con hidroarsenicismo crónico. *Arch. Arg. Dermat.*, 16 (3) 185-189.
- Bertola V. G. de, Biagini R. E., Martín A. y J. E. Mosquera** (1979). Epidemiological Association between Arsenic and Cancer in Argentina. *Biological Trace Elements Research*, Vol. II, N° 1.
- Besuschio S.C.** (1990). "HACRE: Hidroarsenicismo crónico regional endémico". *Consultor de Salud*, 216: 12-14.
- Biagini R.E., Salvador, M.A., Qüerio R.S. de, Torres Soruco C.A., Biagini M.M. y A. Diez Barrantes** (1995). Hidroarsenicismo crónico. Comentario de casos diagnosticados en el periodo 1972-1993. *Arch. Arg. Dermatol.*, 45: 47-52.
- Buchet J.P. and H. Roels**(1981). Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 48: 111-118.
- Buchet J.P., Pauwels J. and R. Lauwerys**(1994). Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. *Environ. Res.*, 66: 44-51.
- Castro J.A.** (1982). Arsénico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Vol. XVI, 1: 3-17.

- Chung J.S., Kalman D.A., Moore L.E., Kosnett M.J., Arroyo A.P., Beeris M., Mazumder D.N., Hernández A.L. and A.H. Smith** (2002). Family correlation of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.*, 110: 729-733.
- Coles D.G., Ragaini R.C., Ondov J.M., Fisher G.L., Silberman D. and B.A. Prentice** (1979). Chemical studies of stack fly ash from a coal-fired power plant. *Environ SciTechnol*, 13(4): 455- 459.
- Concha G., Nermell B. and M.V. Vahter**(1998). Metabolism of organic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environ. Health Perspect.*, 106: 355-359.
- Curtis D. Klaassen** (2008) “Casarett&Doull’s Toxicology: The basic science of poisons.” Seventh Edition. McGraw- Hill Companies, USA.
- Del Razo LM, Garcia-Vargas G, Vargas H, Albores A, and M. Cebrian**(1995). Chronic high arsenic exposure alters the profile of urinary arsenic metabolites in humans. *Toxicologist*, 15:262
- Dirección General de Estadísticas y Censos de La Pampa** (2011), (<http://www.estadisticalapampa.gov.ar>)
- Eguchi N., Kuroda K. and G. Endo** (1997). Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *ArchEnvironContamToxicol.*, 32: 141-145.
- Esparza M.L.C.** (2004). Arsénico en el agua de bebida de América Latina y su efecto en la salud pública. *Hojas de Divulgación Técnica – CEPIS*, Lima, Perú, 95: 1-11.
- Garzon R y E.E. Tello** (1950). Sesiones Dermatológicas en Homenaje al Prof. Pierini, Ed López y Etchegoyen, Buenos Aires, p. 339-358.
- Goyenechea M.** (1917). Sobre la nueva enfermedad descubierta en Bell-Ville. *Rev. Med. de Rosario*, (7): 485.
- Hernandez M.A., González N., Trovatto M.M., CECI J.H. y L. Hernández** (2005). Sobre los criterios para el establecimiento de umbrales de tolerancia de arsénico en agua de bebida. *Actas del IV Congreso Hidrogeológico Argentino*, p. 167-172.
- Hindmarsh J.T. and R.F. McCurdy** (1986). Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity. *CRC. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 23: 315–347.

