



“Exposición ambiental a manganeso y otros metales contenidos en material particulado: bioaccesibilidad y biomonitorización”

“Environmental exposure to manganese and other metals in particulate matter: bioaccessibility and biomonitoring”

Memoria de Tesis Doctoral presentada para optar al título de Doctora por la
Universidad de Cantabria

Programa de Doctorado en Ingenierías Química, de la Energía y de Procesos
(BOE núm. 16, de 19 de enero de 2015. RUCT:5601000)

Bohdana Markiv

Directores:

Dr. Ignacio Fernández Olmo

Dr. Miguel Santibáñez Margüello

Este trabajo ha sido financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y "FEDER Una forma de hacer Europa" a través del proyecto titulado "*Exposición ambiental a manganeso y otros metales contenidos en material particulado: bioaccesibilidad, biomonitorización, y su asociación con la función neurológica (BIONEUROMET)*" CTM2017-82636-R. Durante la ejecución de esta Tesis Doctoral, he percibido una ayuda predoctoral financiada conjuntamente por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y "FSE Invierte en tu futuro", con referencia PRE2018-085152. Asimismo, he disfrutado de una estancia predoctoral de tres meses en la "*Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV)*" perteneciente a la "*Université du Littoral Côte d'Opale*", en Dunkerque, Francia. Expreso mi más sincero agradecimiento a todas estas instituciones.

A mi madre y a Fina

“Todo es veneno, nada es veneno,
sólo la dosis hace el veneno”

Paracelso

Agradecimientos

El camino hasta este momento ha sido una montaña rusa de aventuras y desventuras que no hubiera sido posible gracias a muchas personas, por lo que quiero dedicar estas líneas a agradecer a aquellos que han contribuido a que llegue al fin del camino.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Ignacio Fernández y Miguel Santibáñez, que me dieron la oportunidad de hacer una tesis doctoral y seguir investigando. Gracias por darme la libertad de opinar, enfocar y tomar decisiones. He crecido mucho en esta etapa y en parte ha sido gracias a vosotros.

I would like to thank Dominique Courcot and Frédéric Ledoux for giving me the opportunity to stay with their group. I learnt to ask questions, to doubt and to reason. Here also Marc deserves a special mention, as without his help and guidance it would have been a more difficult experience. Thank you all for the warming welcome I received.

A Laura y Andrea. Gracias por vuestra paciencia y aportar calma y serenidad durante esta etapa. Aquí también merecen una mención especial “*las madres y padres del AMPA*”, por compartir el día a día y muchos, muchos cafés.

No hubiera llegado a este momento sin la fe ciega de Adolfo Bastida. Gracias por creer siempre en mí. Por ayudarme a encontrar la vocación cuando más perdida estaba. Por la cuántica a tropezones. Pero sobre todas las cosas, por la diplomacia en momentos críticos. Después de muchas lágrimas y muchas risas, hemos llegado.

A Elena. A ti te debo la búsqueda de esta aventura. El papeleo cuando la burocracia me desbordaba. Y porque “*una vez encontremos nuestro lugar, sabrán apreciar lo que valemos*”.

A Emma y Victoria, que me han enseñado lo que es el trabajo incansable. Por las clases de inglés, de programación y su divulgación de la física. Habéis conseguido que me sienta óptimamente infiltrada. Muchos Skype y una estancia después, también he conseguido entenderos. Simplemente gracias.

A Paola, porque “*lo que une el Manila...*”. Infinitas gracias por hacer el paso por Santander más ameno. Por las charlas, las excursiones, los paseos, las tardes de juegos lloviendo... pero también por los saltos entre charcos y hojas. Jamás olvidaremos Bruselas. También quiero agradecer a Fer y a Lola, con vosotros he aprendido a ver las cosas desde otra perspectiva, y a medio fluir... Porque bueno, “*los 27 pá 72*” son algo difícil de revertir. Gracias a todos vosotros.

A Ana y Adriana, por animarme a no parar de luchar, por recordarme que la meta estaba ahí al lado, y porque con ellas la distancia sólo es un número más. Aquí también quiero agradecer a “*La Huerta*”, que me animó cuando esta aventura estaba por empezar, por celebrar los logros y compartir las derrotas.

A mi madre y mi tía, que siempre me alentaron a seguir estudiando y me educaron en el respeto y la honestidad. Porque en esta familia “*no se nos caen los anillos*”. Gracias por acompañarme en cada paso de mi vida y por no desistir nunca. Jamás podré agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí.

A Jorge. Tan cerca y tan lejos. No tengo palabras para agradecer todo lo que hemos vivido. Ocho años hace de OBL y entre matraces seguimos. Gracias por el apoyo incansable cada día, por compartir la cuenta atrás de los días que iban de unas vacaciones a las siguientes, porque cada minuto es oro. Por las aventuras, las dudas y las alegrías vividas en el trayecto, y en definitiva, por crecer conmigo. Gracias, amor.

Acabo dedicando estas últimas líneas a Rufo, mi fiel compañero desde hace diecisiete años, que ha sido un gran sustento moral todo este tiempo.

ÍNDICE

Tabla de contenidos

Resumen	3
Abstract	5
Capítulo I. Planteamiento	9
1.1. Metal(oid)es en el medio ambiente	9
1.2. Exposición a metal(oid)es	10
1.2.1. Medios y rutas de exposición	10
1.2.2. Evaluación de la exposición	11
1.2.3. Exposición por inhalación	12
1.2.3.1. El material particulado	12
1.2.3.2. Destino del PM y de los metal(oid)es asociados al mismo en el cuerpo humano	13
1.2.3.3. Fuentes atmosféricas de metal(oid)es	14
1.2.3.4. Muestreo de metal(oid)es en aire ambiente	15
1.2.3.5. Niveles de metal(oid)es en aire ambiente	16
1.2.3.6. Marco legislativo de los metal(oid)es en aire ambiente	17
1.2.4. Caracterización del nivel de exposición por inhalación	17
1.2.4.1. Métodos basados en la distancia entre fuente y receptor	18
1.2.4.2. Métodos basados en la evaluación de los niveles en aire ambiente	18
1.2.4.2.1. Contenido total	19
1.2.4.2.2. Contenido bioaccesible	19
1.2.4.3. Métodos basados en la biomonitorización	24
1.2.4.3.1. Biomarcadores para exposición a corto plazo	25
1.2.4.3.2. Biomarcadores para exposición a largo plazo	26
1.2.4.4. Valores de referencia	26
1.3. Descripción del área de estudio	28
1.4. Hipótesis de partida	29
1.5. Objetivos de la Tesis Doctoral	31
Capítulo II. Materiales y métodos	35
2.1. Área y población de estudio	35
2.2. Toma y preparación de muestras biológicas	36
2.3. Determinación del contenido bioaccesible de metal(oid)es	37
2.3.1. Optimización del método	37
2.3.2. Determinación de la bioaccesibilidad y contenido total de metal(oid)es en muestras reales	40
2.4. Análisis por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	40

2.5. Análisis estadístico	42
2.6. Procedimiento de cálculo de la distancia ponderada por el viento para las métricas de exposición	43
2.7. Evaluación del riesgo por exposición a Mn	45
Capítulo III. Resultados y discusión	51
3.1. Estudio de la bioaccesibilidad de metal(oid)es en material de referencia.....	51
3.1.1. Influencia de la selección del fluido sintético	51
3.1.2. Influencia de la composición de fluidos pulmonares intersticiales	53
3.1.3. Influencia de la relación líquido/sólido (L/S).....	55
3.1.4. Protocolo para evaluar la bioaccesibilidad de metal(oid)es contenidos en el PM inhalado	60
3.2. Caracterización de la población del estudio transversal.....	60
3.3. Caracterización de la exposición a metal(oid)es mediante (bio)marcadores de corto plazo	63
3.3.1. Mediante muestreadores personales de PM	63
3.3.2. Mediante sangre total	73
3.4. Caracterización de la exposición a metal(oid)es mediante biomarcadores de largo plazo	79
3.4.1. Mediante pelo del cuero cabelludo.....	79
3.4.2. Mediante uñas de los dedos de las manos	84
3.5. Correlaciones entre las matrices evaluadas	89
3.6. Evaluación del riesgo de exposición a Mn en la zona de estudio	92
3.6.1. Contribución relativa de los diferentes medios y rutas de exposición a Mn	92
3.6.2. Riesgo individualizado asociado a la exposición a Mn.....	97
Conclusiones	107
Conclusions	109
Referencias bibliográficas	113
Anexos	141
Producción científica derivada del proyecto BIONEUROMET	169

RESUMEN

ABSTRACT

Resumen

Los metales y metaloides presentes en el material particulado atmosférico (PM) se asocian con efectos tóxicos para la salud, principalmente de tipo respiratorio, cardiovascular y neurológico. Algunos metales están regulados en la legislación europea relativa a la calidad del aire, estableciéndose un valor límite u objetivo de metal en la atmósfera calculado a partir del contenido total del mismo en el PM₁₀. Sin embargo, cada vez más, aumenta el número de estudios que indica que debe valorarse la bioaccesibilidad de los mismos en fluidos biológicos y no su contenido total. Además, estos fluidos deberían tener en cuenta el tamaño de partícula del PM y su destino en el cuerpo, distinguiéndose entre la fracción inhalable, torácica y respirable. También es útil disponer de datos de biomonitorización, pudiendo asociar posteriormente los posibles efectos adversos sobre la salud con rangos de concentraciones de estos metales en el organismo.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha elegido al Mn como principal metal a estudiar, ya que si bien no está incluido en las Directivas europeas relativas a la calidad del aire, sí figura en las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las cuales se establece como valor guía anual un valor de 150 ng/m³. Este valor ha sido superado habitualmente en el sur de la bahía de Santander en la última década, debido fundamentalmente a las emisiones procedentes de una planta de ferroaleaciones de Mn. En esta área también se han identificado otros metal(oid)es asociados a la citada planta (Fe, Pb y Zn), al tráfico rodado (Cu, Fe y Zn) y a otras fuentes locales menores (As y Cd).

Por este motivo se evaluó la exposición ambiental a metal(oid)es traza (As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn) en las proximidades de la planta de aleaciones de ferromanganeso, utilizando filtros de muestreadores personales de partículas y sangre total como marcadores de exposición a corto plazo, y pelo del cuero cabelludo y uñas como biomarcadores a largo plazo, recogidos de voluntarios participantes de un estudio transversal en la Bahía de Santander (N=130). Se trataron de establecer las relaciones entre la bioaccesibilidad de estos metal(oid)es en fluidos biológicos sintéticos y su contenido en muestras biológicas, y se evaluó de forma personalizada el riesgo para la salud que supone la exposición continua a Mn de acuerdo con las directrices de la US EPA.

Previamente a la determinación de los niveles totales y bioaccesibles de metal(oid)es en filtros de PM de muestreadores personales, se desarrolló un protocolo para estudiar la bioaccesibilidad a partir de un material de referencia (polvo urbano SRM1648a). Para ello, se utilizaron diferentes fluidos extractores (fluido pulmonar intersticial Gamble G₁ y G₂, fluido lisosomal artificial (ALF), fluido gástrico y agua ultrapura) y relaciones líquido/sólido (L/S). Los resultados mostraron una gran influencia de la composición del fluido pulmonar neutro (solución de Gamble) en la bioaccesibilidad de los metal(oid)es. El tipo de agente de lixiviación (agua ultrapura, Gamble G₂, ALF y gástrico) influyó en la fracción soluble de los metal(oid)es, alcanzándose la mayor

bioaccesibilidad en ALF y la más baja en agua ultrapura. En general, se observó que la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en las muestras de PM dependía no sólo de la composición y el pH del fluido sintético, sino también de su especiación. Además, se vio que la bioaccesibilidad de los metal(oid)es para relaciones L/S de 500 a 20000 en ALF y en el fluido gástrico permaneció casi constante con la relación L/S, mientras que aumentó logarítmicamente con la relación L/S en Gamble G₂. Este comportamiento se atribuyó a diferentes mecanismos de lixiviación de los metal(oid)es del material de referencia estudiado: control de la solubilidad en la solución de Gamble, y de la disponibilidad en ALF y en fluido gástrico. A partir de este estudio previo se decidió emplear fluido ALF para determinar la bioaccesibilidad de la fracción fina del PM recogido en los muestreadores personales del estudio transversal, y fluido gástrico para la fracción gruesa.

Los resultados del estudio transversal se analizaron en función de la exposición, teniendo en cuenta la distancia a la fuente principal industrial de Mn, y del sexo. En cuanto a la exposición, se encontraron diferencias significativas para el Mn en todas las fracciones estudiadas de PM, el As en la sangre total, el Mn y Cu en el pelo del cuero cabelludo y el Mn y Pb en las uñas, siendo las concentraciones mayores para los que vivían más cerca de la fuente de Mn, con la excepción del Cu en el pelo del cuero cabelludo. Además, el análisis de correlaciones entre los niveles de Mn en los bio(marcadores) estudiados y la distancia ponderada por el viento a la fuente principal de Mn permite concluir que el pelo del cuero cabelludo y principalmente las uñas son biomarcadores adecuados de la exposición a largo plazo al Mn en el aire. Esto también fue confirmado por las correlaciones positivas estadísticamente significativas entre el Mn del cabello y el Mn bioaccesible en las fracciones gruesa y fina, así como entre el Mn de las uñas y todas las fracciones de PM (fracciones gruesa y fina bioaccesible/no bioaccesible).

En función del sexo, se observaron diferencias significativas para el Fe, Cu y Pb en la sangre total, con mayores concentraciones de Fe y Pb en los hombres, y mayores niveles de Cu en las mujeres; y para el Mn, Cu, Zn, Cd y Pb en el pelo del cuero cabelludo, con mayores concentraciones en los hombres para todos los metales excepto el Cu.

Además, quedó caracterizada la exposición personal a Mn y otros metales traza al cuantificar su bioaccesibilidad y el contenido total en filtros de PM tomados de muestreadores personales. Los niveles medios de Mn total en el aire en PM_{10-2,5} y PM_{2,5} fueron de 127,2 y 126,2 ng/m³ respectivamente, en el grupo más expuesto, y de 18,6 y 31,7 ng/m³ en el grupo moderadamente expuesto.

Finalmente, estos resultados indicaron que las personas que viven cerca de la planta de aleaciones de Mn tienen un mayor riesgo potencial para la salud por la exposición al Mn debido a las mayores concentraciones totales y bioaccesibles de Mn en el aire, confirmándose esto tras realizar la evaluación de riesgos pormenorizada para cada individuo de acuerdo con las directrices de la US EPA.

Abstract

Metals and metalloids in atmospheric particulate matter (PM) are associated with toxic health effects, mainly respiratory, cardiovascular and neurological. Some metals are regulated in the European air quality legislation, setting a limit or target value for metals in the ambient air calculated from the total metal content in PM₁₀. However, an increasing number of studies indicate that the bioaccessibility of metals in biological fluids, rather than their total content, should be assessed. Furthermore, these fluids should consider the particle size of PM and its fate in the body, distinguishing between the inhalable, thoracic and respirable fraction. It is also useful to have biomonitoring data, so that possible adverse health effects can be associated with ranges of concentrations of these metals in the body.

For the development of this Doctoral Thesis, Mn has been chosen as the main metal to be studied, as although it is not included in the European Directives on air quality, it does appear in the World Health Organisation (WHO) guidelines, which establish a value of 150 ng/m³ as an annual guideline value. This value has been regularly exceeded in the south of Santander Bay in the last decade, mainly due to emissions from a Mn ferroalloy plant. Other metal(loid)s associated with this plant (Fe, Pb and Zn), non-exhaust road traffic (Cu, Fe and Zn) and other minor local sources (As and Cd) have also been identified in this area.

For this reason, environmental exposure to trace metal(loid)s (As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) was assessed in the vicinity of the ferromanganese alloys plant, using filters from personal PM samplers and whole blood as short-term exposure markers, and scalp hair and fingernails as long-term biomarkers, collected from volunteers participating in a cross-sectional study in the Santander Bay (N=130). Relationships between the bioaccessibility of these metal(loid)s in synthetic biological fluids and their content in biological samples were established, and the health risk caused by continuous exposure to Mn was individually assessed according to US EPA guidelines.

Prior to the determination of total and bioaccessible levels of metal(loid)s in PM filters from personal samplers, a protocol was developed to study bioaccessibility from a reference material (urban dust SRM1648a). For this purpose, different extraction fluids (interstitial lung fluid Gamble G₁ and G₂, artificial lysosomal fluid (ALF), gastric fluid and ultrapure water) and liquid/solid (L/S) ratios were used. The results showed a strong influence of the composition of the neutral lung fluid (Gamble's solution) on the bioaccessibility of the metal(loid)s. The type of leaching agent (ultrapure water, Gamble G₂, ALF and gastric) also influenced the soluble fraction of the metal(loid)s, with the highest bioaccessibility achieved in ALF and the lowest in ultrapure water. Overall, the bioaccessibility of metal(loid)s in PM samples was found to depend not only on the composition and pH of the synthetic fluid, but also on their speciation. Furthermore, it was

found that the bioaccessibility of metal(loid)s for L/S ratios from 500 to 20000 in ALF and in gastric fluid remained almost constant with L/S ratio, while it increased logarithmically with L/S ratio in Gamble G₂. This behaviour was attributed to different leaching mechanisms of the metal(loid)s from the reference material studied: solubility-controlled in Gamble solution, and availability-controlled in ALF and in gastric fluid. Based on this previous study, it was decided to use ALF fluid to determine the bioaccessibility of the fine fraction of the PM collected from the personal samplers of the cross-sectional study, and gastric fluid for the coarse fraction.

The results of the cross-sectional study were analysed according to exposure, considering the distance to the main industrial source of Mn, and sex. In terms of exposure, significant differences were found for Mn in all studied PM fractions, As in whole blood, Mn and Cu in scalp hair and Mn and Pb in fingernails, with concentrations being higher for those living closer to the Mn source, with the exception of Cu in scalp hair. Furthermore, the analysis of correlations between Mn levels in the bio(markers) studied and the wind-weighted distance to the main Mn source leads to the conclusion that scalp hair and mainly fingernails are suitable biomarkers of long-term exposure to Mn in air. This was also confirmed by statistically significant positive correlations between scalp hair Mn and bioaccessible Mn in the coarse and fine fractions, and between fingernail Mn and all PM fractions (bioaccessible/non-bioaccessible coarse and fine fractions).

According to sex, significant differences were observed for Fe, Cu and Pb in whole blood, with higher concentrations of Fe and Pb in males, and higher levels of Cu in females; and for Mn, Cu, Zn, Cd and Pb in scalp hair, with higher concentrations in males for all metals except Cu.

In addition, personal exposure to Mn and other trace metals was characterised by quantifying their bioaccessibility and total content in PM filters taken from personal samplers. The mean airborne total Mn levels in PM_{10-2.5} and PM_{2.5} were 127.2 and 126.2 ng/m³ respectively in the most exposed group and 18.6 and 31.7 ng/m³ in the moderately exposed group.

Finally, these results indicated that people living near the Mn alloy plant have a higher potential health risk from Mn exposure due to higher total and bioaccessible Mn concentrations in the air, which was confirmed after performing the detailed risk assessment for the studied population according to the US EPA procedure.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO

Capítulo I. Planteamiento

1.1. Metal(oid)es en el medio ambiente

Los metal(oid)es son componentes naturales de la corteza terrestre constituidos por aquellos elementos de la tabla periódica que poseen una densidad muy superior a la del agua (4 a 7 g/cm³) (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2021), que se caracterizan por ser elementos estables, no degradables química ni biológicamente y que por tanto, tienden a acumularse a lo largo de la cadena trófica, residiendo en esta característica su peligrosidad (He et al., 2005; Kuklina et al., 2014).

A pesar de estar presentes de forma natural en el medio ambiente, algunas actividades antropogénicas, principalmente relativas a la industria y al transporte, así como la producción y el uso industrial, doméstico y agrícola de metales y sus derivados contribuyen a la contaminación ambiental y a la exposición humana a los mismos (Tchounwou et al., 2012). Entre las actividades industriales más importantes destacan la minería, la combustión del carbón y derivados del petróleo en las centrales termoeléctricas, el vertido de efluentes y la eliminación de residuos, los plásticos, los textiles, la industria microelectrónica, la conservación de la madera y las plantas de procesamiento de papel (Arruti et al., 2010; Bradl, 2005).

Algunos de estos metales se encuentran presentes en el organismo en concentraciones muy bajas que varían desde unos pocos ppb hasta menos de 10 ppm, denominándose a este grupo de elementos traza como micronutrientes esenciales, destacando el cobalto (Co), el cobre (Cu), el cromo (Cr), el hierro (Fe), el magnesio (Mg), el manganeso (Mn), el molibdeno (Mo), el níquel (Ni), el selenio (Se) y el zinc (Zn); y tanto su carencia como su exceso dan lugar a diversas enfermedades (Pajarillo et al., 2021; Tchounwou et al., 2012; Zoroddu et al., 2019). La biodisponibilidad (fracción de metal(oide) absorbido por el organismo respecto del total al que está expuesto el individuo) está influida por factores físicos como la temperatura, la adsorción y la captación/secuestro, así como por factores químicos como la especiación, la cinética de complejación y la solubilidad en lípidos (Manjón et al., 2020), además de factores biológicos como las características de las especies, las interacciones tróficas y la adaptación bioquímica/fisiológica. En condiciones normales, estos micronutrientes se encuentran regulados homeostáticamente por el propio organismo, sin embargo, algunos metal(oid)es procedentes de fuentes antropogénicas pueden romper este equilibrio, aumentando así su concentración en las matrices biológicas.

Los metales pesados afectan a los orgánulos y componentes celulares, como la membrana celular, la mitocondria, el lisosoma, el retículo endoplásmico, el núcleo y algunas enzimas que participan en el metabolismo, la desintoxicación y la reparación de daños (Wang y Shi, 2001). Numerosos estudios documentan que los iones metálicos interactúan con componentes celulares como el

ADN y las proteínas nucleares, causando daños y cambios conformacionales que pueden conducir a la modulación del ciclo celular, la carcinogénesis o la apoptosis (Blondet et al., 2019; Nag et al., 2022; Tepanosyan et al., 2017). Por este motivo, la preocupación mundial por la salud pública asociada a la contaminación ambiental por metal(oid)es está en aumento.

1.2. Exposición a metal(oid)es

1.2.1. Medios y rutas de exposición

Como ya se ha mencionado, algunos metales son indispensables para el correcto funcionamiento del organismo, siendo considerados como oligoelementos (entre ellos Mn, Fe, Cu, y Zn); sin embargo, un exceso de los mismos puede causar efectos adversos para la salud (carcinogénicos y neurotóxicos entre otros) (Maret, 2016; Zoroddu et al., 2019). La exposición a metal(oid)es por parte de los seres humanos depende de varios factores, entre los que se encuentran los medios donde están presentes, como el aire exterior e interior, el agua y los sedimentos, el suelo y el polvo, los alimentos, la biota acuática y los productos de consumo (US EPA, 2021a). Los contaminantes presentes en estos medios pueden alcanzar al ser humano principalmente a través de tres rutas de exposición: por contacto dérmico, por ingestión o por inhalación.

La exposición dérmica se produce por el contacto de la piel con medios ambientales contaminados, incluyendo el agua (al bañarse o nadar en agua contaminada), los sedimentos (al transitar, pescar, etc.), la tierra o polvo del exterior (durante actividades recreativas, de jardinería, construcción, etc.) y polvo de interiores depositado en alfombras, suelos u otras superficies (US EPA, 2021a). Esta exposición está condicionada por la concentración del contaminante en el medio con el que se entra en contacto, el tiempo de exposición y otros factores como las características de la piel del individuo, la adherencia dérmica, el grosor de la película de los lípidos sobre la piel, etc.

La exposición por ingestión puede producirse a través del consumo de alimentos, o agua contaminados con residuos químicos como resultado del uso de plaguicidas, la deposición de partículas en los productos comestibles, o la absorción y acumulación biótica a partir del suelo o el agua contaminados; o, una ingestión no intencionada o inadvertida, no alimentaria, de suelo, polvo o residuos químicos en superficies u objetos con los que se entra en contacto a través de la actividad "mano-boca" u "objeto-boca" (US EPA, 2021a). Esta exposición está condicionada por la concentración del contaminante en el medio ingerido, la tasa de ingestión y el tiempo de exposición, así como la frecuencia del contacto "mano-boca" u "objeto-boca".

Finalmente, la exposición por inhalación puede producirse al respirar aire contaminado con partículas, vapores o aerosoles, siendo habitualmente la vía más importante debido a que los individuos están expuestos tanto en actividades exteriores como en interiores. Este tipo de exposición queda condicionada por las concentraciones de los contaminantes en el aire, así como

por sus características fisicoquímicas y por el marco temporal en el que se produce dicha exposición, aunque también influyen las características basales de los receptores (ATSDR, 2019; US EPA, 2021a).

La toxicidad del exceso de estos metal(oid)es se debe a la capacidad de algunos de ellos de generar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que pueden dañar el ADN e interrumpir el funcionamiento de las vías de oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos, provocando enfermedades principalmente respiratorias y cardiovasculares (Bates et al., 2015; Cesaroni et al., 2014; Charrier et al., 2014; See et al., 2007). Este hecho está avalado mediante investigaciones toxicológicas recientes, que han puesto de manifiesto que las formas solubles de los metal(oid)es participan en reacciones redox, que implican la producción de ROS (Bates et al., 2019; Calas et al., 2017; Charrier y Anastasio, 2015; Jaishankar et al., 2014). Por tanto, los efectos sobre la salud de los metal(oid)es presentes en el material particulado (PM, por sus siglas en inglés) dependen de la solubilidad de los elementos en el organismo, así como del tamaño de las partículas, la forma y la exposición humana total (Kelly y Fussell, 2012).

1.2.2. Evaluación de la exposición

La evaluación de la exposición es el proceso de estimar o medir la magnitud, frecuencia y duración de la exposición a un agente tóxico, junto con el número y las características de la población expuesta. Idealmente, describe las fuentes, rutas, vías y la incertidumbre en la evaluación (US EPA, 2004a, 2021a).

La exposición puede estimarse utilizando uno o varios de los medios y las vías descritas (inhalación, ingestión y dérmica) de acuerdo a tres posibles enfoques: (i) medida directa de la exposición; (ii) estimación de la exposición en base a diferentes escenarios y mediciones estacionarias/modelizaciones; (iii) reconstrucción de la exposición a partir de datos de biomonitorización con biomarcadores de exposición (US EPA, 2021a).

La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (US EPA, por sus siglas en inglés) ha elaborado una serie de guías con el objetivo de establecer una metodología común para el cálculo del riesgo de efectos para la salud por exposición a determinados contaminantes que estén presentes en cualquier medio, a través de cualquiera de las rutas de exposición descritas. En primer lugar, se determina la dosis media diaria recibida (mg/kg/día) a través de cada una de las vías (DDM), y posteriormente los riesgos no carcinogénicos y carcinogénicos se determinan mediante su cociente de peligrosidad (HQ) y su riesgo carcinogénico (CR). Finalmente, el índice de peligrosidad (HI) se calcula como la suma de los HQ para elementos no carcinogénicos, o CR para elementos carcinogénicos, como muestran las ecuaciones 1.1 y 1.2.

$$HI = \sum_1^i HQ_i \quad (1.1)$$

$$HI = \sum_1^i CR_i \quad (1.2)$$

Existen, además otros métodos de evaluación alternativos y/o complementarios al propuesto por la US EPA, revisados recientemente por Nag et al. (2022), como son el factor de enriquecimiento (EF), el índice de geoacumulación (Igeo), el índice de contaminación (PI), el índice de contaminación integrado (IPI), el índice de carga de contaminación (IPC), el índice de riesgo ecológico potencial (PERI), la distribución de la sensibilidad de las especies (SSD), el cociente de riesgo (RQ), el índice dietético diario (DDI), la ingesta diaria de metales (DIM), el índice de riesgo para la salud (IRS) o el cociente de peligrosidad objetivo (THQ).

1.2.3. Exposición por inhalación

1.2.3.1. El material particulado

El PM se define como aquellas partículas sólidas o líquidas suspendidas en la atmósfera, generadas por actividades naturales o antropogénicas, que poseen diferentes características fisicoquímicas y distribución de tamaño de partícula dependiendo de su origen (US EPA, 2021b). Entre sus componentes predominan los sulfatos, los nitratos, el amonio, la sal marina, el polvo mineral, los compuestos orgánicos y el carbono elemental, y minoritariamente compuestos orgánicos persistentes, así como trazas de metal(oides), siendo alguno de estos últimos potencialmente tóxicos para el ser humano. En este sentido, estudios epidemiológicos demuestran que existe una relación entre la exposición a PM y el incremento de riesgo de mortalidad de la población (Goix et al., 2014; Pinault et al., 2017).

El aumento del riesgo de mortandad se discute en las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS), informando que en 2019 el 99% de la población mundial residía en lugares donde no se respetaban estas directrices. Además, según estimaciones de 2016, la contaminación atmosférica, principalmente por PM con un tamaño de partícula igual o inferior a 2,5 μm , en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca cada año 4,2 millones de defunciones prematuras (OMS, 2021a, 2021b).

Por este motivo, la Directiva 2008/50/CE relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008), transpuesta en España a través del Real Decreto (RD) 102/2011 (Ministerio de la Presidencia, 2011), modificado recientemente por el RD 39/2017, el RD 773/2017 y el RD 678/2014 (Ministerio de la Presidencia, 2014; Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales, 2017a, 2017b), establece valores límite para el PM de acuerdo con el tamaño de las partículas que lo componen, clasificándolas en PM_{10} y $\text{PM}_{2,5}$.

De acuerdo con esta directiva, se define el PM_x como la materia particulada en suspensión en el aire que es suficientemente pequeña para pasar a través de un cabezal de tamaño selectivo con

una eficiencia de corte del 50% para un diámetro aerodinámico de $x \mu\text{m}$. Además, la Agencia Española de Normalización y Certificación (AENOR) ha creado un método de referencia para el muestreo y la medición de PM_{10} y $\text{PM}_{2,5}$ recogido en la norma UNE EN 12341 (AENOR, 2015). Este método consiste en el muestreo de aire ambiental durante 24 horas a un caudal fijo, pesando los filtros antes y después de dicho muestreo y calculando la diferencia de peso por gravimetría. Finalmente, esta diferencia de peso se divide entre el volumen muestreado, obteniendo así la concentración en $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Los valores límite y guía establecidos por la Directiva 2008/50/CE y la OMS, respectivamente (OMS, 2021a; Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008) se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Valores límite y guía establecidos por la Directiva 2008/50/CE y la OMS para PM_{10} y $\text{PM}_{2,5}$ diarios y anuales.

	Directiva 2008/50/CE		OMS (2005)		OMS (2021)	
	Diario ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Anual ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Diario ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Anual ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Diario ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Anual ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
PM_{10}	50*	40	50	20	50	15
$\text{PM}_{2,5}$	-	25**	25	10	25	5

*No podrá superarse más de 35 veces por año civil;

** 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a partir de 2020

1.2.3.2. Destino del PM y de los metal(oid)es asociados al mismo en el cuerpo humano

La vía de exposición por inhalación es especialmente importante para las personas que viven cerca de fuentes de emisión de metal(oid)es al aire en zonas urbanas e industriales (Bauer et al., 2020), como la metalurgia, las acerías, la combustión (incluido el transporte) y la incineración. Los metal(oid)es que llegan a la atmósfera son emitidos mayoritariamente en forma particulada, pudiendo agregarse a otras partículas, formando parte por tanto del PM, siendo su tamaño un parámetro clave en el destino de estos contaminantes en el cuerpo humano (Kelly y Fussell, 2012). Así, la fracción torácica (equivalente a PM_{10}) incluye la fracción traqueobronquial (fracción de masa de las partículas inhaladas que penetran más allá de la laringe, pero que no llegan a penetrar en las vías respiratorias ciliadas) y la fracción respirable (fracción de masa de las partículas inhaladas que penetran en las vías respiratorias no ciliadas). Las partículas de la fracción de tamaño 2,5-10 μm se depositan en la mayoría de los casos en la región faríngea y traqueal (constituyendo la fracción traqueobronquial). Estas partículas son transportadas por la actividad de depuración mucociliar, impulsando las secreciones de la superficie hacia la orofaringe y se tragan, llegando al tracto gastrointestinal, donde entran en contacto con el jugo gástrico. Las partículas más pequeñas (fracción respirable) pueden viajar más profundamente hasta la región alveolar de los pulmones, donde interactúan con el líquido pulmonar intersticial (pH neutro). Sin embargo, estas pequeñas partículas también pueden ser fagocitadas por los macrófagos alveolares, lo que da lugar a un medio más ácido (pH=4,5) (ver Figura 1.1). Entonces, los

metal(oid)es disueltos pueden llegar al sistema circulatorio (Expósito et al., 2021; Fernández-Olmo et al., 2019; Mukhtar y Limbeck, 2013).

Otra vía de entrada al organismo es la translocación. Este proceso es una vía de entrada directa al sistema nervioso central (SNC) a través de la captación en las terminaciones nerviosas presinápticas del olfato o del trigémino situadas en la mucosa nasal, y el posterior transporte axonal retrógrado directamente al SNC. La cantidad de metal(oid) que se transporta al cerebro por esta vía depende de su especiación, siendo las formas más solubles las que se absorben más eficazmente por este proceso (Roth, 2006).

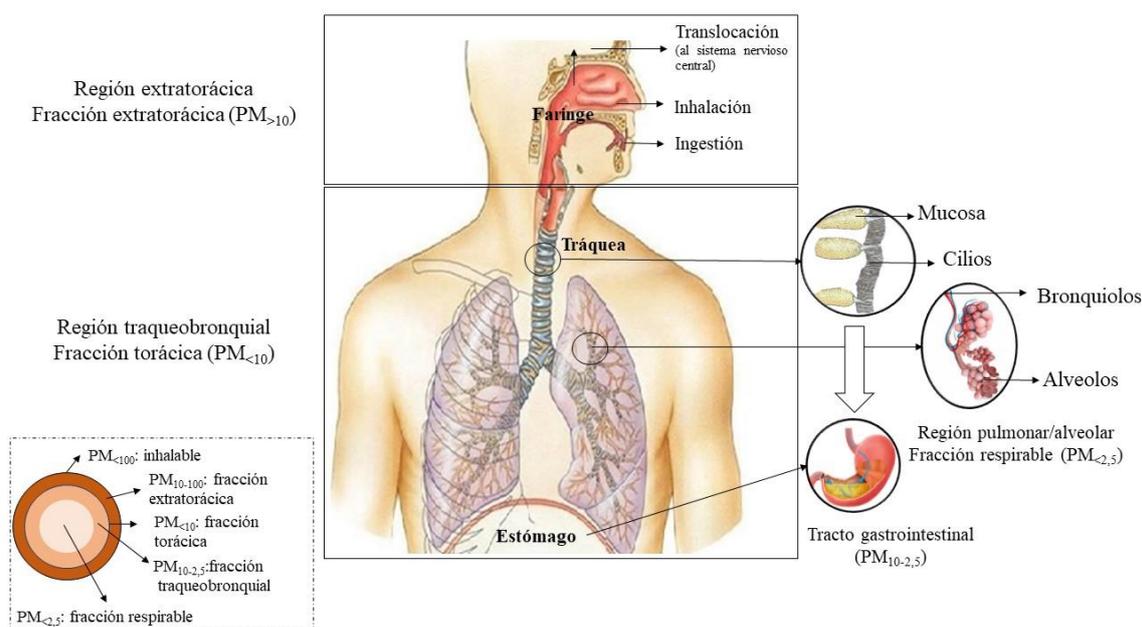


Figura 1.1. Regiones de sistema respiratorio y digestivo a las que acceden las distintas fracciones del PM.

1.2.3.3. Fuentes atmosféricas de metal(oid)es

Los metal(oid)es traza liberados a la atmósfera se encuentran principalmente unidos a PM, procedente de fuentes naturales como la erosión del suelo, las emisiones volcánicas, los incendios forestales, etc., aunque mayoritariamente de fuentes antropogénicas (Bradl, 2005; Srivastava et al., 2018).

En las zonas urbanas, el tráfico rodado representa una de las principales fuentes de estas emisiones, por ejemplo, por el escape de los vehículos, el desgaste de las ruedas, los frenos y el pavimento, o la resuspensión de las partículas depositadas (Johansson et al., 2009). La composición proveniente del escape de los vehículos es variable y depende fundamentalmente del tipo, edad, mantenimiento del motor y combustible del vehículo (Pant y Harrison, 2013). Sin embargo, los trazadores provenientes del desgaste de ruedas, frenos, pavimento y resuspensión de partículas depositadas están definidos de manera más precisa, emitiéndose principalmente Fe, Cu, Zn, Sb, Mo, Ba y Pb (Comisión Europea, 2014; Hagino et al., 2016). Además, en zonas costeras con actividad portuaria, destacan las emisiones de V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Co y Pb

asociadas a las impurezas metálicas de los combustibles empleados por los barcos (Streibel et al., 2017; Viana et al., 2009).

Otra fuente importante es la quema de combustibles fósiles procedentes de actividades industriales, comerciales o residenciales (EEA, 2018). Entre las actividades industriales, son importantes fuentes de emisión de metal(oid)es a la atmósfera las acerías (Al, Mn, Fe, Zn y Pb) (Hleis et al., 2013; Lucas et al., 2015), las fundiciones de cobre (Cu y As) (Chen et al., 2012), las fundiciones de zinc (Zn, Cd y Pb) (MacIntosh et al., 2010), o la producción de ferromanganeso y silicomanganeso (Mn) (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019a; Lucas et al., 2015; Otero-Pregigueiro et al., 2018).

1.2.3.4. Muestreo de metal(oid)es en aire ambiente

Como los metal(oid)es están mayoritariamente ligados a la fracción particulada, su muestreo requiere recoger muestras de PM. Esta toma de muestras puede ser personal (una persona lleva el muestreador) o estacionaria (el muestreador se sitúa en un lugar fijo en el que se va a realizar la determinación de la concentración ambiental de PM).

La principal limitación de los muestreadores estacionarios es que solo proporcionan información en los puntos individuales donde se encuentran (Fulk et al., 2016), inconveniente que puede solucionarse mediante el uso de muestreadores personales, bombas portátiles conectadas a pequeños muestreadores, ciclones o impactadores donde se encuentran los filtros, fáciles de llevar por los individuos expuestos. Esta exposición personal es a veces mayor que la que muestran las mediciones con muestreadores estacionarios debido al llamado efecto de "nube personal", causado por la proximidad a fuentes de contaminación o la resuspensión de partículas por la actividad humana (Fulk et al., 2016; Wallace, 2000). Además, el muestreo personal tiene en cuenta los cambios en la exposición durante el período de muestreo, por lo que refleja fundamentalmente la exposición individual a corto plazo. Por estos motivos, la monitorización personal está ganando popularidad, desarrollándose además avances tecnológicos que han permitido reducir el tamaño y peso de los dispositivos de monitorización al tiempo que han mejorado la precisión y la eficiencia (Zou et al., 2009).

Una vez establecido el método de medición gravimétrico normalizado para la determinación de la concentración másica PM₁₀ o PM_{2,5} de la materia particulada en suspensión, la norma UNE EN 14902, define un método normalizado para la medida de Pb, Cd, As y Ni en la fracción PM₁₀ de la materia particulada en suspensión (AENOR, 1999, 2006, 2015). Este método permite el uso de los captadores de PM de alto y/o bajo volumen establecidos en la norma UNE EN 12341, pudiendo ser captadores de filtro individual o secuenciales. Además, los filtros empleados deben tener una eficacia de separación de al menos un 99,5% para un diámetro aerodinámico de 0,3 µm, siendo analizados los blancos de cada lote de filtros. Tras la toma de muestra, propone una

digestión ácida para la disolución de los metales retenidos en el filtro mediante el empleo de un sistema de digestión por microondas, recomendando emplear volúmenes adecuados de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (proporción 4/1) hasta cubrir completamente el filtro, y realizar la digestión con una rampa de temperatura que alcanza los 180°C en 20 min, incrementándola lentamente hasta aproximadamente 220°C y manteniéndola alrededor de 20 min. Finalmente, establece dos alternativas de análisis de la muestra: por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS, por sus siglas en inglés), o por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/MS, por sus siglas en inglés).

Existen otras técnicas de análisis como la espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/OES, por sus siglas en inglés) (Amin et al., 2018), aunque posee peores límites de detección (LD) y no se encuentra descrita en la norma UNE EN 14902.

1.2.3.5. Niveles de metal(oid)es en aire ambiente

En consonancia con la legislación europea adoptada para la reducción de la contaminación atmosférica, las emisiones de metales pesados por los países miembros de la Unión Europea han disminuido progresivamente desde 2005 hasta 2019 (último año del que se aportan datos), con una bajada promedio de las emisiones de Pb, Hg y Cd del 44%, 45% y 33% respectivamente, siendo los países más contaminantes Alemania, Italia y Polonia en el último año (EEA, 2021). En lo que concierne a España, los niveles de Pb, Hg y Cd han disminuido en un 26%, 58% y 36% respectivamente. Además, la Agencia Europea del Medioambiente (EEA, por sus siglas en inglés) especifica que la exposición a niveles de As, Cd, Pb y Ni en aire ambiente por encima de los valores límite establecidos en la legislación europea se da únicamente en áreas específicas, debido principalmente a que la emisión de estos contaminantes está vinculada con ciertas plantas industriales o de generación de energía (EEA, 2021).

Esta reducción en las emisiones se ha manifestado en los niveles de dichos metal(oid)es en aire ambiente. En 2018, los niveles de As sólo excedieron el valor objetivo (6 ng/m^3) en seis estaciones de muestreo situadas en Bélgica, Polonia, Alemania e Italia, todas ellas situadas en zonas industriales suburbanas y zonas urbanas de fondo (EEA, 2020). En cuanto a Cd, por primera vez no se midieron concentraciones por encima del valor objetivo (5 ng/m^3), y una única estación ubicada en Rumanía superó el valor límite ($0,5\text{ }\mu\text{g/m}^3$) establecido para el Pb (EEA, 2020). Finalmente, solo tres estaciones pertenecientes a Reino Unido, Francia y Noruega sobrepasaron el valor objetivo propuesto para el Ni (20 ng/m^3) (EEA, 2020).

A pesar de los avances impulsados por las políticas de la Unión Europea para reducir las emisiones y proteger a los ciudadanos de los contaminantes atmosféricos como los metal(oid)es, sigue siendo necesaria una mejora en cuanto a la regulación de algunos metales sobre los que existen valores guía pero no valores límite, como es el caso del Mn.

1.2.3.6. Marco legislativo de los metal(oid)es en aire ambiente

La Directiva 2004/107/CE de 15 de diciembre de 2004, relativa al As, Cd, Hg, Ni y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2005), establece valores objetivo para el Ni, As y Cd en el PM₁₀. Asimismo, la Directiva 2008/50/CE de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa establece un valor límite para el Pb (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008). En España, ambas directivas fueron transpuestas en el RD 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire (Ministerio de la Presidencia, 2011), que posteriormente ha sido modificado por el RD 678/2014, el RD 39/2017 y el RD 773/2017 (Ministerio de la Presidencia, 2014; Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales, 2017a, 2017b). A pesar de que, tal y como se menciona en la Directiva 2004/107/CE, los datos científicos muestran que el As, el Cd y el Ni son carcinogénicos genotóxicos para el ser humano y que por tanto no hay ningún límite identificable por debajo del cual estas sustancias no constituyan un riesgo para la salud humana, el valor objetivo establecido para estos metal(oid)es tiene como fin reducir al mínimo dicho riesgo atendiendo además a factores económicos y técnicos. Por otro lado, la OMS establece una serie de valores guía para determinados metales, basándose exclusivamente en criterios de protección de la salud humana (OMS, 2000). Estos valores no han sido actualizados en la nueva guía elaborada por la OMS, revisándose únicamente los valores de PM₁₀, PM_{2,5}, O₃, NO₂, SO₂ y CO (OMS, 2021a).

En la Tabla 1.2 se muestran los valores objetivo y límite establecidos en la legislación europea, así como los valores guía recomendados por la OMS para los metal(oid)es que son de interés en esta Tesis Doctoral.

Tabla 1.2. Valores límite y objetivo establecidos en las Directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE y valores guía recomendados por la OMS para los metal(oid)es de interés en esta Tesis Doctoral.

	Legislación europea		OMS
	Valor objetivo	Valor límite	Valor guía
As	6 ng/m ³ (anual)	-	-
Cd	5 ng/m ³ (anual)	-	5 ng/m ³ (anual)
Pb	-	500 ng/m ³ (anual)	500 ng/m ³ (anual)
Mn	-	-	150 ng/m ³ (anual)

1.2.4. Caracterización del nivel de exposición por inhalación

La exposición por inhalación puede estimarse a partir de varios posibles enfoques, desde el más simple, como la distancia entre la fuente atmosférica principal de metal(oide) y la ubicación (domicilio o lugar de estudio o de trabajo) del receptor, como otros más complejos, entre los que pueden destacarse la medida directa de la concentración de contaminante al que está expuesto en todo momento el receptor mediante muestreadores personales o la medida de la concentración del contaminante mediante un muestreador estacionario ubicado en la zona en la que se encuentra el

receptor, o la biomonitorización de tales contaminantes en los sujetos receptores mediante biomarcadores de exposición.

1.2.4.1. Métodos basados en la distancia entre fuente y receptor

La caracterización del grado de exposición a metal(oid)es por inhalación puede abordarse inicialmente a través de la distancia entre el receptor y una fuente de emisión a la atmósfera concreta (Fulk et al., 2017). A pesar de que la localización del receptor durante el período de análisis es variable y dependiente de la actividad que desarrolle cada sujeto, las ubicaciones más habituales entre las que se reparte el tiempo de exposición son el domicilio (para niños y adultos), el lugar del trabajo (adultos) y el colegio (niños). Esto se ha tenido en cuenta en algunos estudios a través de una distancia ponderada por el tiempo en que cada sujeto pasa en cada tipo de ubicación (Fulk et al., 2016, 2017). Pese a que el hecho de no considerar las pautas de la actividad humana en el tiempo de exposición puede conllevar a la obtención de resultados opuestos a la suposición básica de que, a mayor proximidad, mayor concentración y exposición (Cordier et al., 2004; Zou et al., 2009), algunos estudios epidemiológicos transversales han utilizado la distancia entre el domicilio de los participantes y la fuente de emisión de determinados contaminantes atmosféricos como medida simplificada de la exposición (Mbengue et al., 2015; Vimercati et al., 2016, 2017), mientras que otros indican cualitativamente la importancia de estar a sotavento de la fuente de emisión con respecto a los vientos dominantes (Klepeis et al., 2009; Marshall et al., 2003; Zubero et al., 2010). Esta distancia a la fuente puede ponderarse con la dirección del viento tal como indican Haynes et al. (2012) al abordar la exposición al Mn en las proximidades de una planta de aleación de Mn por parte de los niños que viven en la ciudad de Marietta (Ohio) en EE.UU.

1.2.4.2. Métodos basados en la evaluación de los niveles en aire ambiente

La exposición a metal(oid)es ligados a PM puede evaluarse de forma directa a partir de la medición de los niveles de estos metal(oid)es en el aire a partir de campañas de muestreo personal de PM, o bien a partir de la evaluación de escenarios basados en concentraciones de los metal(oid)es medidas con muestreadores estacionarios o simuladas mediante diferentes modelos, y que tienen en cuenta la frecuencia y duración de la exposición (Fulk et al., 2016; Zou et al., 2009).

La medida directa de la exposición mientras ocurre puede abordarse con el empleo de muestreadores personales de PM. Este método es el que produce la menor incertidumbre posible a la hora de estimar la concentración de exposición, pero tiene como inconvenientes el mayor costo del muestreo, y la incertidumbre de extrapolar a largo plazo la exposición que se ha determinado en un período corto (típicamente menos de 24 horas). Otra ventaja es que la concentración medida promedia todas los posibles escenarios de exposición por los que ha pasado

el receptor, por lo que no son necesarios los datos de frecuencia y duración de los contactos con el contaminante en los diferentes escenarios a la hora de estimar la concentración de exposición (US EPA, 2021a).

En cambio, la evaluación basada en la estimación de la concentración de exposición a partir de concentraciones medidas mediante muestreadores estacionarios o simuladas en áreas o puntos determinados requiere plantear una serie de hipótesis respecto de los escenarios de exposición, que conllevan a una mayor incertidumbre en la evaluación de la exposición (US EPA, 2021a).

En cualquiera de los dos casos, habitualmente se determina el contenido total de los metal(oid)es de interés, aunque recientemente se ha planteado como alternativa la medida de su contenido bioaccesible en fluidos biológicos.

1.2.4.2.1. Contenido total

La metodología de evaluación de la exposición y de riesgos descrita por la US EPA (1992, 2009) se basa en la determinación del contenido total de metal(oid)es presentes en el PM. Asimismo, la OMS tiene en cuenta el contenido total de los metal(oid)es presentes en el PM para establecer los valores guía y elaborar estudios toxicológicos (OMS, 2000, 2021a). Estas pautas, han conducido al desarrollo de distintos estudios de contaminación atmosférica, tanto a nivel regional como en lugares concretos donde la calidad del aire se ve agravada por algún tipo de actividad antropogénica (tráfico, acerías, incineradoras, plantas de ferroaleaciones, minería, etc).

Estudios recientes de monitorización como los desarrollados por Krupnova et al. (2021) y Li et al. (2022) emplean muestreadores estacionarios para determinar la cantidad de metal(oid)es presentes en el distrito de Chelyabinsk (Rusia) y la provincia de Hebei (China), respectivamente. Una vez analizaron la concentración de metal(oid)es presentes en los filtros, procedieron a hacer una evaluación de los riesgos asociados a estas concentraciones totales. Sin embargo, un estudio toxicológico desarrollado por Rosa et al. (2016) supone una mejora al realizar un muestreo personal que aporta una concentración de metal(oid)es más exacta adaptada a cada individuo; aunque el objetivo en este caso no era una evaluación global de riesgos derivados por la inhalación de metal(oid)es sino de establecer una asociación entre el contenido metálico presente en el PM con desordenes respiratorios en adolescentes italianos mediante un muestreo personal de PM.

1.2.4.2.2. Contenido bioaccesible

Hasta el momento, la regulación de la calidad del aire y la evaluación convencional del riesgo a la exposición vía inhalación sólo consideran la concentración total de algunos metal(oid)es traza en el PM sin distinguir las especies existentes (Mukhtar y Limbeck, 2013). Sin embargo, la concentración soluble de estos metal(oid)es traza ligados al PM puede representar mejor el riesgo de exposición de dichos contaminantes en humanos (Hernández-Pellón et al., 2018; Mbengue et al., 2015; Weggeberg et al., 2019a, 2019b).

Se describe a continuación con detalle la metodología y las implicaciones asociadas a la determinación del contenido bioaccesible de metal(oid)es presentes en el PM. El procedimiento analítico *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de los elementos consiste en poner en contacto los filtros de PM con agentes de lixiviación que simulan los fluidos corporales. No obstante, no existe un protocolo unificado para la evaluación de la bioaccesibilidad por inhalación, lo que, debido a la alta variabilidad entre las muestras y los procedimientos encontrados en la bibliografía, dificulta las comparaciones entre estudios. Aunque la alta variabilidad en los valores de bioaccesibilidad se debe en ocasiones al impacto de las diferentes fuentes de PM atmosférico (Caboche et al., 2011; Luo et al., 2019; Pelfrêne et al., 2017), también se debe a las diferentes metodologías aplicadas (Kastury et al., 2017, 2018a, 2018b; Mukhtar y Limbeck, 2013; Wiseman, 2015). Los factores que influyen en la bioaccesibilidad de los elementos pueden clasificarse como externos e internos. Los factores externos incluyen principalmente la composición del fluido pulmonar simulado y las condiciones de los métodos *in vitro*, incluyendo el tiempo de extracción, la relación líquido/sólido (L/S), la agitación (Expósito et al., 2021; Kastury et al., 2018b; Mukhtar y Limbeck, 2013) y el método de separación sólido-líquido (Laird et al., 2015). Los factores internos más importantes son las características fisicoquímicas de las muestras, como la especiación de los metal(oid)es y el tipo y tamaño de las partículas (Ren et al., 2020).

El uso de materiales de referencia es adecuado para el estudio de los aspectos metodológicos que afectan a la bioaccesibilidad. Para tener en cuenta la influencia de la fracción de tamaño de las partículas, deben emplearse diferentes fluidos corporales sustitutos en función del destino de dichas partículas en el organismo. Sólo las partículas menores de 10 μm (PM_{10}) tienen el potencial de depositarse en la región traqueobronquial y alveolar; por lo tanto, el PM_{10} puede suponer un riesgo potencial de inhalación para los seres humanos. Las partículas gruesas de la fracción de tamaño de 2,5-10 μm ($\text{PM}_{10-2,5}$) se depositan en la mayoría de los casos en la región faríngea y traqueal, desde donde son transportadas por la actividad de depuración mucociliar, impulsando las secreciones de la superficie hacia la orofaringe y son tragadas y transportadas hacia el sistema digestivo, donde entran en contacto con el jugo gástrico (Mukhtar y Limbeck, 2013). Además, las partículas finas de menos de 2,5 μm ($\text{PM}_{2,5}$) pueden ser transportadas a la región alveolar. En consecuencia, el uso de fluidos gástricos y pulmonares como agentes de lixiviación con partículas gruesas y finas, respectivamente, parece ser apropiado. Para ello, en la bibliografía se aplican varios fluidos sintéticos sustitutos.

El fluido gástrico se ha utilizado ampliamente para evaluar el riesgo de ingestión midiendo la bioaccesibilidad de los metales en los suelos aplicando protocolos de estandarización (Denys et al., 2012; European Pharmacopoeia, 2010; US EPA, 2007a), pero rara vez se utiliza para evaluar la bioaccesibilidad por inhalación en la fracción gruesa del PM (Kastury et al., 2018a; Mukhtar y Limbeck, 2013). En la literatura se emplean diferentes fluidos pulmonares simulados

(SLF, por sus siglas en inglés) para evaluar la bioaccesibilidad en la fracción fina del PM: la solución de Gamble y el Fluido Lisosomal Artificial (ALF, por sus siglas en inglés) son los SLFs más utilizados para representar condiciones neutras y ácidas respectivamente. Por un lado, la solución de Gamble imita el fluido pulmonar intersticial, pero se encuentran importantes diferencias en la composición de dichos fluidos intersticiales sintéticos, como señalan Wiseman (2015) y Kastury et al. (2017). Por otro lado, el ALF representa el fluido ácido (pH = 4,5) resultante del ataque de los macrófagos a las partículas que llegan a los alvéolos y, a diferencia del fluido de Gamble, su composición es similar en la mayoría de los estudios de investigación (Colombo et al., 2008; Kastury et al., 2018b; Meza-Figueroa et al., 2020; Wiseman y Zereini, 2014).

En la Tabla 1.3 se muestran las distintas composiciones para la solución de Gamble. Estas soluciones de Gamble se pueden clasificar en dos grandes grupos; el primero basado en la composición utilizada por Moss (1979) (Boisa et al., 2014; Colombo et al., 2008; Hernández-Pellón et al., 2018; Kastury et al., 2018a; Weggeberg et al., 2019a) y el segundo en la composición descrita por Eidson y Mewhinney (1983) (Caboche et al., 2011; Gray et al., 2010; Pelfrêne et al., 2017; Wragg y Klinck, 2007). Algunos compuestos inorgánicos (NaCl , CaCl_2 , Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) y orgánicos (citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)) son comunes a ambos grupos. Sin embargo, el grupo basado en Moss (1979) añadió MgCl_2 y KCl en lugar de NH_4Cl (Eidson y Mewhinney, 1983). Otra diferencia importante es que el grupo de Moss (1979) añadió acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) y el grupo de Eidson y Mewhinney (1983) empleó glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$). Además, algunos autores añadieron otros reactivos orgánicos, como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Caboche et al., 2011; Marques et al., 2011; Mbengue et al., 2015; Pelfrêne et al., 2017) con el objetivo de simular mejor el líquido intersticial. Aunque el grupo de Kastury et al. (2018a) comparó las eficiencias de extracción de diferentes fluidos neutros pulmonares sintéticos, aún no se ha comparado la bioaccesibilidad entre los dos grupos de fluidos de Gamble.

Tabla 1.3. Composición molar (mol/L) de las distintas formulaciones del fluido Gamble descritas en la bibliografía.

Reactivo	Fórmula molecular	Moss, (1979)	Eidson y Mewhinne (1983)	Wragg y Klinck (2007)	Colombo et al. (2008)	Gray et al. (2010)	Caboche et al. (2011)	Boisa et al. (2014)	Pelfrêne et al. (2017)
Cloruro de magnesio	MgCl ₂				0,0010			0,0021	
Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0010							
Cloruro de potasio	KCl	0,0040			0,0040			0,0040	
Cloruro de sodio	NaCl	0,1029	0,1160	0,1160	0,1029	0,1162	0,1094	0,1029	0,1159
Cloruro de calcio	CaCl ₂		0,0002	0,0002				0,0023	
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0025			0,0025	0,0020	0,0017		0,0002
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl		0,0100	0,0100		0,0991	0,0022		0,0100
Hidrógeno-fosfato disódico	Na ₂ HPO ₄	0,0010	0,0012		0,0009		0,0011	0,0011	
Bifosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄			0,0012					0,0156
Bifosfato de sodio hidratado	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O					0,0123			
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	0,0005			0,0004			0,0005	
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄					0,0122			
Acetato de sodio	C ₂ H ₃ O ₂ Na				0,0070	0,0071			
Acetato de sodio trihidratado	C ₂ H ₃ O ₂ Na 3H ₂ O	0,0070							
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0,0310	0,0270	0,0270	0,0310	0,0274	0,0321	0,0321	0,0270
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃					0,0059			
Citrato de sodio dihidratado	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O				0,0003	0,0020	0,0005		0,0002
Dihidrógeno-citrato de sodio dihidratado	C ₆ H ₇ NaO ₇ 2H ₂ O	0,0004							
Citrato de sodio	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇		0,0002	0,0002					
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇					0,0022			
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆							0,0001	
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂		0,0050	0,0050		0,0060	0,0025	0,0050	0,0050
L-cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S		0,0010	0,0010				0,0010	0,0010
Hidrogenoftalato de potasio	C ₈ H ₅ KO ₄					0,0010			
Dipalmitoilfosfatidilcolina	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P						0,0200%		
Ácido úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃							0,0001	
Glutatión	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S							0,0001	
Albúmina								<0,0001	
Mucina								<0,0001	
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄		0,0005	0,0005		0,0052			
Ácido pentético	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₁₀		0,0002	0,0002					
Cloruro de benzalconio	C ₂₁ H ₃₈ NCl	0,0001	0,0001						

El uso del mismo material de referencia por parte de diferentes investigadores permite comparar la bioaccesibilidad de algunos metales en contacto con diferentes soluciones de Gamble. La Figura 1.2 muestra la diferencia de bioaccesibilidad para algunos metales (Mn, Cu, Zn y Pb) tras poner en contacto un material de referencia de polvo urbano (SRM1648a) con diferentes soluciones de Gamble (Caboche et al., 2011; Pelfrêne et al., 2017; Weggeberg et al., 2019a). La composición de las soluciones de Gamble utilizadas por Caboche et al. (2011) y Pelfrêne et al. (2017) se basó en la de Eidson y Mewhinney (1983) aunque con algunas pequeñas diferencias (Tabla 1.3). Sin embargo, Weggeberg et al. (2019a) emplearon una solución de Gamble similar a la utilizada por Moss (1979). Además, se utilizaron diferentes relaciones L/S; Weggeberg et al. (2019a) obtuvieron la bioaccesibilidad como una media de las relaciones L/S entre 100 y 3333, mientras que Caboche et al. (2011) utilizaron una relación L/S de 20000 y Pelfrêne et al. (2017) utilizaron relaciones L/S de 1000 y 10000, entre otras. Los resultados mostrados en la Figura 1.2 indican claramente que Weggeberg et al. (2019a) obtuvieron valores mucho más bajos de bioaccesibilidad, demostrando que tanto la relación L/S como la composición química (especialmente la presencia o ausencia de aminoácidos) afectan a la solubilidad de los metales en las soluciones de Gamble. Sin embargo, la justificación de tales diferencias en la bioaccesibilidad es escasa en la bibliografía.

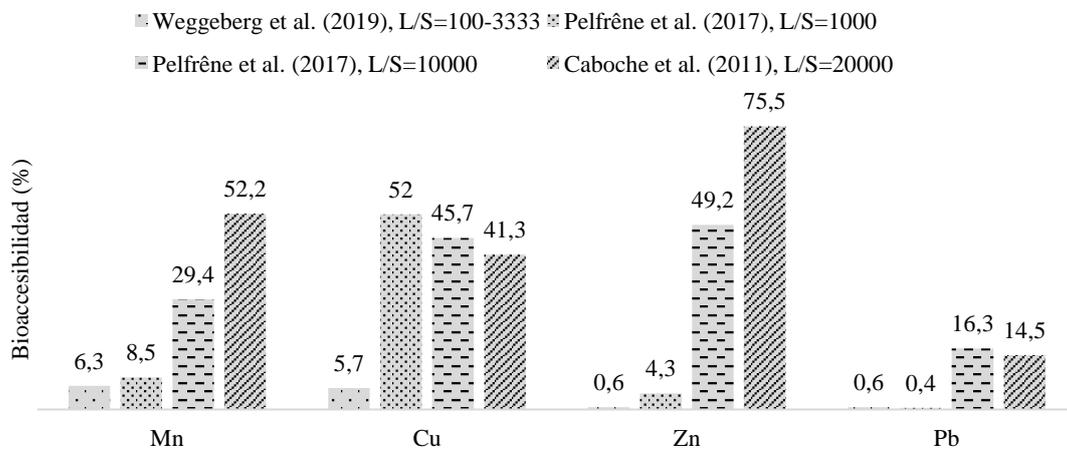


Figura 1.2. Comparación bibliográfica entre los valores de bioaccesibilidad obtenidos para Mn, Cu, Zn y Pb empleando SRM1648a en distintas soluciones de Gamble.

Por otro lado, son relativamente pocos los estudios que han medido la concentración de metales traza en muestreadores personales (Graney et al., 2004; Pollitt et al., 2016). La mayoría de ellos se centraron en un metal específico; por ejemplo, los estudios epidemiológicos en grupos de población expuestos a Mn, analizando el contenido total en el aire recogido con muestreadores ambientales personales (Haynes et al., 2012; Lucchini et al., 2012; Solís-Vivanco et al., 2009). Sin embargo, la medida de la bioaccesibilidad puede proporcionar una imagen más precisa del riesgo de exposición por inhalación (Mukhtar y Limbeck, 2013; Wiseman, 2015).

Aunque se han realizado varios estudios sobre la bioaccesibilidad de elementos traza en los filtros de PM de muestreadores estacionarios (Hernández-Pellón et al., 2018; Wiseman y Zereini, 2014), la concentración bioaccesible de metales de los muestreos personales es un campo abierto a nuevas investigaciones. Este es un objetivo crítico porque los oligoelementos solubilizados en los fluidos biológicos pueden alcanzar la circulación sanguínea sistémica, lo que supone un mayor riesgo para los humanos.

Sólo unos pocos grupos han medido la fracción soluble en agua de metales traza en filtros personales (Graney et al., 2004; Yang et al., 2018). Sin embargo, el uso del agua como agente de lixiviación no es tan adecuado como el de fluidos biológicos que simulen las condiciones del interior del organismo (Caboche et al., 2011; Wiseman, 2015). En este sentido, Graney et al. (2004) destacaron que los fluidos biológicos deberían utilizarse en los procedimientos de extracción/lixiviación aplicados a los filtros recogidos con muestreadores personales, debiendo seleccionarse el fluido biológico en función del destino del PM en el organismo.

1.2.4.3. Métodos basados en la biomonitorización

Otra forma de evaluar el grado de exposición a metal(oid)es por vía inhalatoria es midiendo su concentración en biomarcadores seleccionados (Butler et al., 2019; Fernández-Olmo et al., 2021). Sin embargo, los niveles de metal(oid)es en dichos biomarcadores también pueden dar cuenta del resto de vías de exposición, ya que recogen información recogida desde cualquier punto de exposición, a diferencia de los métodos basados en la medida de los niveles de los metal(oid)es en el PM de muestreadores personales, donde se recoge la información justo en el punto de exposición por inhalación. Pese a tales inconvenientes, también debe considerarse como ventaja la posibilidad de reconstruir la exposición agregada y acumulada a partir de biomarcadores (US EPA, 2004a, 2021a).

La utilidad de un biomarcador debe evaluarse por su capacidad para caracterizar y diferenciar los grupos expuestos y no expuestos, así como por su facultad para predecir trastornos de la salud anticipando cualquier deterioro como resultado de la exposición a corto o largo plazo (Viana et al., 2014; Zheng et al., 2011). Actualmente no hay consenso sobre qué biomarcador define mejor la relación dosis-efecto, y a pesar de no ser posible diferenciar qué parte de estos metal(oid)es entran en el organismo por vía inhalatoria, se han utilizado biomarcadores de exposición en estudios epidemiológicos diseñados para evaluar la exposición a algunos metal(oid)es que son transportados por el aire cerca de las fuentes de emisión, indicando así que estaban evaluando principalmente la vía inhalatoria (Bowler et al., 2015; Haynes et al., 2010; Menezes-Filho et al., 2014).

Estos biomarcadores se dividen en dos grupos en función de la permanencia del metal(oide) en la matriz, diferenciándose los biomarcadores que pueden reflejar la exposición a corto plazo, como

la sangre, la orina o la saliva, y biomarcadores que la pueden reflejar a mayor plazo, como el pelo, las uñas, la dentina o algunos tejidos.

Debido a factores limitantes como el coste y los retos metodológicos, los estudios de biomonitorización suelen utilizar una única matriz para determinar la exposición a varias sustancias químicas (Ashrap et al., 2020; Borowska y Brzóška, 2015; Rehman et al., 2018). Sin embargo, en el caso de los metal(oid)es, cada uno posee propiedades farmacocinéticas diferentes, por lo que la utilización de una única matriz para medir las mezclas de metal(oid)es puede no representar la exposición para cada metal(oid) ni reflejar con precisión la exposición humana general (Ashrap et al., 2021). Además, para los diferentes metal(oid)es, cada medio puede representar también un tipo de exposición diferente proporcionando información importante en relación con el resultado sanitario de interés (Ashrap et al., 2021), por lo que el uso combinado de varios biomarcadores aportaría ventajas (Levin-Schwartz et al., 2021).

1.2.4.3.1. Biomarcadores para exposición a corto plazo

La sangre ha sido considerada como biomarcador de la exposición a corto plazo para algunos metal(oid)es como el As, Cd o Pb (Freire et al., 2015; Stojavljević et al., 2019). Se ha empleado con frecuencia para evaluar la exposición a metales no esenciales como el Pb y el Cd (Henríquez-Hernández et al., 2017; Wong y Lye, 2008), destacando la posibilidad de evaluar intoxicaciones agudas debido a la eficiencia y sensibilidad del uso de este biomarcador. Sin embargo, existen dudas razonables sobre su uso para evaluar la exposición a oligoelementos esenciales como el Mn, Fe, Cu o Zn, debido a su regulación homeostática. Por ejemplo, el tiempo medio de residencia del Mn en sangre es mucho más corto que en otros tejidos y compartimentos celulares (Zheng et al., 2011), por lo que algunos autores consideran que no es un buen biomarcador de la exposición a corto plazo (Jiang et al., 2007; Kim et al., 2015), siendo esto más notorio en el caso de la exposición por inhalación, ya que a pesar de encontrar niveles más elevados en la sangre de individuos laboralmente expuestos, es difícil cuantificar cómo la captación pulmonar de Mn contenido en el PM contribuye al aumento en sangre (Roth, 2006). Sin embargo, otros autores defienden que a pesar de no ser la sangre un biomarcador indicativo de la exposición a largo plazo, es probable que refleje la exposición ambiental a corto plazo, al tomar la huella química en un momento determinado (Aschner et al., 2007; Michalke y Fernsebner, 2014; Ntihakose et al., 2018).

Algo similar ocurre cuando se emplea la orina como biomarcador. Algunos autores consideran que no es un biomarcador adecuado a Mn, ya que el Mn excretado en la orina solamente representa una pequeña fracción del Mn eliminado, sin tener en cuenta el que ha sido asimilado y acumulado por/en el organismo (Bader et al., 1999; Zheng et al., 2011), aunque otros autores como Ellingsen et al. (2003) han encontrado asociaciones entre el Mn respirado y el Mn presente en la orina.

1.2.4.3.2. Biomarcadores para exposición a largo plazo

Por otro lado, se han considerado otros candidatos para la exposición a más largo plazo a los metal(oid)es, como el pelo y las uñas (Butler et al., 2019; Fernández-Olmo et al., 2021; Nakaona et al., 2020)

La tasa de crecimiento del pelo, de entre 1 y 1,2 cm/mes permitiría una estimación de la exposición entre 1 a 6 meses (Haynes et al., 2015; Van Neste y Rushton, 2016), mientras que la tasa de crecimiento más lenta de las uñas, de unos 3,47 mm/mes permitiría estimar la exposición de forma más crónica (a más largo plazo) (Viana et al., 2014; Yaemsiri et al., 2010). La simplicidad para el muestreo, el transporte y la manipulación del pelo y las uñas hace que sean biomarcadores más adecuados y convenientes para el seguimiento de la exposición localizada a metales tóxicos (Menezes-Filho et al., 2009b, 2009a; Riojas-Rodríguez et al., 2010; Sukumar y Subramanian, 2007) aunque sigue siendo imposible discriminar la vía específica de exposición a los mismos, proporcionando una concentración final resultante de las vías inhalatoria, oral y dérmica.

En cuanto al Mn, Coetzee et al. (2016) concluyeron que el pelo era el biomarcador más consistente tras revisar distintos biomarcadores en niños, a pesar de desconocer los mecanismos de captación de Mn en el pelo (Bouchard et al., 2011). Sin embargo, los bajos valores de Mn en pelo encontrados en algunos estudios cercanos a las plantas de ferromanganeso como el de Eastman et al. (2013) y el de Haynes et al. (2012) sugieren que las diferencias pueden atribuirse a la presencia de metal exógeno por emplear protocolos de lavado menos intensivos, lo que podría afectar a la validez para representar la dosis interna de exposición (Eastman et al., 2013; Fernández-Olmo et al., 2021).

1.2.4.4. Valores de referencia

En cuanto a los biomarcadores, según la Comisión alemana de Biomonitorio Humano (HBM, por sus siglas en inglés), los valores HBM representan la concentración de una sustancia en una matriz biológica humana por debajo de la cual, no hay riesgo de efectos adversos para la salud y, en consecuencia, no es necesario actuar. Estos valores HBM se derivan sobre la base de estudios toxicológicos y epidemiológicos (HBM Commission, 2015). Sin embargo, no existen valores HBM para la mayoría de los metal(oid)es, excepto para el Hg, Cd y Tl en orina y el Hg en sangre. En Alemania se establecieron valores guía de HBM para el Pb en sangre, pero se suspendieron posteriormente porque los estudios epidemiológicos demostraron que no existía un nivel seguro de concentración de Pb en esta matriz (Schulz et al., 2011). Debido a esto, los programas de biomonitorización de diferentes países y regiones han desarrollado valores de referencia (RV, por sus siglas en inglés), que se derivan estrictamente del análisis estadístico de los datos de los biomarcadores. A diferencia de los valores guía basados en la salud, los RV no tienen en cuenta

la información toxicológica de los biomarcadores y, por lo tanto, no pueden utilizarse para evaluar los riesgos para la salud o como umbral para la acción clínica a nivel individual o poblacional. Además, los RV se definen para un período y una región determinados, y es necesario revisarlos periódicamente cuando se disponga de nuevos datos (Saravanabhavan et al., 2017).

La Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC, por sus siglas en inglés) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) desarrollaron el concepto de intervalos de referencia junto con las metodologías estadísticas pertinentes para evaluar la exposición de fondo a sustancias químicas en una población de referencia (Poulsen et al., 1997; Solberg, 2004). La IFCC define los rangos de referencia para un biomarcador clínico basándose en las estimaciones de los percentiles 2,5 y 97,5 de su concentración en una población de referencia. En lo que respecta a la exposición humana a sustancias químicas ambientales, las personas situadas en el extremo superior de la distribución de la exposición se consideran más vulnerables que las situadas en el extremo inferior y, por tanto, los valores de referencia basados en el extremo superior de la distribución son más valiosos en las evaluaciones de la exposición (Saravanabhavan et al., 2017).

Basándose en las recomendaciones de la IFCC y la IUPAC, la Comisión alemana de HBM estableció como valor de referencia el RV_{95} , definido como el percentil 95 de los niveles de concentración de contaminantes medidos en la matriz correspondiente de la población de referencia. Para derivarlo, se redondea dentro del intervalo de confianza del 95% (HBM Commission, 2015). La Comisión HBM ha desarrollado el RV_{95} para una serie de químicos ambientales, incluidos los metales, en diferentes matrices biológicas en la población alemana (Becker et al., 2003; Heitland y Köster, 2006; Schulz et al., 2009, 2011; Wilhelm et al., 2004). Otros países como Brasil (Freire et al., 2015; Kuno et al., 2013; Takeda et al., 2017), Italia (Apostoli et al., 2002), República Checa (Batáriová et al., 2006; Černá et al., 2012), República de Corea (Lee et al., 2012), Serbia (Stojsavljević et al., 2019), Eslovenia (Tratnik et al., 2019), Francia (Falq et al., 2011), España (Cañas et al., 2014) y Reino Unido (White y Sabbioni, 1998) han desarrollado RV_{95} para contaminantes ambientales específicos en sus respectivas poblaciones generales o subgrupos de población. Sin embargo, en algunos de estos estudios la definición de "valor de referencia" no está bien articulada o los detalles de la metodología utilizada para derivar el RV_{95} carecen de claridad, por lo que se necesita una definición clara y universal de los valores de referencia aplicados a los estudios de biomonitorización.

Por otro lado, en cuanto a la concentración de metal(oid)es en aire ambiente, la US EPA define un parámetro denominado "concentración de referencia" (RfC, por sus siglas en inglés) que es una estimación de una exposición continuada por inhalación para la población humana (incluyendo los grupos sensibles de la misma) que probablemente no presente un riesgo apreciable

de efectos adversos a lo largo de la vida. Este valor se utiliza en evaluaciones de salud por inhalación de contaminantes no relacionadas con el cáncer (US EPA, 2021c).

Una vez establecido el valor RfC, el riesgo no carcinogénico se expresa como cociente de peligrosidad (HQ), definido como la relación de una estimación de la exposición sobre la concentración de referencia (RfC), de acuerdo con la ecuación 1.3.

$$HQ_i = \frac{C(\text{aire-ajustada})_i}{RfC_i} \quad (1.3)$$

La concentración de aire ajustada se calcula como establece la ecuación 1.4, donde C_{aire} es la concentración del metal(oide) (mg/m^3) medida experimentalmente o modelada, TE es el tiempo de exposición (horas/día), FE es la frecuencia de exposición (días/año), DE es la duración de la exposición (años) y TM es el tiempo medio de exposición (días). En el caso de riesgo no carcinogénico, TM equivale a DE. Sin embargo, para las evaluaciones crónicas se calcula la concentración media diaria potencial a lo largo de la vida, en la que TM es el tiempo de vida medio (70 años) (US EPA, 2011, 2021a).

$$C_{\text{aire-ajustada}} = \frac{C_{\text{aire}} * TE * FE * DE * 1 \text{ día} / 24 \text{ horas}}{TM} \quad (1.4)$$

En la Tabla 1.4 se indican los RfC para el cálculo de riesgo no carcinogénico de los metal(oides) incluidos en los procedimientos de la US EPA estudiados en esta Tesis Doctoral.

Tabla 1.4. Valores de RfC para los metal(oides) considerados en esta Tesis Doctoral.

Metal(oide)	Sustancia	RfC (mg/m^3)	Fuente
As	Arsénico inorgánico	$1.50 * 10^{-5}$	IRIS
Cd	Cadmio	$1.00 * 10^{-5}$	ATSDR
Mn	Manganeso inhalado	$5.00 * 10^{-5}$	IRIS

IRIS: Integrated Risk Information System; <https://www.epa.gov/iris>

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; <https://www.atsdr.cdc.gov/>

1.3. Descripción del área de estudio

El área de interés en esta Tesis Doctoral se encuentra en la comunidad autónoma de Cantabria (582905 habitantes, 2020), concretamente en la bahía de Santander (235346 habitantes, 2020), que comprende 6 municipios en su conjunto, siendo estos Santander, Camargo, El Astillero, Marina de Cudeyo, Ribamontán al Mar y Villaescusa, con 173375, 30320, 18134, 5106, 4478 y 3933 habitantes, respectivamente (2020) (INE, 2021).

La ciudad de Santander, capital de la región, se dedica principalmente a actividades comerciales y zonas residenciales, caracterizándose como un área urbana (Figura 1.3). Por otro lado, la zona sur de la bahía se caracteriza por la presencia de actividades industriales cercanas a núcleos urbanos, principalmente una planta de ferroaleaciones y una acería, por lo que se define como una zona urbano-industrial (Figura 1.3).

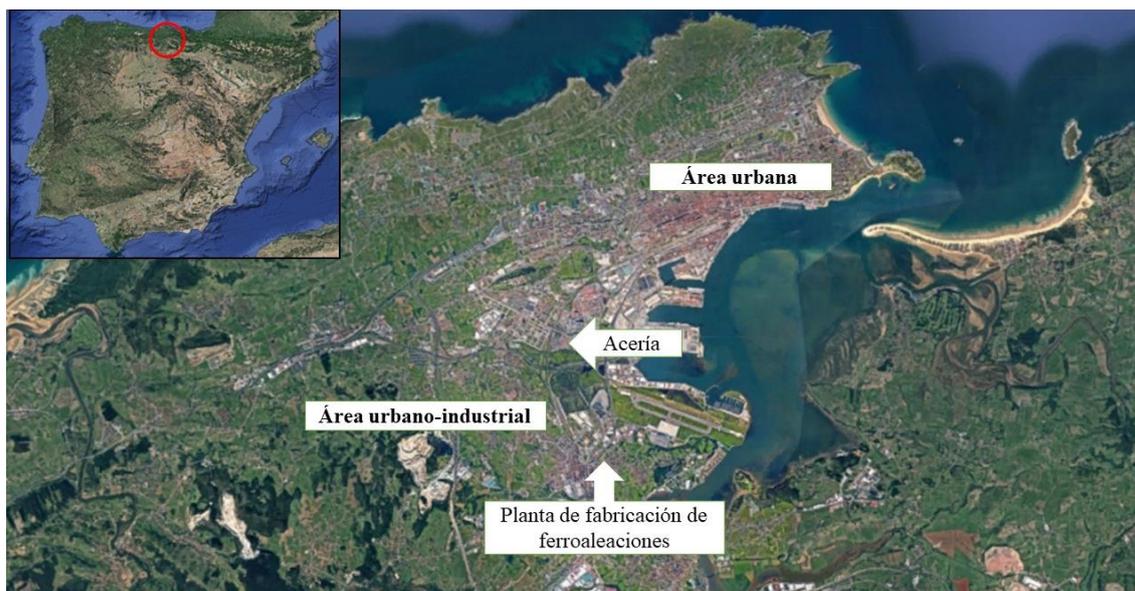


Figura 1.3. Mapa de la bahía de Santander, área de estudio de la presente Tesis Doctoral. Fuente: Google Earth.

Estudios previos llevados a cabo en la bahía de Santander relacionan este área con altas concentraciones de Mn en aire, de acuerdo al valor guía recomendado por la OMS, identificando a la planta de fabricación de aleaciones de Mn como la principal fuente emisora (Arruti et al., 2010, 2011; Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019b; Otero-Pregigueiro et al., 2018).

Dicha planta de aleaciones de Mn ocupa un área total de 174353 m² y tiene una capacidad máxima de operación de 225000 toneladas anuales. Esta planta está especializada en la fabricación de silicomanganeso y ferromanganeso, incluyendo en su producción aleaciones de ferromanganeso de alto estándar, ferromanganeso afinado y silicomanganeso, dedicándose cuatro hornos a la producción continua de ferromanganeso y silicomanganeso indistintamente, y un quinto horno eléctrico a la producción de ferromanganeso afinado de forma discontinua (Hernandez-Pellón et al., 2017).

Las emisiones procedentes de los cuatro hornos principales son tratadas mediante un depurador húmedo antes de ser quemadas mediante una antorcha y liberadas a la atmósfera. Además, en caso de riesgo de fuego o explosión, también se contempla un sistema de liberación directa, sin pasar por los equipos de tratamiento de gases. Por otro lado, las emisiones procedentes de los procesos de vaciado de la mezcla de aleación de metal y escoria, separación, enfriamiento, así como de las zonas de trituración y cribado se controlan mediante filtros de mangas (Hernandez-Pellón et al., 2017).

1.4. Hipótesis de partida

Aunque no existe un valor límite u objetivo en la legislación europea relativa a la calidad del aire respecto del Mn (algo que sí ocurre con el Pb, As, Cd y Ni), la OMS ha propuesto un valor guía

anual de 150 ng/m³ (OMS, 2000). Así mismo, la US EPA ha fijado una concentración de referencia de 50 ng/m³ (IRIS US EPA, 1998).

Estos valores guía están basados en la medida del contenido total de metal en filtros de PM. Sin embargo, en la bibliografía reciente hay una tendencia en asociar una mayor importancia a la cantidad de metal que es bioaccesible para el ser humano, midiendo la solubilidad de este en fluidos biológicos simulados (Kastury et al., 2017; Mukhtar y Limbeck, 2013; Wiseman, 2015). Para la elección de estos fluidos se debería tener en cuenta el tamaño de partícula del aerosol, distinguiéndose entre fracción inhalable (diámetro de corte de 100 µm), torácica (diámetro de corte de 10 µm) y respirable (diámetro de corte de 2,5 µm). En particular, la fracción respirable debería evaluarse con fluidos pulmonares mientras que la fracción comprendida entre la torácica y la respirable debería evaluarse mediante fluidos gástricos (Mukhtar y Limbeck, 2013).

Recientemente, en Maliaño (estación de Cros) se ha reportado una media anual de Mn de 232 ng/m³ en 2015, registrando niveles mensuales superiores a 150 ng/m³ en una campaña intensiva en 2015 en varias ubicaciones próximas, llegándose incluso a medias mensuales de 700 ng/m³ (Hernandez-Pellón et al., 2017). Además, se han determinado las características físico-químicas de las partículas con alto contenido en Mn presentes en el PM₁₀ en las proximidades de la planta de ferroaleaciones de Mn, observándose pequeñas esferas de tamaño inferior a 1 µm ricas en Mn y silicio (Si), que podrían presentar un mayor impacto sobre la salud (Hernandez-Pellón et al., 2017).

Además, en España solo existen investigaciones aisladas con relación a la biomonitorización de metales pesados, no disponiéndose de ningún programa de biomonitorización humana que aporte información acerca de los niveles de exposición a metales pesados como el Mn, a pesar de los importantes efectos adversos que pueden tener en la población y de la existencia de áreas urbanas afectadas por una actividad industrial local como fuente de una alta exposición ambiental.

Por todo esto, teniendo en cuenta que en la bahía de Santander alrededor de 250000 personas viven en zonas separadas menos de 10 km de las principales fuentes industriales de Mn y considerando los altos niveles de Mn en aire medidos en los últimos años en dicho área, se ha considerado esta zona como idónea para desarrollar un estudio transversal sobre adultos sometidos a una exposición ambiental relativamente elevada a Mn, que trate de establecer las relaciones entre la bioaccesibilidad de Mn procedente de PM en fluidos biológicos sintéticos y su contenido en muestras biológicas, partiendo de la hipótesis de que a mayor cantidad de Mn inhalado, mayor será la concentración analizada en las distintas muestras biológicas, además de ser esta más elevada en la población que reside más cerca de la fuente de ferroaleaciones.

1.5. Objetivos de la Tesis Doctoral

Esta Tesis Doctoral tiene dos objetivos principales: el primero consiste en sistematizar como evaluar la bioaccesibilidad de metales en matrices atmosféricas (fracciones de PM) mediante muestreadores personales y el segundo, consiste en determinar mediante la realización de un estudio transversal, la exposición a Mn y otros metales pesados y metaloides en población adulta de la bahía de Santander.

Para alcanzar estos objetivos principales, se abordan los siguientes objetivos específicos:

- i. Estudiar diferentes condiciones de ensayos de bioaccesibilidad de metal(oid)es en PM, que permitan desarrollar un procedimiento para determinar la bioaccesibilidad de los mismos en las fracciones fina ($PM_{2,5}$) y gruesa ($PM_{10-2,5}$) de PM.
- ii. Desarrollar un estudio transversal con participantes residentes en la bahía de Santander para evaluar la exposición a metal(oid)es.
- iii. Aplicar la metodología de bioaccesibilidad desarrollada a filtros de muestreadores personales recogidos por los voluntarios del estudio transversal, para describir la exposición ambiental a los mismos en población adulta de la bahía de Santander.
- iv. Describir la exposición a metal(oid)es en población adulta de Cantabria mediante biomarcadores de exposición, a partir de muestras de sangre, pelo y uñas de los participantes del estudio transversal.
- v. Determinar la correlación entre los distintos biomarcadores y los niveles de metales en las muestras recogidas con muestreadores personales (concentración total y bioaccesible en las fracciones fina y gruesa), y de estos con la distancia entre la fuente industrial y la residencia de los participantes del estudio transversal.
- vi. Evaluar el riesgo no carcinogénico para la salud según la metodología US EPA, a través de los datos individualizados de exposición a Mn del estudio transversal

CAPÍTULO II

MATERIALES Y

MÉTODOS

Capítulo II. Materiales y métodos

2.1. Área y población de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Bahía de Santander, perteneciente a la región de Cantabria (norte de España), con una población aproximada de 250000 habitantes en 2019, donde se encuentran algunas fuentes industriales de metal(oid)es. Entre ellas destacan una planta siderúrgica no integral, dos fundiciones de hierro y una planta de aleaciones de Mn, siendo esta última el principal emisor de metal(oid)es a la atmósfera en la zona (véase la Figura 2.1), provocando niveles relativamente altos de Mn en el aire ambiente, que suelen superar el valor guía de la OMS (es decir, 150 ng/m^3 , media anual) (OMS, 2000) en la localidad de Maliaño (unos 10000 habitantes) (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019a).

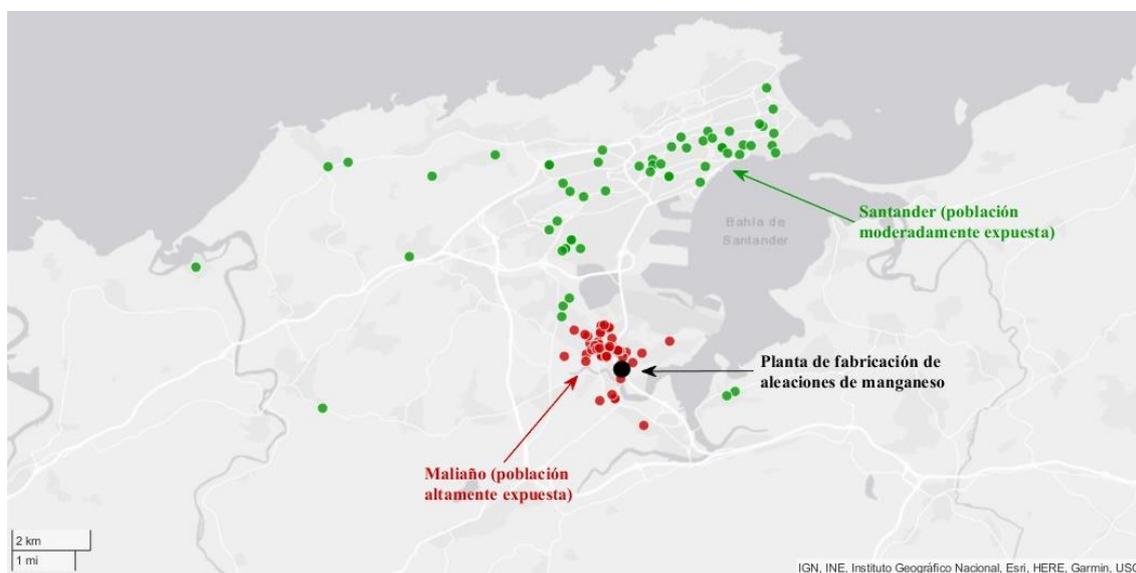


Figura 2.1. Mapa de la bahía de Santander: ubicación de la residencia de los participantes del estudio transversal y de la planta de ferroaleaciones de Mn.