- Hinwood A.L., Sim M.R., Jolley D., de Klerk N., Bastone E.B., Gerostamoulos J. and O.H. Drummer** (2003). Hair and Toenail Arsenic Concentrations of Residents Living in Areas with High Environmental Arsenic Concentrations. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 111, 2: 187-193.
- Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Smith A.H., Kalman D.A. and L.E. Moore** (1996). Methylation Study of a Population Environmentally Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 104, 6: 620-628.
- Huang C., Ke Q., Costa M. and X. Shi** (2004). Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 255: 57-66.
- Hughes M.F.** (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.*, 133: 1-16.
- IARC** (1980). En: IARC Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans Vol. 50, pharmaceutical Drugs, 47-63, IARC, Lyon. Francia 1980. [Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol-23/arsenic.html>].
- Jack C.N., Wang J. and A. Shraim** (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, 52: 1353-1359.
- Jones F.T.** (2007). A broad view of arsenic. *Poult Sci.*, 86:2-14.
- Kazi T.G., Baig J.A., Shah A.Q., Arain M.B., Jamali M.K., Kandhro G.A., Afridi H.I., Khan S., Wadhwa S.K, Shah F.** (2010). Determination of Arsenic in Scalp Hair of Children and its Correlation with Drinking Water in Exposed Areas of Sindh Pakistan. *Biol Trace Elem Res.* DOI: 10.1007/s12011-010-8866-z.
- Kraynov S., Ryzhenko B., Shvarov Y., Vasilikova I. and L. Kraynova** (1980). Hydrodynamic conditions for computer simulation of physicochemical interactions in a water-rock system in hydrochemical forecasting: Application to CaF₂ with solutions of various compositions. *Geochem. Intemat.* 17(3), 17-29.
- Kurttio P., Komulainen H., Hakala E., Kahelin H. and J. Pekkanen** (1998). Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Arch Environ Contam Toxicol*, 34: 297-305.
- Litter M.I., Amienta M.A., Farías S.S** (2009). Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos.

- Mandal B.K. and K.T. Suzuki** (2002). Arsenic around the world: A review. *Talanta*, 58: 201-235.
- Marafante E. & M. Vahter**(1987).Solubility, retention, and metabolism of intratracheally and orally administered inorganic arsenic compounds in the hamster.*Environ Res*, 42: 72–82.
- Medus M., Mariño E.E. y C.J. Schulz** (2005). Variación temporal en los contenidos de arsénico en la batería de pozos que abastece a General Pico, La Pampa. *Actas del IV Congreso Hidrogeológico Argentino*, p. 73-81.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food** (1999). Total Diet Study: Metals and Other Elements. *Food Surveillance Information Sheet No. 191*. The Stationery Office, London.
- Moore M.M., Harrington-Brock K. and C.L. Doerr**(1997).Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites.*Mutat. Res.*,386: 279-290.
- Morgan A.** (2001).Arsenic exposure and health affects. Office of water, science and technology.Health and Ecological Criteria Division.US EPA.Washington D.C., U.S.A., Chapter 3.
- Nriagu J.O. and J.M. Pacyna** (1988).Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature*, 333: 134-139.
- Petrick J.S., Ayala Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E. and H.V. Aposhian**(2000).Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl.Pharmacol.*,163(2): 203-207.
- Rogers C.E., Tomita A.V., Trowbridge P.R., Gone J.K., Chen J. and P. Zeeb**(1997). Hair analysis does not support hypothesized arsenic and chromium exposure from drinking water in Woburn, Massachusetts. *Environ Health Perspect*, 105:1090-97.
- Saad A. and M.A. Hassanien** (2001). Assessment of arsenic level in the hair of the nonoccupational Egyptian population: Pilot study. *Environment International*. Vol. 27, 6:471-478.
- Sastre M.S., Varillas A., Boemo A., Torres S. y P. Kirshbaum**(1997). Determinación de arsénico en aguas de la provincia de Salta. *Congreso Internacional Sobre Aguas*. Buenos Aires. Argentina. III-3.