Se diseñó un estudio transversal para evaluar la exposición a Mn ambiental (principal objetivo de esta Tesis Doctoral) y su posible repercusión en la función motora y cognitiva en la población expuesta (fuera del objetivo de la presente Tesis Doctoral). En primer lugar, se reclutaron voluntarios residentes en la zona de interés entre los asistentes a la Noche Europea de los Investigadores 2018 y 2019 en Santander, y a una reunión vecinal organizada por el Ayuntamiento de Camargo en el Centro Cultural La Vidriera (Maliaño). Además, se colocaron carteles de búsqueda de voluntarios en edificios municipales de la zona estudiada (Anexos A1 – A3). Todos los voluntarios considerados en este estudio cumplían los siguientes criterios de inclusión: ser mayores de edad (18 años) y menores de 75 años, no padecer ninguna enfermedad física o psiquiátrica importante o trastorno degenerativo y/o neurológico, no tener antecedentes de exposición laboral previa al Mn que requiera tratamiento médico ni haber trabajado o trabajar en una fábrica de ferromanganeso ni estar en condición de Incapacidad Temporal por Enfermedad

Común o Contingencia Laboral, así como no estar en tratamiento farmacológico que pueda interferir en la función cognitiva o motora. Todos los voluntarios residieron durante un mínimo de un año o durante más de diez años en los últimos tres lustros en las proximidades de la principal fuente de Mn de la bahía de Santander. Además, se tuvo en cuenta el criterio laboral para aquellas personas que pasaban ocho o más horas diarias durante al menos los diez últimos años en la bahía de Santander. Así, la población del estudio se dicotomizó en altamente expuesta (AE) (distancia inferior o igual a 1,5 km respecto a la principal fuente industrial de Mn) y moderadamente expuesta (ME) (distancia superior a 1,5 km).

Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de cada sujeto y la recogida de muestras biológicas (sangre total, pelo del cuero cabelludo y uñas de las manos) se realizó sólo después de tener dicho permiso (Anexos A4 y A5). Además de las muestras biológicas, también se recogieron muestras de PM de los muestreadores personales llevados durante 24-36 horas de cada voluntario. Se pidió a los sujetos que completaran un cuestionario estructurado que contenía características sociodemográficas, estado de salud y medicación, datos ocupacionales, hábitos de tabaquismo, consumo de alcohol y otros estilos de vida (Anexo A6).

Para la recogida de datos se tuvo en cuenta la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos de Carácter Personal (Jefatura del Estado, 2018), quedando asegurado el derecho al acceso, cese y cancelación de datos por parte de todos los participantes, manteniendo en todo momento la confidencialidad y garantizando el principio de no maleficencia. Además, se garantizó a todos los sujetos que sus aportaciones serían destinadas exclusivamente a fines de investigación y, en caso de extrapolarse a otros trabajos, se les informaría y pediría el consentimiento.

La campaña de muestreo comenzó en noviembre de 2019 y finalizó en noviembre de 2020 siendo interrumpida desde marzo de 2020 hasta junio de 2020 debido al confinamiento decretado por el Gobierno de España con motivo de la pandemia de COVID-19, completando la campaña de muestreo con un total de 130 voluntarios. Con relación a la situación pandémica, dado que se impuso el uso de mascarilla obligatoria en Cantabria a partir de julio de 2020, se actualizó el cuestionario y se recogieron datos sobre el tipo de mascarilla empleada así como la duración.

El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica de Cantabria (CEIC) y por el comité ético de investigación de la Universidad de Cantabria (CEUC) (Anexos A7 y A8).

2.2. Toma y preparación de muestras biológicas

Todos los reactivos utilizados para el tratamiento y la preparación de las muestras fueron de grado analítico proporcionados por Merck y PanReac AppliChem (Darmstadt, Alemania).

Se obtuvieron muestras de sangre de los voluntarios de aproximadamente 7,5 mL por venopunción tras la desinfección de la piel con alcohol al 70%, recogidas en jeringas de heparina

de litio desarrolladas para la determinación de metales (S-Monovette®, LxØ=95x15), así como agujas específicas libres de metales (S-Monovette®, 21Gx1 1/2") (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Estas muestras se refrigeraron un máximo de 14 días hasta su dilución con una solución alcalina ((2% (p/v) de 1-butanol, 0,05% (p/v) de EDTA, 0,05% (p/v) de Tritón X-100 y 1% (p/v) de NH₄OH)) como se describe en González-Antuña et al. (2017) a una proporción mínima de sangre/solución alcalina de 1/10 (p/p), y posterior análisis por ICP/MS. Esta solución alcalina tiene la ventaja de facilitar la lisis de los glóbulos rojos (NH₄OH) y evitar la precipitación de los metales por su complejación con EDTA, a la vez que se reduce la obstrucción del inyector a la antorcha gracias al Tritón X-100 (Lu et al., 2015; Rodushkin et al., 2000), con la ventaja adicional de reducción de los riesgos de contaminación debido a la manipulación restringida de la muestra, así como la disminución del tiempo de preparación y, por tanto, de los costes.

Las muestras de pelo y uñas se recogieron en frascos de polipropileno utilizando tijeras de cerámica limpias, modelo Kyocera advanced ceramics CS-124 (Kyocera, Osaka, Japón) y cortaúñas respectivamente. El pelo se cortó de la parte occipital de la cabeza, utilizando los 2 cm más cercanos al cuero cabelludo para el análisis. Para la recogida de las uñas, se pidió a los participantes que se lavaran las manos con el jabón líquido proporcionado y que las enjuagaran a fondo con agua del grifo. Después de secarlas, todas las uñas de ambas manos se cortaron directamente almacenándose en frascos de polipropileno estéril (Deltalab, Barcelona, España).

Se ha desarrollado un protocolo de lavado para el pelo y las uñas, basado en el descrito por (Eastman et al., 2013), que es más exhaustivo que otros documentados, eliminando todos los metales exógenos y asegurando que sólo se cuantifican los endógenos. Este protocolo consta de cinco etapas: una primera sonicación durante 20 minutos con una solución al 0,5% (p/v) de Tritón X-100, posterior lavado (cinco veces) con agua ultrapura, una segunda sonicación con una solución de HNO₃ 1N, posterior lavado con la solución de HNO₃ 1N y último lavado (cinco veces) con agua ultrapura, secando en estufa durante la noche a 65°C. Una vez limpias, las muestras fueron digeridas por microondas modelo Milestone Ethos One (Milestone Systems, Brøndby, Dinamarca) a 200°C en una solución de HNO₃/H₂O₂ en una proporción 4/1 (v/v), y finalmente analizadas por ICP/MS modelo Agilent 7500ce (Agilent Technologies, California, EE. UU.).

2.3. Determinación del contenido bioaccesible de metal(oid)es

2.3.1. Optimización del método

Se empleó el material de referencia estándar de polvo urbano 1648a (SRM1648a) (NIST, Maryland, EE.UU.) para analizar el efecto de la relación L/S así como el tipo y la composición de los agentes de lixiviación sobre la bioaccesibilidad de los metal(oid)es. Para cada metal(oide), la bioaccesibilidad se calculó de acuerdo la ecuación 2.1 (Guney et al., 2017):

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{C_{\text{bio}} * V_{\text{fluido}}}{C_{\text{total}} * m} * 100 \quad (2.1)$$

Donde C_{bio} es la concentración del elemento en el fluido sustituto (mg/L), V_{fluido} es el volumen de fluido (mL), C_{total} es la concentración total certificada del elemento (mg/kg) y m es la masa del material de referencia (g).

Para simular las condiciones del organismo se seleccionaron fluidos corporales sintéticos como agentes de lixiviación. La selección de estos fluidos se hizo en función del destino del PM en el organismo, que depende del diámetro aerodinámico de las partículas. Así, se seleccionaron la solución de Gamble y el fluido ALF como fluidos pulmonares que pueden entrar en contacto con el $\text{PM}_{2,5}$: la solución de Gamble como sustituto del fluido pulmonar intersticial, y ALF como sustituto de las condiciones ácidas resultantes del ataque de los macrófagos a las partículas en los alvéolos. Para representar el fluido corporal que puede entrar en contacto con partículas gruesas ($\text{PM}_{10-2,5}$) se empleó un fluido gástrico, ya que estas partículas son deglutidas desde las vías respiratorias superiores hasta el sistema digestivo. Se seleccionaron dos soluciones de Gamble debido a la diferente composición descrita en la bibliografía, denominadas G_1 y G_2 . La composición de G_1 , G_2 y ALF, y el orden de orden de adición de los reactivos se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Composición de los fluidos pulmonares sintéticos empleados: Gamble G_1 , Gamble G_2 y ALF.

Reactivo	Fórmula molecular	G_1 (g/L) pH 7,4±0,1	G_2 (g/L) pH 7,4±0,1	ALF (g/L) pH 4,5±0,1
Cloruro de magnesio hexahidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,095	-	0,050
Cloruro de sodio	NaCl	6,019	6,779	3,210
Cloruro de potasio	KCl	0,298	-	-
Hidrógenofosfato disódico	Na_2HPO_4	0,126	0,142	0,071
Sulfato de sodio	Na_2SO_4	0,063	-	0,039
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,368	0,026	0,128
Acetato de sodio	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	0,574	-	-
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	2,604	2,268	-
Citrato de sodio dihidratado	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,097	0,055	0,077
Cloruro de amonio	NH_4Cl	-	0,535	-
Hidróxido de sodio	NaOH	-	-	6,000
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	-	-	20,800
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	-	0,375	0,059
Tartrato de sodio dihidratado	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	0,090
Lactato de sodio	$\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$	-	-	0,085
Piruvato de sodio	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$	-	-	0,086

En total, se emplearon cinco soluciones para determinar y comparar la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en SRM1648a: agua ultrapura (pH = 6,8 ± 0,1), Gamble (G_1) basado en Moss (1979) (pH = 7,4 ± 0,1), Gamble (G_2) basado en Eidson y Mewhinney (1983) (pH = 7,4 ± 0,1), ALF (pH = 4,5 ± 0,1) (Marques et al., 2011) y fluido gástrico (pH = 1,5 ± 0,1) (US EPA, 2007a). Para el ajuste del pH se utilizó HNO_3 y NaOH .

Respecto al fluido gástrico, aunque se han empleado formulaciones complejas que incluyen diferentes aminoácidos, enzimas y ácidos metabólicos (European Pharmacopoeia, 2010; Gao

et al., 2018; Nie et al., 2018; Ruby et al., 1993), una formulación más sencilla de glicina y HCl ha demostrado proporcionar resultados similares en las pruebas de bioaccesibilidad (US EPA, 2007a), por lo que se preparó el fluido gástrico empleando glicina 0,4 M ajustando el pH con HCl (37%) (Drexler y Brattin, 2007; US EPA, 2007a). El pH de los fluidos sintéticos se midió inmediatamente antes de comenzar la prueba de bioaccesibilidad.

Las pruebas de bioaccesibilidad *in vitro* se realizaron introduciendo 2,5 mg de SRM1648a pesados con precisión en un recipiente de polipropileno de 50 mL y añadiendo cada uno de los agentes de lixiviación seleccionados. De acuerdo con Hernández-Pellón et al. (2018), la masa diaria de PM₁₀ recogida por un dispositivo de bajo volumen de muestreo (2,3 m³/h) suele ser entre 0,6 y 3,1 mg. A continuación, se taparon los recipientes y se colocaron en un rotatorio SBS (Science Basic Solutions, Barcelona, España) dentro de un incubador MRHX-04 (LSCI, Francia) agitando los frascos a 30 rpm y a 37°C, simulando la temperatura corporal. El tiempo de extracción fue de 24 h para los fluidos sintéticos pulmonares (Caboche et al., 2011; Colombo et al., 2008; Kastury et al., 2018b; Luo et al., 2019; Midander et al., 2007) así como agua ultrapura (Caboche et al., 2011) y 1 h para fluido gástrico (Deshommes et al., 2012; Drexler y Brattin, 2007; Kastury et al., 2018a; Oomen et al., 2002; US EPA, 2007a). Después del ensayo de extracción, las muestras se centrifugaron en una centrífuga modelo Mixtasel-BL/SELECTA (J. P. Selecta, Barcelona, España) a 4200 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de jeringa de polipropileno de 0,45 µm (B. Braun, Melsungen, Alemania). Las muestras se almacenaron hasta su análisis por ICP/MS a 4°C un tiempo máximo de 48 h para las soluciones de Gamble y ALF.

Se realizaron diferentes pruebas para analizar la influencia de la relación L/S en los valores de bioaccesibilidad en SRM1648a al aplicar los siguientes agentes de lixiviación: solución de Gamble (G₂), ALF y fluido gástrico. Los valores de la relación L/S (expresados en mL/g) fueron 500, 1000, 5000 y 20000. Además, se realizaron otras pruebas adicionales con Gamble (G₁) a relaciones L/S de 500 y 5000 y agua ultrapura a una relación L/S de 500. En cada caso, se pesaron 2,5 mg de SRM1648a y luego se añadieron entre 1,25 y 50 mL de agente lixivante. Además, todos los ensayos se realizaron por triplicado. La desviación media entre las réplicas fue menor de 3,3% para ALF, menor de 7,4% para fluido gástrico y menor de 7,7% para la solución de Gamble.

Finalmente, se utilizó el software de especiación química Visual MINTEQ 3.1 (Gustafsson, 2013) para simular el contacto entre el agente de lixiviación y el material de referencia con el objetivo de comprender cómo cambia la solubilidad de los metal(oid)es en la solución de lixiviación en función de la composición del fluido empleado y de la especiación de los metal(oid)es. La composición de los fluidos se introdujo como cationes y aniones, además de fijar el pH, la relación L/S y la temperatura. La especiación de los metal(oid)es en SRM1648a es desconocida, por lo

que se utilizaron diferentes especies para simular el proceso de lixiviación. En cada simulación, se obtuvo la fracción de solubilidad de los metal(oid)es y la distribución de las especies.

2.3.2. Determinación de la bioaccesibilidad y contenido total de metal(oid)es en muestras reales.

Se tomaron muestras de $PM_{2,5}$ y $PM_{10-2,5}$ de 24 a 36 h empleando un impactador modular personal de dos etapas (SKC PMI coarse) conectado a una bomba personal (SKC Aircheck XR5000) que funcionaba a un caudal de 3 L/min. Se usaron filtros de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 37 (para $PM_{10-2,5}$) y 25 mm de diámetro (para $PM_{2,5}$), con malla de PTFE y un tamaño de poro de 1 μ m (SKC, Pensilvania, EE. UU.).

Los filtros se analizaron en un procedimiento de dos pasos. En primer lugar, se realizó la prueba de bioaccesibilidad in vitro extrayendo cada filtro con 10 mL del agente lixivante correspondiente en el rotatorio descrito en la sección 2.3.1 a 30 rpm y 37°C. Después de la prueba de lixiviación, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron. Como la masa de PM recogida por los muestreadores personales era muy baja, se empleó el fluido gástrico para la fracción $PM_{10-2,5}$ y solamente un fluido pulmonar sintético para la fracción de $PM_{2,5}$, el ALF, debido a un mayor porcentaje bioaccesible con respecto a la solución de Gamble (Hernández-Pellón et al., 2018), y porque la bioaccesibilidad basada en este fluido es independiente de la relación L/S, a diferencia de la basada en la solución de Gamble (Expósito et al., 2021). En segundo lugar, la fracción insoluble (fracción no bioaccesible) fue digerida en base a la norma europea UNE EN 14902 (AENOR, 2006), que comprende la digestión ácida del filtro en un sistema de microondas utilizando recipientes cerrados de PTFE (HNO_3/H_2O_2 con una proporción 4/1, hasta 220°C). Ambas fracciones se analizaron mediante ICP/MS, y la bioaccesibilidad se determinó mediante la ecuación 2.1 modificada para tener en cuenta en el denominador la concentración total de cada elemento medida tras la digestión total mediante microondas.

2.4. Análisis por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

La concentración de ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{111}Cd y ^{207}Pb se midió mediante ICP/MS. Para la sangre se utilizaron conos de níquel (para aumentar la sensibilidad) y un nebulizador de flujo cruzado (para aumentar la tolerancia a la matriz), y para el pelo, las uñas y los filtros se utilizaron conos de platino (tolerantes a muestras ácidas) y un nebulizador micromist (para aumentar la sensibilidad). Se añadieron estándares internos (^{89}Y , ^{103}Rh y ^{185}Re) para corregir las derivas instrumentales, y se utilizó una celda de colisión de He con un flujo de 4,8 mL/min para minimizar las interferencias espectrales. Dado que la sangre y los fluidos biológicos sintéticos pueden causar interferencias espectrales y no espectrales (efectos de matriz) durante el análisis ICP/MS, la determinación de la concentración de los metal(oid)es estudiados en estas muestras se realizó añadiendo la misma solución alcalina a la solución estándar multielemento utilizada para calibrar

el instrumento. Se utilizaron siete puntos de calibración entre 0 y 25 ppb y las muestras se diluyeron con la solución correspondiente cuando fue necesario. En el caso de las muestras de pelo, uñas, y filtros ya digeridos, los estándares de calibración se prepararon simplemente en HNO₃ diluido (1 N).

Para validar el método analítico en las matrices biológicas se emplearon materiales de referencia certificados para sangre total (Seronom™ Trace Elements Whole Blood L-1, SERO, Billingstad, Noruega) y pelo humano (ERM®- DB001, Comisión Europea, Geel, Bélgica), no encontrando ningún material de referencia para las uñas. Las recuperaciones obtenidas para los diferentes metal(oid)es certificados van del 94 al 110% para la sangre y del 93 al 110% para el pelo, obteniendo recuperaciones ligeramente peores para los metales no certificados (véase la Tabla 2.2). Además del uso de materiales de referencia certificados, después de la calibración y al final de cada lote de muestras, se midieron estándares de control de calidad que cubrían el rango de concentración de interés para comprobar la exactitud de las mediciones. El instrumento se recalibró después de no más de 20 muestras.

Tabla 2.2. Recuperaciones obtenidas en material de referencia de sangre total y pelo humano, Seronom™ Trace Elements Whole Blood L-1 y ERM®- DB001.

Metal(oide)	Sangre. Concentración certificada (µg/L)	Recuperación obtenida (%)	Pelo. Concentración certificada (ng/g)	Recuperación obtenida (%)
Mn	18,4	109,5	442*	144,2
Fe	334000*	100,5	22600*	98,1
Cu	640	93,5	33000	109,2
Zn	4300	103,3	209000	93,1
As	2,4	112,1	44	116,6
Cd	0,28	**	125	108,6
Pb	9,9	97,3	2140	100,6

*Valor informativo.

**Valor por debajo de LD.

Los LD se calcularon en base a la variabilidad de 10 blancos de procedimiento (t de Student bilateral con un 95% de confianza para n-1 muestras (2,26) veces la desviación estándar de los blancos), siendo constantes para cada metal(oide) para la sangre y los filtros y variables para el pelo y las uñas, dependiendo de la cantidad de muestra de cada voluntario. Los LD se muestran en las Tablas 2.3 y 2.4. Las mediciones de estos blancos de procedimiento también permitieron comprobar la posible contaminación de los recipientes y los reactivos. Los valores medios de los metal(oid)es estudiados medidos en estos blancos se sustrajeron de las muestras de pelo, de uñas y de filtros, pero no de las muestras de sangre total porque los puntos de calibración y las muestras de sangre se prepararon en la misma solución alcalina.

Tabla 2.3. LD para los metal(oid)es estudiados en sangre, pelo y uñas.

Metal(oid)	Sangre (µg/L)	Pelo (ng/g)	Uñas (ng/g)
Mn	0,74	3,37-115,86	9,76-89,23
Fe	8,81	112,62-3870,08	326,08-2981,19
Cu	22,89	5,85-200,86	16,92-154,68
Zn	9,97	21,49-738,34	62,20-568,70
As	0,10	1,56-53,70	4,53-41,37
Cd	-	0,71-24,53	2,07-18,88
Pb	1,48	0,85-29,12	2,46-22,49

Tabla 2.4. LD para los metal(oid)es estudiados en filtros.

Metal(oid)	PM _{10-2,5} bioaccesible (ng/m ³)	PM _{10-2,5} no bioaccesible (ng/m ³)	PM _{2,5} bioaccesible (ng/m ³)	PM _{2,5} no bioaccesible (ng/m ³)
Mn	0,76	2,52	0,59	0,99
Fe	14,39	64,00	31,42	36,56
Cu	0,86	15,15	3,48	6,07
Zn	58,33	41,03	13,00	17,37
As	0,04	0,07	0,24	0,06
Cd	0,11	0,32	0,27	0,03
Pb	5,74	1,84	0,42	0,73

2.5. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante los softwares IBM SPSS Statistics (versión 22) y R (versiones 4.0.3 y 4.0.5). El análisis estadístico sólo se ha realizado para los analitos con al menos el 50% de los datos por encima del LD (Tabla 2.5), por lo que se excluyó el As en pelo, y el As y Cd en uñas. En cuanto a filtros, se han tenido en cuenta únicamente la concentración de Mn bioaccesible y no bioaccesible tanto para PM_{10-2,5} como para PM_{2,5}, la concentración de Pb bioaccesible y Fe bioaccesible en las fracciones de PM_{2,5} y PM_{10-2,5} respectivamente, y la concentración de Fe no bioaccesible en la fracción PM_{2,5}, excluyendo el Cd no bioaccesible de la fracción PM_{2,5} debido a la cercanía de las concentraciones analizadas al LD. Para las concentraciones por debajo del LD, se asignó un valor de LD/2.

Tabla 2.5. Porcentaje de muestras analizadas por debajo de LD.

Matriz	Mn (%)	Fe (%)	Cu (%)	Zn (%)	As (%)	Cd (%)	Pb (%)
Sangre	0	0	0	0	0	-	0,8
Pelo	0	0	0	0	80,9	7,0	0
Uñas	0	0	0	0	68,1	63,8	0
PM _{10-2,5} bioaccesible	1,5	21,5	70,8	92,3	82,3	86,2	97,7
PM _{10-2,5} no bioaccesible	40,8	66,2	94,6	86,2	95,4	96,2	96,9
PM _{2,5} bioaccesible	4,6	67,7	67,7	55,4	86,9	69,2	12,3
PM _{2,5} no bioaccesible	6,9	30,8	76,9	64,6	93,8	0	53,1

Se comprobó la normalidad de todas las variables cuantitativas del estudio mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. Para las variables continuas se estimaron medias con su desviación estándar (DE) o medianas y rangos intercuartílicos (RIC) en caso de distribuciones asimétricas. En cuanto a los niveles de Mn y resto de metal(oid)es en los muestreadores personales y en los distintos biomarcadores (sangre, pelo y uñas), estos se describieron mediante las siguientes medidas de tendencia central: media aritmética, mediana y percentil 95 (P₉₅), además de las medidas de dispersión descritas anteriormente (DE y RIC). En

el caso de distribuciones simétricas, las medias se compararon mediante la prueba t de Student (para varianzas iguales o diferentes, dependiendo del resultado previo en la prueba de Levene). En el caso de distribuciones asimétricas, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se utilizaron modelos de regresión lineal para calcular las diferencias de medias (DM) crudas y ajustadas de cada concentración de metal(oide) con sus intervalos de confianza (IC) al 95% para estudiar el posible efecto de los factores de confusión en las diferencias entre grupos. La edad (como variable continua), el sexo y el nivel de estudios (categorizado ordinalmente) se preestablecieron como factores de confusión y se incluyeron en un primer modelo multivariable. En un segundo modelo multivariable se añadieron como factores de confusión adicionales la situación laboral, el tabaquismo y los hábitos alimentarios (ingesta de suplementos de Mn y consumo de alimentos con alto contenido en Mn (frutos secos, té ≥ 5 veces/semana, pescado azul ≥ 3 veces/semana)).

Se calcularon los coeficientes no paramétricos de correlación de Spearman (ρ) entre los metal(oid)es en cada matriz y entre las matrices para cada metal(oide). Por último, también se calcularon las correlaciones entre los marcadores estudiados y la distancia a la fuente principal de metal(oid)es ponderada por la dirección del viento, así como la edad. Se aplicó la prueba de Chi-cuadrado para determinar si existía alguna relación entre la exposición (dicotomizada en alta y moderadamente expuestos) y las variables categóricas utilizadas en la descripción de la población (sexo, nivel de educación, hábito de fumar...). Todas las pruebas fueron bilaterales y el error alfa se fijó en el 5%.

2.6. Procedimiento de cálculo de la distancia ponderada por el viento para las métricas de exposición

Para estudiar la correlación entre los niveles de metal(oid)es en los marcadores a corto plazo (sangre y PM) y, la distancia entre la residencia de cada voluntario y la fuente principal de metal(oid)es ponderada por el viento, se tomaron datos horarios de viento para las franjas horarias de muestreo personal de cada sujeto. Para ello se utilizaron los datos horarios de dirección y velocidad del viento de la estación meteorológica del Aeropuerto de Santander - Parayas proporcionados por Openair a través del paquete World Met (R versión 4.0.5).

Para el cálculo de la distancia fuente/domicilio ponderada por el viento se siguió el procedimiento descrito por Haynes et al. (2012). En primer lugar, se calculó el índice de viento (WI, por sus siglas en inglés), un parámetro entre 0-1 que indica si el sujeto se encuentra a barlovento (0) o a sotavento (1) de la fuente, de acuerdo con la ecuación 2.2, donde $\alpha_{\text{domicilio/fuente}}$ es el ángulo formado entre el domicilio del participante y la fuente (rad) y θ_m representa la dirección media del viento en la estación meteorológica seleccionada en el periodo de muestreo en el que el voluntario llevaba el muestreador personal (rad):

$$WI = (1 - \cos(\alpha_{domicilio/fuente} - \theta_m))/2 \quad (2.2)$$

La dirección media del viento (θ_m) se calculó a partir de los datos horarios considerando la velocidad del viento. Para calcular la dirección media en cada periodo fue necesario determinar primero las componentes U_{media} y V_{media} a partir de las ecuaciones 2.3 y 2.4, donde N es el número de horas en el período de muestreo, u_i es la velocidad horaria del viento (m/s) y θ_i es la dirección horaria del viento (rad).

$$U_{media} : -\frac{1}{N} \sum u_i \text{sen}(\theta_i) \quad (2.3)$$

$$V_{media} : -\frac{1}{N} \sum u_i \text{cos}(\theta_i) \quad (2.4)$$

Para obtener la dirección media (θ_m), se aplicó la ecuación 2.5 (Grange, 2014), donde FLUJO = +180 cuando $\text{ArcTan} < 180$ y FLUJO = -180 cuando $\text{ArcTan} > 180$:

$$\theta_m = \text{ArcTan} \left(\frac{U_{media}}{V_{media}} \right) + \text{FLUJO} \quad (2.5)$$

A continuación, se calculó la distancia ponderada para cada sujeto (d_p) dividiendo la distancia real (d) por el WI, como se muestra en la ecuación 2.6.

$$d_p = \frac{d}{WI} \quad (2.6)$$

Con respecto a los marcadores a largo plazo, para calcular la distancia ponderada entre la fuente y el domicilio, se tomaron los datos del viento de los meses anteriores al muestreo de las uñas y del pelo de cada sujeto (6 meses para las muestras de las uñas y 2 meses para las muestras del pelo del cuero cabelludo). Para estos períodos más largos, el procedimiento mostrado en las ecuaciones 2.2 - 2.6 falló debido a la falta de representatividad de la dirección media del viento durante estos períodos. Para solucionar esto, se desarrolló un procedimiento alternativo para calcular la distancia ponderada (d'_p), utilizando un factor de ponderación (f_p) que considera la frecuencia con la que el viento sopla desde la fuente hasta la residencia durante el período considerado para cada sujeto. Para ello, se dividió el área de interés en 8 sectores, situando el foco emisor en el centro del área y asignando a cada residencia un sector de viento. A continuación, se calculó la frecuencia (fracción de horas) en la que el viento sopló desde el sector opuesto a la vivienda del voluntario con respecto al número total de horas. Por último, se ponderó la distancia entre la fuente y el domicilio del sujeto dividiendo la distancia bruta por este factor de ponderación (ecuación 2.7).

$$d'_p = \frac{d}{f_p} \quad (2.7)$$

2.7. Evaluación del riesgo por exposición a Mn

A continuación, se describe la metodología para evaluar el riesgo de efectos para la salud no carcinogénicos por exposición a Mn presente en diferentes medios (aire, suelo, alimentos y agua) según la metodología US EPA, de cara al cumplimiento del objetivo específico vi.

En primer lugar se describe cómo evaluar la exposición a Mn transportado por el aire, distinguiendo entre tres posibles rutas de exposición: (i) inhalación directa de partículas atmosféricas finas (PM_{2,5}) a través de la boca y la nariz; (ii) ingestión de partículas atmosféricas gruesas (PM_{10-2,5}) que han sido previamente inhaladas pero que posteriormente son deglutidas y acaban en el tracto gastrointestinal; y (iii) absorción dérmica a través de partículas adheridas a la piel expuesta (PM₁₀).

De acuerdo con el manual de evaluación de la salud humana (Parte A) (US EPA, 1989), la orientación complementaria para la evaluación del riesgo dérmico (Parte E) (US EPA, 2004b) y la orientación complementaria para la evaluación del riesgo por inhalación (Parte F) (US EPA, 2009), para evaluar los riesgos por exposición crónica/subcrónica que plantea el Mn presente en el aire ambiente asociado a distintas fracciones de PM, se deben estimar la concentración de Mn inhalada (C_{aire-ajustada}), la ingesta media diaria (DDM_{ingestión}) y la dosis media diaria de absorción dérmica (DDM_{dérmica}), de acuerdo con las ecuaciones 2.8 - 2.10. Es necesario matizar que el *Programa Superfund* ya no aconseja el uso de la DDM_{inhalación} para evaluar la exposición a los contaminantes del aire (US EPA, 2009), recomendando en su lugar el empleo de la concentración del propio contaminante en el aire.

$$C_{\text{aire-ajustada}} = \frac{C_{\text{aire}} * TE * FE * DE}{TM} \quad (2.8)$$

$$DDM_{\text{ingestión}} = \frac{C_{\text{medio}} * InhR * FE * DE}{PC * TM} \quad (2.9)$$

$$DDM_{\text{dérmica}} = \frac{C_T * TA * FA * SA * FE * DE}{PC * TM} \quad (2.10)$$

Donde: DDM = dosis diaria media de Mn (mg/kg/día); C_{aire} = concentración de Mn en la fracción fina, PM_{2,5} (ng/m³), C_{medio} es la concentración de Mn en la fracción gruesa, PM_{10-2,5} (ng/m³), C_T = concentración de Mn en PM₁₀ (mg/kg), InhR = tasa de inhalación (m³/día); TA = tasa de adherencia PM-piel (mg/cm²/día); TE = tiempo de exposición (horas/día); FE = frecuencia de exposición (días/año); DE = duración de la exposición (años); PC = peso corporal (kg); TM = tiempo medio (días); SA = superficie de piel disponible para el contacto (cm²) y FA = factor de absorción dérmico (adimensional). Para evaluar riesgos no carcinogénicos, (TM = DE*FE). Debe tenerse en cuenta que para estimar la DDM_{ingestión} se consideró el Mn presente en el PM_{10-2,5} que es inhalado, pero posteriormente procesado en el tracto gastrointestinal.

Idealmente, la concentración del metal en el medio debería ser la verdadera concentración media dentro de la unidad de exposición, sin embargo, debido a la incertidumbre asociada con la concentración media estimada en un sitio, se emplea ampliamente el límite superior de confianza del 95% de la media aritmética como una estimación conservadora de la concentración media (Hernández-Pellón et al., 2018; US EPA, 2007b). No obstante, para exposiciones a corto plazo (agudas) como las que corresponden a este estudio transversal mediante el empleo de muestreadores de PM personales durante 24 horas, el procedimiento de la US EPA establece que la concentración de aire ajustada es realmente la concentración medida con el muestreador personal para cada sujeto expuesto (US EPA, 2009), lo que facilita los cálculos de la caracterización de la exposición, simplificando las ecuaciones 2.8 - 2.10.

Una vez caracterizada la exposición, la estimación del riesgo no carcinogénico por exposición a Mn se determina mediante su cociente de peligrosidad (HQ_i) de acuerdo con las ecuaciones 2.11 - 2.13.

$$\text{Inhalación} \quad HQ_i = \frac{C(\text{aire-ajustada})_i}{RfC_i} \quad (2.11)$$

$$\text{Ingestión} \quad HQ_i = \frac{DDM_{\text{ingestión}}}{RfD_i} \quad (2.12)$$

$$\text{Contacto dérmico} \quad HQ_i = \frac{DDM_{\text{dérmica}}}{RfD_i * GIABS} \quad (2.13)$$

Donde RfC/RfD es la concentración/dosis de referencia para la exposición crónica por inhalación, ingestión (mg/m^3 o $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$). La US EPA define la dosis de referencia dérmica como la RfD de la ingestión dietética multiplicada por el factor $GIABS$ (fracción absorbida por el tracto gastrointestinal), siendo este un 4% en el caso concreto de Mn (US EPA, 2004b). Un HQ superior a uno se considera un indicador de efectos adversos para la salud de la población expuesta. Debe tenerse en cuenta que, aunque las medidas de los muestreadores personales corresponden a un corto período de tiempo (exposición aguda), se asume que los sujetos están expuestos de forma crónica a estos niveles de Mn, por lo que se emplean los RfC y RfD para exposición crónica.

La US EPA obtuvo una RfC crónica por inhalación de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mg}/\text{m}^3$ para el Mn respirable (IRIS US EPA, 1998). Este valor se basa en el nivel más bajo de efecto adverso observado (LOAEL, por sus siglas en inglés) de $0,15 \text{ mg}/\text{m}^3$ obtenido a partir de un estudio sobre trabajadores de una fábrica de baterías expuestos a dióxido de manganeso (MnO_2) (Roels et al., 1992). El LOAEL se calculó dividiendo la media geométrica de la concentración de polvo respirable integrada durante toda la vida de los trabajadores expuestos por la duración media del empleo en la instalación. La US EPA calculó la RfC ajustándola a la exposición continua y dividiéndola por un factor de incertidumbre de 1000 (10 para el uso de un LOAEL, 10 para proteger a los individuos sensibles y 10 para las limitaciones de la base de datos que reflejan tanto los períodos de exposición menos crónicos como la falta de datos sobre el desarrollo, así como las diferencias potenciales, pero no

cuantificadas, en la toxicidad de las diferentes formas de Mn), asumiendo una tasa de respiración de 10 m³/día.

En cuanto a la RfD, el valor proporcionado por el IRIS (0,14 mg/kg/día) abarca el Mn de todas las fuentes, incluida la dieta. Sin embargo, para la evaluación de la exposición a Mn a fuentes no alimentarias (como agua o suelo) el autor de la evaluación del IRIS recomendó para el Mn que se restase la contribución dietética de la dieta normal de los EE.UU. (un límite superior de 5 mg/día), lo que lleva a una RfD de 0,071 mg/kg/día. El texto explicativo de IRIS recomienda además utilizar un factor modificador de 3 al calcular los riesgos asociados a las fuentes no alimentarias debido a una serie de incertidumbres, lo que lleva a una RfD de 0,024 mg/kg/día (IRIS US EPA, 1998).

Finalmente, el índice de peligrosidad asociado a la exposición a Mn presente en el aire (HI)_{aire} se calcula como la suma de los HQ_i para todas las vías de exposición, como muestra la ecuación 2.14.

$$HI_{aire} = \sum_1^i HQ_i \quad (2.14)$$

En segundo lugar, se describe cómo evaluar la exposición a Mn presente en el suelo/polvo. Teniendo en cuenta que el presente estudio se ha realizado en adultos, se asume en primer lugar como despreciable la ingestión de Mn por contacto mano-boca del suelo, ruta más factible en niños y para la cual la US EPA proporciona valores orientativos sólo para menores de 21 años (US EPA, 2011). Sin embargo, existe un procedimiento para caracterizar la exposición asociada a la ingestión de suelo/polvo resuspendido que es previamente inhalado, empleando una ecuación similar a la 2.9.

$$DDM_{ingestión} = \frac{C'_{medio} * IngR * FE * DE}{PC * TM} \quad (2.15)$$

La US EPA asume una ingesta diaria de suelo para adultos (IngR_{suelo}) por esta vía de 20 mg/día, y de 30 mg/día de polvo (IngR_{polvo}), y la C'_{medio} correspondería con la concentración de Mn en suelo y polvo respectivamente (mg Mn/kg de suelo o polvo) (US EPA, 2011). Aunque se dispone de valores del contenido de Mn en suelo local (4333 mg/kg en Maliaño (Fernández-Olmo et al., 2015) y 565,7 mg/kg promedio en Cantabria (Boente et al., 2020)), no se ha tenido en cuenta esta ruta para los cálculos del riesgo por exposición a Mn, ya que se considera que el PM recogido en el muestreador personal también incluye partículas resuspendidas de suelo y/o polvo, por lo que este riesgo ya estaría evaluado de acuerdo con las ecuaciones 2.9 y 2.12.

Otro posible riesgo ligado al suelo/polvo sería el contacto dérmico con el mismo; sin embargo, tampoco se ha incluido en el procedimiento, ya que es una ruta de exposición más habitual para niños (en contacto con el polvo del suelo de la vivienda, o con el suelo de un jardín o parque infantil). También puede ser relevante en el caso de determinadas profesiones y actividades

puntuales, como la jardinería, pero teniendo en cuenta la naturaleza del estudio transversal y las características de los participantes de dicho estudio, se ha considerado razonable no incluir este riesgo en los cálculos.

Finalmente se describe cómo evaluar la exposición a Mn presente en alimentos y agua de consumo. Trumbo et al. (2001) recomiendan una dosis de Mn ingerida a partir de 19 años de 2,3 mg/día para hombres y 1,8 mg/día para mujeres. Sin embargo, para la estimación de una RfD para Mn, la US EPA se basó en distintos estudios (Freeland-Graves et al., 1987; McLeod y Robinson, 1972; National Research Council, 1989; OMS, 1973), concluyendo que una dosis de 10 mg/día (0,14 mg/kg/día) es segura para el organismo. Al aplicar esta RfD para el Mn a una evaluación de riesgos, es importante tener en cuenta la naturaleza ubicua del Mn, concretamente que la mayoría de las personas consumen entre 2 y 5 mg de Mn al día en su dieta (IRIS US EPA, 1998).

Específicamente, para el cálculo de la dosis ingerida se emplea la ecuación 2.16, donde la concentración diaria recomendada promedio es de 2,05 mg/día de acuerdo con Trumbo et al. (2001).

$$DDM_{ingestión} = \frac{C_{diaria\ recomendada}}{PC} \quad (2.16)$$

Esta dosis se aplica posteriormente en la ecuación 2.12 teniendo en consideración que la RfD para la evaluación del riesgo por ingestión de alimentos es 0,14 mg/kg/día.

Para el caso particular del agua de consumo, se considera por un lado la concentración de Mn en el agua de grifo, la cual se ha medido experimentalmente, y por otro, la RfD para no dieta, tal como recomienda el procedimiento de la US EPA, 0,024 mg/kg/día (IRIS US EPA, 1998).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo III. Resultados y discusión

3.1. Estudio de la bioaccesibilidad de metal(oid)es en material de referencia

3.1.1. Influencia de la selección del fluido sintético

Un protocolo detallado para tener en cuenta la bioaccesibilidad de los metal(oid)es procedentes de las partículas inhaladas debería considerar diferentes fluidos corporales sintéticos en función del destino de las partículas en el cuerpo, que a su vez depende del tamaño de las partículas. El pH y la composición química de estos fluidos afectarán a la solubilidad de dichos metal(oid)es. Por esta razón, se utilizó agua ultrapura y diferentes fluidos corporales simulados cuya composición se ha descrito en la Tabla 2.1 (Gamble para representar el fluido pulmonar intersticial, ALF como sustituto de las condiciones ácidas resultantes del ataque de los macrófagos a las partículas finas en los alvéolos, y fluido gástrico para representar el fluido corporal con el que finalmente contactarán las partículas gruesas) para evaluar la bioaccesibilidad de los metal(oid)es potencialmente tóxicos de material de referencia “polvo urbano” (SRM1648a). Para este primer análisis se eligió el fluido intersticial Gamble G₂, para poder comparar los resultados con otros autores que utilizaron esta misma composición de fluido Gamble.

La Figura 3.1 muestra la media y la desviación estándar de la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en los fluidos estudiados a una relación L/S de 5000. Estos resultados confirman que la bioaccesibilidad de los mismos depende del tipo de agente de lixiviación, que difieren entre sí en pH y composición química. La fracción soluble de los metal(oid)es estudiados fue menor en el agua ultrapura que en los fluidos biológicos sintéticos.

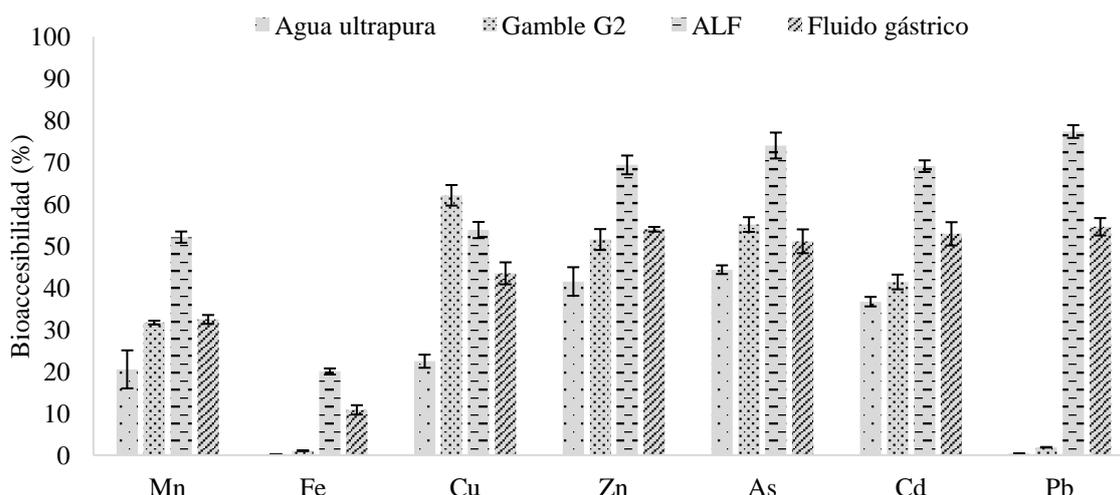


Figura 3.1. Porcentaje bioaccesible de SRM1648a en agua ultrapura, solución Gamble G₂, ALF y fluido gástrico a una relación L/S de 5000.

Cuando se compararon los fluidos neutros estudiados (es decir, Gamble G₂ y agua), la mayoría de los metal(oid)es mostraron una mayor bioaccesibilidad en el fluido Gamble G₂, lo que se atribuyó a la presencia de reactivos orgánicos e inorgánicos en este fluido sintético, capaces de

formar complejos solubles con los metal(oid)es. En este sentido, Caboche et al. (2011) ya indicaron que la bioaccesibilidad de los metales en la solución de Gamble era mayor que en el agua.

La bioaccesibilidad de la mayoría de los metal(oid)es fue mayor en el fluido ALF que en la solución de Gamble G₂, de acuerdo con lo observado en la bibliografía (Gosselin y Zagury, 2020; Guney et al., 2016; Hernández-Pellón et al., 2018; Meza-Figueroa et al., 2020; Mukhtar et al., 2015; Weggeberg et al., 2019a; Wiseman y Zereini, 2014). El Fe y el Pb fueron los metales con mayores diferencias, como se muestra en la Figura 3.1 (Fe: 1,1 vs 20,0%; Pb: 1,9 vs 77,3% en G₂ y ALF respectivamente). Este comportamiento no se observó para el Cu, obteniendo también Pelfrêne et al. (2017) una bioaccesibilidad similar en las soluciones de Gamble G₂ y ALF a una relación L/S de 5000.

Además, para Mn, Fe, Zn, As, Cd y Pb los valores bioaccesibles más altos se encontraron en ALF (pH=4,5), siendo superiores a los obtenidos en fluido gástrico (pH=1,5), apoyando la idea de que el pH no es el único factor que afecta a la solubilidad. Esto coincide con los resultados encontrados por Kastury et al. (2018), que mostraron que la bioaccesibilidad del Pb, Fe, As y Mn de un material de referencia de suelo (SRM2710a) también fue mayor en ALF que en fluido gástrico.

Por último, las diferencias entre la bioaccesibilidad obtenida en la solución de Gamble G₂ y el fluido gástrico a una relación L/S de 5000 no fueron relevantes, con la excepción del Pb (2% en Gamble G₂ frente al 55% en gástrico), el Fe (1% en Gamble G₂ frente al 11% en gástrico) y el Cd (42% en Gamble G₂ frente al 53% en gástrico). Esto puede deberse a que la diferente composición y pH de ambos fluidos afecta a la solubilidad de estos metales.

Se utilizó el software de especiación Visual MINTEQ 3.1. para explicar de forma semicuantitativa porqué algunos metal(oid)es mostraron una bioaccesibilidad diferente entre los fluidos gástrico y Gamble G₂, mientras que los demás metal(oid)es mostraron valores de bioaccesibilidad similares. En particular, se seleccionaron Pb y Mn como metales objetivo para realizar esta comparación, porque el Pb mostró una mayor diferencia en la bioaccesibilidad, mientras que la solubilidad del Mn fue similar en ambos fluidos. Como la especiación de ambos metales en SRM1648a era desconocida, se consideraron cuatro especies sólidas de Pb y tres de Mn calculando la concentración de las especies de en mol/kg a partir del contenido total certificado en SRM1648a. Los resultados de la simulación utilizando Visual MINTEQ 3.1. se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Fracción soluble de Pb⁺² y Mn⁺² en Gamble G₂ y fluido gástrico obtenida con Visual MINTEQ 3.1.

Especie metálica	Log (K _{ps})	Concentración (mol/kg)	Fracción soluble de Pb ⁺² en Gamble G ₂ (%)	Fracción soluble de Pb ⁺² en fluido gástrico (%)
Pb(OH) ₂	8,15	0,027	5	100
Pb ₃ (PO ₄) ₂	-43,53	0,008	6	100
Pb ₂ O(OH) ₂	26,19	0,014	100	100
PbHPO ₄	-23,80	0,009	100	100
			Fracción soluble de Mn ⁺² en Gamble G ₂ (%)	Fracción soluble de Mn ⁺² en fluido gástrico (%)
Mn ₃ (PO ₄) ₂	-23,83	0,0023	100	100
MnSO ₄	2,58	0,0052	100	100
MnSb	-2,91	0,0045	100	100

La fracción soluble de Pb fue del 100% en el fluido gástrico en todas las hipótesis, mientras que la fracción soluble de Pb en la solución de Gamble G₂ varía con la especiación del metal del 5 al 100%. Con respecto al Mn, los resultados de Visual MINTEQ 3.1. mostraron que la fracción soluble de Mn⁺² era similar en los dos fluidos y para todas las especies de Mn estudiadas. Este análisis indicó que la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en el PM no sólo depende de la composición y el pH del fluido sintético (factor externo), sino también de su especiación en el PM (factor interno). Por tanto, la alta variabilidad en los valores de bioaccesibilidad de los metal(oid)es que se encuentra típicamente en la bibliografía cuando se trabaja con muestras reales de PM utilizando el mismo método de bioaccesibilidad con el mismo fluido de extracción puede explicarse por las diferencias entre muestras en la especiación de estos metal(oid)es, debido a la distinta contribución de las fuentes a lo largo de las campañas de muestreo.

3.1.2. Influencia de la composición de fluidos pulmonares intersticiales

Con el objetivo de analizar la influencia de la composición de los fluidos neutros de revestimiento pulmonar en la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en SRM1648a se utilizaron dos soluciones Gamble con diferente composición, G₁ y G₂ de acuerdo con la Tabla 2.1.

De acuerdo con la Figura 3.2, los metal(oid)es analizados mostraron una baja bioaccesibilidad en el fluido Gamble G₁ empleando relaciones L/S de 500 y 5000. Estos resultados mostraron un mayor impacto de la relación L/S en el fluido Gamble G₂, aumentando la bioaccesibilidad al aumentar la relación L/S. Por ejemplo, el valor medio de Mn cambió de 1,5% a una relación L/S de 500 a 31,7% a una relación L/S de 5000. Sin embargo, la bioaccesibilidad empleando una relación L/S de 500 fue similar en ambos fluidos Gamble (G₁ y G₂), con la excepción del Cu (12,5% G₁ y 31,6% G₂).

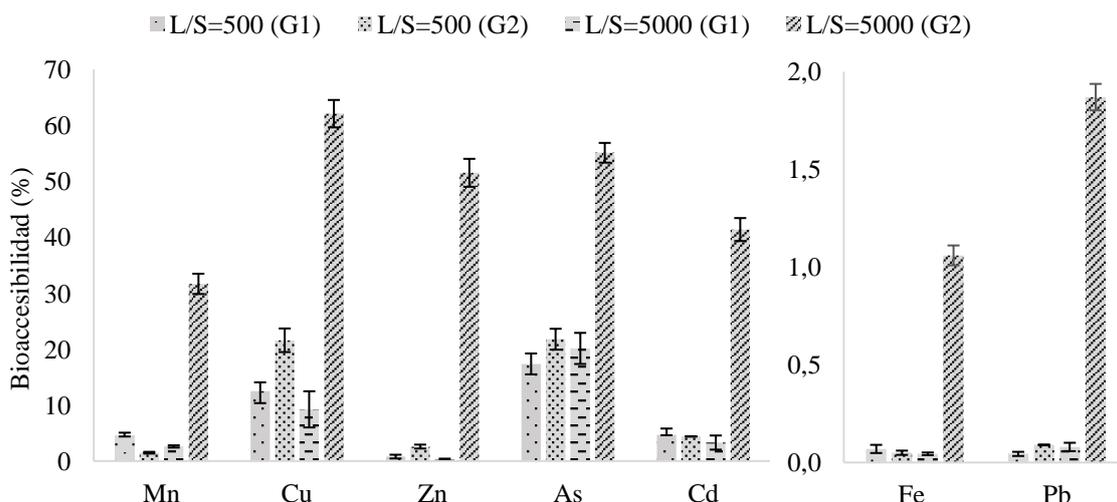


Figura 3.2. Bioaccesibilidad de los metal(oid)es presentes en SRM1648a empleando dos tipos de fluidos Gamble (G₁ y G₂) a dos relaciones L/S (500 y 5000).

La gran diferencia entre la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en ambos fluidos Gamble a una relación L/S de 5000 sugiere que algunos componentes de Gamble G₂ aumentan su solubilidad. La composición iónica de ambos fluidos se presenta en la Tabla 3.2, encontrando que ambos fluidos difieren principalmente en que Gamble G₁ contiene ion acetato (C₂H₃O₂⁻¹) y Gamble G₂ ion glicinato (C₂H₄NO₂⁻¹), es decir la forma básica del aminoácido glicina.

Tabla 3.2. Composición iónica molar de los fluidos Gamble G₁ y G₂.

Ion	Gamble G ₁ (M)	Gamble G ₂ (M)
H ⁺	0,0319	0,0330
Na ⁺	0,1445	0,1454
Ca ⁺²	0,0025	0,0001
K ⁺	0,0040	-
Mg ⁺²	0,0010	-
NH ₄ ⁺	-	0,0100
CO ₃ ⁻²	0,0310	0,0270
PO ₄ ⁻³	0,0009	0,0010
C ₆ H ₅ O ₇ ⁻³	0,0003	0,0002
C ₂ H ₃ O ₂ ⁻¹	0,0070	-
C ₂ H ₄ NO ₂ ⁻¹	-	0,0050

Como la especiación de los metal(oid)es en el material de referencia SRM1648a es desconocida, se utilizó Visual MINTEQ 3.1. con el fin de simular la lixiviación de algunas especies de metales objetivo en Gamble G₁ y G₂ (pH=7,4). Por ejemplo, la lixiviación del Cu, uno de los metales que muestra la mayor diferencia de solubilidad entre los fluidos Gamble G₁ y G₂, se simuló utilizando Cu₃(PO₄)₂ (0,001 M) como compuesto objetivo, indicando los resultados que la solubilidad del Cu en Gamble G₁ y G₂ era del 3% y del 82%, respectivamente. Con Gamble G₁, el Cu soluble se asocia principalmente con las especies CuCO₃ (aq) y [Cu(C₆H₅O₇)] (citrato de cobre). Sin embargo, cuando se utilizó Gamble G₂, la especiación cambió significativamente con más del 90% del Cu soluble en forma de [Cu(C₂H₄NO₂)₂] (aq) (bis-glicinato de cobre (II)). Aunque esto no debe interpretarse de forma cuantitativa, podemos suponer que la presencia de glicina en

Gamble G₂ permitió la formación de complejos metálicos solubles aumentando la bioaccesibilidad de dichos metales, como predijeron Kastury et al. (2017).

El efecto de la composición del fluido pulmonar neutro también fue estudiado por Kastury et al. (2018), quienes analizaron la bioaccesibilidad de algunos metal(oid)es (As, Pb, Al, Cd, Fe, Mn y Zn) procedentes de un material de referencia de suelo (SRM2710a) y de filtros de PM₁₀ preparados a partir de muestras de suelo a una relación L/S de 5000 para cinco fluidos pulmonares neutros simulados: solución original de Gamble (Moss, 1979), simulación de suero modificado (Caboche et al., 2011), solución de Gamble modificada (Twining et al., 2005), fluido pulmonar epitelial simulado (Boisa et al., 2014) y solución de Hatch (Berlinger et al., 2008). Estos autores achacaron la mayor bioaccesibilidad de los metal(oid)es en la solución de Hatch a la mayor cantidad de albúmina en comparación con el fluido pulmonar epitelial simulado y la solución de Gamble modificada, y a la falta de albúmina en los otros fluidos probados. El alto contenido de albúmina puede jugar un papel importante en la mayor extracción de metal(oid)es debido a su capacidad de unir metales a través del secuestro/complejación (Peters y Blumenstock, 1967). Sin embargo, por simplicidad, en la formulación de fluidos pulmonares sintéticos, se suelen emplear aminoácidos en lugar de proteínas, siendo la más utilizada la glicina, aunque no queda claro en la bibliografía por qué se escogió este aminoácido en concreto (Kastury et al., 2017). Además, la eficacia quelante de los aminoácidos es diferente (Harris y Silberman, 1983), pudiendo conducir a diferentes valores de bioaccesibilidad de los metal(oid)es seleccionados en función del aminoácido elegido (Kastury et al., 2017). Por tanto, en la formulación de la solución de Gamble, es importante utilizar siempre el mismo aminoácido (glicina), y a la misma concentración.

3.1.3. Influencia de la relación líquido/sólido (L/S)

Según Macklin (1955), una profundidad media del fluido alveolar de 0,2 μm que cubre una superficie de 100 m² conduciría a un volumen total de fluido alveolar de 20 mL. Considerando condiciones de exposición por inhalación durante 24 h bajo un gran rango de concentraciones de partículas (de 20 a 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), y asumiendo que el 100% de las partículas inhaladas llegan a los alvéolos con una captación de aire diaria entre 10 y 20 m³ y un volumen de fluido alveolar total que oscila entre 5 y 20 mL, la relación L/S correspondiente podría variar entre 100000 y 500 mL/g (Caboche et al., 2011; Kastury et al., 2018b; Pelfrêne et al., 2017). Esto ha dado lugar a una amplia gama de relaciones L/S utilizadas en estudios previos para las pruebas de bioaccesibilidad. Por ejemplo, Caboche et al. (2011) utilizaron relaciones L/S entre 30 y 50000 para obtener la bioaccesibilidad de cuatro materiales de referencia que representan diferentes tipos de partículas (NIST 1648a, BC 038, NIES 8 y NIST 2548) en la solución de Gamble, sugiriendo que relaciones L/S superiores a 500 presentan riesgo de saturación de la solución o de competencia entre los elementos solubles. Pelfrêne et al. (2017) estudiaron la bioaccesibilidad de tres materiales de referencia (BCR-723, NIST2710a y NIST1648a) utilizando cuatro relaciones de 100 a 10000 en

la solución de Gamble y ALF, observando un impacto de la relación L/S en la bioaccesibilidad de algunos metal(oid)es en la solución de Gamble. Del mismo modo, Kastury et al. (2018a; 2018b) informaron de un aumento de la bioaccesibilidad de los metal(oid)es para las relaciones L/S más altas cuando se emplea la solución de Gamble, pero no la de ALF.

Además, el protocolo de estandarización desarrollado por la US EPA para medir la bioaccesibilidad de metales en los suelos recomendaba una relación L/S de 100 para reducir el efecto de la disolución (US EPA, 2007a). Sin embargo, aunque esta relación puede aplicarse con materiales de referencia, se necesitan relaciones L/S más altas con las muestras de PM ambiental debido al bajo peso de la muestra que se suele recoger con muestreadores de bajo volumen. En resumen, la variación de la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en la solución de Gamble con la relación L/S es incierta en la literatura y en el fluido gástrico es desconocida para el polvo urbano, mientras que para el fluido ALF parece no influir demasiado.

Teniendo en cuenta los resultados encontrados en la bibliografía y las limitaciones experimentales, se utilizaron cuatro relaciones L/S (de 500 a 20000) para analizar la influencia de la relación L/S en la bioaccesibilidad de los metal(oid)es estudiados en las soluciones de Gamble, ALF y fluido gástrico. En la Figura 3.3 se representa la bioaccesibilidad de Mn, Fe, Cu, Zn, As, Cd y Pb en los citados fluidos, observándose que la bioaccesibilidad en Gamble G₂ aumentó logarítmicamente con la relación L/S, mientras que se mantuvo prácticamente constante para los fluidos gástrico y ALF.

El efecto de la relación L/S sobre la bioaccesibilidad en la solución de Gamble G₂ es similar al encontrado en un estudio realizado por Pelfrêne et al. (2017) para el Mn, Zn y Cd, aumentado la bioaccesibilidad con la relación L/S. Sin embargo, dicho estudio mostró que la bioaccesibilidad en solución Gamble del Cu era constante con la relación L/S. Kastury et al. (2018a) también apreciaron que la bioaccesibilidad de As y Pb en el SRM2710a y en algunos filtros de PM₁₀ preparados a partir del suelo a las 120 h utilizando una relación L/S de 5000 era significativamente mayor que en la que utilizaba relaciones L/S de 100, 500 y 1000; encontrando una tendencia similar para el Mn, Fe, Zn y Cd, con la mayor bioaccesibilidad del metal a una relación L/S de 5000. Sysalová et al. (2014) también observaron un comportamiento similar para Mn, Zn, As, Cd y Pb con muestras reales de PM, pero utilizando la solución de Hatch en un rango de L/S entre 100 y 1000. En cuanto al fluido ALF, Pelfrêne et al. (2017) y Kastury et al. (2018a) informaron que la bioaccesibilidad de los metal(oid)es no se ve afectada significativamente por la relación L/S, estando de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 3.3.

Sin embargo, los resultados derivados del estudio del efecto de la relación L/S en la bioaccesibilidad de muchos metal(oid)es no se han explicado todavía en la literatura, por lo que sigue siendo necesario considerar que algunos parámetros fisicoquímicos pueden afectar a la

liberación de contaminantes de los sólidos, como el tipo de contacto, el tamaño de las partículas, la temperatura, el pH y la composición de los agentes de lixiviación, la cinética, los mecanismos de lixiviación, etc.

Una primera hipótesis es que cuando se utiliza la solución de Gamble, la concentración de metal(oid)es solubilizados al final del periodo de extracción puede no estar en equilibrio debido a las limitaciones cinéticas de la liberación de dichos metal(oid)es. Sin embargo, según la bibliografía, un tiempo de contacto de 24 horas debería ser suficiente para alcanzar las condiciones de equilibrio; así, Caboche et al. (2011) indicaron de que los resultados obtenidos para cuatro materiales de referencia sugieren que la bioaccesibilidad se maximiza tras un tiempo de extracción de 24 h para relaciones L/S que van de 500 a 50000. De manera similar, Kastury et al. (2018b) informaron que para el As y el Pb la cantidad solubilizada en ALF se estabiliza en 24 h. Además, la bioaccesibilidad en el fluido gástrico es prácticamente constante utilizando un tiempo de contacto de solo una hora.

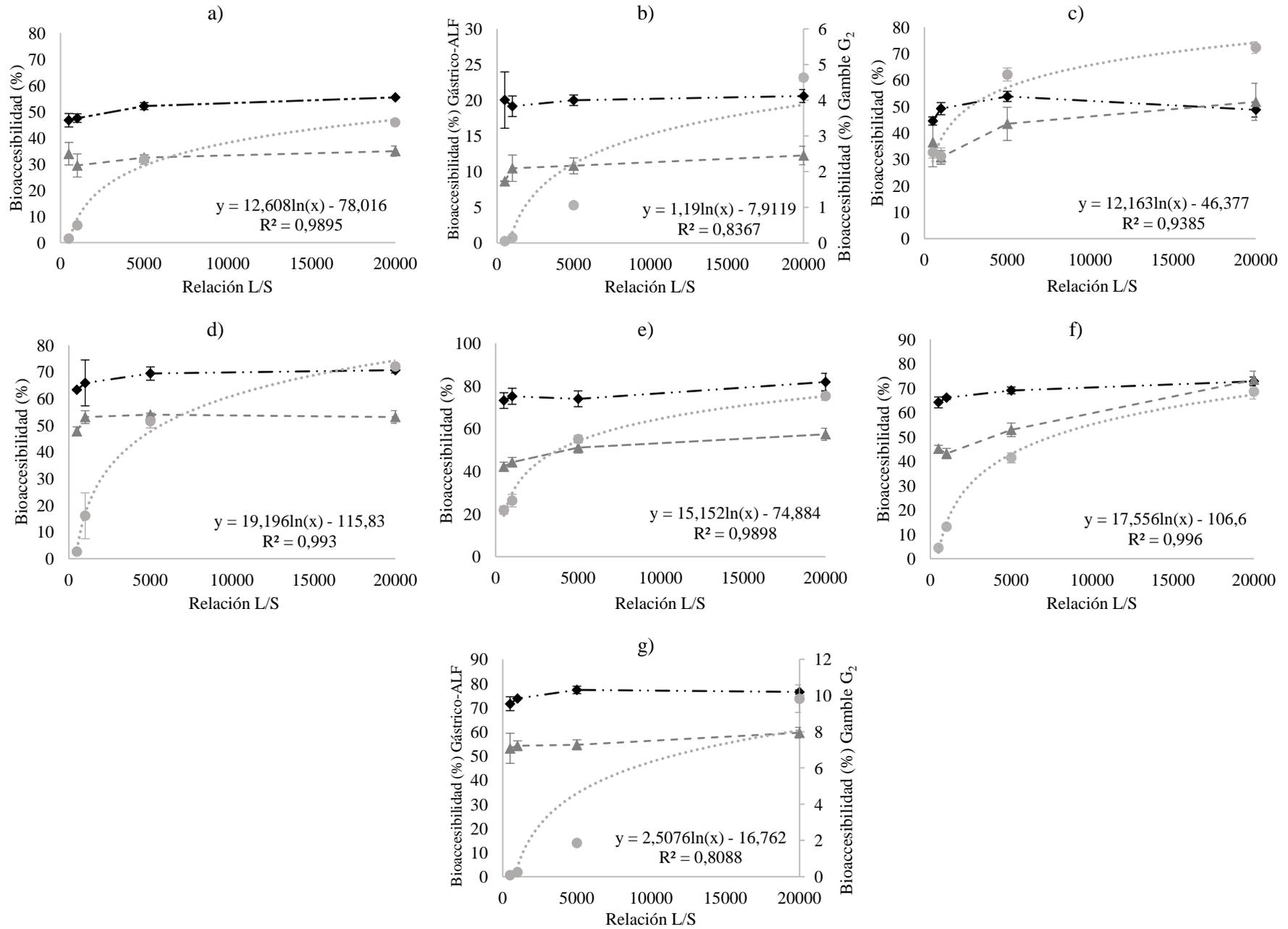


Figura 3.3. Variación de la bioaccesibilidad (%) de SRM1648a en Gamble G₂ (●), fluido gástrico (▲) y ALF (◆) con la relación L/S para a) Mn; b) Fe; c) Cu; d) Zn; e) As f) Cd y g) Pb.

Para explicar el diferente comportamiento de la bioaccesibilidad con la relación L/S en Gamble, ALF y fluido gástrico se asumió que pueden ocurrir diferentes mecanismos de control de la lixiviación cuando se usa la solución de Gamble respecto a ALF y a fluido gástrico de acuerdo con sus diferentes solubilidades. Así, se ha supuesto que la lixiviación de los metal(oid)es en la solución de Gamble está controlada por la solubilidad, mientras que en los fluidos más ácidos (ALF y fluido gástrico) está controlada por la disponibilidad. Estos mecanismos de lixiviación han sido utilizados previamente para explicar el diferente comportamiento en la solubilización de algunos elementos de los residuos sólidos cuando se cambia la relación L/S (Van Der Sloot, 2002).

El control de la solubilidad ocurre cuando la solución en contacto con un sólido está saturada con respecto a las especies constituyentes de interés, lo que significa que a una relación L/S dada, la concentración soluble es la concentración de saturación. Cuando la relación L/S se incrementa, la liberación de un determinado metal aumenta a mayores relaciones L/S para alcanzar la concentración de equilibrio. Esto significa que la fracción soluble (bioaccesibilidad) aumentará con la relación L/S hasta alcanzar la máxima solubilidad (Figura 3.4a). La disponibilidad se define como la cantidad máxima de un componente que puede liberarse de un sólido a la solución en condiciones de lixiviación agresiva. En condiciones de control de la disponibilidad, la concentración de metal resultante en la solución disminuirá con la relación L/S porque se liberará la misma cantidad de metal, lo que conducirá a una dilución del metal debido al mayor volumen de lixiviado. Sin embargo, la fracción soluble se mantendrá constante con la relación L/S (Figura 3.4b), siendo este valor la disponibilidad (Kosson et al., 1996).

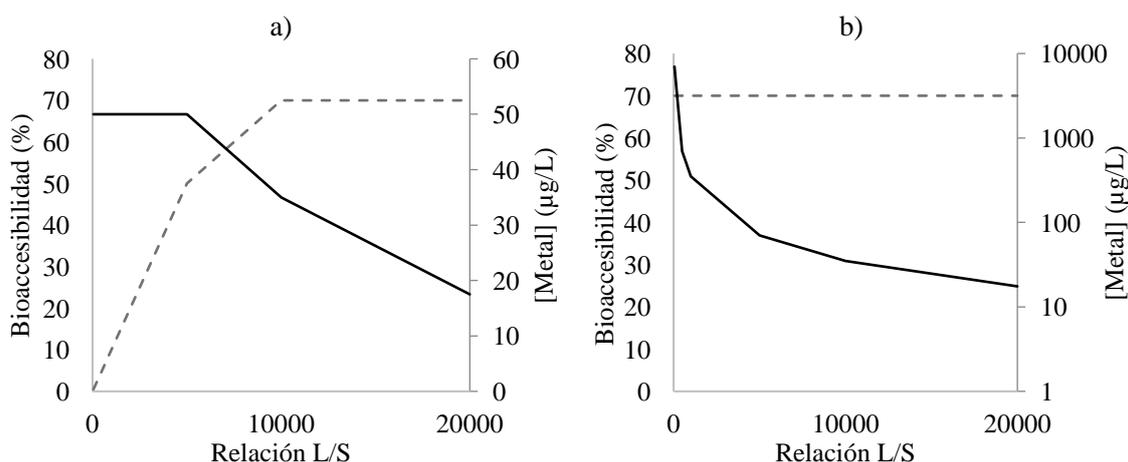


Figura 3.4. Mecanismos sobre el control de la lixiviación: a) Control por solubilidad: concentración total de metal = 500 mg/kg; concentración de metal disponible = 350 mg/kg; solubilidad de metal = 50 µg/L. b) Control por disponibilidad: concentración total de metal = 500 mg/kg; concentración de metal disponible = 350 mg/kg; solubilidad de metal = 7000 µg/L; donde la línea continua representa la variación de la concentración de metal (µg/L) y la línea discontinua representa la variación de la bioaccesibilidad (%).

3.1.4. Protocolo para evaluar la bioaccesibilidad de metal(oid)es contenidos en el PM inhalado

A la vista de estos resultados, la composición del fluido intersticial simulado, el tipo de agente lixivante y la relación L/S son factores que influyen en la evaluación de la bioaccesibilidad por inhalación, derivando del presente estudio las siguientes recomendaciones:

La evaluación de la bioaccesibilidad de los metal(oid)es ligados al PM por vía inhalatoria debe considerar en primer lugar el destino de las partículas en el cuerpo humano en función del tamaño de partícula, lo que implica emplear SLFs para las partículas finas (PM_{2,5}), y fluido gástrico para las partículas gruesas (PM_{10-2,5}). Entre los SLFs, dos tipos de fluidos pulmonares (neutro, como la solución de Gamble, y ácido, como el ALF) permiten tener en cuenta dos escenarios en los que se pueden encontrar las partículas finas en el pulmón. Dado que la composición de los fluidos pulmonares neutros puede afectar drásticamente a la solubilidad de algunos metal(oid)es, debe utilizarse una composición única que simule el fluido pulmonar intersticial; recomendando para ello fluidos sintéticos que contengan sustitutos de proteínas, como la solución Gamble G₂, que contiene glicina como aminoácido tipo.

La bioaccesibilidad en ALF y en el fluido gástrico es casi independiente de la relación L/S, por lo que se recomienda una relación L/S relativamente baja (por ejemplo, de 500 a 1000), ya que permitirá determinar la bioaccesibilidad de elementos presentes en concentraciones muy bajas en el PM e incluso cuando se recojan pequeñas cantidades de PM en filtros. Sin embargo, es importante evitar trabajar con relaciones L/S inferiores a 5000 cuando se utiliza el fluido de Gamble G₂, ya que la bioaccesibilidad aumenta logarítmicamente con la relación L/S, principalmente en el rango entre 500 y 5000. Lo ideal es realizar esta prueba con la mayor relación L/S posible que permita cuantificar la concentración de metal en el ensayo de bioaccesibilidad de Gamble.

3.2. Caracterización de la población del estudio transversal

En la Tabla 3.3 se muestran las características sociodemográficas de la población estudiada dividida en función de la exposición (moderada/altamente expuestos) con un intervalo de edad entre 20 y 71 años, y una media global de 41,75 años (DE = 13,97), siendo mujeres el 73,1% de los participantes y hombres el resto (26,9%). La población altamente expuesta vive a una distancia promedio de 0,8 km (0,25-1,5 km) respecto a la fábrica de ferroaleaciones de Mn, considerada como la principal fuente de contaminación, mientras que la población moderadamente expuesta reside a una distancia promedio de 7,3 km (2-34 km). En cuanto al nivel de estudios, el 55,4% tuvieron estudios universitarios (14,6% diplomatura y el 40,8% licenciatura o grado), el 23,1% estudios de bachillerato, el 16,9% estudios secundarios y el 4,6% estudios primarios. El número de años promedio de residencia en el mismo domicilio fue de 15,26 años (DE = 13,71). Respecto

a la situación laboral, el 74,6% fueron empleados a tiempo completo, el 10,0% jubilados, el 7,7% estudiantes a tiempo completo, el 3,8% amas de casa y el 3,8% estuvieron en situación de desempleo en el momento de la entrevista.

El 64,6% refirió no haber fumado nunca tabaco, el 16,9% fueron exfumadores y el 18,5% fumadores activos. En cuanto al consumo de alcohol, el 54,6% refirió no consumir nada de alcohol, mientras que el 45,4% fueron consumidores ocasionales. Al analizar el consumo de los bebedores ocasionales se observó que el 16,9% consumía entre 1 y 24 gramos de etanol puro semanal, el 25,40% entre 25 y 74 gramos por semana y el 3,1% tuvo un consumo de más de 75 gramos por semana.

Se observaron diferencias significativas entre la exposición en función de los años de residencia, mayor para el grupo más expuesto ($p < 0,001$), en función del nivel educativo, menor para la población más expuesta ($p = 0,005$) y en función de la situación laboral, con más personas empleadas a tiempo completo en la población moderadamente expuesta ($p = 0,045$), aunque no se observaron diferencias en función del sexo y del hábito de fumar o el consumo de alcohol. En cuanto a la dieta, ningún participante refirió ser vegetariano y el consumo de cereales, guisantes y judías fue similar entre los participantes. Además, la población estudiada procede de una zona urbana/industrial, por lo que su dieta se basa principalmente en productos adquiridos en supermercados, descartando así la ingesta de alimentos potencialmente contaminados cultivados en suelos o huertas locales. Respecto a la ingesta de agua, se determinó un bajo contenido de metal(oid)es en el agua del grifo local (0,38, 7,91, 5,22, 0,41, 0,11, 0,02 y 0,06 $\mu\text{g/L}$ para Mn, Fe, Cu, Zn, As, Cd y Pb respectivamente), por lo que no se consideró relevante en el estudio. El resto de las características dietéticas para las que se observaron diferencias entre los grupos se incluyen también en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características sociodemográficas de la población de estudio dividida en dos grupos de exposición (altamente expuestos (AE) ($\leq 1,5$ km) y moderadamente expuestos (ME) ($> 1,5$ km)).

Características	ME ($> 1,5$ km) N=65		AE ($\leq 1,5$ km) N=65		Total N=130		p-valor
Distancia fuente/residencia (m)							
Media aritmética, DE	7294,68	5258,64	799,24	297,94	4046,96	4938,92	
Media geométrica	6212,08		747,87		2155,42		
Mediana, P ₉₅	6085,55	18782,14	743,19	1447,45	1770,40	17910,06	
Rango: mín., máx.	2040,80	33984,74	268,07	1500,00	268,07	33984,74	
Rango intercuartílico (P ₂₅ , P ₇₅)	4969,84	7254,11	594,43	946,25	728,56	6089,44	
Edad							
Media aritmética, DE	39,77	13,45	43,66	14,31	41,72	13,97	0,092**
Rango: mín., máx.	20	71	20	71	20	71	
Años de residencia							
Media aritmética, DE	11,62	12,42	18,85	13,96	15,23	13,65	<0,001**
Rango: mín., máx.	1	60	1	71	1	71	
Sexo (n, %)							0,553*
Femenino	46	70,8%	49	75,4%	95	100,0%	
Masculino	19	29,2%	16	24,6%	35	100,0%	
Nivel educativo (n, %)							0,005*
Educación primaria	3	4,6%	3	4,6%	6	4,6%	
Educación secundaria/FP medio	7	10,8%	15	23,1%	22	16,9%	
Bachillerato/FP superior	10	15,4%	20	30,8%	30	23,1%	
Universitario (Diplomatura)	8	12,3%	11	16,9%	19	14,6%	
Universitario (Grado o Licenciatura)	37	56,9%	16	24,6%	53	40,8%	
Situación laboral (n, %)							0,045*
Activo	54	83,1%	43	66,2%	97	74,6%	
Desempleado	1	1,5%	4	6,2%	5	3,8%	
Ama de casa	0		5	7,7%	5	3,8%	
Jubilado	7	10,8%	6	9,2%	13	10,0%	
Estudiante a tiempo completo	3	4,6%	7	10,8%	10	7,7%	
Hábito tabáquico (n, %)							0,498*
No fumador	42	64,6%	42	64,6%	84	64,6%	
Exfumador	9	13,8%	13	20,0%	22	16,9%	
Fumador	14	21,5%	10	15,4%	24	18,5%	
Consumo de alcohol							0,597*
Nunca	34	52,3%	37	56,9%	71	54,6%	
Ocasional	31	47,7%	28	43,1%	59	45,4%	
Media de etanol puro (n, %)							0,245*
0 g/semana	34	52,3%	37	56,9%	71	54,6%	
1-24 g/semana	11	16,9%	11	16,9%	22	16,9%	
25-74 g/semana	16	24,6%	17	26,2%	33	25,4%	
≥ 75 g/semana	4	6,2%	0	0,0%	4	3,1%	
Suplementos de Mn (n, %)							0,154*
No	63	96,9%	65	100,0%	128	98,5%	
Sí	2	3,1%	0	0,0%	2	1,5%	
Nueces ≥ 5/semana (n, %)							0,456*
No	57	87,7%	54	83,1%	111	85,4%	
Sí	8	12,3%	11	16,9%	19	14,6%	
Té ≥ 5/semana (n, %)							0,019*
No	59	90,8%	49	75,4%	108	83,1%	
Sí	6	9,2%	16	24,6%	22	16,9%	
Pescado azul ≥ 3/semana (n, %)							0,784*
No	58	89,2%	57	87,7%	115	88,5%	
Sí	7	10,8%	8	12,3%	15	11,5%	

*Test de X² (Chi-cuadrado).

**Test U de Mann Whitney.

3.3. Caracterización de la exposición a metal(oid)es mediante (bio)marcadores de corto plazo

3.3.1. Mediante muestreadores personales de PM

Las concentraciones bioaccesibles y no bioaccesibles de metales (Mn, Pb y Fe) asociadas a los dos tamaños de partícula, PM_{2,5} (fracción fina) y PM_{10-2,5} (fracción gruesa) por grupo de exposición y sexo se recogen en la Tabla 3.4. Asimismo, en la Figura 3.5 se muestra mediante un diagrama de cajas y bigotes la variabilidad de las concentraciones tanto bioaccesibles como no bioaccesibles para todos los metales medidos. Esta variabilidad puede explicarse por el diferente tiempo de permanencia en exteriores o interiores durante el muestreo personal (Haynes et al., 2012), las distancias respecto a la fuente principal (Hernández-Pellón et al., 2018; Mbengue et al., 2015), las condiciones meteorológicas (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019a) y los patrones de emisión (Davourie et al., 2017; Mbengue et al., 2015).

Los niveles de Mn bioaccesible en las dos fracciones de tamaño y los valores de Fe bioaccesible en la fracción gruesa fueron significativamente más altos en el grupo más expuesto ($p < 0,001$), en consonancia con la proximidad a la industria de aleaciones de Mn. Las concentraciones de Pb bioaccesibles en la fracción fina fueron menores en el grupo moderadamente expuesto, aunque sin alcanzar la significación estadística. Además, no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto al contenido de Fe no bioaccesible en la modalidad fina.

La Tabla 3.4 también muestra que el Mn se distribuyó por igual entre las modalidades gruesa y fina, tanto en la fracción bioaccesible como en la no bioaccesible. La contribución de la fracción fina al Mn total fue ligeramente mayor en el grupo moderadamente expuesto (relación PM_{2,5}/PM₁₀ de 0,63) que en el grupo altamente expuesto (relación PM_{2,5}/PM₁₀ de 0,52). En este sentido, Bowler et al. (2015) informaron de una media más baja de la relación PM_{2,5}/PM₁₀ modelada para el Mn (0,28) cerca de una planta de ferromanganeso en Marietta (Ohio, EE.UU.). En cualquier caso, la mayoría de los estudios sobre la distribución del tamaño de los contaminantes contenidos en el PM se basan principalmente en muestreos estacionarios (Du et al., 2018; Kastury et al., 2017; Wiseman y Zereini, 2014).

Tabla 3.4. Concentraciones bioaccesibles y no bioaccesibles de metales (Mn, Fe y Pb) asociadas a PM_{2,5} y PM_{10-2,5} por grupo de exposición (moderadamente expuestos (ME) y altamente expuestos (AE)), y sexo de los participantes.

Metal	ME				AE				p-valor*	Total			
	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅		N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅
Mn bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	65	14,61 (38,46)	5,62	53,99	65	107,62 (242,15)	45,91	288,3	<0,001	130	61,11 (178,90)	13,61	249,1
Mn no bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	65	4,02 (7,23)	1,26	24,24	65	19,62 (51,31)	8,19	74,54	<0,001	130	11,82 (37,33)	3,39	39,73
Mn total en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	65	18,63 (43,92)	7,86	73,44	65	127,24 (292,37)	53,49	344,1	<0,001	130	79,93 (215,26)	16,47	289,2
Mn bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	65	23,42 (40,46)	8,07	86,23	65	109,20 (178,30)	34,23	472,1	<0,001	130	66,31 (135,79)	17,05	315,5
Mn no bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	65	8,32 (17,27)	4,33	40,26	65	16,96 (22,85)	7,5	67,17	<0,001	130	12,64 (20,64)	5,80	61,23
Mn total en PM _{2,5} (ng/m ³)	65	31,74 (48,43)	12,78	157,0	65	126,16 (190,10)	44,58	503,7	<0,001	130	78,95 (146,07)	25,00	350,6
Mn total en PM ₁₀ (ng/m ³)	65	50,38 (81,23)	19,55	235,3	65	253,40 (440,67)	105,67	985,8	<0,001	130	151,89 (331,66)	43,87	577,2
Fe bioaccesible PM _{10-2,5} (ng/m ³)	65	36,69 (74,19)	18,80	96,07	65	72,63 (98,51)	41,30	302,10	<0,001	130	54,67 (88,72)	31,65	252,6
Fe no bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	65	95,74 (170,09)	60,20	322,0	65	119,89 (250,44)	69,30	368,36	0,104	130	107,82 (213,59)	65,05	326,3
Pb bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	65	10,28 (17,68)	4,50	33,09	65	15,46 (20,69)	6,80	56,55	0,065	130	12,87 (19,34)	5,25	50,09

Metal	Mujeres				Hombres				p-valor*
	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	
Mn bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	95	68,18 (204,49)	15,17	246,8	35	41,92 (72,82)	10,57	301,0	0,527
Mn no bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	95	12,73 (43,07)	3,40	42,13	35	9,36 (12,16)	2,62	39,72	0,862
Mn total en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	95	80,91 (246,81)	16,51	287,1	35	51,28 (82,10)	15,46	340,7	0,723
Mn bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	95	70,07 (147,06)	17,82	323,9	35	53,12 (100,09)	12,85	298,6	0,680
Mn no bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	95	14,02 (23,27)	5,73	66,41	35	8,91 (9,98)	6,61	33,28	0,858
Mn total en PM _{2,5} (ng/m ³)	95	84,08 (159,31)	25,26	355,6	35	65,03 (102,57)	20,02	308,1	0,937
Mn total en PM ₁₀ (ng/m ³)	95	165,00 (376,19)	42,13	608,9	35	116,31 (155,90)	51,53	548,9	0,927
Fe bioaccesible PM _{10-2,5} (ng/m ³)	95	62,66 (101,29)	36,30	281,10	35	32,96 (28,96)	26,10	111,26	0,112
Fe no bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	95	118,42 (244,32)	65,40	346,32	35	79,03 (82,99)	62,00	276,82	0,869
Pb bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	95	13,24 (21,10)	4,50	54,80	35	11,86 (13,71)	7,40	49,38	0,634

N = Número total de muestras

MA (DE) = Media Aritmética (Desviación Estándar)

P₉₅ = Percentil 95

*Test U de Mann Whitney.

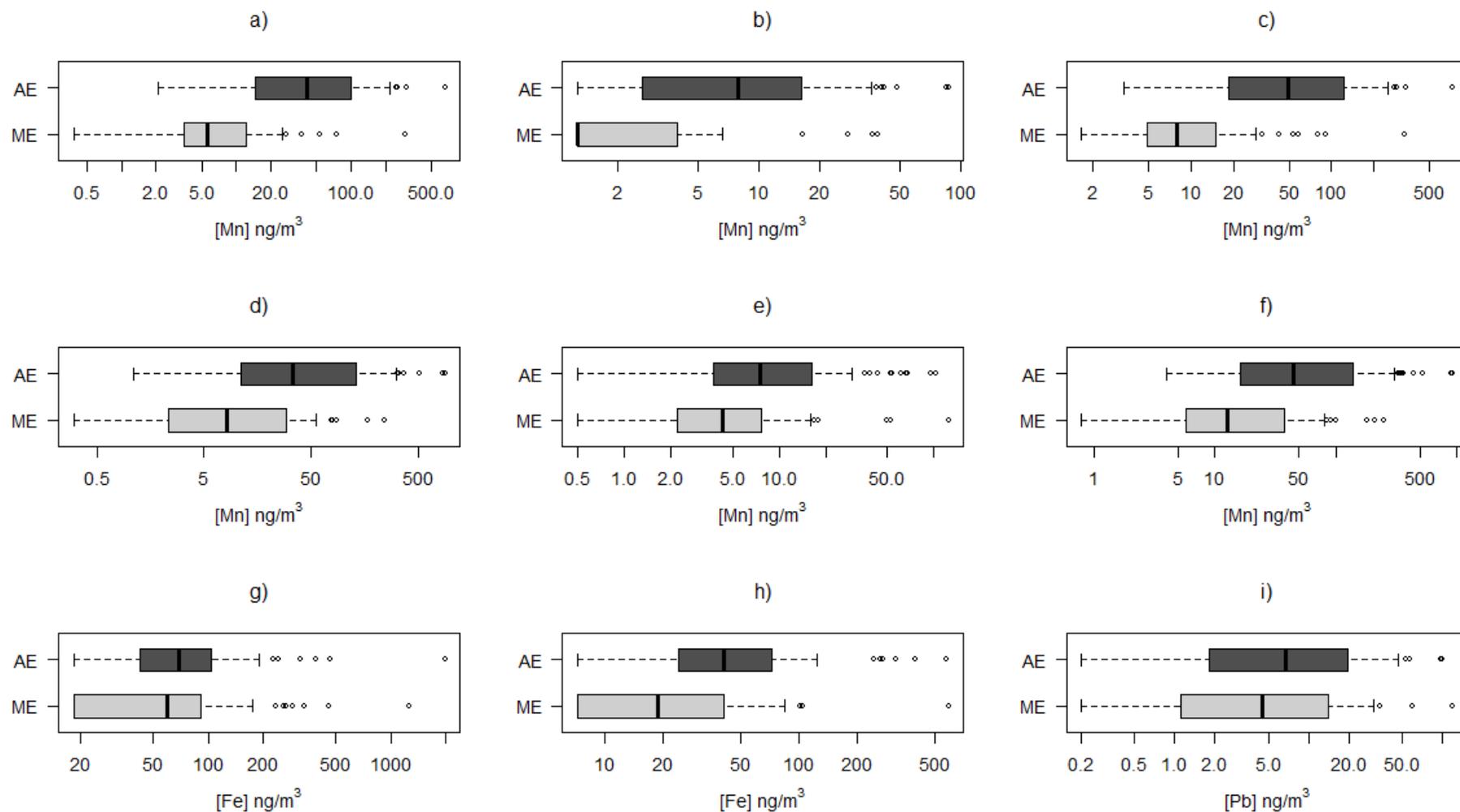


Figura 3.5. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de metales en los filtros procedentes del muestreo personal en función de la exposición: moderadamente expuestos (ME) frente a altamente expuestos (AE): a) Mn bioaccesible, PM_{10-2,5}; b) Mn no bioaccesible, PM_{10-2,5}; c) Mn total, PM_{10-2,5}; d) Mn bioaccesible, PM_{2,5}; e) Mn no bioaccesible, PM_{2,5}; f) Mn total, PM_{2,5}; g) Fe no bioaccesible, PM_{2,5}; h) Fe bioaccesible, PM_{10-2,5} e i) Pb bioaccesible, PM_{2,5}.

Pocos estudios han analizado la segregación por tamaño de partícula de los contaminantes contenidos en las muestras de PM recogidas mediante muestreadores personales. Para ejemplo, Rasmussen et al. (2018) caracterizaron las concentraciones de elementos en PM_{2,5} y PM_{10-2,5} en microambientes personales de Windsor (Ontario, Canadá), encontrando proporciones similares de PM_{2,5}/PM₁₀ para el Mn respecto al muestreo en interiores (0,62 frente a 0,63) y mucho mayor respecto al muestreo en exteriores (0,32). En las proximidades de las plantas de ferroaleaciones de Mn, las partículas gruesas portadoras de Mn se atribuyen principalmente a las emisiones fugitivas procedentes de las pilas de mineral, del apagado de las escorias, de la colada, y de la trituración y cribado de la ferroaleación (Davourie et al., 2017; Hernandez-Pellón et al., 2017). Estas partículas tienen una baja flotabilidad (Fulk et al., 2016), por lo que su concentración es mayor cerca de las plantas de ferroaleaciones de Mn; mientras que las partículas finas, que se atribuyen principalmente a procesos de condensación de vapores metálicos en las unidades de fundición (Hernandez-Pellón et al., 2017), son transportadas a mayores distancias.