- Schulz C., Castro E., Mariño E. y G. Dalmaso** (2002). El agua potable en la provincia de La Pampa. Consecuencias por presencia de arsénico. Work Shop sobre arsénico en Aguas Subterráneas. *Actas del XXXII Congreso Internacional de Hidrología Subterránea y V Congreso Latinoamericano de Aguas Subterráneas*. Asociación Internacional de Hidrogeólogos y Asociación Latinoamericana de Hidrología Subterránea para el Desarrollo, Mar del Plata, 21-25 de Octubre de 2002.
- Schulz C.J., Castro E.C. y E. Mariño** (2005). Presencia de arsénico en las aguas subterráneas de La Pampa. II° Seminario Hispano-Latinoamericano sobre temas actuales de hidrología subterránea y IV° Congreso Hidrogeológico Argentino, Río Cuarto, Argentina.
- Slooff W., Haring B.J.A., Hesse J.M, Janus.J.A. and R. Thomas**(1990).Integrated criteria document arsenic. *National Institute of Public Health and Environmental Protection*.Bilthoven, Netherlands (Report No. 710401004).
- Smedley P.L. and D.G. Kinniburgh**(2002).A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters.*Applied Geochemistry*, 17: 517-568.
- Smith A.H., Hopenhayn-Rich C., Bates M.N., Goeden H.M., Hertz Pichiotto I., Duggan H.M., Wood R., Kosnett M.J. and M.T. Smith** (1992). Cancer Risk From Arsenic in Drinking Water. *Environ. Health Perspect.*, 97: 259-267.
- Styblo M. and D.J. Thomas** (1997).Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system.*Toxicol.Appl.Pharmacol.*,147(1): 1-8.
- Styblo M., Del Razo L.M., Vega L., Germolec D.R., Hamilton G.A., LeCluyse E.L., Reed W., Wang C., Cullen W.R. and D.J. Thomas** (2000).Comparative toxicity of trivalent and pentavalentinorganic and methylated arsenicals in rat and human cells.*Arch. Toxicol.*,74(6): 289-299).
- Tello E.E.** (1951). Hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE). Sus manifestaciones clínicas. *Imprenta de la Univ. Nac.de Córdoba*, 1, 162.
- Thomas D.J.** (2007).Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 222: 365-373.
- Thomas D.J., Styblo M. and L. Shan** (2001).Cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic.*ToxicolApplPharmacol.* 176:127–144.

- Tong Q., Zeng F., Zheng L., Zhao J. and G. Lu** (2001). Apoptosis inducing effects of arsenic trioxide on human bladder cancer cell line BIU-87. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 114: 402-406.
- Tseng W.P., Chu H.M., How S.W., Fong J.M., Lin C.S. and S. Yeh** (1968). Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *Journal of the National Cancer Institute*, 40: 453-463.
- US NRC** (1999). Arsenic in drinking water. *US National Research Council*. National Academy Press. Washington, DC.
- Vahter M.** (1999). Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci. Prog.*, 82: 69-88.
- Vahter M.** (2000). Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol. Lett.*, 112-113: 209-217.
- Vahter M.** (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182: 211-217.
- Vahter M. and G. Concha** (2001). Role of metabolism on arsenic toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, 89: 1-5.
- Vahter M., Concha G., Nermell B., Nilsson R., Dulout F. and A.T. Natarajan** (1995). A unique metabolism of inorganic arsenic in Native Andean women. *European J. Pharmacol.* 293: 445-462.
- Vahter M., Marafante E., & L. Dencker** (1983). Metabolism of arsenobetaine in mice, rats and rabbits. *Sci. Total Environ.*, 30, 197-211.
- Valentine J.L., Kang H.K., and G. Spivey** (1979). Arsenic levels in human blood, urine, and hair in response to exposure via drinking. *Environ Res*, 20: 24-32.
- WHO** (2001). Environmental Health Criteria 224: *Arsenic and Arsenic Compounds*. ISBN 92 4 157224 8. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO** (2003). Chemical Hazards in drinking water. Arsenic. *Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality*. World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/75), Geneva, Switzerland.
- WHO** (2009). Arsenic in Drinking Water. Fact sheet. No. 210 Retrieved June 6, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/>.

- Wildfang E., Healy S.M. and H.V. Aposhian**(2000). Arsenic. En: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. J.Koropatrck and R.K. Zalups (Eds.). Mercer University of School of Medicine and London Regional Centre: 75-112.
- Wong M., Mori V. y M.L. Esparza** (2000). Procedimiento normalizado de operación para la determinación de arsénico por el método dietilditiocarbamato de plata. CEPIS-OPS-OMS.
- Yamanaka K., Hayashi H., Tachikawa M., Kato K., Hasegawa A., Oku N. and S. Okada**(1997). Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat Res.*, 394: 95-101.
- Yeh S., How S.W. and C.S. Lin** (1968).Arsenical cancer of skin-histologic study with special reference to Bowen's disease.*Cancer* 21(2):312-39.
- Yost L.J., Schoof R.A., and R. Aucoin**(1998).Intake of inorganic arsenic in the North American diet.*Human and Ecological Risk Assessment*, 4: 137–152.
- Zettel H.** (1943). Der einflusschronischerarsenschadigung auf herz und gefasse.*Z Clin. Med.*, 142: 689-703.