La concentración total de Mn contenido en PM₁₀ se calculó sumando las concentraciones bioaccesible y no bioaccesible obtenidas en las fracciones fina y gruesa. La media aritmética para la población total de estudio fue de 151,9 ng/m³; superior en el grupo altamente expuesto (253,4 ng/m³), que es similar a la media anual de 231,8 ng/m³ medida en 2015 en Maliaño mediante un muestreador estacionario (donde reside la mayoría de los participantes altamente expuestos) (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019b). El valor más alto (3145,3 ng/m³) se midió en un participante que residía en esta zona y fue superior al valor máximo estacionario medido en una ubicación situada a 350 m de la fábrica de ferroaleaciones (2061,6 ng/m³ en 2015). En cualquier caso, en promedio, el valor total de Mn en el aire recomendado por la OMS (150 ng/m³) fue superado por la población residente en las cercanías de la fuente industrial de Mn.

En contraste con otros estudios que utilizan muestreadores personales, los niveles de Mn en este trabajo fueron mucho más altos (Graney et al., 2004; Pollitt et al., 2016), incluso superiores a los reportados en estudios realizados en áreas residenciales cercanas a fuentes industriales de Mn; por ejemplo, Lucchini et al. (2012) reportaron un valor medio de 49,5 ng/m³ en PM_{2,5} en una población del norte de Italia próxima a una planta de fabricación de ferroaleaciones de Mn, y Haynes et al. (2012) una media geométrica de 8,1 ng/m³ en PM₁₀ en Marietta (Ohio, EE. UU.), localidad que se encuentra a menos de 10 km de la principal fábrica de ferromanganeso en EE.UU. Sólo se notificaron niveles más altos de Mn en muestreos personales cerca de las minas de mineral de Mn en Molango (México), con una media de 420 ng/m³ en PM₁₀ (Solís-Vivanco et al., 2009).

El plomo se detectó principalmente en la fracción fina (el 88% y el 47% de las mediciones estaban por encima del LD para las fracciones bioaccesibles y no bioaccesibles respectivamente, como se muestra en la Tabla 2.5). La concentración media bioaccesible de Pb en la fracción fina (12,87 ng/m³) estuvo muy por debajo del valor límite anual en PM₁₀ establecido por la Directiva

2008/50/CE (500 ng/m³) (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008); así como los niveles de Pb en la fracción gruesa y en el PM₁₀ total, que también fueron inferiores al valor límite.

La bioaccesibilidad del Mn fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en el grupo altamente expuesto (media de 81,8% en fluido gástrico (PM_{10-2,5}) y de 77,1% en ALF (PM_{2,5})) respecto al grupo moderadamente expuesto (69,8% y 61,6%, respectivamente). Como se muestra en la Figura 3.6, la bioaccesibilidad del Mn asociada a las fracciones gruesa (fluido gástrico) y fina (ALF) aumentó con la correspondiente concentración total de Mn, que fue mayor para los participantes más expuestos. De forma similar, Hernández-Pellón et al. (2018) informaron de una disminución de la solubilidad del Mn en la solución de Gamble y ALF con la distancia a la misma planta de aleaciones de Mn en muestras de PM₁₀. Resultados similares también fueron reportados por Mbengue et al. (2015) respecto a la bioaccesibilidad de los metales en la solución de Gamble para las muestras de PM₁ influenciadas por actividades metalúrgicas. Bioaccesibilidades medias de Mn en PM_{2,5} ligeramente superiores al 60% en ALF fueron también obtenidas por Zhao et al. (2021) en un punto de muestreo industrial y otro urbano en la ciudad de Nanjing en China, encontrándose escasas diferencias entre ambas ubicaciones.

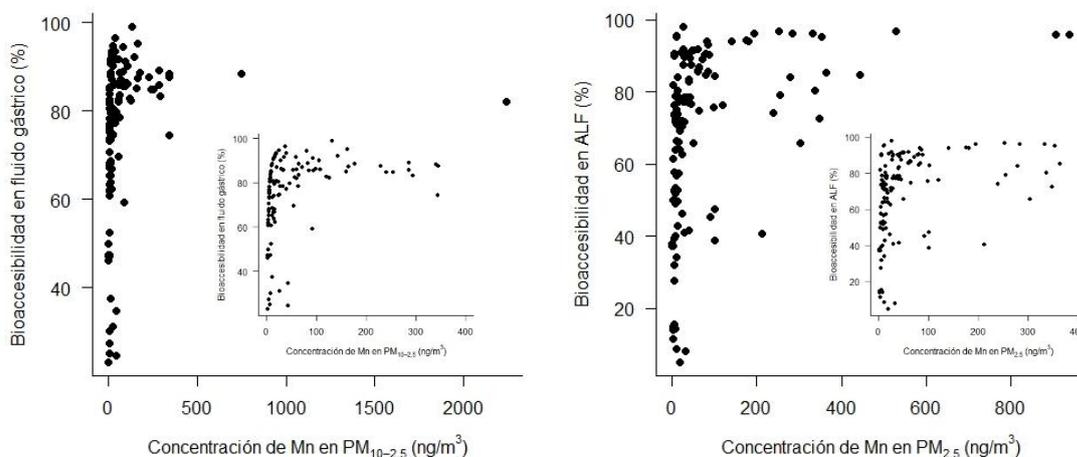


Figura 3.6. Variación de la bioaccesibilidad de Mn (%) en fluido gástrico (PM_{10-2,5}) y ALF (PM_{2,5}) respecto a la concentración total de Mn.

Estudios recientes han puesto de manifiesto el riesgo potencial para la salud asociado a la exposición ambiental al Mn en el aire, principalmente con las funciones cognitiva y motora (Fernández-Olmo et al., 2021; Lucchini et al., 2012). Aunque la mayoría de estos estudios se han realizado cerca de fuentes industriales de Mn, la concentración total en el aire reportada es menor que la obtenida en este estudio. Además, en estos estudios no se determinó la fracción bioaccesible. Por tanto, considerando que, de acuerdo con los resultados obtenidos, una mayor bioaccesibilidad del Mn (%) está relacionada con mayores concentraciones totales de Mn, las personas residentes en las proximidades de la industria de aleaciones de ferromanganeso están

expuestas a concentraciones más altas de Mn bioaccesible, suponiendo un mayor riesgo potencial para su salud. En este contexto, se debería investigar si el deterioro de la función cognitiva y motora presenta una mayor asociación con la concentración de Mn bioaccesible que con el contenido total de Mn.

Además, debería abrirse un debate sobre la idoneidad del valor de referencia anual de la OMS para el Mn, e incluso sobre la falta de un valor límite/umbral en la Unión Europea. Aunque algunos autores han señalado la necesidad de aumentar el valor guía de referencia de la OMS (150 ng/m³) y la concentración de referencia de la US EPA (50 ng/m³), dicho debate se ha centrado en la concentración total de Mn en el aire (Gentry et al., 2017; Winder et al., 2010). Sin embargo, su concentración bioaccesible, que puede reflejar mejor los riesgos derivados de la exposición al Mn en el aire, no había sido considerada en la bibliografía hasta ahora. Recientemente, un estudio del grupo de investigación realizado con los mismos participantes de este estudio transversal muestran una peor función motora evaluada con el test Grooved Pegboard en relación a la proximidad a la fuente aleaciones de Mn y a la concentración de Mn en PM_{2,5} bioaccesible (Ruiz-Azcona et al., 2021) así como peores resultados en diferentes test de función cognitiva en relación a la proximidad a dicha fuente de Mn y al Mn presente en las distintas fracciones de PM analizadas (Ruiz-Azcona et al., 2022).

Por otro lado, se evaluaron los coeficientes de correlación de Spearman entre los metales analizados en cada fracción (Tabla 3.5). En general, las correlaciones fueron más fuertes cuando se consideró la fracción bioaccesible, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,826 para el Mn bioaccesible en PM_{10-2,5} y PM_{2,5}. Además, se observaron coeficientes de correlación relativamente altos entre Pb y Mn bioaccesibles en PM_{2,5} ($\rho=0,682$) y entre Fe y Mn bioaccesibles en PM_{10-2,5} ($\rho=0,486$).

Asimismo, una vez calculadas las distancias ponderadas por el viento entre las residencias de cada uno de los voluntarios y la fuente industrial de Mn, de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 2.6, se determinaron los coeficientes de correlación entre los metales de cada fracción y la distancia ponderada, así como con la edad (Tabla 3.6). Pudo verse que el Mn ligado a PM mostró una correlación negativa significativa para todas las fracciones analizadas con respecto a la distancia, al igual que el Fe en PM_{10-2,5}. Por tanto, como era de esperar, los sujetos más expuestos fueron aquellos que residen más cerca de la fábrica de aleaciones de Mn (es decir, el municipio de Maliaño).

Las diferencias de medias entre alta y moderadamente expuestos se mantuvieron estadísticamente significativas tras ajustar por los factores de confusión potenciales (edad, sexo, nivel de estudios, situación laboral, tabaquismo y hábitos dietéticos) con la excepción de Mn no bioaccesible en PM_{2,5} y Fe bioaccesible en PM_{2,5} (Tabla 3.7). Ambos perdieron significación en los modelos

multivariantes de regresión lineal con la inclusión de estos factores de confusión. También se observó una correlación negativa pero no significativa entre la distancia y los niveles de Pb bioaccesibles. En cuanto a las correlaciones de los niveles de metales en los filtros de muestreadores personales y la edad de los participantes, no se vieron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en esta sección muestran la importancia de la vía inhalatoria de exposición al Mn procedente de las emisiones de la industria del ferromanganeso, de acuerdo con estudios previos de modelización y muestreo estacionario (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019b; Otero-Pregigueiro et al., 2018), aportando como mejora en este trabajo la monitorización precisa de la exposición de 24 horas durante la cual cada voluntario llevaba el muestreador personal.

Tabla 3.5. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre los metales en filtros. B (Bioaccesible), NB (No Bioaccesible).

	Mn. PM _{10-2.5} . B. (ng/m ³)	Mn. PM _{10-2.5} . NB. (ng/m ³)	Mn. PM _{10-2.5} . Total (ng/m ³)	Mn. PM _{2.5} . B. (ng/m ³)	Mn. PM _{2.5} . NB (ng/m ³)	Mn. PM _{2.5} . Total (ng/m ³)	Mn. PM ₁₀ (ng/m ³)	Fe. PM _{10-2.5} . B. (ng/m ³)	Fe. PM _{2.5} . NB (ng/m ³)	Pb. PM _{2.5} . B (ng/m ³)
Mn. PM _{10-2.5} . B. (ng/m ³)	1									
Mn. PM _{10-2.5} . NB. (ng/m ³)	0,750 (<0,001)	1								
Mn. PM _{10-2.5} . Total (ng/m ³)	0,983 (<0,001)	0,831 (<0,001)	1							
Mn. PM _{2.5} . B. (ng/m ³)	0,826 (<0,001)	0,596 (<0,001)	0,794 (<0,001)	1						
Mn. PM _{2.5} . NB (ng/m ³)	0,631 (<0,001)	0,494 (<0,001)	0,621 (<0,001)	0,703 (<0,001)	1					
Mn. PM _{2.5} . Total (ng/m ³)	0,813 (<0,001)	0,608 (<0,001)	0,789 (<0,001)	0,969 (<0,001)	0,829 (<0,001)	1				
Mn. PM ₁₀ (ng/m ³)	0,920 (<0,001)	0,737 (<0,001)	0,916 (<0,001)	0,943 (<0,001)	0,776 (<0,001)	0,957 (<0,001)	1			
Fe. PM _{10-2.5} . B. (ng/m ³)	0,486 (<0,001)	0,325 (<0,001)	0,476 (<0,001)	0,294 (0,001)	0,245 (0,005)	0,290 (0,001)	0,389 (<0,001)	1		
Fe. PM _{2.5} . NB (ng/m ³)	0,220 (0,012)	0,128 (0,146)	0,222 (0,011)	0,222 (0,011)	0,433 (<0,001)	0,279 (0,001)	0,277 (0,001)	0,161 (0,067)	1	
Pb. PM _{2.5} . B (ng/m ³)	0,533 (<0,001)	0,397 (<0,001)	0,512 (<0,001)	0,682 (<0,001)	0,564 (<0,001)	0,678 (<0,001)	0,635 (<0,001)	0,210 (0,016)	0,145 (0,100)	1

Tabla 3.6. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de metales en filtros, la distancia ponderada con el viento, y la edad de los participantes.

Metal	Distancia ponderada		Edad	
	rho	p-valor	rho	p-valor
Mn bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	-0,609	<0,001	0,102	0,248
Mn no bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	-0,440	<0,001	0,080	0,364
Mn total en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	-0,612	<0,001	0,108	0,223
Mn bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	-0,449	<0,001	-0,069	0,439
Mn no bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	-0,319	0,001	-0,001	0,988
Mn total en PM _{2,5} (ng/m ³)	-0,439	<0,001	-0,040	0,651
Mn total en PM ₁₀ (ng/m ³)	-0,549	<0,001	0,027	0,758
Fe bioaccesible en PM _{10-2,5} (ng/m ³)	-0,343	<0,001	0,070	0,431
Fe no bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	-0,150	0,114	0,037	0,678
Pb bioaccesible en PM _{2,5} (ng/m ³)	-0,179	0,057	-0,062	0,481

Tabla 3.7. Diferencias de medias crudas y ajustadas entre los niveles de metales en filtros en función de la distancia a la planta de ferroaleaciones (altamente expuestos (AE), moderadamente expuestos (ME)).

Metal	Distancia a la fuente ($\leq 1,5$ vs $>1,5$ km)											
	DM cruda	IC 95%	<i>p</i> -valor	DMa ₁	IC 95%	<i>p</i> -valor	DMa ₂	IC 95%	<i>p</i> -valor			
Mn en PM_{10-2,5}												
Bioaccesible	93,00	32,83	153,18	0,003	82,42	18,99	145,85	0,011	89,88	22,84	156,92	0,009
No bioaccesible	15,60	2,88	28,31	0,017	14,67	1,21	28,14	0,033	16,71	2,49	30,93	0,022
Total	108,60	36,04	181,16	0,004	97,09	20,53	173,65	0,013	106,59	25,67	187,51	0,010
Mn en PM_{2,5}												
Bioaccesible	85,78	40,91	130,65	<0,001	88,22	41,41	135,03	<0,001	90,03	41,92	138,13	<0,001
No bioaccesible	8,64	1,61	15,67	0,016	6,30	-0,95	13,54	0,088	4,38	-2,57	11,34	0,214
Total	94,42	46,28	142,56	<0,001	94,52	44,34	144,69	<0,001	106,59	25,67	187,51	0,010
Mn en PM₁₀	203,02	93,05	312,99	<0,001	191,61	75,67	307,54	0,001	201,00	78,58	323,42	0,001
Fe en PM_{10-2,5}												
Bioaccesible	35,94	5,65	66,23	0,020	28,94	-2,63	60,50	0,072	30,63	-2,27	63,53	0,068
Fe en PM_{2,5}												
No bioaccesible	24,15	-50,15	98,45	0,521	18,38	-60,02	96,78	0,643	-8,30	-89,28	72,68	0,840
Pb en PM_{2,5}												
Bioaccesible	5,19	-1,49	11,87	0,127	3,75	-3,27	10,77	0,293	3,68	-3,56	10,91	0,317

DM = Diferencia de medias.

DMa₁ = DM ajustada por edad, sexo y nivel de estudios.

DMa₂ = DM ajustada por edad, sexo, nivel de estudios, situación laboral, tabaquismo y hábitos dietéticos.

Una DM positiva indica niveles más altos en los participantes que viven a menor distancia de la planta de ferroaleaciones.

3.3.2. Mediante sangre total

Los niveles de los metal(oid)es estudiados en sangre se muestran en la Figura 3.7 en forma de diagrama de cajas y bigotes, así como en la Tabla 3.8, donde se exponen los resultados agrupados por grupo de exposición (moderada/altamente expuestos), y por sexo de los participantes.

En cuanto al Mn, el metal que se encuentra en mayores concentraciones en el aire local, existe una falta de consenso para la elección de un biomarcador adecuado para el mismo, dificultado además por su papel como micronutriente (Aschner y Aschner, 2005; Hassani et al., 2016; Jursa et al., 2018). Nuestros resultados sugieren que la sangre total no es un buen biomarcador de la exposición al Mn en el aire a corto plazo (Tabla 3.8), siendo incapaz de diferenciar entre los grupos alta y moderadamente expuestos (medianas de 9,16 $\mu\text{g/L}$ frente a 9,68 $\mu\text{g/L}$, $p=0,865$), incluso después de ajustar por posibles factores de confusión (Tabla 3.9). Esta ausencia de correlación entre valores ambientales y sanguíneos para el Mn ya fue descrita por Mazarrasa-Mowinckel (1983) en un estudio realizado sobre trabajadores de la planta de ferroaleaciones de Mn descrita en esta Tesis Doctoral. Estos resultados pueden explicarse porque los niveles de Mn están estrechamente regulados en esta matriz debido a su regulación homeostática, siendo el tiempo medio de residencia del Mn en sangre mucho más corto que en otros tejidos y compartimentos celulares, en paralelo a su eliminación por el hígado y excreción en la bilis y la orina (Gurol et al., 2022; Klaassen, 1974; Malecki et al., 1996; Zheng et al., 2011).

Respecto a los otros metal(oid)es estudiados, únicamente se observaron diferencias significativas entre las medianas de As, con la población más expuesta mostrando niveles estadísticamente significativos más altos (4,24 $\mu\text{g/L}$ vs. 2,81 $\mu\text{g/L}$, $p=0,002$) (Tabla 3.8). El origen del As en esta zona necesita más investigación, ya que, aunque se midió en estudios anteriores tanto en muestras de PM_{10} recogidas mediante muestreadores estacionarios (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019b) como en el suelo (Boente et al., 2020) cerca de la planta de ferromanganeso, los niveles de As en las fracciones bioaccesible y no bioaccesible de los filtros personales recogidos en el presente estudio estaban por debajo del LD, por lo que no se descartan otras fuentes y vías de exposición. La variabilidad de concentraciones de As en sangre total y la presencia de valores atípicos, especialmente en el grupo más expuesto, puede verse con más detalle en el diagrama de cajas y bigotes de la Figura 3.7.

Por lo que respecta al Pb, la sangre se ha considerado un biomarcador fiable de la exposición al mismo (Barbosa et al., 2005). Sin embargo, aunque los niveles de Pb en sangre total fueron mayores en el grupo altamente expuesto (Tabla 3.8), la diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,106$). Este estudio también confirmó que los niveles actuales de Pb en sangre son mucho más bajos que los de décadas anteriores, incluso en zonas industriales como la bahía de Santander, debido a las estrictas regulaciones dadas a nivel mundial. Por ejemplo, la Comisión

HBM derivó RVs de 70 y 90 $\mu\text{g/L}$ para mujeres y hombres respectivamente en el periodo 1997-1999 (Schulz et al., 2011), mucho más altos que el RV de 24,82 $\mu\text{g/L}$ medido en este trabajo, siendo este muy similar al del informe elaborado por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. (US HHS, por sus siglas en inglés) (US HHS, 2018), con un P_{95} de 23,9 $\mu\text{g/L}$ en 2015/2016. Otros trabajos recientes mostraron niveles similares, como los publicados por Saravanabhavan et al. (2017) en un estudio de biomonitorización canadiense, con un P_{95} de 33 $\mu\text{g/L}$, o por Ferreira et al. (2019) en una población no expuesta en Brasil ($P_{95}=22,5$ $\mu\text{g/L}$). En España, un estudio nacional de biomonitorización realizado hace unos años, entre 2009 y 2010 (BIOAMBIENT), informó de un valor P_{95} de 56,8 $\mu\text{g/L}$ Cañas et al. (2014), evidenciando este descenso progresivo de los niveles de Pb en sangre.

Respecto al sexo de los participantes, se observaron diferencias significativas para Fe ($p=0,039$), Cu ($p=0,006$) y Pb ($p=0,001$), con mayores concentraciones de Fe y Pb en los hombres (492650 $\mu\text{g/L}$ frente a 466302 $\mu\text{g/L}$ y 11,40 $\mu\text{g/L}$ frente a 8,49 $\mu\text{g/L}$ respectivamente), frente a mayores niveles de Cu en las mujeres (824,5 $\mu\text{g/L}$ frente a 716,4 $\mu\text{g/L}$) (Tabla 3.8).

Estas diferencias están en consonancia con las notificadas en estudios anteriores (Bocca et al., 2011; Coelho et al., 2014; Saravanabhavan et al., 2017; Stojsavljević et al., 2019). Las mayores concentraciones de Pb en sangre total encontradas en los hombres coinciden con las reportadas por Batárióvá et al. (2006), Coelho et al. (2014), Schulz et al. (2011), Stojsavljević et al., (2019) y Zhang et al. (2015). Además, los mayores niveles de Cu en sangre en las mujeres están de acuerdo con Bocca et al. (2011) y Zeng et al. (2019), y pueden deberse a que la síntesis de ceruloplasmina inducida por los estrógenos en el hígado puede conducir a un aumento de dichos niveles (Martín-Lagos et al., 1998; Prasad et al., 2014). Por otro lado, no se han encontrado diferencias significativas por sexo en los niveles de Mn y As en sangre, de acuerdo con lo reportado por Freire et al. (2015), Haynes et al. (2010), Nisse et al. (2017), Stojsavljević et al. (2019) y Zeng et al. (2019), aunque, al contrario que en este trabajo, Zeng et al. (2019) sí informan de niveles más altos de Zn, Fe y As en la sangre total de los hombres.

Los valores de biomonitorización en sangre obtenidos en este trabajo ($N=130$) están dentro del rango o son ligeramente inferiores a los reportados en la literatura con la excepción del As. Para este metaloide, se midieron algunos valores atípicos, correspondientes a algunos participantes que viven en las cercanías de la principal fuente de metales en Maliaño. Es inusual encontrar valores de As en sangre total por encima de 15 $\mu\text{g/L}$, aunque existen estudios previos que reportan niveles similares a nuestros valores anómalos, como los de Tratnik et al. (2019) (máximo de As en mujeres de 28,9 $\mu\text{g/L}$ y en hombres de 22,4 $\mu\text{g/L}$), Freire et al. (2015) (máximo en mujeres de 26,28 $\mu\text{g/L}$ y en hombres de 30,75 $\mu\text{g/L}$), Henríquez-Hernández et al. (2018) (máximo de 29,12 $\mu\text{g/L}$ en población de 20-40 años en Canarias (España)), y Kim et al. (2017) (máximo de 59,8 $\mu\text{g/L}$ en mujeres y 53,1 $\mu\text{g/L}$ en hombres).

Tabla 3.8. Concentraciones de metal(oid)es en sangre total por grupo de exposición (moderadamente expuestos (ME) y altamente expuestos (AE)), y sexo de los participantes.

Metal(oid)e	ME				AE				<i>p</i> -valor*	Total			
	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)		N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)
Mn (µg/L)	65	9,86 (3,11)	9,68	16,63 (15,88-17,39)	65	10,04 (3,65)	9,16	16,13 (15,24-17,02)	0,865	130	9,95 (3,38)	9,58	16,01 (15,43-16,59)
Fe (µg/L)	65	494242 (75732)	480592	663957 (645547-682369)	65	487082 (76054)	468264	634328 (615839-652817)	0,620	130	490662 (75684)	478263	654062 (641052-667072)
Cu (µg/L)	65	859,4 (220,8)	800,1	1399,5 (1345,9-1453,2)	65	851,6 (249,0)	799,5	1368,4 (1307,9-1429,0)	0,604	130	855,5 (234,4)	799,8	1368,3 (1328,0-1408,6)
Zn (µg/L)	65	6127 (2131)	5748	9959 (9441-10477)	65	6059 (1513)	5744	9450 (9083-9818)	0,760	130	6093 (1841)	5746	9964 (9347-9980)
As (µg/L)	65	3,38 (3,31)	2,81	8,79 (7,99-9,60)	65	6,17 (6,47)	4,24	23,69 (22,11-25,26)	0,002	130	4,77 (5,31)	3,06	18,90 (17,98-19,81)
Pb (µg/L)	65	10,41 (7,27)	8,71	23,19 (21,42-24,96)	65	11,65 (6,70)	9,42	26,22 (24,59-27,85)	0,106	130	11,03 (6,99)	9,13	24,82 (23,62-26,02)

Metal(oid)e	Mujeres				Hombres				<i>p</i> -valor*
	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	
Mn (µg/L)	95	10,04 (3,14)	9,76	15,89 (15,26-16,53)	35	9,71 (4,01)	9,01	18,51 (17,18-19,84)	0,375
Fe (µg/L)	95	485327 (81231)	466302	668017 (651682-684351)	35	505143 (56523)	492650	633413 (614687-652139)	0,039
Cu (µg/L)	95	886,9 (248,1)	824,5	1425,7 (1375,8-1475,6)	35	770,2 (167,7)	716,4	1142,9 (1087,4-1198,5)	0,006
Zn (µg/L)	95	6071 (1897)	5799	9538 (9157-9920)	35	6150 (1705)	5596	10187 (9622-10752)	0,923
As (µg/L)	95	4,68 (5,36)	3,06	18,38 (17,30-19,45)	35	5,02 (5,26)	3,04	21,63 (19,89-23,37)	0,797
Pb (µg/L)	95	9,74 (5,52)	8,49	19,52 (18,41-20,63)	35	14,53 (9,17)	11,40	40,24 (37,20-43,27)	0,001

N = Número total de muestras

MA (DE) = Media Aritmética (Desviación Estándar)

RV (IC 95%) = Valor de Referencia (Intervalo de Confianza del 95%)

*Test U de Mann Whitney.

Tabla 3.9. Diferencias de medias crudas y ajustadas entre los niveles de metal(oid)es en sangre total en función de la distancia a la planta de ferroaleaciones (altamente expuestos (AE), moderadamente expuestos (ME)).

Metal(oide)	Distancia a la fuente ($\leq 1,5$ vs $>1,5$ km)											
	DM cruda	IC 95%		<i>p</i> -valor	DMa ₁	IC 95%		<i>p</i> -valor	DMa ₂	IC 95%		<i>p</i> -valor
Mn (µg/L)	0,18	-1,00	1,36	0,759	0,52	-0,71	1,75	0,403	0,42	-0,85	1,70	0,513
Fe (µg/L)	-7159,30	-33500,51	19181,92	0,592	-1212,46	-28783,72	26358,79	0,931	7210,15	-21596,27	36016,57	0,621
Cu (µg/L)	-7,86	-89,54	73,82	0,849	6,10	-76,71	88,91	0,884	-13,78	-95,38	67,82	0,739
Zn (µg/L)	-67,65	-709,11	573,81	0,835	-74,33	-750,22	601,56	0,828	24,75	-676,75	726,25	0,944
As (µg/L)	2,79	1,01	4,58	0,002	2,24	0,48	4,01	0,013	2,05	0,22	3,88	0,028
Pb (µg/L)	1,24	-1,19	3,67	0,314	0,63	-1,58	2,84	0,573	0,75	-1,45	2,94	0,502

DM = Diferencia de medias.

DMa₁ = DM ajustada por edad, sexo y nivel de estudios.

DMa₂ = DM ajustada por edad, sexo, nivel de estudios, situación laboral, tabaquismo y hábitos dietéticos.

Una DM positiva indica niveles más altos en los participantes que viven a menor distancia de la planta de ferroaleaciones.

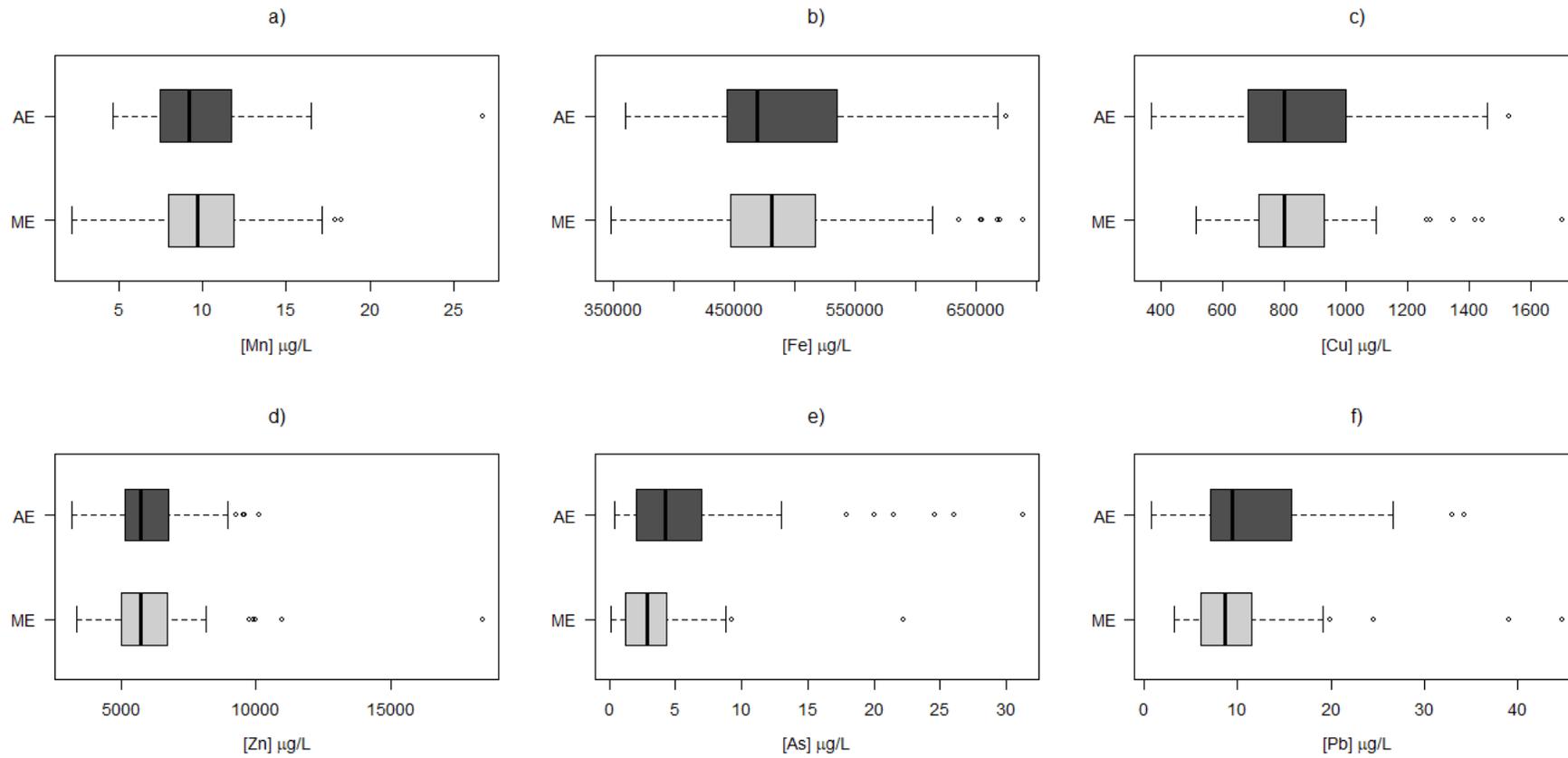


Figura 3.7. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de metal(oid)es en sangre total en función de la exposición: moderadamente expuestos (ME) frente a altamente expuestos (AE): a) Mn; b) Fe; c) Cu; d) Zn; e) As y f) Pb.

En el caso del Mn, la mediana (9,58 µg/L) fue ligeramente superior a la encontrada en EE.UU. en el Cuarto Informe Nacional sobre Exposición Humana a Productos Químicos Ambientales, 9,52 µg/L en 2015/2016 a partir de una muestra de 4987 participantes (US HHS, 2018). Los valores más altos de Mn en sangre total se correspondían con algunos participantes que vivían cerca de la planta de aleaciones de Mn, pero su máximo (26,76 µg/L) estaba claramente por debajo de algunos valores reportados cerca de fuentes industriales de Mn como los reportados por Santos-Burgoa et al. (2001), que alcanzaron un máximo de 88 µg/L cerca de minas de mineral de Mn en México.

Por otro lado, se comprobaron las correlaciones de Spearman entre los metal(oid)es analizados en esta matriz, encontrando correlaciones positivas significativas entre Mn/Fe ($\rho=0,191$, $p=0,030$), Fe/Zn ($\rho=0,283$, $p=0,001$), Cu/Zn ($\rho=0,180$, $p=0,040$) y As/Pb ($\rho=0,443$, $p<0,001$) (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre los metal(oid)es analizados en sangre total.

	Mn (µg/L)	Fe (µg/L)	Cu (µg/L)	Zn (µg/L)	As (µg/L)	Pb (µg/L)
Mn (µg/L)	1					
Fe (µg/L)	0,191 (0,030)	1				
Cu (µg/L)	0,104 (0,240)	-0,008 (0,926)	1			
Zn (µg/L)	0,163 (0,064)	0,283 (0,001)	0,180 (0,040)	1		
As (µg/L)	-0,115 (0,192)	-0,057 (0,519)	0,093 (0,293)	0,071 (0,421)	1	
Pb (µg/L)	0,027 (0,759)	0,127 (0,149)	-0,036 (0,681)	0,101 (0,255)	0,443 (<0,001)	1

El análisis de la correlación con la distancia a la fuente apoya que la sangre total no es el mejor biomarcador para determinar la exposición ambiental al Mn con fines epidemiológicos, ya que no mostró correlaciones significativas con la distancia (Tabla 3.11). Sí se encontró una correlación negativa significativa del As en sangre total con la distancia ($\rho=-0,239$, $p=0,011$), aunque no es posible afirmar que la inhalación fuera la principal vía de exposición debido a que sus niveles en los filtros de PM estaban por debajo del LD.

En cuando a la edad de los participantes, hubo una correlación positiva significativa de As y Pb ($\rho=0,367$, $p<0,001$ y $\rho=0,451$, $p<0,001$ respectivamente), y una correlación negativa significativa de Cu ($\rho=-0,239$, $p=0,006$), teniendo los voluntarios más jóvenes concentraciones más altas.

Tabla 3.11. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de metal(oid)es en sangre total, la distancia ponderada con el viento, y la edad de los participantes.

Metal(oide)	Distancia ponderada		Edad	
	ρ	<i>p</i> -valor	ρ	<i>p</i> -valor
Mn (µg/L)	0,055	0,563	-0,158	0,073
Fe (µg/L)	0,065	0,495	-0,025	0,777
Cu (µg/L)	0,152	0,109	-0,239	0,006
Zn (µg/L)	0,028	0,766	0,049	0,584
As (µg/L)	-0,239	0,011	0,367	<0,001
Pb (µg/L)	-0,063	0,506	0,451	<0,001

3.4. Caracterización de la exposición a metal(oid)es mediante biomarcadores de largo plazo

3.4.1. Mediante pelo del cuero cabelludo

Los niveles de los metales estudiados en pelo del cuero cabelludo, se muestran en la Figura 3.8 en forma de diagrama de cajas y bigotes, así como en la Tabla 3.12, donde se exponen los resultados agrupados por grupo de exposición (moderada/altamente expuestos), y por sexo de los participantes.

En cuanto al nivel de exposición, únicamente se observaron diferencias significativas de las medianas para Mn y Cu ($p=0,008$ y $0,001$, respectivamente) (Tabla 3.12), siendo la concentración de Mn más elevada para el grupo altamente expuesto, al contrario de lo que ocurre en el caso del Cu. Estas diferencias también quedan reflejadas en la Figura 3.8. La diferencia de medias se mantuvo para Mn tras ajustar por los potenciales factores de confusión. Sin embargo, para el Cu la diferencia entre ambos grupos perdió significación estadística (Tabla 3.13).

Considerando las diferencias entre sexos, estas fueron significativas para Mn ($p=0,008$), Cu ($p=0,021$), Zn ($p=0,009$), Cd ($p=0,020$) y Pb ($p=0,007$) (Tabla 3.12), con concentraciones más altas en los hombres para todos los metales excepto el Cu (10639 ng/g vs. 8450 ng/g). Viana et al. (2014) también observaron niveles más altos de Mn en el pelo de los hombres en un escenario similar, aunque la significación que reportaron fue limitada. Sin embargo, otros estudios bibliográficos no informaron de diferencias significativas en los niveles de Mn en el pelo en función del sexo (Haynes et al., 2010; Menezes-Filho et al., 2009b; Riojas-Rodríguez et al., 2010).

Comparando con la bibliografía, los valores obtenidos en nuestro estudio se encuentran casi siempre muy por debajo de los documentados, excepto para Zn y Cu, que están dentro del rango de otros estudios. Esto puede deberse a que nuestro protocolo de limpieza es mucho más exhaustivo que la mayoría de los utilizados por otros autores, lo que conduce a una completa eliminación de la contaminación exógena. La influencia del protocolo de limpieza ha sido tratado por Eastman et al. (2013). Nuestros rangos de concentraciones en pelo se encuentran en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por Butler et al. (2019), quienes utilizaron el mismo protocolo de limpieza previamente reportado por Eastman et al. (2013). Por ejemplo, para Mn, Cu y Pb obtuvieron medianas de 0,08, 9,57 y 0,17 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, en comparación con las medianas obtenidas en el presente estudio de 0,19, 9,79 y 0,15 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Sin embargo, los estudios en los que se utilizó un protocolo de limpieza menos exhaustivo mostraron niveles de Mn en el cabello mucho más altos (por ejemplo, 6,9-31,3 $\mu\text{g/g}$ en población altamente expuesta a Mn en aire ambiente en Menezes-Filho et al. (2009), 12 $\mu\text{g/g}$ en Mohmand et al. (2015), y 9,7 $\mu\text{g/g}$ para los hombres y 4,4 $\mu\text{g/g}$ para las mujeres en Viana et al. (2014)).

Tabla 3.12. Concentraciones de metales en pelo por grupo de exposición (moderadamente expuestos (ME) y altamente expuestos (AE)), y sexo de los participantes.

Metal	ME				AE				p-valor*	Total			
	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)		N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)
Mn (ng/g)	61	229,9 (320,0)	132,7	646,4 (566,1-726,7)	61	280,4 (232,2)	231,6	773,4 (715,1-831,7)	0,008	122	255,2 (279,6)	185,1	719,0 (669,3-768,6)
Fe (ng/g)	61	14963 (30859)	7307	51451 (43707-59195)	61	12886 (32918)	6476	23676 (15416-31937)	0,065	122	13925 (31790)	6823	45887 (40246-51528)
Cu (ng/g)	61	15457 (15807)	11162	44681 (40714-48648)	61	10745 (8928)	8450	27872 (25632-30113)	0,001	122	13101 (13001)	9787	35516 (33209-37823)
Zn (ng/g)	61	129236 (68346)	122757	207162 (190011-224313)	61	137271 (55314)	139094	222481 (208600-236362)	0,071	122	133253 (62046)	130098	218907 (207897-229917)
Cd (ng/g)	61	14,33 (20,41)	7,47	52,65 (47,53-57,77)	61	12,52 (23,52)	7,77	46,92 (41,08-52,75)	0,383	122	13,42 (21,81)	7,57	48,09 (44,22-51,96)
Pb (ng/g)	61	312,1 (338,2)	176,6	964,5 (879,6-1049,3)	61	181,4 (139,1)	145,7	499,6 (464,6-534,5)	0,088	122	246,7 (265,7)	148,2	861,1 (813,9-908,2)

Metal	Mujeres				Hombres				p-valor*
	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	
Mn (ng/g)	93	220,5 (205,4)	168,3	721,7 (680,0-763,5)	29	366,3 (427,2)	295,9	1550,5 (1395,1-1706,0)	0,008
Fe (ng/g)	93	9997 (15188)	6728	30010 (26923-33096)	29	26519 (58257)	8615	233860 (212657-255063)	0,094
Cu (ng/g)	93	14175 (14387)	10639	40706 (37782-43630)	29	9658 (5850)	8450	26932 (24262-28521)	0,021
Zn (ng/g)	93	123641 (47488)	124375	199111 (189460-208763)	29	164080 (89082)	150307	434800 (402378-467222)	0,009
Cd (ng/g)	93	12,52 (23,47)	6,74	37,21 (32,44-41,98)	29	16,31 (15,31)	10,98	54,75 (49,18-60,32)	0,020
Pb (ng/g)	93	210,9 (214,6)	139,0	669,5 (625,9-713,1)	29	361,5 (368,7)	234,0	1387,2 (1253,0-1521,4)	0,007

N = Número total de muestras

MA (DE) = Media Aritmética (Desviación Estándar)

RV (IC 95%) = Valor de Referencia (Intervalo de Confianza del 95%)

*Test U de Mann Whitney.

Tabla 3.13. Diferencias de medias crudas y ajustadas entre los niveles de metales en pelo en función de la distancia a la planta de ferroaleaciones (altamente expuestos (AE), moderadamente expuestos (ME)).

Metal	Distancia a la fuente ($\leq 1,5$ vs $>1,5$ km)											
	DM cruda	IC 95%		<i>p</i> -valor	DMA ₁	IC 95%		<i>p</i> -valor	DMA ₂	IC 95%		<i>p</i> -valor
Mn (ng/g)	299,76	-207,48	806,99	0,244	311,02	-209,23	831,27	0,239	371,24	-177,56	920,03	0,183
Fe (ng/g)	-1574,27	-12962,60	9814,06	0,785	1372,38	-10245,03	12989,80	0,815	1520,24	-10804,21	13844,70	0,807
Cu (ng/g)	-4732,05	-9296,41	-167,70	0,042	-4034,22	-8700,45	632,02	0,090	-3422,19	-8374,47	1530,09	0,174
Zn (ng/g)	7099,71	-15084,49	29283,91	0,528	12442,24	-9882,76	34767,23	0,272	15850,70	-3814,92	35516,33	0,113
Cd (ng/g)	-1,70	-9,48	6,08	0,666	-1,74	-9,91	6,43	0,674	-0,66	-9,27	7,94	0,879
Pb (ng/g)	-64,09	-225,73	97,55	0,434	-44,34	-208,08	119,39	0,593	-25,24	-196,43	145,95	0,771

DM = Diferencia de medias.

DMA₁ = DM ajustada por edad, sexo y nivel de estudios.

DMA₂ = DM ajustada por edad, sexo, nivel de estudios, situación laboral, tabaquismo y hábitos dietéticos.

Una DM positiva indica niveles más altos en los participantes que viven a menor distancia de la planta de ferroaleaciones.

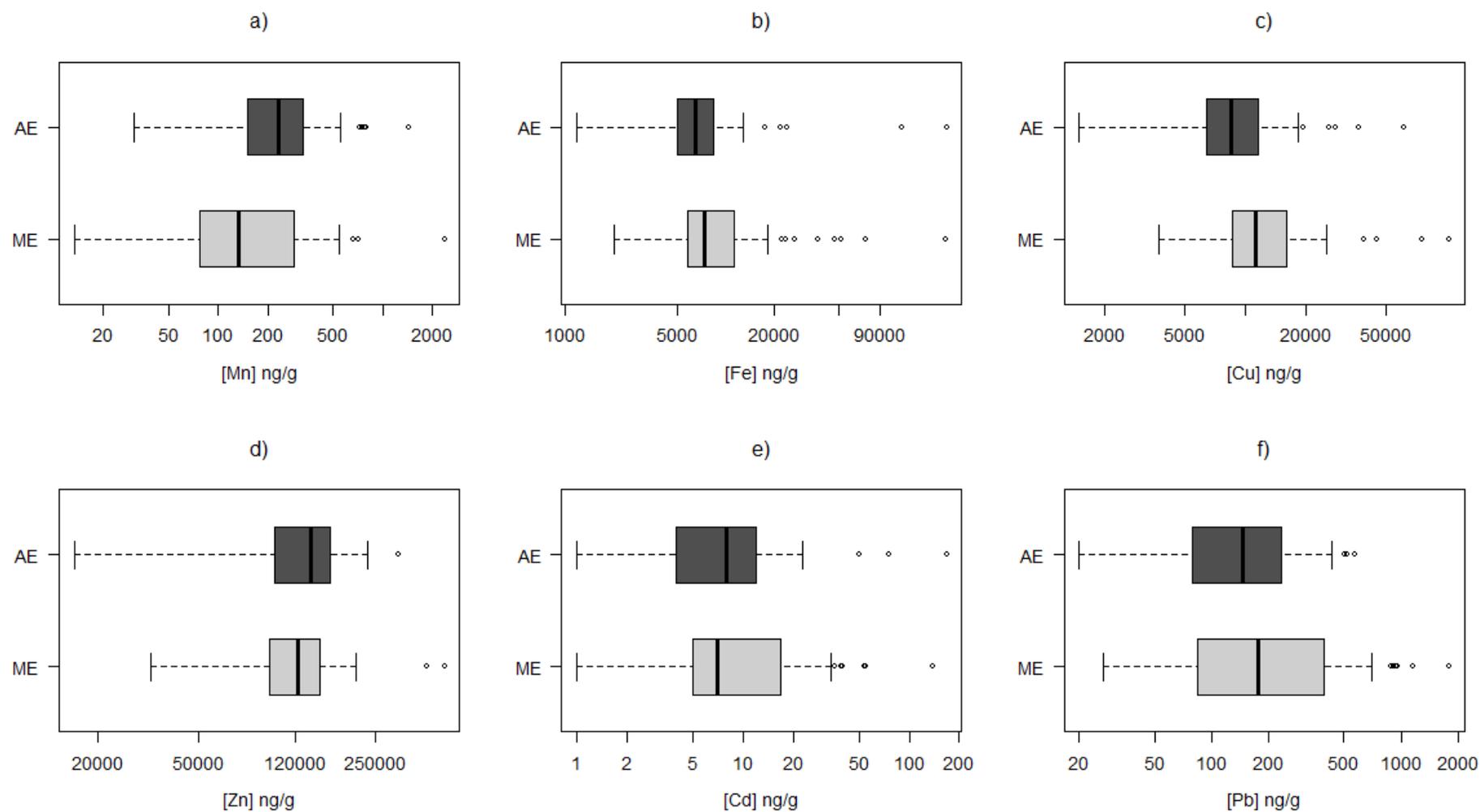


Figura 3.8. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de metales en pelo en función de la exposición: moderadamente expuestos (ME) frente a altamente expuestos (AE): a) Mn; b) Fe; c) Cu; d) Zn; e) Cd y f) Pb.

Se calcularon las correlaciones de Spearman entre los metales en pelo (Tabla 3.14), encontrando correlaciones positivas significativas entre Mn/Fe ($p=0,002$), Mn/Cd ($p<0,001$), Mn/Pb ($p<0,001$), Fe/Cd ($p=0,001$), Cu/Cd ($p=0,037$), Cu/Pb ($p<0,001$) y Cd/Pb ($p<0,001$).

Tabla 3.14. Coeficientes de correlación de Spearman (p -valor) entre los metales analizados en pelo del cuero cabelludo.

	Mn (ng/g)	Fe (ng/g)	Cu (ng/g)	Zn (ng/g)	Cd (ng/g)	Pb (ng/g)
Mn (ng/g)	1					
Fe (ng/g)	0,282 (0,002)	1				
Cu (ng/g)	0,086 (0,348)	0,146 (0,109)	1			
Zn (ng/g)	0,038 (0,680)	-0,157 (0,085)	-0,061 (0,504)	1		
Cd (ng/g)	0,442 (<0,001)	0,288 (0,001)	0,189 (0,037)	0,124 (0,175)	1	
Pb (ng/g)	0,348 (<0,001)	0,151 (0,098)	0,345 (<0,001)	0,115 (0,209)	0,504 (<0,001)	1

Asimismo, se calcularon los coeficientes de correlación entre los metales analizados, la distancia ponderada a la fuente, y la edad de los participantes (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de metales en pelo, la distancia ponderada con el viento, y la edad de los participantes.

Metal	Distancia ponderada		Edad	
	rho	p -valor	rho	p -valor
Mn (ng/g)	-0,104	0,291	-0,077	0,398
Fe (ng/g)	0,269	0,006	-0,112	0,219
Cu (ng/g)	0,311	0,001	-0,337	<0,001
Zn (ng/g)	-0,207	0,035	-0,103	0,261
Cd (ng/g)	0,151	0,127	-0,070	0,443
Pb (ng/g)	0,300	0,002	-0,059	0,520

Se observó que el Mn mostró una correlación negativa con la distancia ponderada, aunque no alcanzó la significación estadística. También se observó una correlación negativa significativa con la distancia a la fuente para el Zn ($\rho=-0,207$, $p=0,035$). El Cu y el Fe muestran una correlación positiva y significativa entre la distancia ponderada y su concentración en pelo (Fe ($\rho=0,269$, $p=0,006$) y Cu ($\rho=0,311$, $p=0,001$)). Con respecto al Pb, se encontró una correlación positiva con la distancia, y, en contra de nuestra hipótesis, la concentración fue ligeramente superior en el grupo moderadamente expuesto ($p=0,088$). La interpretación de estos resultados es más compleja, debido entre otras cuestiones a que no es posible descartar otras fuentes cercanas de emisión de Pb, Zn y Fe, como una planta siderúrgica situada a 3,5 km al norte de la fábrica de ferroaleaciones, y el tráfico rodado (emisiones no confinadas) para Zn y Fe. Además, el Zn y el Fe son oligoelementos esenciales que pueden entrar en el organismo por otras vías además de la inhalación, como la ingestión de alimentos.

En cuanto al Cu, a pesar de mostrar diferencias significativas entre los grupos de exposición, pierde la significación estadística tras ajustar por los potenciales factores de confusión, atribuidos principalmente a las diferencias de edad (personas mayores en el grupo altamente expuesto, como se muestra en la Tabla 3.3, y correlación negativa entre el Cu en pelo y la edad de los sujetos, encontrando las concentraciones más altas en los participantes más jóvenes, como se muestra en la Tabla 3.15). De todos modos, se hallaron mayores niveles de Cu en el pelo del cuero cabelludo en la población moderadamente expuesta, avalado con una correlación positiva significativa con

la distancia ($\rho=0,311$, $p=0,001$), concluyendo que el origen de este metal no se debe a la planta de ferroaleaciones. Según la bibliografía, el Cu transportado por el aire se origina principalmente en las emisiones procedentes del desgaste de los frenos (Amato et al., 2010; Bäckström et al., 2003; Johansson et al., 2009). Esto aporta coherencia a nuestros resultados, ya que el tráfico rodado es similar o incluso mayor en la zona de Santander, donde vive la mayor parte del grupo moderadamente expuesto.

3.4.2. Mediante uñas de los dedos de las manos

Los niveles de los metales estudiados en uñas de los dedos de las manos se muestran en la Figura 3.9 en forma de diagrama de cajas y bigotes, así como en la Tabla 3.16, donde se muestran los resultados agrupados por grupo de exposición (moderada/altamente expuestos), y por sexo de los participantes.

Se han encontrado diferencias de medianas significativas en términos de exposición para Mn ($p<0,001$) y Pb ($p=0,025$), siendo la concentración de ambos metales superior para el grupo más expuesto (Tabla 3.16). Estas diferencias mantuvieron su significación estadística tras ajustar por los factores de confusión potenciales (Tabla 3.17). En la Figura 3.9 se muestra también de forma gráfica esta diferencia, más evidente para el caso del Mn.

Esas diferencias están de acuerdo con una correlación negativa significativa encontrada para Mn y la distancia ($\rho=-0,607$, $p<0,001$) (Tabla 3.18). Además, se encontró una correlación positiva significativa entre la concentración de Mn y la edad de los participantes ($\rho=0,315$, $p=0,001$), siendo superiores para los participantes de mayor edad.

Tabla 3.16. Concentraciones de metales en uñas por grupo de exposición (moderadamente expuestos (ME) y altamente expuestos (AE)), y sexo de los participantes.

Metal	ME				AE				p-valor*	Total			
	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)		N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)
Mn (ng/g)	58	433,4 (308,8)	331,3	1054 (975-1134)	58	1440,1 (1386,4)	917,9	5244 (4887-5601)	<0,001	116	936,7 (1120,5)	555	3549 (3345-3753)
Fe (ng/g)	58	28579 (30305)	19390	88147 (80348-95946)	58	28356 (31614)	18506	97318 (89182-105454)	0,886	116	28468 (30832)	18746	90461 (84850-96072)
Cu (ng/g)	52	5293 (9643)	3767	12507 (9886-15128)	44	5626 (7650)	4373	16485 (14225-18746)	0,076	96	5446 (8743)	3634	14470 (12721-16219)
Zn (ng/g)	58	130513 (49498)	116017	219047 (206309-231786)	58	131391 (54652)	123365	233366 (219301-247431)	0,912	116	130952 (51913)	118442	220002 (210555-229449)
Pb (ng/g)	52	116,4 (91,1)	82,8	340,6 (315,8-365,3)	44	190,8 (259,9)	103,3	927,1 (850,3-1003,9)	0,025	96	150,5 (190,8)	96,0	424,8 (386,6-462,9)

Metal	Mujeres				Hombres				p-valor*
	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	N	MA (DE)	Mediana	RV (IC 95%)	
Mn (ng/g)	87	967,5 (1097,1)	562	3778 (3547-4008)	29	844,3 (1203,3)	532	4331 (3893-4769)	0,337
Fe (ng/g)	87	28365 (31490)	19187	93071 (86454-99687)	29	28776 (29301)	18363	101105 (90441-111769)	0,690
Cu (ng/g)	73	5671 (9904)	3544	15626 (13355-17898)	23	4730 (2887)	3840	13412 (12232-14592)	0,328
Zn (ng/g)	87	135378 (55913)	124375	227144 (215395-238893)	29	117672 (34975)	150307	207368 (194639-220097)	0,064
Pb (ng/g)	73	127,5 (208,5)	97,3	402,0 (354,2-449,9)	23	128,5 (119,3)	94,3	474,1 (425,3-522,8)	0,866

N = Número total de muestras

MA (DE) = Media Aritmética (Desviación Estándar)

RV (IC 95%) = Valor de Referencia (Intervalo de Confianza del 95%)

*Test U de Mann Whitney.

Tabla 3.17. Diferencias de medias crudas y ajustadas entre los niveles de metales en uñas en función de la distancia a la planta de ferroaleaciones (altamente expuestos (AE), moderadamente expuestos (ME)).

Metal	Distancia a la fuente ($\leq 1,5$ vs $>1,5$ km)											
	DM cruda	IC 95%		<i>p</i> -valor	D _{Ma1}	IC 95%		<i>p</i> -valor	D _{Ma2}	IC 95%		<i>p</i> -valor
Mn (ng/g)	1006,68	637,21	1376,14	<0,001	839,68	459,68	1219,68	<0,001	861,31	467,36	1255,26	<0,001
Fe (ng/g)	-222,52	-11613,92	11168,88	0,969	-1030,66	-13153,73	11092,42	0,867	774,68	-11971,86	13521,21	0,904
Cu (ng/g)	333,81	-3240,20	3907,83	0,853	1065,19	-2763,15	4893,53	0,582	1440,86	-2729,58	5611,31	0,494
Zn (ng/g)	878,48	-18301,33	20058,29	0,928	-1950,18	-22105,12	18204,75	0,848	-3036,20	-24646,57	18574,16	0,781
Pb (ng/g)	74,32	-2,20	150,84	0,057	75,86	-6,80	158,51	0,072	102,06	14,21	189,91	0,023

DM = Diferencia de medias.

D_{Ma1} = DM ajustada por edad, sexo y nivel de estudios.

D_{Ma2} = DM ajustada por edad, sexo, nivel de estudios, situación laboral, tabaquismo y hábitos dietéticos.

Una DM positiva indica niveles más altos en los participantes que viven a menor distancia de la planta de ferroaleaciones.

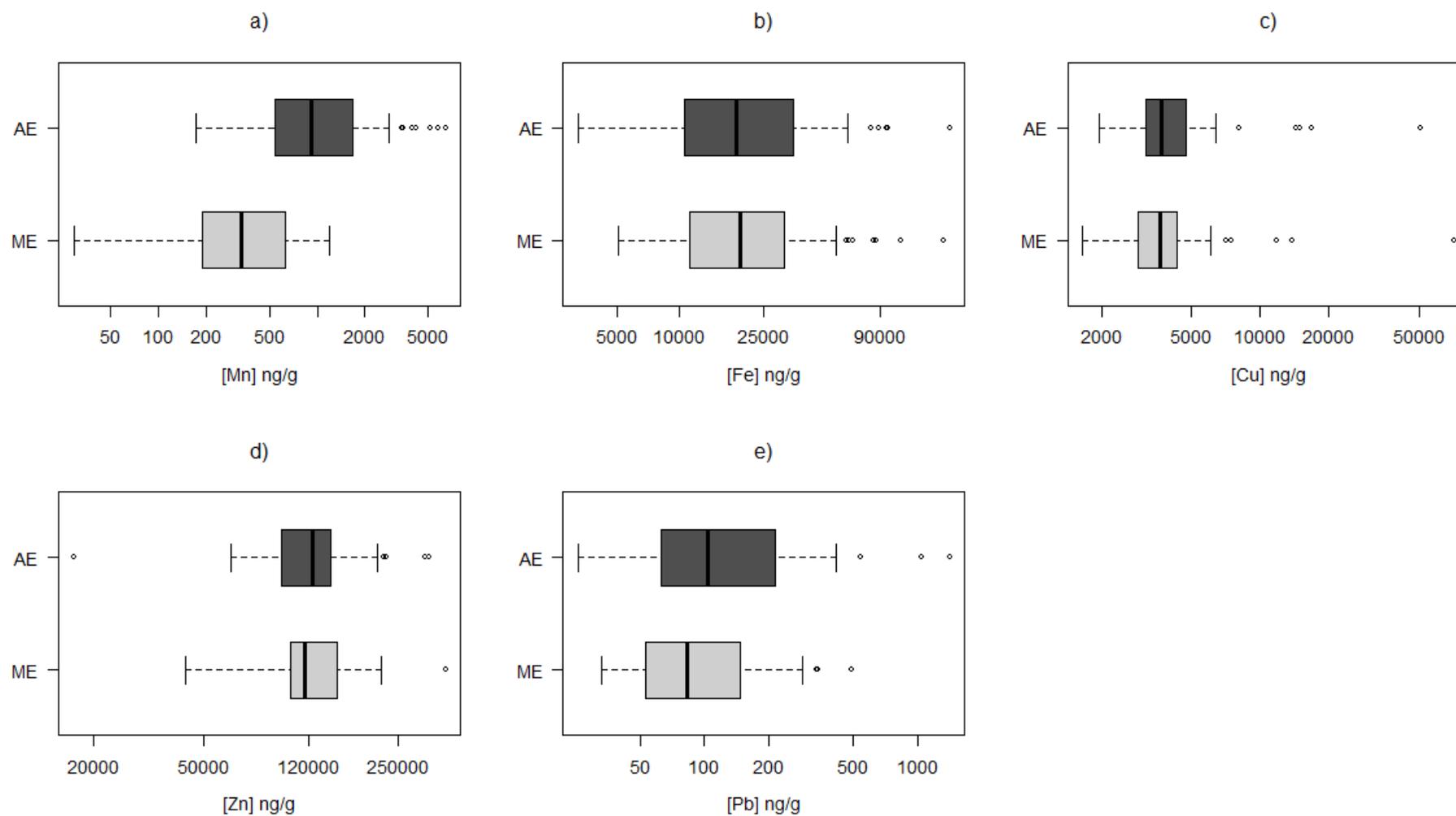


Figura 3.9. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de metales en uñas en función de la exposición: moderadamente expuestos (ME) frente a altamente expuestos (AE): a) Mn; b) Fe; c) Cu; d) Zn y e) Pb.

Tabla 3.18. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de metales en uñas, la distancia ponderada con el viento, y la edad de los participantes.

Metal	Distancia ponderada		Edad	
	rho	p-valor	rho	p-valor
Mn (ng/g)	-0,607	<0,001	0,315	0,001
Fe (ng/g)	0,041	0,682	-0,013	0,894
Cu (ng/g)	-0,039	0,725	-0,094	0,361
Zn (ng/g)	-0,032	0,754	-0,048	0,609
Pb (ng/g)	-0,344	<0,001	0,020	0,845

En cuanto a la correlación entre los propios metales en la matriz, se encontraron correlaciones significativas entre Mn/Fe (rho=0,268, $p=0,004$), Mn/Pb (rho=0,414, $p<0,001$), Fe/Zn (rho=0,340, $p<0,001$), Fe/Pb (rho=0,253, $p=0,013$) and Cu/Pb (rho=0,211, $p=0,039$) (Tabla 3.19).

Tabla 3.19. Coeficientes de correlación de Spearman (*p-valor*) entre los metales analizados en uñas de las manos.

	Mn (ng/g)	Fe (ng/g)	Cu (ng/g)	Zn (ng/g)	Pb (ng/g)
Mn (ng/g)	1				
Fe (ng/g)	0,268 (0,004)	1			
Cu (ng/g)	0,093 (0,369)	0,136 (0,188)	1		
Zn (ng/g)	0,090 (0,339)	0,340 (<0,001)	0,160 (0,119)	1	
Pb (ng/g)	0,414 (<0,001)	0,253 (0,013)	0,211 (0,039)	0,193 (0,060)	1

Aunque los niveles de Mn medidos en los biomarcadores pueden ser el resultado de las tres vías de exposición, los resultados comentados anteriormente sobre las concentraciones de Mn contenido en PM y la importancia de la fracción bioaccesible pueden explicar los resultados obtenidos cuando se utilizan el pelo y las uñas. Así, podemos considerar el pelo del cuero cabelludo y principalmente las uñas como potenciales biomarcadores de la exposición al Mn en el aire a largo plazo.

La población más expuesta mostró una mediana de 917,9 ng/g en las uñas, siendo esta concentración notablemente inferior para la población menos expuesta (331,3 ng/g), como se ha puesto de manifiesto en otros estudios (Coetzee et al., 2016; Haynes et al., 2015; Levin-Schwartz et al., 2021).

Con respecto al Pb, Zn y Fe, su presencia en la zona de estudio también se atribuyó principalmente a la fábrica de ferroaleaciones (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019a), aunque como se ha comentado anteriormente no se descartan otras fuentes de estos metales. En cualquier caso, se han obtenido correlaciones positivas significativas entre Mn, Pb, Zn y Fe en las uñas, como se observa en la Tabla 3.19.

Además, para el Pb, se encontraron resultados contradictorios: una correlación positiva con la distancia en el pelo (Tabla 3.15) y negativa en las uñas (Tabla 3.18), ambas significativas. Así, encontramos niveles más altos en el grupo altamente expuesto (103,3 vs 82,8 ng/g, $p=0,025$) en las uñas, pero en contra de nuestra hipótesis, estos niveles fueron ligeramente superiores en el grupo moderadamente expuesto ($p=0,088$) en el caso del pelo. Estos resultados necesitan más investigación para dilucidar la idoneidad de estos biomarcadores para dar cuenta de la exposición

al Pb transportado por el aire, y la contribución de fuentes de emisión locales distintas de la planta de ferroaleaciones.

Finalmente, al igual que en pelo, debido al protocolo de limpieza empleado, se observaron las mismas diferencias en las uñas respecto a los valores obtenidos de la bibliografía, con la peculiaridad de que el número de estudios bibliográficos disponibles para comparar con el intervalo de valores obtenido en el presente estudio eran más limitados. En particular, el intervalo de concentraciones de metales en las uñas se encontraban en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por Butler et al. (2019), que utilizaron el mismo protocolo de limpieza descrito previamente por Eastman et al. (2013). Por ejemplo, Butler et al. (2019) reportaron medianas para Mn, Cu y Pb de 0,19, 2,66 y 0,1 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, mientras que para los mismos metales nuestras medianas fueron de 0,56, 3,63 y 0,10 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

3.5. Correlaciones entre las matrices evaluadas

Las correlaciones entre matrices para los metal(oid)es detectados (con al menos el 50% de las muestras por encima del LD) se muestran en las Tablas 3.20 - 3.24.

En lo que respecta al Mn, no se observaron correlaciones significativas entre la sangre total y ninguna de las fracciones de Mn analizadas en PM ni otros biomarcadores. Sin embargo, el Mn del pelo del cuero cabelludo mostró correlaciones positivas significativas con el Mn bioaccesible y total en ambas fracciones (gruesa y fina), y el Mn de las uñas se correlacionó bien con todas las fracciones de PM analizadas. Estos resultados permiten resaltar la utilidad que tiene el pelo del cuero cabelludo y especialmente las uñas de la mano como biomarcador de exposición a Mn en aire ambiente. Es cierto que los niveles de PM han sido obtenidos con muestreadores personales, y que por tanto corresponden a un periodo de exposición muy corto (24 horas), y que los niveles de Mn en pelo y uñas reflejan una exposición a más largo plazo; sin embargo, los niveles de Mn en PM_{10} que se han obtenido en promedio en el grupo más expuesto mediante muestreadores personales son similares a los obtenidos previamente por el grupo de investigación en la misma zona con muestreadores estacionarios durante un año, en particular en Maliaño, estación de Cros (231,8 ng/m^3 en el año 2015/2016, respecto a 253,4 ng/m^3 en este estudio); de la misma forma, los niveles obtenidos en promedio por el grupo menos expuesto (50,4 ng/m^3), compuesto fundamentalmente por voluntarios residentes en Santander, son similares a los obtenidos también por el grupo de investigación en la ciudad de Santander mediante un muestreador estacionario durante un año (60,8 ng/m^3 en 2015/2016) (Hernández-Pellón y Fernández-Olmo, 2019b). Por todo ello, los niveles de Mn obtenidos en este estudio a partir de muestreadores personales también se consideran representativos de una exposición a más largo plazo.

En lo que respecta a otros metales, también se observaron correlaciones positivas significativas para los niveles de Fe en el pelo y las uñas ($\rho=0,228$, $p=0,018$); además de las concentraciones de Pb en la sangre total y el pelo del cuero cabelludo ($\rho=0,210$, $p=0,020$), aunque no respecto a las uñas.

Tabla 3.20. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre el Mn presente en las distintas matrices. B (Bioaccesible), NB (No Bioaccesible).

	Sangre	Pelo	Uñas	PM _{10-2.5} . B.	PM _{10-2.5} . NB.	PM _{10-2.5} . Total.	PM _{2.5} . NB.	PM _{2.5} . B.	PM _{2.5} . Total.	PM ₁₀
Sangre	1									
Pelo	0,143 (0,116)	1								
Uñas	-0,179 (0,054)	0,169 (0,080)	1							
PM _{10-2.5} . B.	-0,060 (0,497)	0,224 (0,013)	0,439 (<0,001)	1						
PM _{10-2.5} . NB.	0,017 (0,848)	0,175 (0,054)	0,371 (<0,001)	0,750 (<0,001)	1					
PM _{10-2.5} . Total.	-0,056 (0,526)	0,207 (0,022)	0,434 (<0,001)	0,983 (<0,001)	0,831 (<0,001)	1				
PM _{2.5} . NB.	-0,127 (0,151)	0,160 (0,079)	0,255 (0,006)	0,631 (<0,001)	0,494 (<0,001)	0,621 (<0,001)	1			
PM _{2.5} . B.	-0,044 (0,617)	0,191 (0,035)	0,235 (0,011)	0,826 (<0,001)	0,596 (<0,001)	0,794 (<0,001)	0,703 (<0,001)	1		
PM _{2.5} . Total.	-0,073 (0,408)	0,192 (0,034)	0,258 (0,005)	0,813 (<0,001)	0,608 (<0,001)	0,789 (<0,001)	0,829 (<0,001)	0,969 (<0,001)	1	
PM ₁₀	-0,069 (0,437)	0,202 (0,026)	0,356 (0,000)	0,920 (<0,001)	0,737 (<0,001)	0,916 (<0,001)	0,776 (<0,001)	0,943 (<0,001)	0,957 (<0,001)	1

Tabla 3.21. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre el Fe presente en las distintas matrices. B (Bioaccesible), NB (No Bioaccesible).

	Sangre	Pelo	Uñas	PM _{10-2,5} . B.	PM _{2,5} . NB.
Sangre	1				
Pelo	-0,018 (0,848)	1			
Uñas	0,106 (0,256)	0,228 (0,018)	1		
PM _{10-2,5} . B.	0,071 (0,420)	0,035 (0,699)	0,140 (0,133)	1	
PM _{2,5} . NB.	-0,033 (0,712)	-0,106 (0,243)	-0,005 (0,961)	0,161 (0,067)	1

Tabla 3.22. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre el Cu presente en las distintas matrices.

	Sangre	Pelo	Uñas
Sangre	1		
Pelo	0,125 (0,170)	1	
Uñas	-0,187 (0,068)	-0,070 (0,510)	1

Tabla 3.23. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre el Zn presente en las distintas matrices.

	Sangre	Pelo	Uñas
Sangre	1		
Pelo	-0,092 (0,312)	1	
Uñas	0,019 (0,843)	-0,102 (0,294)	1

Tabla 3.24. Coeficientes de correlación de Spearman (*p*-valor) entre el Pb presente en las distintas matrices. B (Bioaccesible).

	Sangre	Pelo	Uñas	PM _{2,5} . B.
Sangre	1			
Pelo	0,210 (0,020)	1		
Uñas	0,019 (0,855)	0,064 (0,548)	1	
PM _{2,5} . B.	0,088 (0,321)	-0,028 (0,763)	-0,036 (0,704)	1

3.6. Evaluación del riesgo de exposición a Mn en la zona de estudio

Una vez caracterizada la exposición a los principales metal(oid)es presentes en la Bahía de Santander, y observando que el Mn se pudo cuantificar en todos los medios estudiados y que presentó en general los niveles más elevados respecto a la bibliografía en la mayoría de las matrices evaluadas y respecto a la RfC de la US EPA en aire ambiente, se decidió realizar una evaluación del riesgo por exposición a Mn en el área de estudio.

3.6.1. Contribución relativa de los diferentes medios y rutas de exposición a Mn

Con el objetivo de evaluar qué medios y qué rutas de exposición a Mn contribuyen a un mayor riesgo por exposición al mismo, se ha partido de un caso base de estudio donde se han considerado en primer lugar las concentraciones medias de Mn bioaccesible y total en $PM_{2,5}$, $PM_{10-2,5}$ y PM_{10} de la población de estudio para estimar el riesgo promedio por inhalación, ingestión y dérmico respectivamente asociado al Mn presente en el aire ambiente; y en segundo lugar, se ha tenido en cuenta la exposición a Mn a través de la ingesta de alimentos y de agua, ya que, al tratarse de un oligoelemento, unas mínimas cantidades son necesarias para el correcto funcionamiento del organismo. Una vez analizada la contribución de los diferentes medios y rutas de exposición a Mn para este caso base, se determinó el riesgo individualizado para todos los participantes del estudio transversal.

En la Tabla 3.25 se describe de forma esquemática qué información se ha empleado para calcular la contribución de las distintos medios y rutas al HI por exposición a Mn. También se incluyen en la Tabla 3.25 la dosis media diaria y los HQ de cada uno de los medios y rutas de exposición considerados. Los valores de HQ se calcularon empleando tanto el enfoque clásico, que considera la concentración total del contaminante en el PM_x como el enfoque más innovador, que defiende el empleo de la concentración bioaccesible (Hernández-Pellón et al., 2018; Mbengue et al., 2015; Nie et al., 2018; Ren et al., 2021).

En cuanto a la exposición al Mn presente en el aire, los valores de HQ obtenidos para la ruta de inhalación (1,27 y 1,58 considerando el Mn bioaccesible y total en $PM_{2,5}$, respectivamente) refuerzan los resultados a partir de un estudio previo en la zona (Hernández-Pellón et al., 2018). Dicho estudio analizó el riesgo no carcinogénico asociado a la inhalación de Mn ligado a PM_{10} recogido en las proximidades de la fábrica de ferroaleaciones mencionada, obteniendo HQ superiores a 1 para todos los escenarios contemplados. En el presente estudio se mejora este enfoque al separar las distintas fracciones de PM en función de su destino en el organismo, obteniendo que el mayor riesgo está asociado a la entrada de Mn vía inhalación, a través de las partículas más finas.

En cuanto a la ruta de ingestión de Mn asociado a la fracción $PM_{10-2,5}$ previamente inhalado se observa que, pese a que las concentraciones de Mn son similares a las que se encuentran en el

PM_{2,5}, la asimilación de este, y por tanto del riesgo derivado, es mucho menor (HQ del orden de 10⁻⁴).

Finalmente, en cuanto a la exposición por contacto dérmico con el Mn presente en el PM₁₀, se observa una contribución no despreciable de dicha ruta (0,24 y 0,29 para Mn ligado a PM₁₀ bioaccesible y total respectivamente). Sin embargo, este riesgo puede estar sobreestimado, ya que el procedimiento de la US EPA para evaluar el riesgo dérmico tiene en cuenta el contacto de la piel con contaminantes presentes en agua, sedimento, suelo y polvo interior y exterior, pero no específicamente en el PM, aunque en la bibliografía reciente sí se ha empleado esta misma metodología para evaluar el riesgo dérmico ligado a contaminantes presentes en el PM en algunos estudios (Aguilera et al., 2022; Al-Harbi et al., 2021; Fadel et al., 2022; Roy et al., 2022). En particular, la tasa de adherencia a la piel de un sólido para adultos se estima en 0,07 mg/cm²/evento, y se asume que un adulto en determinadas actividades laborales o recreativas puede estar en contacto con suelo o polvo una serie de eventos al año (US EPA, 2004b, 2011). Sin embargo, el contacto entre el PM y la piel es permanente por lo que no se puede hablar de eventos particulares, aunque en los citados estudios y en este trabajo se ha utilizado la misma tasa de adherencia para PM (Aguilera et al., 2022; Al-Harbi et al., 2021; Fadel et al., 2022; Roy et al., 2022).

Con relación a la superficie empleada, ésta será diferente en función de la época del año en que se realice el muestreo, estando expuestos durante los períodos más fríos la cara y las manos, aumentado esta superficie a los brazos en períodos más cálidos. Para el cálculo de la contribución promedio de esta vía se ha empleado una superficie de 5700 cm², tal como recomienda la US EPA. Posteriormente, para el cálculo del riesgo personalizado para cada participante del estudio transversal, se empleará un valor de superficie para cada voluntario en función del sexo y el período del año en que se ha muestreado.

Como se ha mencionado a lo largo de esta Tesis Doctoral, el Mn es un oligoelemento, por lo que una mínima concentración de este es necesaria para el correcto funcionamiento del organismo. Por ello, Trumbo et al. (2001) recomiendan una dosis diaria de ingestión de Mn de 2,3 mg/día para hombres y 1,8 mg/día para mujeres a partir de los 19 años, por lo que además de la exposición a Mn en el aire, los individuos también están expuestos a Mn a través de la dieta (presente en té, legumbres, nueces, etc.). Asimismo, algunos suplementos vitamínicos contienen Mn, por lo que se ha empleado la concentración de un suplemento genérico para el cálculo del riesgo añadido por la toma de suplementos. En concreto se consideró un suplemento a base de fósforo (P), jalea real, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, taurina, vitaminas y minerales (calcio (Ca), P, Zn y Mn), que contribuyen a la función cognitiva y al rendimiento intelectual normal, cuya concentración de Mn es de 0,5 mg de Mn por comprimido, recomendando una ingesta de entre 1 y 2

comprimidos diarios. Para el cálculo del aporte de Mn debido a este tipo de suplementos, se ha tenido un enfoque conservador considerando la ingesta de 2 comprimidos de suplemento diarios.

En nuestro estudio no se estudió la dieta en profundidad, por lo que se consideró un aporte constante de Mn equivalente al promedio de la dosis diaria recomendada para hombres y mujeres, derivando esta dosis en un HQ de 0,18, una quinta parte del valor umbral que se considera inocuo para la salud.

Asimismo, se cuantificó la contribución del agua ingerida, cuya dosis diaria media se calculó en base a las directrices de la US EPA (2011), considerando la concentración medida de Mn en el agua de grifo local analizada en este estudio (0,38 µg/L) y una tasa de ingestión de agua para población mayor de 21 años de 16 mL/kg/día. El riesgo asociado a la ingestión de agua es muy bajo y del mismo orden de magnitud que la ingestión de PM_{10-2,5} previamente inhalado.

Tomando la Tabla 3.25 como base, se elaboraron diagramas circulares para observar el porcentaje de contribución de cada medio y ruta al índice de peligrosidad total, considerando tanto la metodología clásica ([Mn]_{total}) como la metodología alternativa ([Mn]_{bioaccesible}) (Figura 3.10).

Haciendo uso de la metodología clásica se evidenció una contribución del 88% del aire al HI_{total} (74% mediante la ruta de inhalación y un 14% mediante absorción dérmica), suponiendo la dieta el 12% restante (8% en forma de ingesta diaria recomendada y 4% en forma de suplementos).

Estos porcentajes se ven levemente modificados al considerar el enfoque alternativo, donde la contribución del aire pasa a ser del 85% (71% mediante la ruta de inhalación y 14% mediante absorción dérmica), aumentando la contribución dietética (10% en forma de ingesta de alimentos y 5% en forma de suplementos).

Tras observar una mayor contribución del aire al HI, se estudió de forma pormenorizada cada una de las rutas en este medio, observando que en los dos enfoques la contribución fue la misma: 84% mediante inhalación de PM_{2,5} y 16% mediante absorción dérmica, siendo prácticamente despreciable la contribución de la ingestión de Mn presente en el PM_{10-2,5}.

Tabla 3.25. Valores empleados para calcular la contribución de las distintos medios y rutas de exposición al HI para el Mn.

Medio de exposición	Ruta	Dato de entrada	Valor/unidades	Referencia	DDM/C _{aire-ajustada}	HQ _i	
Aire	Inhalación	[Mn]PM _{2,5}	78,95 ng/m ³	Estudio transversal	78,95 ng/m ³	1,579	
		[Mn _{bio}]PM _{2,5}	63,31 ng/m ³	Estudio transversal	63,31 ng/m ³	1,266	
	Ingestión*	[Mn]PM _{10-2,5}	72,93 ng/m ³	Estudio transversal	1,46*10 ⁻⁵ mg/kg/día	6,08*10 ⁻⁴	
		[Mn _{bio}]PM _{10-2,5}	61,11 ng/m ³	Estudio transversal	1,22*10 ⁻⁵ mg/kg/día	5,09*10 ⁻⁴	
	Dérmica	[PM ₁₀]	27 µg/m ³	Centro de Investigación del Medio Ambiente (2022)			
		[Mn]PM ₁₀	151,89 ng/m ³	Estudio transversal	2,81*10 ⁻⁴ mg/kg/día	0,292	
		[Mn _{bio}]PM ₁₀	124,42 ng/m ³	Estudio transversal	2,30*10 ⁻⁴ mg/kg/día	0,239	
Suelo y/o polvo	Ingestión	Incluida en *					
	Dérmica	No considerada. Población adulta.					
Alimentos/agua	Ingestión	[Mn] _{dieta}	2,05 mg/día	Trumbo et al. (2001)	2,60*10 ⁻² mg/kg/día	0,183	
		[Mn] _{suplementos}	0,50 mg/comprimido	Estudio transversal	1,25*10 ⁻² mg/kg/día	8,90*10 ⁻²	
		[Mn] _{agua grifo}	0,38 µg/L	Experimental, este estudio	6,08*10 ⁻⁶ mg/kg/día	2,53*10 ⁻⁴	

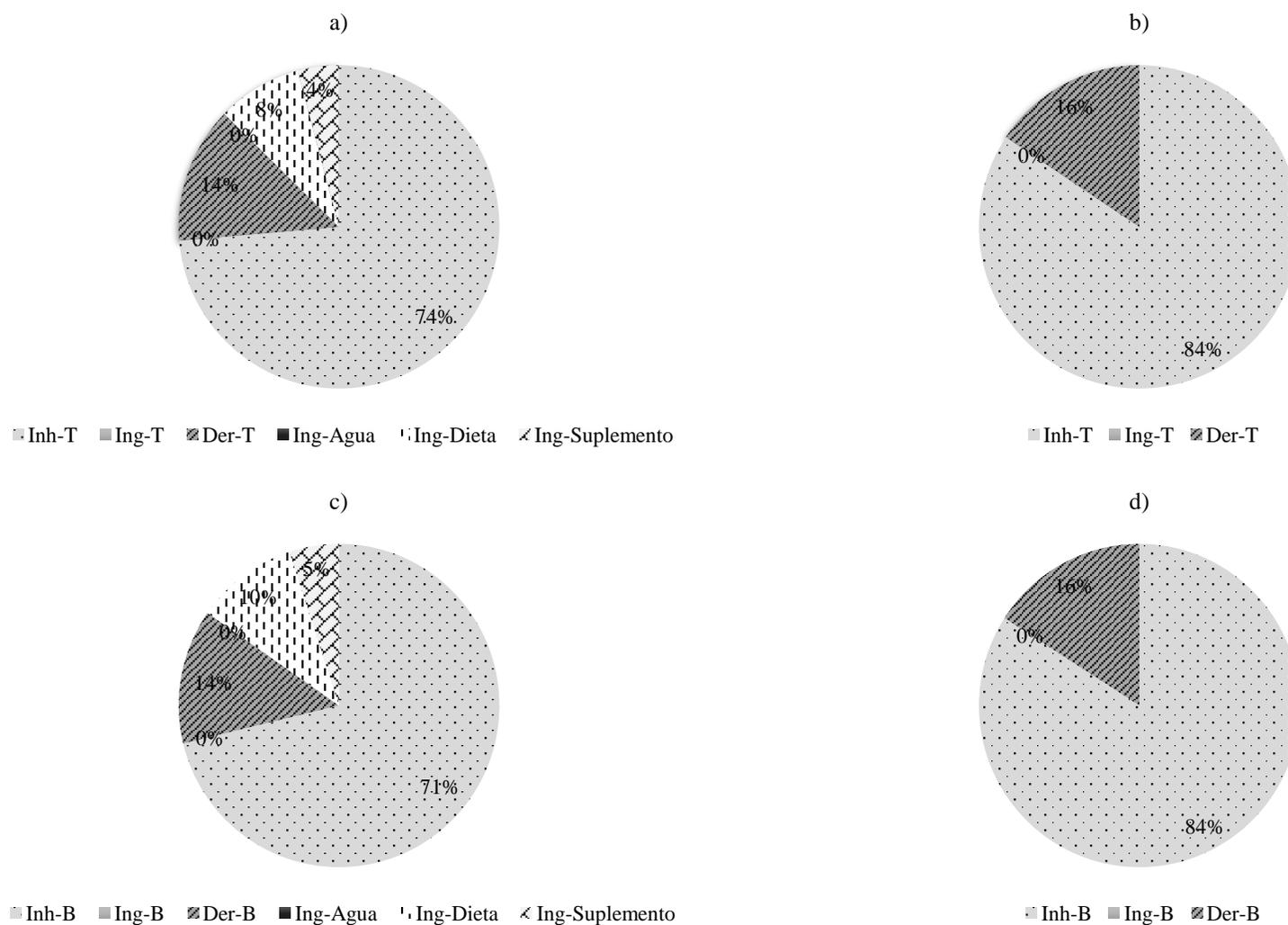


Figura 3.10. Contribución (%) de cada medio y ruta de exposición al HI_{total} : a) basado en la concentración total de Mn e incluyendo todos los medios; b) basado en la concentración total de Mn y para la exposición al aire; c) basado en la concentración de Mn bioaccesible e incluyendo todos los medios; d) basado en la concentración de Mn bioaccesible y para la exposición al aire.

3.6.2. Riesgo individualizado asociado a la exposición a Mn

Una vez analizada la contribución media de los diferentes medios y rutas de exposición a Mn en el área de estudio, se procedió a calcular el riesgo individualizado para todos los participantes del estudio transversal, teniendo en cuenta los diferentes medios y rutas de exposición al mismo. Para el medio “aire” se ha considerado la concentración de Mn a la que ha estado expuesto cada participante, teniendo en cuenta tanto el método clásico basado en la concentración total de Mn como el alternativo basado en la concentración bioaccesible.

Respecto a la contribución dietética, para una correcta estimación de la exposición individualizada se requiere información sobre la concentración de Mn en cada alimento ingerido por cada participante, así como la tasa de ingestión (US EPA, 2021a). Sin embargo, dado que la ruta de ingestión de alimentos no era el objetivo principal de este estudio, se ha considerado el fondo que aporta la dosis diaria recomendada al riesgo total, distinguiendo únicamente entre la dosis diaria de hombres y mujeres. Por otro lado, dado que únicamente dos individuos reportaron el consumo de suplementos dietéticos que contenían Mn, no se ha incluido en el riesgo individualizado. Finalmente, en cuanto al Mn presente en el agua de grifo, no se ha considerado en el cálculo del riesgo individualizado, ya que en el apartado anterior se ha observado que la contribución al riesgo total es despreciable.

Una vez calculado el HI por exposición a Mn de los 130 participantes del estudio transversal, se han calculado los estadísticos que resumen los principales resultados del estudio, teniendo en cuenta tanto el método clásico donde la exposición asociada al medio “aire” se calcula en base a la concentración total de Mn en el PM (Tabla 3.26), como el método alternativo, en base a la concentración bioaccesible de Mn (Tabla 3.27). Estos resultados también se muestran agrupados en función de la exposición (moderada/altamente expuestos) y del sexo.

Siguiendo el método clásico se observan diferencias significativas en el riesgo que supone la exposición a Mn entre los grupos alta y moderadamente expuestos. En primer lugar, para el grupo moderadamente expuesto casi todo el riesgo deriva de la inhalación del Mn en aire ($HQ_{\text{inhalación}} = 0,26$) y del fondo aportado por la ingesta media diaria. No obstante, en la población altamente expuesta, además de la vía inhalatoria ($HQ_{\text{inhalación}} = 0,89$), también adquiere cierta relevancia el contacto dérmico ($HQ_{\text{dérmico}} = 0,11$), aunque como se ha discutido en el apartado 3.6.1, esta contribución parece estar sobreestimada, y requeriría un estudio más profundo. En la Figura 3.11 puede verse claramente la diferencia entre ambos grupos de exposición, quedando la mediana del grupo más expuesto prácticamente en el valor umbral ($HI_{\text{aire}} = 0,95$), superando este valor cuando se tiene en consideración el aporte dietético ($HI_{\text{total}}=1,14$), por lo que puede acarrear consecuencias a la salud de estos individuos.

Esta tendencia se mantiene al calcular el riesgo considerando las concentraciones bioaccesibles de las distintas fracciones de Mn. Así, el riesgo que supone la inhalación de aire induce un $HQ_{\text{inhalación}} = 0,16$ para los menos expuestos, subiendo notablemente hasta 0,68 para la población más expuesta. De nuevo, la contribución dérmica es más acusada en la población más expuesta ($HQ_{\text{dérmico}}=0,088$). A diferencia del enfoque clásico, al considerar únicamente las concentraciones bioaccesibles, el HI_{total} cambia de 0,36 a 0,96 de los menos a los más expuestos, quedando la mediana por debajo del valor umbral propuesto por la US EPA (Figura 3.12).

En cuanto al empleo de la concentración total o la bioaccesible del contaminante para el cálculo del riesgo por inhalación hay cierta discusión en la bibliografía. Así, mientras estudios recientes recomiendan el uso de la concentración bioaccesible, debido a que puede reflejar mejor el riesgo de exposición a tales contaminantes (Hernández-Pellón et al., 2018; Mbengue et al., 2015; Nie et al., 2018; Ren et al., 2021; Weggeberg et al., 2019a), el propio procedimiento por el que se deriva la RfC de los diferentes contaminantes incluye distintas incertidumbres asociadas al valor final de la RfC que tienen en cuenta entre otras la toxicidad de la especie del contaminante que se evalúa. En particular, para el caso de la RfC del Mn, el estudio original del que se deriva este valor es un estudio de exposición laboral de trabajadores de una planta de baterías de MnO_2 , muestrándose la fracción respirable de las partículas presentes, y analizando el Mn total de las partículas (Roels et al., 1992). Posteriormente, se incluyen varios factores de incertidumbre, entre otros un factor de 10 para las limitaciones de la base de datos que reflejan tanto los períodos de exposición menos crónicos como la falta de datos sobre el desarrollo, así como las diferencias potenciales, pero no cuantificadas, en la toxicidad de las diferentes formas de Mn (IRIS US EPA, 1998), no especificando exactamente si en la toxicidad de las diferentes formas de Mn se tiene en cuenta la especiación, solubilidad, bioaccesibilidad, etc. De acuerdo con este procedimiento, bastaría con considerar la metodología clásica para el cálculo de riesgos. O bien, si se incluye la concentración bioaccesible, se calcularía un riesgo en un escenario menos conservador que empleando la concentración total.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral coinciden con la literatura en que la ruta que más contribuye a la exposición al medio “aire” es la inhalación de las partículas finas ($PM_{2,5}$) presentes en el aire (Abdulaziz et al., 2022; Fadel et al., 2022; Krupnova et al., 2021; Nie et al., 2018), siendo prácticamente despreciable la entrada al organismo vía ingestión. No obstante, en estos estudios, la entrada vía ingestión no considera como tal el $PM_{10-2,5}$ o la entrada vía inhalación y su asimilación por el sistema gastrointestinal como se ha matizado a lo largo de esta evaluación, sino que considera el PM depositado en alimentos, agua o distintas superficies que después son ingeridas (Dahmardeh Behrooz et al., 2021).

Tabla 3.26. Estadística descriptiva de los HQ en aire, así como los HI en aire y totales en función de la exposición (AE (altamente expuestos); ME (moderadamente expuestos)) y el sexo siguiendo el método clásico (teniendo en cuenta la concentración total de Mn para el cálculo de los riesgos asociados al medio “aire”).

	ME				AE				<i>p</i> -valor*	Total			
	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅		N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅
HQ _{inhalación}	65	0,64 (0,97)	0,26	3,14	65	2,52 (3,80)	0,89	10,07	<0,001	130	1,58 (2,92)	0,50	7,01
HQ _{ingestión}	65	2,0*10 ⁻⁴ (3,3*10 ⁻⁴)	1,0*10 ⁻⁴	6,0*10 ⁻⁴	65	1,1*10 ⁻³ (2,5*10 ⁻³)	4,0*10 ⁻⁴	2,9*10 ⁻³	<0,001	130	6,0*10 ⁻⁴ (1,8*10 ⁻³)	1,0*10 ⁻⁴	2,5*10 ⁻³
HQ _{dérmico}	65	4,5*10 ⁻² (6,6*10 ⁻²)	2,0*10 ⁻²	0,19	65	0,27 (0,64)	0,11	1,01	<0,001	130	0,16 (0,47)	4,1*10 ⁻²	0,84
HI _{aire}	65	0,68 (1,03)	0,27	3,49	65	2,80 (4,31)	0,95	10,94	<0,001	130	1,74 (3,29)	0,54	7,80
HI _{total}	65	0,86 (1,03)	0,45	3,67	65	2,98 (4,31)	1,14	11,12	<0,001	130	1,92 (3,29)	0,72	7,98

	Mujeres				Hombres				<i>p</i> -valor*
	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	
HQ _{inhalación}	95	1,68 (3,19)	0,51	7,11	35	1,30 (2,05)	0,40	6,16	0,944
HQ _{ingestión}	95	7,0*10 ⁻⁴ (2,1*10 ⁻³)	1,0*10 ⁻⁴	2,6*10 ⁻³	35	4,0*10 ⁻⁴ (6,0*10 ⁻⁴)	1,0*10 ⁻⁴	2,5*10 ⁻³	0,314
HQ _{dérmico}	95	0,17 (0,53)	4,2*10 ⁻²	0,82	35	0,13 (0,23)	4,0*10 ⁻²	0,93	0,838
HI _{aire}	95	1,85 (3,61)	0,54	8,10	35	1,43 (2,25)	0,52	6,52	0,927
HI _{total}	95	2,04 (3,61)	0,72	8,28	35	1,61 (2,25)	0,70	6,71	0,927

N = Número total de muestras

MA (DE) = Media Aritmética (Desviación Estándar)

P₉₅ = Percentil 95

*Test U de Mann Whitney.

Tabla 3.27. Estadística descriptiva de los HQ en aire, así como los HI en aire y totales en función de la exposición (AE (altamente expuestos); ME (moderadamente expuestos)) y el sexo siguiendo el método alternativo (teniendo en cuenta la concentración bioaccesible de Mn para el cálculo de los riesgos asociados al medio “aire”).

	ME				AE				<i>p</i> -valor*	Total			
	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅		N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅
HQ _{inhalación}	65	0,47 (0,81)	0,16	1,72	65	2,20 (3,57)	0,68	9,44	<0,001	130	1,33 (2,72)	0,34	6,31
HQ _{ingestión}	65	1,0*10 ⁻⁴ (2,9*10 ⁻⁴)	<1,0*10 ⁻⁴	4,0*10 ⁻⁴	65	9,0*10 ⁻⁴ (2,1*10 ⁻³)	3,0*10 ⁻⁴	2,3*10 ⁻³	<0,001	130	5,0*10 ⁻⁴ (1,5*10 ⁻³)	1,0*10 ⁻⁴	2,2*10 ⁻³
HQ _{dérmico}	65	3,4*10 ⁻² (5,9*10 ⁻²)	1,3*10 ⁻²	0,17	65	0,23 (0,55)	8,8*10 ⁻²	0,92	<0,001	130	0,13 (0,40)	0,03	0,75
HI _{aire}	65	0,50 (0,86)	0,18	1,93	65	2,42 (4,02)	0,78	10,25	<0,001	130	1,46 (3,05)	0,37	7,07
HI _{total}	65	0,69 (0,86)	0,36	2,11	65	2,60 (4,02)	0,96	10,44	<0,001	130	1,64 (3,05)	0,55	7,25

	Mujeres				Hombres				<i>p</i> -valor*
	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	N	MA (DE)	Mediana	P ₉₅	
HQ _{inhalación}	95	1,40 (2,94)	0,36	6,48	35	1,12 (2,00)	0,26	5,97	0,680
HQ _{ingestión}	95	6,0*10 ⁻⁴ (1,8*10 ⁻³)	1,0*10 ⁻⁴	2,2*10 ⁻³	35	3,0*10 ⁻⁴ (5,3*10 ⁻⁴)	1,0*10 ⁻⁴	2,2*10 ⁻³	0,228
HQ _{dérmico}	95	0,14 (0,46)	3,1*10 ⁻²	0,72	35	0,11 (0,22)	2,5*10 ⁻²	0,85	0,550
HI _{aire}	95	1,55 (3,32)	0,39	7,33	35	1,23 (2,20)	0,36	6,32	0,633
HI _{total}	95	1,73 (3,32)	0,57	7,51	35	1,42 (2,20)	0,54	6,50	0,633

N = Número total de muestras

MA (DE) = Media Aritmética (Desviación Estándar)

P₉₅ = Percentil 95

*Test U de Mann Whitney.

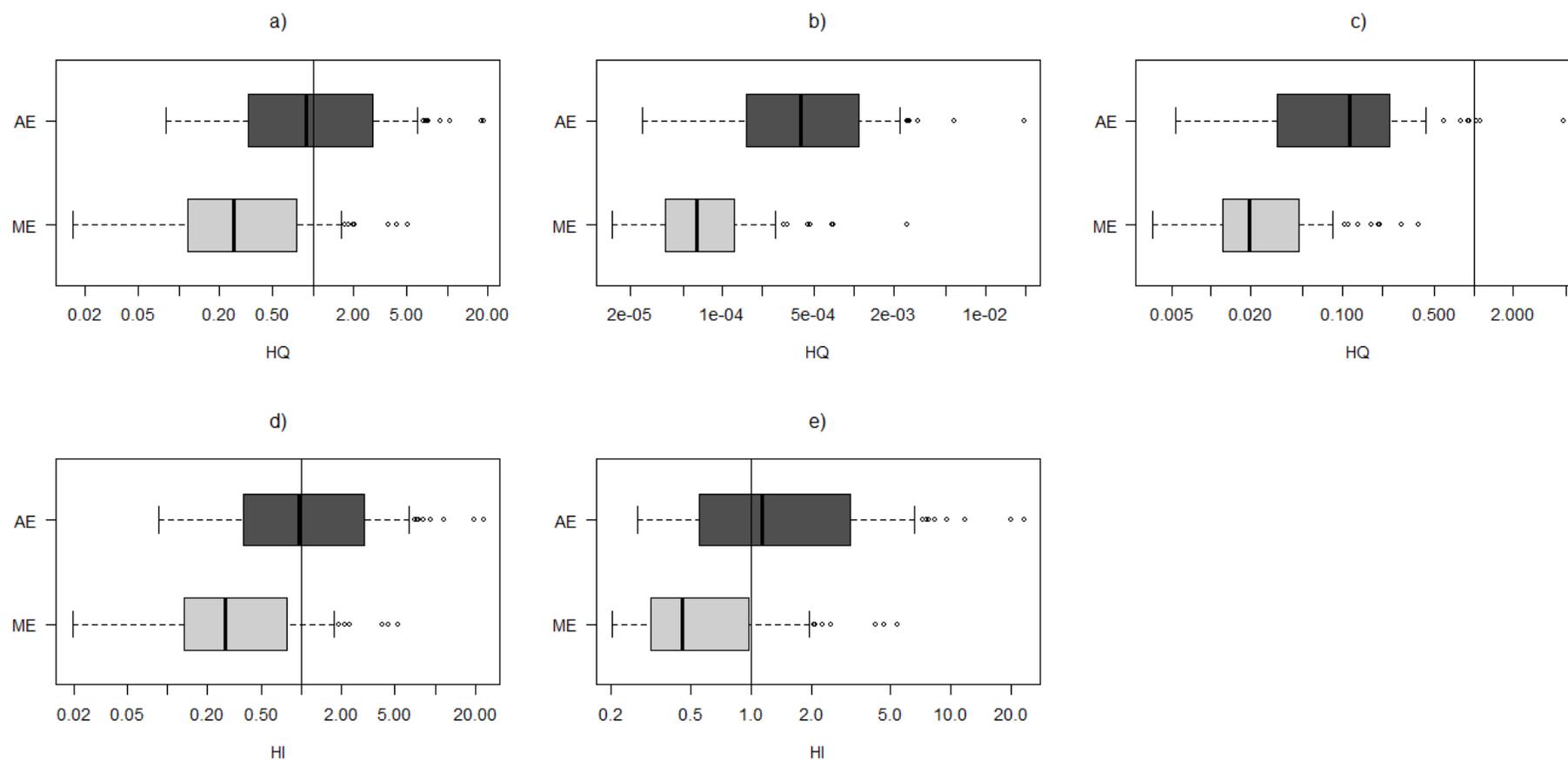


Figura 3.11. Diagrama de cajas y bigotes de los HQ y HI para los grupos alta (AE) y moderadamente (ME) expuestos a Mn de acuerdo con la metodología clásica: a) HQ_{inhalación}; b) HQ_{ingestión}; c) HQ_{dérmico}; d) HI_{aire} y e) HI_{total}.

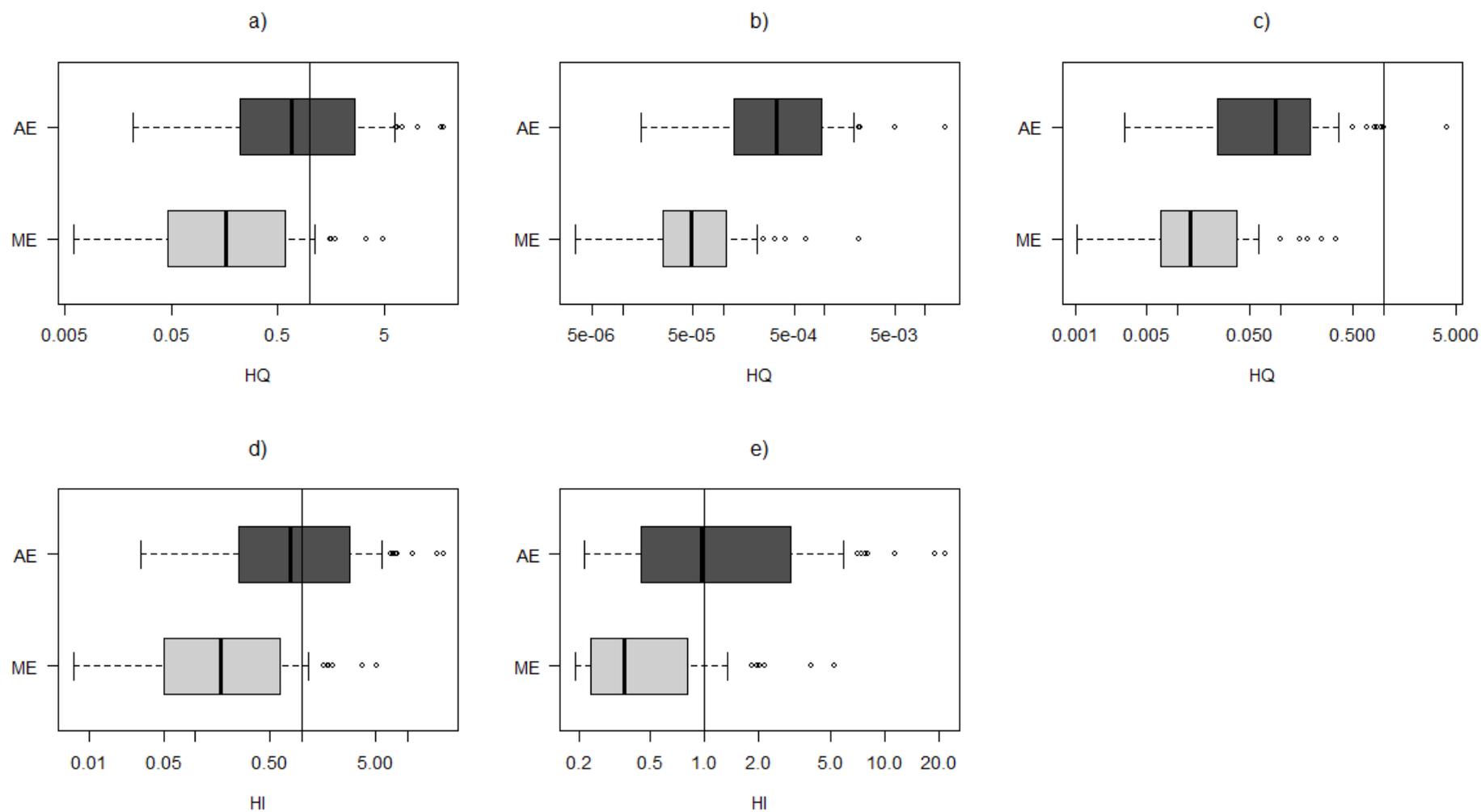


Figura 3.12. Diagrama de cajas y bigotes de los HQ y HI para los grupos alta (AE) y moderadamente (ME) expuestos a Mn de acuerdo con la metodología alternativa: a) HQ_{inhalación}; b) HQ_{ingestión}; c) HQ_{dérmico}; d) HI_{aire} y e) HI_{total}.

Por otro lado, el riesgo derivado de la exposición al Mn presente en el PM por contacto dérmico es variable a lo largo de la literatura. Por ejemplo, Fadel et al. (2022) reportan un $HQ_{\text{dérmico}}$ de 0,0002 frente al $HQ_{\text{inhalación}}$ de 0,0812 -0,1080 en Beirut (Líbano); Nie et al. (2018) obtienen un $HQ_{\text{dérmico}}$ de $1,03 \cdot 10^{-4}$ frente al $HQ_{\text{inhalación}}$ de 0,558 en Yangzhou (China), matizando además que hacen el cálculo empleando la concentración total de Mn en el aire ambiente a pesar de determinar la concentración bioaccesible como parte del estudio.

Hernández-Pellón et al. (2018) llevaron a cabo un muestreo estacionario en las dos áreas de estudio más relevantes de la presente Tesis Doctoral: en las inmediaciones de la fábrica de ferroaleaciones de Maliaño, y en otro punto de la bahía a 7 km de dicha fábrica, reportando concentraciones de Mn en PM_{10} de 901,1 ng/m^3 en Maliaño, que disminuyen notablemente en la zona de Santander (hasta 74,6 ng/m^3). Para el cálculo de riesgos, tuvieron en cuenta la concentración bioaccesible promedio (tanto en ALF como en Gamble) de esta campaña de muestreo (20 días consecutivos), obteniendo que el riesgo de efectos para la salud no carcinogénicos en las inmediaciones de la planta de ferroaleaciones era notablemente superior al valor umbral definido por la US EPA para todos los escenarios contemplados. Además, en el área más urbana, Santander, reportaron valores de HQ por encima del umbral para algunos escenarios de exposición específicos, lo que pone de manifiesto la necesidad de hacer un estudio más exhaustivo del riesgo asociado a la exposición a Mn en PM en la bahía de Santander. Por tanto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral suponen una mejora considerable de la literatura previa al basarse en el riesgo individualizado de los diferentes participantes.

Finalmente, se ha elaborado un mapa de riesgos individualizado de todos los participantes del estudio transversal siguiendo la metodología clásica, más conservadora (Figura 3.13). En verde se observan los $HI_{\text{total}} < 1$, valores seguros para la salud; y en una escala de amarillo a rojo aquellos $HI_{\text{total}} > 1$ que pueden derivar en efectos adversos a la salud.

Dado que la dirección predominante del viento en la zona de estudio es del suroeste, la pluma de dispersión del Mn en el aire da lugar a mayores concentraciones de Mn ligado a PM para los receptores situados al norte de la planta de ferroaleaciones, acarreado esto un mayor riesgo asociado a la exposición a Mn, tal como se observa en la Figura 3.13.

Estos resultados están de acuerdo con el estudio de Otero-Pregigueiro et al. (2018) donde se reportan niveles máximos de concentración de Mn ligado a PM_{10} en los alrededores de la planta de aleaciones de ferromanganeso, con niveles de concentración media diaria de hasta 5000 ng/m^3 en Maliaño (bajo condiciones de viento suroeste de intensidad moderada). Además, el modelo indica que la pluma de Mn se distribuye a lo largo de la bahía de Santander pudiendo resultar en niveles de concentración en torno a los 200 ng/m^3 (Otero-Pregigueiro et al., 2018).



Figura 3.13. Mapa de riesgos por exposición a Mn en función del domicilio de los participantes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

Conclusiones

La bioaccesibilidad de los metal(oid)es en polvo urbano (SRM1648a) se ha investigado utilizando diferentes fluidos (Gamble G₁ y G₂, ALF, gástrico y agua ultrapura) y relaciones L/S con el fin de proporcionar nuevos conocimientos que ayuden a comprender mejor la bioaccesibilidad de estos metal(oid)es en fluidos corporales, y permitan el desarrollo de un protocolo unificado para la evaluación de la bioaccesibilidad de PM inhalado. Los resultados mostraron una gran influencia de la composición del fluido pulmonar neutro (solución de Gamble) en la bioaccesibilidad de los metal(oid)es. Como era de esperar el tipo de agente de lixiviación (agua ultrapura, Gamble G₂, ALF y gástrico) influyó en la fracción soluble de los metal(oid)es: la mayoría de los metal(oid)es analizados alcanzaron la mayor bioaccesibilidad en ALF y la más baja en agua ultrapura. Cuando se compararon el fluido gástrico y Gamble G₂ a una relación L/S de 5000, se observaron valores de bioaccesibilidad similares para la mayoría de los metal(oid)es estudiados, a excepción del Pb y el Fe, concluyendo que la bioaccesibilidad de los metal(oid)es en las muestras de PM depende no sólo de la composición y el pH del fluido sintético, sino también de su especiación. Además, se vio que la bioaccesibilidad de los metal(oid)es para relaciones L/S de 500 a 20000 en ALF y en el fluido gástrico fue casi constante con la relación L/S; sin embargo, aumentó logarítmicamente con la relación L/S en Gamble G₂. Este comportamiento se atribuyó a los diferentes mecanismos de lixiviación de los metal(oid)es del material de referencia estudiado: en la solución de Gamble estaría controlada por la solubilidad, mientras que en el ALF y en el fluido gástrico estaría controlada por la disponibilidad.

En cuanto al estudio transversal, se midieron las concentraciones bioaccesibles y no bioaccesibles de Mn y otros metales en muestras de PM_{10-2,5} y PM_{2,5} de 130 participantes residentes en la Bahía de Santander. Los participantes se dicotomizaron en función de la exposición a Mn en alta y moderadamente expuestos en base a la distancia entre la residencia del voluntario y una planta de ferroaleaciones de Mn, considerada como la principal fuente industrial de Mn a la atmósfera en la zona de estudio. Los niveles más altos de Mn bioaccesible y no bioaccesibles de Mn en ambas fracciones de tamaño y de Fe bioaccesible en PM_{10-2,5} se obtuvieron en el grupo de población que vivía a menos de 1,5 km de la planta de aleación de Mn, con correlaciones negativas significativas entre los niveles de metal en el aire y la distancia a la fuente de Mn. La variabilidad de los niveles de metales observada en ambos grupos se atribuyó a los diferentes patrones que se produjeron durante el periodo de muestreo, como el tiempo pasado en el exterior y en el interior, las condiciones meteorológicas y las tasas de emisión de Mn. Además, los resultados mostraron que la mayor bioaccesibilidad del Mn (%) se encontró a mayores concentraciones de Mn total. Por lo tanto la población que vive en las proximidades de la industria de ferroaleaciones de Mn está expuesta a mayores concentraciones de Mn bioaccesible, lo que supone una mayor peligrosidad potencial para su salud. Esto ha sido además avalado a través de la determinación del índice de

peligrosidad (HI) para efectos perjudiciales para la salud no carcinogénicos siguiendo la metodología propuesta por la US EPA, siendo la ruta inhalatoria la que más contribuye al riesgo para la salud.

Entre los indicadores estudiados de la exposición al Mn, las concentraciones de Mn ligadas a las PM mostraron las mayores diferencias entre los altamente expuestos y los moderadamente expuestos, lo que pone de manifiesto la importancia de la vía de inhalación de la exposición al Mn procedente de las emisiones de la industria del ferromanganeso, como ha quedado confirmado en el estudio de evaluación de riesgos para la salud. Los mayores niveles de Mn en las uñas de las personas que viven cerca de la fuente de Mn, la correlación negativa significativa de dichos niveles con la distancia entre fuente y receptor ponderada por el viento, y las correlaciones positivas significativas entre el Mn en las uñas y todas las fracciones de PM (grueso y fino bioaccesible/no bioaccesible), lo confirman como el mejor biomarcador de la exposición a largo plazo al Mn, el principal contaminante en la Bahía de Santander según las directrices de la OMS.

Con respecto al Pb, Zn y Fe, su presencia en la zona de estudio también se atribuyó principalmente a la fábrica de ferroleaciones, sin embargo, no se pueden descartar otras fuentes de emisión cercanas, como una planta siderúrgica para el Pb, Zn y Fe y las emisiones no confinadas derivadas del tráfico rodado para el Zn y el Fe; además, el Zn y el Fe son oligoelementos esenciales que pueden entrar en el organismo por otras vías. Los resultados contradictorios mostrados aquí para los tres biomarcadores estudiados, principalmente para el Pb, indican las dificultades para interpretar los resultados cuando pueden darse diferentes fuentes ambientales de metal(oid)es y rutas de exposición a los mismos. Por último, este estudio también confirmó que los niveles actuales de Pb en sangre, incluso en una zona mixta urbano-industrial, son mucho más bajos que en décadas anteriores.

En definitiva, esta tesis doctoral ha permitido avanzar en el conocimiento sobre la evaluación de la exposición a determinados metal(oid)es presentes en el PM, a través de la relación entre la bioaccesibilidad de los mismos en el PM inhalado y sus niveles en biomarcadores de exposición. Como trabajo futuro queda profundizar en los mecanismos de toxicidad de esos componentes del PM que tras ser inhalados acaban alcanzando distintos fluidos corporales provocando fundamentalmente estrés oxidativo e inflamación. En este sentido, el estudio de otros parámetros que tengan en cuenta la capacidad de los componentes del PM de generar especies reactivas de oxígeno, y por tanto de alterar el balance de oxidantes y antioxidantes, como puede ser la determinación del potencial oxidativo, tanto de la fracción bioaccesible como de la no bioaccesible del PM, se recomienda para dar continuidad al trabajo de investigación presentado.

Conclusions

The bioaccessibility of metal(loid)s in urban dust (SRM1648a) has been investigated using different fluids (Gamble G₁ and G₂, ALF, gastric and ultrapure water) and L/S ratios in order to provide new insights that will help to better understand the bioaccessibility of these metal(loid)s in body fluids, and to allow the development of a unified protocol for the assessment of inhaled PM bioaccessibility. The results showed a strong influence of the composition of the neutral lung fluid (Gamble's solution) on the bioaccessibility of the metal(loid)s. As expected the type of leaching fluid (ultrapure water, Gamble G₂, ALF and gastric) influenced the soluble fraction of the metal(loid)s: most of the analysed metal(loid)s reached the highest bioaccessibility in ALF and the lowest in ultrapure water. When gastric fluid and Gamble G₂ were compared at a L/S ratio of 5000, similar bioaccessibility values were observed for most of the metal(loid)s studied, with the exception of Pb and Fe, concluding that the bioaccessibility of metal(loid)s in PM samples depends not only on the composition and pH of the synthetic fluid, but also on their speciation. Furthermore, it was seen that the bioaccessibility of metal(loid)s for L/S ratios from 500 to 20000 in ALF and gastric fluid was almost constant with L/S ratio; however, it increased logarithmically with L/S ratio in Gamble G₂. This behaviour was attributed to the different leaching mechanisms of the metal(loid)s from the reference material studied: solubility-controlled in Gamble solution, and availability-controlled in ALF and gastric fluid.

Regarding the cross-sectional study, bioaccessible and non-bioaccessible concentrations of Mn and other metals were measured in PM_{10-2.5} and PM_{2.5} samples from 130 participants residing in Santander Bay. Participants were dichotomized according to Mn exposure into high and moderately exposed based on the distance between the volunteer's residence and a Mn ferroalloy plant, considered to be the main industrial source of airborne Mn in the study area. The highest levels of bioaccessible and non-bioaccessible Mn in both size fractions and bioaccessible Fe in PM_{10-2.5} were obtained in the population group living within 1.5 km of the Mn alloy plant, with significant negative correlations between airborne metal levels and distance to the Mn source. The variability of metal levels observed in both groups was attributed to the different patterns that occurred during the sampling period, such as time spent outdoors and indoors, weather conditions, and Mn emission rates. Furthermore, the results showed that the highest Mn bioaccessibility (%) was found at higher concentrations of total Mn. Therefore, the population living in the vicinity of the Mn ferroalloy industry is exposed to higher concentrations of bioaccessible Mn, which poses a higher potential hazard to their health. This has been further supported through the determination of the hazard index (HI) for non-carcinogenic adverse health effects following the methodology proposed by the US EPA, with the inhalation route contributing most to the health risk.

Among the studied markers of Mn exposure, PM-bound Mn showed the greatest differences between the highly exposed and moderately exposed groups, highlighting the importance of the

inhalation route of Mn exposure from ferromanganese industry emissions, as confirmed by the health risk assessment study. The higher levels of Mn in the fingernails of people living close to the Mn source, the significant negative correlation of these levels with the wind-weighted source-receptor distance, and the significant positive correlations between Mn in fingernails and all PM fractions (coarse and fine bioaccessible/non-bioaccessible), confirm it as the best biomarker of long-term exposure to Mn, the main pollutant in Santander Bay according to WHO guidelines.

With respect to Pb, Zn and Fe, their presence in the study area was also mainly attributed to the ferroalloy factory, however, other nearby emission sources cannot be ruled out, such as a steel plant for Pb, Zn and Fe and non-exhaust road traffic emissions for Zn and Fe; moreover, Zn and Fe are essential trace elements that can enter the organism by other routes. The contradictory results shown here for these three biomarkers, mainly for Pb, indicate the difficulties in interpreting the results when different environmental sources of metal(loid)s and routes of exposure to them may occur. Finally, this study also confirmed that current blood Pb levels, even in a mixed urban-industrial area, are much lower than in previous decades.

In summary, this Doctoral Thesis has contributed to the knowledge on the evaluation of exposure to certain metal(loid)s present in PM, through the relationship between their bioaccessibility in inhaled PM and their levels in biomarkers of exposure. Future work should focus on the mechanisms of toxicity of these components in PM that, after being inhaled, end up reaching different body fluids, mainly triggering oxidative stress and inflammation. In this sense, the study of other parameters that consider the capacity of PM components to generate reactive oxygen species, and therefore to alter the balance of oxidants and antioxidants, such as the determination of the oxidative potential of both the bioaccessible and non-bioaccessible fractions of PM, is recommended to give continuity to the research work presented.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Abdulaziz, M., Alshehri, A., Yadav, I.C., Badri, H., 2022. Pollution level and health risk assessment of heavy metals in ambient air and surface dust from Saudi Arabia: a systematic review and meta-analysis. *Air Quality, Atmosphere and Health* 15, 799-810. <https://doi.org/10.1007/s11869-022-01176-1>
- AENOR, 2015. UNE EN 12341. Aire ambiente. Método de medición gravimétrico normalizado para la determinación de la concentración másica PM10 o PM2,5 de la materia particulada en suspensión.
- AENOR, 2006. UNE EN 14902. Calidad del aire ambiente. Método normalizado para la medida de Pb, Cd, As y Ni en la fracción PM10 de la materia particulada en suspensión.
- AENOR, 1999. UNE EN 12341. Calidad del aire. Determinación de la fracción PM10 de la materia particulada en suspensión. Método de referencia y procedimiento de ensayo de campo para demostrar la equivalencia de los métodos de medida al de referencia.
- Aguilera, A., Cortés, J.L., Delgado, C., Aguilar, Y., Aguilar, D., Cejudo, R., Quintana, P., Goguitchaichvili, A., Bautista, F., 2022. Heavy Metal Contamination (Cu, Pb, Zn, Fe, and Mn) in Urban Dust and its Possible Ecological and Human Health Risk in Mexican Cities. *Frontiers in Environmental Science* 10, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.854460>
- Al-Harbi, M., Alhajri, I., Whalen, J.K., 2021. Characteristics and health risk assessment of heavy metal contamination from dust collected on household HVAC air filters. *Chemosphere* 277, 130276. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130276>
- Amato, F., Querol, X., Johansson, C., Nagl, C., Alastuey, A., 2010. A review on the effectiveness of street sweeping, washing and dust suppressants as urban PM control methods. *Science of the Total Environment* 408, 3070-3084. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.025>
- Amin, N.S.S.M., Azid, A., Sani, S.M.A., Yusof, K.M.K., Ku, Samsudin, M.S., Rani, N.L.A., Khalit, S.I., 2018. Heavy metals in the air: Analysis using Instrument, air pollution and human health-a review. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 14, 490-494. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v14n4.967>
- Apostoli, P., Baj, A., Bavazzano, P., Ganzi, A., Neri, G., Ronchi, A., Soleo, L., Di Lorenzo, L., Spinelli, P., Valente, T., Minoia, C., 2002. Blood lead reference values: The results of an Italian polycentric study. *Science of the Total Environment* 287, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00975-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00975-5)
- Arruti, A., Fernández-Olmo, I., Irabien, A., 2011. Regional evaluation of particulate matter composition in an Atlantic coastal area (Cantabria region, northern Spain): Spatial variations

- in different urban and rural environments. *Atmospheric Research* 101, 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2011.03.001>
- Arruti, A., Fernández-Olmo, I., Irabien, Á., 2010. Evaluation of the contribution of local sources to trace metals levels in urban PM_{2.5} and PM₁₀ in the Cantabria region (Northern Spain). *Journal of Environmental Monitoring* 12, 1451-1458. <https://doi.org/10.1039/b926740a>
- Aschner, J.L., Aschner, M., 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 353-362. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.003>
- Aschner, M., Guilarte, T.R., Schneider, J.S., Zheng, W., 2007. Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.001>
- Ashrap, P., Watkins, D.J., Mukherjee, B., Boss, J., Richards, M.J., Rosario, Z., Vélez-Vega, C.M., Alshwabkeh, A., Cordero, J.F., Meeker, J.D., 2020. Predictors of urinary and blood Metal(loid) concentrations among pregnant women in Northern Puerto Rico. *Environmental Research* 183, 109178. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109178>
- Ashrap, P., Watkins, D.J., Mukherjee, B., Rosario-Pabón, Z., Vélez-Vega, C.M., Alshwabkeh, A., Cordero, J.F., Meeker, J.D., 2021. Performance of urine, blood, and integrated metal biomarkers in relation to birth outcomes in a mixture setting. *Environmental Research* 200. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111435>
- ATSDR, 2019. Módulo II. Rutas de exposición. Notas para la instrucción [WWW Document]. URL https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/2/es_lecturenotes.html#anchor_1554755638669 (accedido 11.24.21).
- Bäckström, M., Nilsson, U., Häkansson, K., Allard, B., Karlsson, S., 2003. Speciation of heavy metals in road runoff and roadside total deposition. *Water, Air, and Soil Pollution* 147, 343-366. <https://doi.org/10.1023/A:1024545916834>
- Bader, M., Dietz, M.C., Ihrig, A., Triebig, G., 1999. Biomonitoring of manganese in blood, urine and axillary hair following low-dose exposure during the manufacture of dry cell batteries. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 72, 521-527. <https://doi.org/10.1007/s004200050410>
- Barbosa, F., Tanus-Santos, J.E., Gerlach, R.F., Parsons, P.J., 2005. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations, and future needs. *Environmental Health Perspectives* 113, 1669-1674. <https://doi.org/10.1289/ehp.7917>
- Batáriová, A., Spěváčková, V., Beneš, B., Čejchanová, M., Šmíd, J., Černá, M., 2006. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed

- reference values. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209, 359-366.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.02.005>
- Bates, J.T., Fang, T., Verma, V., Zeng, L., Weber, R.J., Tolbert, P.E., Abrams, J.Y., Sarnat, S.E., Klein, M., Mulholland, J.A., Russell, A.G., 2019. Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environmental Science and Technology* 53, 4003-4019.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430>
- Bates, J.T., Weber, R.J., Abrams, J., Verma, V., Fang, T., Klein, M., Strickland, M.J., Sarnat, S.E., Chang, H.H., Mulholland, J.A., Tolbert, P.E., Russell, A.G., 2015. Reactive Oxygen Species Generation Linked to Sources of Atmospheric Particulate Matter and Cardiorespiratory Effects. *Environmental Science and Technology* 49, 13605-13612.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02967>
- Bauer, J.A., Devick, K.L., Bobb, J.F., Coull, B.A., Bellinger, D., Benedetti, C., Cagna, G., Fedrigli, C., Guazzetti, S., Oppini, M., Placidi, D., Webster, T.F., White, R.F., Yang, Q., Zoni, S., Wright, R.O., Smith, D.R., Lucchini, R.G., Henn, B.C., 2020. Associations of a metal mixture measured in multiple biomarkers with IQ: Evidence from italian adolescents living near ferroalloy industry. *Environmental Health Perspectives* 128, 097002-1-097002-12. <https://doi.org/10.1289/EHP6803>
- Becker, K., Schulz, C., Kaus, S., Seiwert, M., Seifert, B., 2003. German Environmental Survey 1998 (GerES III): Environmental pollutants in the urine of the German population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 206, 15-24.
<https://doi.org/10.1078/1438-4639-00188>
- Berlinger, B., Ellingsen, D.G., Náray, M., Záray, G., Thomassen, Y., 2008. A study of the bio-accessibility of welding fumes. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1448-1453.
<https://doi.org/10.1039/b806631k>
- Blondet, I., Schreck, E., Viers, J., Casas, S., Jubany, I., Bahí, N., Zouiten, C., Dufréchou, G., Freydier, R., Galy-Lacaux, C., Martínez-Martínez, S., Faz, A., Soriano-Disla, M., Acosta, J.A., Darrozes, J., 2019. Atmospheric dust characterisation in the mining district of Cartagena-La Unión, Spain: Air quality and health risks assessment. *Science of the Total Environment* 693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.302>
- Bocca, B., Madeddu, R., Asara, Y., Tolu, P., Marchal, J.A., Forte, G., 2011. Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 25, 19-26.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.12.004>

- Boente, C., Martín-Méndez, I., Bel-Lán, A., Gallego, J.R., 2020. A novel and synergistic geostatistical approach to identify sources and cores of Potentially Toxic Elements in soils: An application in the region of Cantabria (Northern Spain). *Journal of Geochemical Exploration* 208, 106397. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.106397>
- Boisa, N., Elom, N., Dean, J.R., Deary, M.E., Bird, G., Entwistle, J.A., 2014. Development and application of an inhalation bioaccessibility method (IBM) for lead in the PM10 size fraction of soil. *Environment International* 70, 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.021>
- Borowska, S., Brzóska, M.M., 2015. Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology* 35, 551-572. <https://doi.org/10.1002/jat.3129>
- Bouchard, M.F., Sauvé, S., Barbeau, B., Legrand, M., Brodeur, M.È., Bouffard, T., Limoges, E., Bellinger, D.C., Mergler, D., 2011. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environmental Health Perspectives* 119, 138-143. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002321>
- Bowler, R.M., Kornblith, E.S., Gocheva, V. V., Colledge, M.A., Bollweg, G., Kim, Y., Beseler, C.L., Wright, C.W., Adams, S.W., Lobdell, D.T., 2015. Environmental exposure to manganese in air: Associations with cognitive functions. *NeuroToxicology* 49, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.06.004>
- Bradl, H.B., 2005. Sources and origins of heavy metals, en: *Interface Science and Technology*. pp. 1-27. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(05\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(05)80020-1)
- Butler, L., Gennings, C., Peli, M., Borgese, L., Placidi, D., Zimmerman, N., Hsu, H.H.L., Coull, B.A., Wright, R.O., Smith, D.R., Lucchini, R.G., Claus Henn, B., 2019. Assessing the contributions of metals in environmental media to exposure biomarkers in a region of ferroalloy industry. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 29, 674-687. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0081-6>
- Caboche, J., Perdrix, E., Malet, B., Alleman, L.Y., 2011. Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 621-630. <https://doi.org/10.1039/c0em00439a>
- Calas, A., Uzu, G., Martins, J.M.F., Voisin, Di., Spadini, L., Lacroix, T., Jaffrezo, J.L., 2017. The importance of simulated lung fluid (SLF) extractions for a more relevant evaluation of the oxidative potential of particulate matter. *Scientific Reports* 7, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11979-3>
- Cañas, A.I., Cervantes-Amat, M., Esteban, M., Ruiz-Moraga, M., Pérez-Gómez, B., Mayor, J., Castaño, A., Aleixandre, J.L., Aragonés, N., Bartolomé, M., Calvo, E., Cortés, M. V.,

- Cutanda, F., Huetos, O., Jiménez, J.A., López-Abente, G., López-Herranz, A., Méndez, C.F., Molina, M.A., Navarro, C., Pastor, R., Pollán, M., Román, J., Sánchez, J., 2014. Blood lead levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENT.ES project. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217, 452-459. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.09.001>
- Centro de Investigación del Medio Ambiente, 2022. Red de Control y Vigilancia de la Calidad del Aire de Cantabria [WWW Document]. URL <https://airecantabria.com/> (accedido 6.24.22).
- Černá, M., Krsková, A., Čejchanová, M., Spěváčková, V., 2012. Human biomonitoring in the Czech Republic: An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.09.007>
- Cesaroni, G., Forastiere, F., Stafoggia, M., Andersen, Z.J., Badaloni, C., Beelen, R., Caracciolo, B., De Faire, U., Erbel, R., Eriksen, K.T., Fratiglioni, L., Galassi, C., Hampel, R., Heier, M., Hennig, F., Hilding, A., Hoffmann, B., Houthuijs, D., Jöckel, K.H., Korek, M., Lanki, T., Leander, K., Magnusson, P.K.E., Migliore, E., Ostenson, C.G., Overvad, K., Pedersen, N.L., Pekkanen, J.J., Penell, J., Pershagen, G., Pyko, A., Raaschou-Nielsen, O., Ranzi, A., Ricceri, F., Sacerdote, C., Salomaa, V., Swart, W., Turunen, A.W., Vineis, P., Weinmayr, G., Wolf, K., De Hoogh, K., Hoek, G., Brunekreef, B., Peters, A., 2014. Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: Prospective cohort study and meta-analysis in 11 european cohorts from the escape project. *BMJ (Online)* 348, 1-16. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7412>
- Charrier, J.G., Anastasio, C., 2015. Rates of Hydroxyl Radical Production from Transition Metals and Quinones in a Surrogate Lung Fluid. *Environmental Science and Technology* 49, 9317-9325. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01606>
- Charrier, J.G., McFall, A.S., Richards-Henderson, N.K., Anastasio, C., 2014. Hydrogen peroxide formation in a surrogate lung fluid by transition metals and quinones present in particulate matter. *Environmental Science and Technology* 48, 7010-7017. <https://doi.org/10.1021/es501011w>
- Chen, B., Stein, A.F., Castell, N., de la Rosa, J.D., Sanchez de la Campa, A.M., Gonzalez-Castanedo, Y., Draxler, R.R., 2012. Modeling and surface observations of arsenic dispersion from a large Cu-smelter in southwestern Europe. *Atmospheric Environment* 49, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.12.014>
- Coelho, P., Costa, S., Costa, C., Silva, S., Walter, A., Ranville, J., Pastorinho, M.R., Harrington, C., Taylor, A., Dall'Armi, V., Zoffoli, R., Candeias, C., da Silva, E.F., Bonassi, S., Laffon, B., Teixeira, J.P., 2014. Biomonitoring of several toxic metal(loid)s in different biological

- matrices from environmentally and occupationally exposed populations from Panasqueira mine area, Portugal. *Environmental Geochemistry and Health* 36, 255-269. <https://doi.org/10.1007/s10653-013-9562-7>
- Coetzee, D.J., McGovern, P.M., Rao, R., Harnack, L.J., Georgieff, M.K., Stepanov, I., 2016. Measuring the impact of manganese exposure on children's neurodevelopment: Advances and research gaps in biomarker-based approaches. *Environmental Health* 15, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0174-4>
- Colombo, C., Monhemius, A.J., Plant, J.A., 2008. Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 722-730. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.011>
- Comisión Europea, 2014. Non-exhaust traffic related emissions. Brake and tyre wear PM, JRC Science and Policy Reports. <https://doi.org/10.2790/21481>
- Cordier, S., Chevrier, C., Robert-Gnansia, E., Lorente, C., Brula, P., Hours, M., 2004. Risk of congenital anomalies in the vicinity of municipal solid waste incinerators. *Occupational and Environmental Medicine* 61, 8-15.
- Dahmardeh Behrooz, R., Kaskaoutis, D.G., Grivas, G., Mihalopoulos, N., 2021. Human health risk assessment for toxic elements in the extreme ambient dust conditions observed in Sistan, Iran. *Chemosphere* 262, 127835. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127835>
- Davourie, J., Westfall, L., Ali, M., McGough, D., 2017. Evaluation of particulate matter emissions from manganese alloy production using life-cycle assessment. *NeuroToxicology* 58, 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.09.015>
- Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., Feidt, C., 2012. In vivo validation of the unified BARGE method to assess the bioaccessibility of arsenic, antimony, cadmium, and lead in soils. *Environmental Science and Technology* 46, 6252-6260. <https://doi.org/10.1021/es3006942>
- Deshommes, E., Tardif, R., Edwards, M., Sauvé, S., Prévost, M., 2012. Experimental determination of the oral bioavailability and bioaccessibility of lead particles. *Chemistry Central Journal* 6. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-138>
- Drexler, J.W., Brattin, W.J., 2007. An in vitro procedure for estimation of lead relative bioavailability: With validation. *Human and Ecological Risk Assessment* 13, 383-401. <https://doi.org/10.1080/10807030701226350>
- Du, W., Chen, Y., Zhu, X., Zhong, Q., Zhuo, S., Liu, W., Huang, Y., Shen, G., Tao, S., 2018. Wintertime air pollution and health risk assessment of inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in rural China. *Atmospheric Environment* 191, 1-8.

- <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.07.054>
- Eastman, R.R., Jursa, T.P., Benedetti, C., Lucchini, R.G., Smith, D.R., 2013. Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. *Environmental Science and Technology* 47, 1629-1637. <https://doi.org/10.1021/es3035297>
- EEA, 2021. Heavy metal emissions in Europe [WWW Document]. URL <https://www.eea.europa.eu/ims/heavy-metal-emissions-in-europe> (accedido 12.2.21).
- EEA, 2020. Air quality in Europe. 2020 report, Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2800/786656>
- EEA, 2018. European Union emission inventory report 1990-2016 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP), Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2800/571876>
- Eidson, A.F., Mewhinney, J.A., 1983. In vitro dissolution of respirable aerosols of industrial uranium and plutonium mixed-oxide nuclear fuels. *Health Physics* 45, 1023-1037. <https://doi.org/10.1097/00004032-198312000-00001>
- Ellingsen, D.G., Hetland, S.M., Thomassen, Y., 2003. Manganese air exposure assessment and biological monitoring in the manganese alloy production industry. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 84-90. <https://doi.org/10.1039/b209095c>
- European Pharmacopoeia, 2010. Recommendations on methods for dosage forms testing. *Farmacopea Europea* 727-729.
- Expósito, A., Markiv, B., Ruiz-Azcona, L., Santibáñez, M., Fernández-Olmo, I., 2021. Understanding how methodological aspects affect the release of trace metal(loid)s from urban dust in inhalation bioaccessibility tests. *Chemosphere* 267, 129181. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129181>
- Fadel, M., Ledoux, F., Afif, C., Courcot, D., 2022. Human health risk assessment for PAHs, phthalates, elements, PCDD/Fs, and DL-PCBs in PM_{2.5} and for NMVOCs in two East-Mediterranean urban sites under industrial influence. *Atmospheric Pollution Research* 13. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2021.101261>
- Falq, G., Zeghnoun, A., Pascal, M., Vernay, M., Le Strat, Y., Garnier, R., Olichon, D., Bretin, P., Castetbon, K., Fréry, N., 2011. Blood lead levels in the adult population living in France the French Nutrition and Health Survey (ENNS 2006-2007). *Environment International* 37, 565-571. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.012>
- Fernández-Olmo, I., Mantecón, P., Markiv, B., Ruiz-Azcona, L., Santibáñez, M., 2021. A review on the environmental exposure to airborne manganese, biomonitoring, and

- neurological/neuropsychological outcomes, en: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. pp. 85-130. https://doi.org/10.1007/398_2020_46
- Fernández-Olmo, I., Markiv, B., Santibáñez, M., 2019. A protocol to assess the bioaccessibility of particulate matter-bound metals, en: *ANQUE-ICCE-2019*. p. 178.
- Fernández-Olmo, I., Puente, M., Irabien, A., 2015. A comparative study between the fluxes of trace elements in bulk atmospheric deposition at industrial, urban, traffic, and rural sites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 13427-13441. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4562-z>
- Ferreira, A.P.S. da S., Pereira, E.C., Salles, F.J., Silva, F.F. da, Batista, B.L., Handakas, E., Olympio, K.P.K., 2019. Home-based and informal work exposes the families to high levels of potentially toxic elements. *Chemosphere* 218, 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.083>
- Freeland-Graves, J.H., Bales, C.W., Behmardi, F., 1987. Manganese requirements of humans. *American Chemistry Society* 90-104. <https://doi.org/10.1021/bk-1987-0354.ch009>
- Freire, C., Koifman, R.J., Fujimoto, D., de Oliveira Souza, V.C., Barbosa, F., Koifman, S., 2015. Reference values of cadmium, arsenic and manganese in blood and factors associated with exposure levels among adult population of Rio Branco, Acre, Brazil. *Chemosphere* 128, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.083>
- Fulk, F., Haynes, E.N., Hilbert, T.J., Brown, D., Petersen, D., Reponen, T., 2016. Comparison of stationary and personal air sampling with an air dispersion model for children's ambient exposure to manganese. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 26, 494-502. <https://doi.org/10.1038/jes.2016.30>
- Fulk, F., Succop, P., Hilbert, T.J., Beidler, C., Brown, D., Reponen, T., Haynes, E.N., 2017. Pathways of inhalation exposure to manganese in children living near a ferromanganese refinery: A structural equation modeling approach. *Science of the Total Environment* 579, 768-775. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.030>
- Gao, P., Guo, H., Zhang, Z., Ou, C., Hang, J., Fan, Q., He, C., Wu, B., Feng, Y., Xing, B., 2018. Bioaccessibility and exposure assessment of trace metals from urban airborne particulate matter (PM10 and PM2.5) in simulated digestive fluid. *Environmental Pollution* 242, 1669-1677. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.109>
- Gentry, P.R., Van Landingham, C., Fuller, W.G., Sulsky, S.I., Greene, T.B., Clewell, H.J., Andersen, M.E., Roels, H.A., Taylor, M.D., Keene, A.M., 2017. A tissue dose-based comparative exposure assessment of manganese using physiologically based pharmacokinetic modeling—The importance of homeostatic control for an essential metal.

- Toxicology and Applied Pharmacology 322, 27-40.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.02.015>
- Goix, S., Lévêque, T., Xiong, T.T., Schreck, E., Baeza-Squiban, A., Geret, F., Uzu, G., Austruy, A., Dumat, C., 2014. Environmental and health impacts of fine and ultrafine metallic particles: Assessment of threat scores. *Environmental Research* 133, 185-194.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.05.015>
- González-Antuña, A., Camacho, M., Henríquez-Hernández, L.A., Boada, L.D., Almeida-González, M., Zumbado, M., Luzardo, O.P., 2017. Simultaneous quantification of 49 elements associated to e-waste in human blood by ICP-MS for routine analysis. *MethodsX* 4, 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.10.001>
- Gosselin, M., Zagury, G.J., 2020. Metal(loid)s inhalation bioaccessibility and oxidative potential of particulate matter from chromated copper arsenate (CCA)-contaminated soils. *Chemosphere* 238, 124557. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124557>
- Graney, J.R., Landis, M.S., Norris, G.A., 2004. Concentrations and solubility of metals from indoor and personal exposure PM_{2.5} samples. *Atmospheric Environment* 38, 237-247.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.09.052>
- Grange, S.K., 2014. Technical note: Averaging wind speeds and directions.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3349.2006>
- Gray, J.E., Plumlee, G.S., Morman, S.A., Higuera, P.L., Crock, J.G., Lowers, H.A., Witten, M.L., 2010. In vitro studies evaluating leaching of mercury from mine waste calcine using simulated human body fluids. *Environmental Science and Technology* 44, 4782-4788.
<https://doi.org/10.1021/es1001133>
- Guney, M., Bourges, C.M.J., Chapuis, R.P., Zagury, G.J., 2017. Lung bioaccessibility of As, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn in fine fraction (< 20 µm) from contaminated soils and mine tailings. *Science of the Total Environment* 579, 378-386.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.086>
- Guney, M., Chapuis, R.P., Zagury, G.J., 2016. Lung bioaccessibility of contaminants in particulate matter of geological origin. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 24422-24434. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6623-3>
- Guro, K.C., Aschner, M., Smith, D.R., Mukhopadhyay, S., 2022. Role of excretion in manganese homeostasis and neurotoxicity: a historical perspective. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 322, G79-G92.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00299.2021>
- Gustafsson, J.P., 2013. Visual MINTEQ. A free equilibrium speciation model [WWW

- Document]. URL <https://vminteq.lwr.kth.se/> (accedido 9.3.21).
- Hagino, H., Oyama, M., Sasaki, S., 2016. Laboratory testing of airborne brake wear particle emissions using a dynamometer system under urban city driving cycles. *Atmospheric Environment* 131, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.02.014>
- Harris, W.R., Sllberman, D., 1983. Time-Dependent Leaching of Coal Fly Ash by Chelating Agents. *Environmental Science and Technology* 17, 139-145. <https://doi.org/10.1021/es00109a004>
- Hassani, H., Golbabaee, F., Shirkhanloo, H., Tehrani-Doust, M., 2016. Relations of biomarkers of manganese exposure and neuropsychological effects among welders and ferroalloy smelters. *Industrial Health* 54, 79-86. <https://doi.org/10.2486/indhealth.2014-0250>
- Haynes, E.N., Heckel, P., Ryan, P., Roda, S., Leung, Y.K., Sebastian, K., Succop, P., 2010. Environmental manganese exposure in residents living near a ferromanganese refinery in Southeast Ohio: A pilot study. *NeuroToxicology* 31, 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.10.011>
- Haynes, E.N., Ryan, P., Chen, A., Brown, D., Roda, S., Kuhnell, P., Wittberg, D., Terrell, M., Reponen, T., 2012. Assessment of personal exposure to manganese in children living near a ferromanganese refinery. *Science of the Total Environment* 427-428, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.037>
- Haynes, E.N., Sucharew, H., Kuhnell, P., Alden, J., Barnas, M., Wright, R.O., Parsons, P.J., Aldous, K.M., Praamsma, M.L., Beidler, C., Dietrich, K.N., 2015. Manganese exposure and neurocognitive outcomes in rural school-age children: The communities actively researching exposure study (Ohio, USA). *Environmental Health Perspectives* 123, 1066-1071. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408993>
- HBM Commission, 2015. Reference and HBM Values [WWW Document]. URL <https://www.umweltbundesamt.de/en/topics/health/commissions-working-groups/human-biomonitoring-commission/reference-hbm-values> (accedido 5.3.21).
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 125-140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Heitland, P., Köster, H.D., 2006. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 20, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2006.08.001>
- Henríquez-Hernández, L.A., Boada, L.D., Carranza, C., Pérez-Arellano, J.L., González-Antuña, A., Camacho, M., Almeida-González, M., Zumbado, M., Luzardo, O.P., 2017. Blood levels

- of toxic metals and rare earth elements commonly found in e-waste may exert subtle effects on hemoglobin concentration in sub-Saharan immigrants. *Environment International* 109, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.08.023>
- Henríquez-Hernández, L.A., González-Antuña, A., Boada, L.D., Carranza, C., Pérez-Arellano, J.L., Almeida-González, M., Camacho, M., Zumbado, M., Fernández-Fuertes, F., Tapia-Martín, M., Luzardo, O.P., 2018. Pattern of blood concentrations of 47 elements in two populations from the same geographical area but with different geological origin and lifestyles: Canary Islands (Spain) vs. Morocco. *Science of the Total Environment* 636, 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.311>
- Hernández-Pellón, A., Fernández-Olmo, I., 2019a. Using multi-site data to apportion PM-bound metal(loid)s: Impact of a manganese alloy plant in an urban area. *Science of the Total Environment* 651, 1476-1488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.261>
- Hernández-Pellón, A., Fernández-Olmo, I., 2019b. Airborne concentration and deposition of trace metals and metalloids in an urban area downwind of a manganese alloy plant. *Atmospheric Pollution Research* 10, 712-721. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2018.11.009>
- Hernandez-Pellón, A., Fernandez-Olmo, I., Ledoux, F., Courcot, L., Courcot, D., 2017. Characterization of manganese-bearing particles in the vicinities of a manganese alloy plant. *Chemosphere* 175, 411-424. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.056>
- Hernández-Pellón, A., Nischkauer, W., Limbeck, A., Fernández-Olmo, I., 2018. Metal(loid) bioaccessibility and inhalation risk assessment: A comparison between an urban and an industrial area. *Environmental Research* 165, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.04.014>
- Hleis, D., Fernández-Olmo, I., Ledoux, F., Kfoury, A., Courcot, L., Desmonts, T., Courcot, D., 2013. Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant. *Journal of Hazardous Materials* 250-251, 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.080>
- INE, 2021. Cantabria: Población por municipios y sexo. (2893) [WWW Document]. URL <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=2893&L=0> (accedido 12.14.21).
- IRIS US EPA, 1998. Manganese (CASRN 7439-96-5). [WWW Document]. URL https://iris.epa.gov/static/pdfs/0373_summary.pdf (accedido 12.28.21)
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7, 60-72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Jefatura del Estado, 2018. Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos

- Personales y garantía de los derechos digitales, Boletín Oficial del Estado.
<https://doi.org/10.2307/j.ctv17hm980.5>
- Jiang, Y., Zheng, W., Long, L., Zhao, W., Li, X., Mo, X., Lu, J., Fu, X., Li, W., Liu, S., Long, Q., Huang, J., Pira, E., 2007. Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: Search for biomarkers of manganese exposure. *NeuroToxicology* 28, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.08.005>
- Johansson, C., Norman, M., Burman, L., 2009. Road traffic emission factors for heavy metals. *Atmospheric Environment* 43, 4681-4688. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.024>
- Jursa, T., Stein, C.R., Smith, D.R., 2018. Determinants of Hair Manganese, lead, cadmium and arsenic levels in environmentally exposed children. *Toxics* 6, 12-14. <https://doi.org/10.3390/toxics6020019>
- Kastury, F., Smith, E., Juhasz, A.L., 2017. A critical review of approaches and limitations of inhalation bioavailability and bioaccessibility of metal(loid)s from ambient particulate matter or dust. *Science of the Total Environment* 574, 1054-1074. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.056>
- Kastury, F., Smith, E., Karna, R.R., Scheckel, K.G., Juhasz, A.L., 2018a. An inhalation-ingestion bioaccessibility assay (IIBA) for the assessment of exposure to metal(loid)s in PM10. *Science of the Total Environment* 631-632, 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.337>
- Kastury, F., Smith, E., Karna, R.R., Scheckel, K.G., Juhasz, A.L., 2018b. Methodological factors influencing inhalation bioaccessibility of metal(loid)s in PM2.5 using simulated lung fluid. *Environmental Pollution* 241, 930-937. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.094>
- Kelly, F.J., Fussell, J.C., 2012. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment* 60, 504-526. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>
- Kim, G., Lee, H.S., Bang, J.S., Kim, B., Ko, D., Yang, M., 2015. A current review for biological monitoring of manganese with exposure, susceptibility, and response biomarkers. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 33, 229-254. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1030530>
- Kim, H.J., Lim, H.S., Lee, K.R., Choi, M.H., Kang, N.M., Lee, C.H., Oh, E.J., Park, H.K., 2017. Determination of trace metal levels in the general population of Korea. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070702>
- Klaassen, C.D., 1974. Biliary excretion of manganese in rats, rabbits, and dogs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 29, 458-468. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(74\)90117-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(74)90117-3)

- Klepeis, N.E., Gabel, E.B., Ott, W.R., Switzer, P., 2009. Outdoor air pollution in close proximity to a continuous point source. *Atmospheric Environment* 43, 3155-3167. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.03.056>
- Kosson, D.S., Van Der Sloot, H.A., Eighmy, T.T., 1996. An approach for estimation of contaminant release during utilization and disposal of municipal waste combustion residues, *Journal of Hazardous Materials*. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(95\)00109-3](https://doi.org/10.1016/0304-3894(95)00109-3)
- Krupnova, T.G., Rakova, O. V., Bondarenko, K.A., Saifullin, A.F., Popova, D.A., Potgieter-Vermaak, S., Godoi, R.H.M.M., 2021. Elemental composition of PM_{2.5} and PM₁₀ and health risks assessment in the industrial districts of Chelyabinsk, South Ural Region, Russia, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312354>
- Kuklina, I., Kouba, A., Buřič, M., Horká, I., Ďuriš, Z., Kozák, P., 2014. Accumulation of heavy metals in crayfish and fish from selected czech reservoirs. *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/306103>
- Kuno, R., Roquetti, M.H., Becker, K., Seiwert, M., Gouveia, N., 2013. Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216, 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.05.010>
- Laird, B.D., Weiseth, B., Packull-McCormick, S.R., Peak, D., Dodd, M., Siciliano, S.D., 2015. Solid-liquid separation method governs the in vitro bioaccessibility of metals in contaminated soil-like test materials. *Chemosphere* 134, 544-549. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.019>
- Lee, J.H.J.W.T., Lee, C.K., Moon, C.S., Choi, I.J., Lee, K.J., Yi, S.M., Jang, B.K., Yoon, B. jun, Kim, D.S., Peak, D., Sul, D., Oh, E., Im, H., Kang, H.S., Kim, J.H., Lee, J.H.J.W.T., Kim, K., Park, K.L., Ahn, R., Park, S.H., Kim, S.C., Park, C.H., Lee, J.H.J.W.T., 2012. Korea National Survey for Environmental Pollutants in the Human Body 2008: Heavy metals in the blood or urine of the Korean population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215, 449-457. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.01.002>
- Levin-Schwartz, Y., Claus Henn, B., Gennings, C., Coull, B.A., Placidi, D., Horton, M.K., Smith, D.R., Lucchini, R.G., Wright, R.O., 2021. Integrated measures of lead and manganese exposure improve estimation of their joint effects on cognition in Italian school-age children. *Environment International* 146, 106312. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106312>
- Li, X., Yan, C., Wang, C., Ma, J., Li, W., Liu, J., Liu, Y., 2022. PM_{2.5}-bound elements in Hebei

- Province, China: Pollution levels, source apportionment and health risks. *Science of the Total Environment* 806, 150440. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150440>
- Lu, Y., Kippler, M., Harari, F., Grandér, M., Palm, B., Nordqvist, H., Vahter, M., 2015. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis-comparison with acid digestion. *Clinical Biochemistry* 48, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.003>
- Lucas, E.L., Bertrand, P., Guazzetti, S., Donna, F., Peli, M., Jursa, T.P., Lucchini, R., Smith, D.R., 2015. Impact of ferromanganese alloy plants on household dust manganese levels: Implications for childhood exposure. *Environmental Research* 138, 279-290. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.01.019>
- Lucchini, R.G., Guazzetti, S., Zoni, S., Donna, F., Peter, S., Zacco, A., Salmistraro, M., Bontempi, E., Zimmerman, N.J., Smith, D.R., 2012. Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *NeuroToxicology* 33, 687-696. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.01.005>
- Luo, X., Zhao, Z., Xie, J., Luo, J., Chen, Y., Li, H., Jin, L., 2019. Pulmonary bioaccessibility of trace metals in PM_{2.5} from different megacities simulated by lung fluid extraction and DGT method. *Chemosphere* 218, 915-921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.079>
- MacIntosh, D.L., Stewart, J.H., Myatt, T.A., Sabato, J.E., Flowers, G.C., Brown, K.W., Hlinka, D.J., Sullivan, D.A., 2010. Use of CALPUFF for exposure assessment in a near-field, complex terrain setting. *Atmospheric Environment* 44, 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.09.023>
- Macklin, C.C., 1955. Pulmonary Sumps, Dust Accumulations, Alveolar Fluid And Lymph Vessels. *Cells Tissues Organs* 23, 1-33. <https://doi.org/10.1159/000140979>
- Malecki, E.A., Radzanowski, G.M., Radzanowski, T.J., Gallaher, D.D., Greger, J.L., 1996. Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat. *Journal of Nutrition* 126, 489-498. <https://doi.org/10.1093/jn/126.2.489>
- Manjón, I., Ramírez-Andreotta, M.D., Sáez, A.E., Root, R.A., Hild, J., Janes, M.K., Alexander-Ozinskas, A., 2020. Ingestion and inhalation of metal(loid)s through preschool gardening: An exposure and risk assessment in legacy mining communities. *Science of the Total Environment* 718. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134639>
- Maret, W., 2016. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1-8. <https://doi.org/10.3390/ijms17010066>

- Marques, M.R.C., Loebenberg, R., Almukainzi, M., 2011. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technologies* 18, 15-28. <https://doi.org/10.14227/DT180311P15>
- Marshall, J.D., Riley, W.J., McKone, T.E., Nazaroff, W.W., 2003. Intake fraction of primary pollutants: motor vehicle emissions in the South Coast Air Basin. *Atmospheric Environment* 37, 3455-3468. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00269-3](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00269-3)
- Martín-Lagos, F., Navarro-Alarcón, M., Terrés-Martos, C., López-García De La Serrana, H., Pérez-Valero, V., López-Martínez, M.C., 1998. Zinc and copper concentrations in serum from Spanish women during pregnancy. *Biological Trace Element Research* 61, 61-70. <https://doi.org/10.1007/BF02784041>
- Mazarrasa-Mowinckel, O., 1983. Estudio crítico de los métodos analíticos modernos propuestos para las determinaciones de Pb, Hg y Mn en medios ambientales y líquidos fisiológicos (orina y sangre) y establecimiento de las correlaciones existentes entre las concentraciones halladas para su utilización en toxicología. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Mbengue, S., Alleman, L.Y., Flament, P., 2015. Bioaccessibility of trace elements in fine and ultrafine atmospheric particles in an industrial environment. *Environmental Geochemistry and Health* 37, 875-889. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9756-2>
- McLeod, B.E., Robinson, M.F., 1972. Metabolic balance of manganese in young women. *British Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1079/bjn19720085>
- Menezes-Filho, J.A., Bouchard, M., De N. Sarcinelli, P., Moreira, J.C., 2009a. Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: A review. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health* 26, 541-548. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892009001200010>
- Menezes-Filho, J.A., de Carvalho-Vivas, C.F., Viana, G.F.S., Ferreira, J.R.D., Nunes, L.S., Mergler, D., Abreu, N., 2014. Elevated manganese exposure and school-aged children's behavior: A gender-stratified analysis. *NeuroToxicology* 45, 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.09.006>
- Menezes-Filho, J.A., Paes, C.R., Ângela, Â.M., Moreira, J.C., Sarcinelli, P.N., Mergler, D., 2009b. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *NeuroToxicology* 30, 1207-1213. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.04.005>
- Meza-Figueroa, D., Barboza-Flores, M., Romero, F.M., Acosta-Elias, M., Hernández-Mendiola, E., Maldonado-Escalante, F., Pérez-Segura, E., González-Grijalva, B., Meza-Montenegro, M., García-Rico, L., Navarro-Espinoza, S., Santacruz-Gómez, K., Gallego-Hernández, A.,

- Pedroza-Montero, M., 2020. Metal bioaccessibility, particle size distribution and polydispersity of playground dust in synthetic lysosomal fluids. *Science of the Total Environment* 713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136481>
- Michalke, B., Fernsebner, K., 2014. New insights into manganese toxicity and speciation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.08.005>
- Midander, K., Wallinder, I.O., Leygraf, C., 2007. In vitro studies of copper release from powder particles in synthetic biological media. *Environmental Pollution* 145, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.03.041>
- Ministerio de la Presidencia, 2014. Real Decreto 678/2014, de 1 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire, Boletín Oficial del Estado.
- Ministerio de la Presidencia, 2011. Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire, Boletín Oficial del Estado.
- Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales, 2017a. Real Decreto 39/2017, de 27 de enero, por el que se modifica el Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire, Boletín Oficial del Estado.
- Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales, 2017b. Real Decreto 773/2017, de 28 de julio, por el que se modifican diversos reales decretos en materia de productos y emisiones industriales, Boletín Oficial del Estado.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2021. Metales pesados [WWW Document]. URL https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/metales_pesados.aspx (accedido 11.24.21).
- Mohmand, J., Eqani, S.A.M.A.S., Fasola, M., Alamdar, A., Mustafa, I., Ali, N., Liu, L., Peng, S., Shen, H., 2015. Human exposure to toxic metals via contaminated dust: Bio-accumulation trends and their potential risk estimation. *Chemosphere* 132, 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.004>
- Moss, O.R., 1979. Simulants of lung interstitial fluid. *Health Physics* 36, 447-448.
- Mukhtar, A., Limbeck, A., 2013. Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: A review. *Analytica Chimica Acta* 774, 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.008>
- Mukhtar, A., Mohr, V., Limbeck, A., 2015. The suitability of extraction solutions to assess

- bioaccessible trace metal fractions in airborne particulate matter: a comparison of common leaching agents. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 16620-16630. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4789-8>
- Nag, R., O'Rourke, S.M., Cummins, E., 2022. Risk factors and assessment strategies for the evaluation of human or environmental risk from metal(loid)s – A focus on Ireland. *Science of the Total Environment* 802, 149839. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149839>
- Nakaona, L., Maseka, K.K., Hamilton, E.M., Watts, M.J., 2020. Using human hair and nails as biomarkers to assess exposure of potentially harmful elements to populations living near mine waste dumps. *Environmental Geochemistry and Health* 42, 1197-1209. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00376-6>
- National Research Council, 1989. Recommended dietary allowances, The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/1349>
- Nie, D., Wu, Y., Chen, M., Liu, H., Zhang, K., Ge, P., Yuan, Y., Ge, X., 2018. Bioaccessibility and health risk of trace elements in fine particulate matter in different simulated body fluids. *Atmospheric Environment* 186, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.05.024>
- Nisse, C., Tagne-Fotso, R., Howsam, M., Richeval, C., Labat, L., Leroyer, A., 2017. Blood and urinary levels of metals and metalloids in the general adult population of Northern France: The IMEPOGE study, 2008–2010. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220, 341-363. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.020>
- Ntihakose, R., Surette, C., Foucher, D., Clarisse, O., Bouchard, M.F., 2018. Assessment of saliva, hair and toenails as biomarkers of low level exposure to manganese from drinking water in children. *NeuroToxicology* 64, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.08.011>
- OMS, 2021a. WHO global air quality guidelines. Particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide.
- OMS, 2021b. Calidad del aire ambiente (exterior) y salud [WWW Document]. URL [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) (accedido 11.26.21).
- OMS, 2000. Air Quality Guidelines for Europe. Air Quality Guidelines 1-496. [WWW Document]. URL https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf (accedido 10.24.20)
- OMS, 1973. Trace elements in human nutrition, Technical Report Service. [WWW Document]. URL https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41057/WHO_TRS_532_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (accedido 07.12.20)

- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van De Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., Van Wijnen, J.H., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology* 36, 3326-3334. <https://doi.org/10.1021/es010204v>
- Otero-Pregigueiro, D., Hernández-Pellón, A., Borge, R., Fernández-Olmo, I., 2018. Estimation of PM10-bound manganese concentration near a ferromanganese alloy plant by atmospheric dispersion modelling. *Science of the Total Environment* 627, 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.246>
- Pajarillo, E.A.B., Lee, E., Kang, D.-K., 2021. Trace metals and animal health: Interplay of the gut microbiota with iron, manganese, zinc, and copper. *Animal Nutrition* 7, 750-761. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.005>
- Pant, P., Harrison, R.M., 2013. Estimation of the contribution of road traffic emissions to particulate matter concentrations from field measurements: A review. *Atmospheric Environment* 77, 78-97. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.04.028>
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008. Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de mayo de 2008 relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa, Diario Oficial de la Unión Europea.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2005. Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente, Diario Oficial de la Unión Europea.
- Pelfrêne, A., Cave, M.R., Wragg, J., Douay, F., 2017. In vitro investigations of human bioaccessibility from reference materials using simulated lung fluids. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14, 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijerph14020112>
- Peters, T., Blumenstock, F.A., 1967. Copper-binding properties of bovine serum albumin and its amino-terminal peptide fragment. *Journal of Biological Chemistry* 242, 1574-1578. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)96130-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)96130-2)
- Pinault, L.L., Weichenthal, S., Crouse, D.L., Brauer, M., Erickson, A., Donkelaar, A. van, Martin, R. V., Hystad, P., Chen, H., Finès, P., Brook, J.R., Tjepkema, M., Burnett, R.T., 2017. Associations between fine particulate matter and mortality in the 2001 Canadian Census Health and Environment Cohort. *Environmental Research* 159, 406-415. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.037>

- Pollitt, K.J.G., Maikawa, C.L., Wheeler, A.J., Weichenthal, S., Dobbin, N.A., Liu, L., Goldberg, M.S., 2016. Trace metal exposure is associated with increased exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 15, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0173-5>
- Poulsen, O.M., Holst, E., Christensen, J.M., 1997. A supplement to the approved IFCC recommendation on the theory of reference values. *Pure and Applied Chemistry*. 69, 1601-1611.
- Prasad, V.D., Shireen, S., Ramana, G. V., Gupta, T.S., 2014. Assessment of copper, ceruloplasmin, total proteins and albumin in gestational hypertension. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 13, 101-104. <https://doi.org/10.9790/0853-1344101104>
- Rasmussen, P.E., Levesque, C., Chénier, M., Gardner, H.D., 2018. Contribution of metals in resuspended dust to indoor and personal inhalation exposures: Relationships between PM10 and settled dust. *Building and Environment* 143, 513-522. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2018.07.044>
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., Akash, M.S.H., 2018. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry* 119, 157-184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Ren, H., Yu, Y., An, T., 2020. Bioaccessibilities of metal(loid)s and organic contaminants in particulates measured in simulated human lung fluids: A critical review. *Environmental Pollution* 265, 115070. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115070>
- Ren, Y., Luo, Q., Zhuo, S., Hu, Y., Shen, G., Cheng, H., Tao, S., 2021. Bioaccessibility and public health risk of heavy Metal(loid)s in the airborne particulate matter of four cities in northern China. *Chemosphere* 277, 130312. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130312>
- Riojas-Rodríguez, H., Solís-Vivanco, R., Schilman, A., Montes, S., Rodríguez, S., Ríos, C., Rodríguez-Agudelo, Y., 2010. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environmental Health Perspectives* 118, 1465-1470. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901229>
- Rodushkin, I., Odman, O.F., Olofsson, R., Axelsson, M.D., 2000. Determination of 60 elements in whole blood by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of analytical atomic spectrometry* 15, 937-944. <https://doi.org/10.1039/b003561k>
- Roels, H.A., Ghyselen, P., Buchet, J.P., Ceulemans, E., Lauwerys, R.R., 1992. Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust. *British Journal of Industrial Medicine* 49, 25-34. <https://doi.org/10.1136/oem.49.1.25>
- Rosa, M.J., Benedetti, C., Peli, M., Donna, F., Nazzaro, M., Fedrighi, C., Zoni, S., Marcon, A.,

- Zimmerman, N., Wright, R., Lucchini, R., 2016. Association between personal exposure to ambient metals and respiratory disease in Italian adolescents: A cross-sectional study. *BMC Pulmonary Medicine* 16, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0173-9>
- Roth, J.A., 2006. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biological Research* 39, 45-57. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000100006>
- Roy, D., Lyou, E.S., Kim, J., Lee, T.K., Park, J., 2022. Commuters health risk associated with particulate matter exposures in subway system – Globally. *Building and Environment* 216, 109036. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109036>
- Ruby, M. V., Davis, A., Link, T.E., Schoof, R., Chaney, R.L., Freeman, G.B., Bergstrom, P., 1993. Development of an in Vitro Screening Test to Evaluate the in Vivo Bioaccessibility of Ingested Mine-Waste Lead. *Environmental Science and Technology* 27, 2870-2877. <https://doi.org/10.1021/es00049a030>
- Ruiz-Azcona, L., Markiv, B., Expósito, A., González-Aramburu, I., Sierra, M., Fernández-Olmo, I., Santibáñez, M., 2021. Biomonitoring and bioaccessibility of environmental airborne manganese in relation to motor function in a healthy adult population. *NeuroToxicology* 87, 195-207. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.10.005>
- Ruiz-Azcona, L., Markiv, B., Expósito, A., Pozueta, A., García-Martínez, M., Fernández-Olmo, I., Santibáñez, M., 2022. Poorer cognitive function and environmental airborne Mn exposure determined by biomonitoring and personal environmental monitors in a healthy adult population. *Science of The Total Environment* 815, 152940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152940>
- Santos-Burgoa, C., Rios, C., Mercado, L.A., Arechiga-Serrano, R., Cano-Valle, F., Eden-Wynter, R.A., Texcalac-Sangrador, J.L., Villa-Barragan, J.P., Rodriguez-Agudelo, Y., Montes, S., 2001. Exposure to manganese: Health effects on the general population, a pilot study in Central Mexico. *Environmental Research* 85, 90-104. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4108>
- Saravanabhavan, G., Werry, K., Walker, M., Haines, D., Malowany, M., Khoury, C., 2017. Human biomonitoring reference values for metals and trace elements in blood and urine derived from the Canadian Health Measures Survey 2007–2013. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220, 189-200. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.10.006>
- Schulz, C., Angerer, J., Ewers, U., Heudorf, U., Wilhelm, M., 2009. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from

- the German Environmental Survey on Children 2003-2006 (GerES IV). *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 637-647. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2009.05.003>
- Schulz, C., Wilhelm, M., Heudorf, U., Kolossa-Gehring, M., 2011. Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.06.007>
- See, S.W., Wang, Y.H., Balasubramanian, R., 2007. Contrasting reactive oxygen species and transition metal concentrations in combustion aerosols. *Environmental Research* 103, 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.08.012>
- Solberg, H.E., 2004. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 42, 710-714. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.121>
- Solís-Vivanco, R., Rodríguez-Agudelo, Y., Riojas-Rodríguez, H., Ríos, C., Rosas, I., Montes, S., 2009. Cognitive impairment in an adult Mexican population non-occupationally exposed to manganese. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.04.001>
- Srivastava, A., Siddiqui, N.A., Koshe, R.K., Singh, V.K., 2018. Human Health Effects Emanating from Airborne Heavy Metals Due to Natural and Anthropogenic Activities: A Review 279-296. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7122-5_29
- Stojšavljević, A., Borković-Mitić, S., Vujotić, L., Grujičić, D., Gavrović-Jankulović, M., Manojlović, D., 2019. The human biomonitoring study in Serbia: Background levels for arsenic, cadmium, lead, thorium and uranium in the whole blood of adult Serbian population. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.043>
- Streibel, T., Schnelle-Kreis, J., Czech, H., Harndorf, H., Jakobi, G., Jokiniemi, J., Karg, E., Lintelmann, J., Matuschek, G., Michalke, B., Müller, L., Orasche, J., Passig, J., Radischat, C., Rabe, R., Reda, A., Rüger, C., Schwemer, T., Sippula, O., Stengel, B., Sklorz, M., Torvela, T., Weggler, B., Zimmermann, R., 2017. Aerosol emissions of a ship diesel engine operated with diesel fuel or heavy fuel oil. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 10976-10991. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6724-z>
- Sukumar, A., Subramanian, R., 2007. Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi. *Science of the Total Environment* 372, 474-479. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.020>

- Sysalová, J., Száková, J., Tremlová, J., Kašparovská, K., Kotlík, B., Tlustoš, P., Svoboda, P., 2014. Methodological Aspects of In Vitro Assessment of Bio-accessible Risk Element Pool in Urban Particulate Matter. *Biological Trace Element Research* 161, 216-222. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0101-x>
- Takeda, S.H.K., Kuno, R., Barbosa, F., Gouveia, N., 2017. Trace element levels in blood and associated factors in adults living in the metropolitan area of São Paulo, Brazil. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 44, 307-314. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.09.005>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment, en: *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. pp. 133-164.
- Tepanosyan, G., Sahakyan, L., Belyaeva, O., Maghakyan, N., Saghatelian, A., 2017. Human health risk assessment and riskiest heavy metal origin identification in urban soils of Yerevan, Armenia. *Chemosphere* 184, 1230-1240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.108>
- Tratnik, J.S., Falnoga, I., Mazej, D., Kocman, D., Fajon, V., Jagodic, M., Stajniko, A., Trdin, A., Šlejkovec, Z., Jeran, Z., Osredkar, J., Sešek-Briški, A., Krsnik, M., Kobal, A.B., Kononenko, L., Horvat, M., 2019. Results of the first national human biomonitoring in Slovenia: Trace elements in men and lactating women, predictors of exposure and reference values. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222, 563-582. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.02.008>
- Trumbo, P., Yates, A., Schlicker, S., Poos, M., 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association* 101, 294-301. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(01\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(01)00078-5)
- Twining, J., McGlenn, P., Loi, E., Smith, K., Gieré, R., 2005. Risk ranking of bioaccessible metals from fly ash dissolved in simulated lung and gut fluids. *Environmental Science and Technology* 39, 7749-7756. <https://doi.org/10.1021/es0502369>
- US EPA, 2021a. Exposure assessment tools by routes [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-routes> (accedido 11.25.21).
- US EPA, 2021b. Conceptos básicos sobre el material particulado (PM, por sus siglas en inglés) [WWW Document]. URL <https://espanol.epa.gov/espanol/conceptos-basicos-sobre-el-material-particulado-pm-por-sus-siglas-en-ingles> (accedido 1.20.22).
- US EPA, 2021c. Basic information about the integrated risk information system. USEPA [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/iris/basic-information-about-integrated-risk->

- information-system (accedido 12.14.21).
- US EPA, 2011. Exposure Factors Handbook: 2011 Edition. U.S. Environmental Protection Agency EPA/600/R-, 1-1466. <https://doi.org/EPA/600/R-090/052F>
- US EPA, 2009. Risk assessment guidance for superfund (RAGS). Volume I. Human health evaluation manual (HHEM). Part F. Supplemental guidance for inhalation risk assessment, EPA-540-R-070-002. OSWER 9285.7-82.
- US EPA, 2007a. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods, US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response.
- US EPA, 2007b. Framework for metals risk assesment. EPA 120/R-07/001 [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/sites/default/files/2013-09/documents/metals-risk-assessment-final.pdf> (accedido 12.14.21).
- US EPA, 2004a. Example Exposure Scenarios. EPA/600/R-03/036. [WWW Document]. URL https://ordspub.epa.gov/ords/eims/eimscomm.getfile?p_download_id=435481 (accedido 12.20.21)
- US EPA, 2004b. Risk assessment guidance for superfund (RAGS). Volume I. Human health evaluation manual (HHEM). Part E. Supplemental guidance for dermal risk assessment. EPA/540/R/99/005. OSWER 9285.7-02EP. PB99-963312.
- US EPA, 1992. Guidelines for exposure assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, EPA/600/Z-92/001. US EPA, 1989. Risk assessment guidance for superfund. Volume I. Human health evaluation manual (Part A) I, 289.
- US HHS, 2018. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. [WWW Document]. URL. https://dtsc.ca.gov/wp-content/uploads/sites/31/2018/10/CDC_Report_2.pdf (accedido 18.07.20)
- Van Der Sloot, H.A., 2002. Chapter 7. Harmonisation of leaching extraction procedure for sludge, compost, soil and sediment analyses, en: Methodologies for soil and sediment fractionation studies. pp. 142-174.
- Van Neste, D.J.J., Rushton, D.H., 2016. Gender differences in scalp hair growth rates are maintained but reduced in pattern hair loss compared to controls. *Skin Research and Technology* 22, 363-369. <https://doi.org/10.1111/srt.12274>
- Viana, G.F. de S., de Carvalho, C.F., Nunes, L.S., Rodrigues, J.L.G., Ribeiro, N.S., de Almeida, D.A., Dutra Ferreira, J.R., Abreu, N., Menezes-Filho, J.A., 2014. Noninvasive biomarkers of manganese exposure and neuropsychological effects in environmentally exposed adults

- in Brazil. *Toxicology Letters* 231, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.018>
- Viana, M., Amato, F., Alastuey, A., Querol, X., Moreno, T., Dos Santos, S.G., Herce, M.D., Fernández-Patier, R., 2009. Chemical tracers of particulate emissions from commercial shipping. *Environmental Science and Technology* 43, 7472-7477. <https://doi.org/10.1021/es901558t>
- Vimercati, L., Baldassarre, A., Gatti, M.F., Gagliardi, T., Serinelli, M., De Maria, L., Caputi, A., Dirodi, A.A., Galise, I., Cuccaro, F., Assennato, G., 2016. Non-occupational exposure to heavy metals of the residents of an industrial area and biomonitoring. *Environmental Monitoring and Assessment* 188. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5693-5>
- Vimercati, L., Gatti, M.F., Gagliardi, T., Cuccaro, F., De Maria, L., Caputi, A., Quarato, M., Baldassarre, A., 2017. Environmental exposure to arsenic and chromium in an industrial area. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 11528-11535. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8827-6>
- Wallace, L., 2000. Correlations of personal exposure to particles with outdoor air measurements: A review of recent studies. *Aerosol Science and Technology* 32, 15-25. <https://doi.org/10.1080/027868200303894>
- Wang, S., Shi, X., 2001. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 222, 3-9. <https://doi.org/10.1023/A:1017918013293>
- Weggeberg, H., Benden, T.F., Lierhagen, S., Steinnes, E., Flaten, T.P., 2019a. Characterization and bioaccessibility assessment of elements in urban aerosols by extraction with simulated lung fluids. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 1, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2019.10.001>
- Weggeberg, H., Benden, T.F., Steinnes, E., Flaten, T.P., 2019b. Element analysis and bioaccessibility assessment of ultrafine airborne particulate matter (PM_{0.1}) using simulated lung fluid extraction (artificial lysosomal fluid and Gamble's solution). *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 1, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2019.08.001>
- White, M.A., Sabbioni, E., 1998. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. X. A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population. *Science of the Total Environment* 216, 253-270. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00156-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00156-9)
- Wilhelm, M., Ewers, U., Schulz, C., 2004. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207, 69-73. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00260>

- Winder, B.S., Salmon, A.G., Marty, M.A., 2010. Inhalation of an essential metal: Development of reference exposure levels for manganese. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 57, 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.02.007>
- Wiseman, C.L.S., 2015. Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: A scoping review. *Analytica Chimica Acta* 877, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.024>
- Wiseman, C.L.S., Zereini, F., 2014. Characterizing metal(loid) solubility in airborne PM10, PM2.5 and PM1 in Frankfurt, Germany using simulated lung fluids. *Atmospheric Environment* 89, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.02.055>
- Wong, S.L., Lye, E.J.D., 2008. Lead, mercury and cadmium levels in Canadians. *Statistics Canada. Health Reports* 19, 31-36.
- Wragg, J., Klinck, B., 2007. The bioaccessibility of lead from Welsh mine waste using a respiratory uptake test. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 42, 1223-1231. <https://doi.org/10.1080/10934520701436054>
- Yaemsiri, S., Hou, N., Slining, M.M., He, K., 2010. Growth rate of human fingernails and toenails in healthy American young adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24, 420-423. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03426.x>
- Yang, S.Y., Lin, J.M., Young, L.H., Chang, C.W., 2018. Mass-size distribution and concentration of metals from personal exposure to arc welding fume in pipeline construction: A case report. *Industrial Health* 56, 356-363. <https://doi.org/10.2486/indhealth.2017-0197>
- Zeng, H.L., Li, H., Lu, J., Guan, Q., Cheng, L., 2019. Assessment of 12 Metals and Metalloids in Blood of General Populations Living in Wuhan of China by ICP-MS. *Biological Trace Element Research* 189, 344-353. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1486-8>
- Zhao, Z., Luo, X.S., Jing, Y., Li, H., Pang, Y., Wu, L., Chen, Q., Jin, L., 2021. In vitro assessments of bioaccessibility and bioavailability of PM2.5 trace metals in respiratory and digestive systems and their oxidative potential. *Journal of Hazardous Materials* 409, 124638. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124638>
- Zheng, W., Fu, S.X., Dydak, U., Cowan, D.M., 2011. Biomarkers of manganese intoxication. *NeuroToxicology* 32, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.10.002>
- Zoroddu, M.A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V.M., 2019. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 195, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>

Zou, B., Wilson, J.G., Zhan, F.B., Zeng, Y., 2009. Air pollution exposure assessment methods utilized in epidemiological studies. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 475-490. <https://doi.org/10.1039/b813889c>

Zubero, M.B., Aurrekoetxea, J.J., Ibarluzea, J.M., Arenaza, M.J., Rodríguez, C., Sáenz, J.R., 2010. Heavy metal levels (Pb, Cd, Cr and Hg) in the adult general population near an urban solid waste incinerator. *Science of the Total Environment* 408, 4468-4474. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.003>

ANEXOS

Anexos

Anexo A1. Tríptico de búsqueda e información de/a voluntarios.

<p>Si quiere participar como voluntario o tiene alguna duda...</p> <p>Si desea participar pida mas información sobre el estudio a los investigadores responsables.</p> <p>Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación.</p> <p>Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar a los investigadores principales del estudio a los siguientes teléfonos 942 206745 (Dr. Ignacio Fernandez Olmo) o al 942 201698 (Dr. Miguel Santibáñez Margüello); o si lo prefiere puede contactar por email:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ ignacio.fernandez@unican.es ➤ miguel.santibanez@unican.es 	<p>Grupos de Investigación participantes</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ DePRO: Desarrollo de Procesos Químicos y Control de Contaminantes, ETSII y T, UC ✓ Salud Global, Facultad de Enfermería, UC  <p>Proyecto CTM2017-82636 R</p>	<p>UC BIONEUROMET</p> <p>“EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MANGANESO Y OTROS METALES CONTENIDOS EN MATERIAL PARTICULADO: BIOACCESIBILIDAD, BIOMONITORIZACIÓN, Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA”</p> <p>¡ESTAMOS COMENZANDO EL PROYECTO!</p> <p>Buscamos voluntarios para participar en este proyecto de investigación</p> <p>¡Conozca los niveles de metales pesados a los que está expuesto y los que quedan en su cuerpo!</p>
	<p>GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y UNIVERSIDADES</p> <p>AGENCIA ESTATAL DE INVESTIGACIÓN UNIÓN EUROPEA “Una manera de hacer Europa”</p> <p>FEDER Fondo Europeo de Desarrollo Regional</p>	

<p>Estimado participante</p> <p>Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación correspondiente cumpliendo con la normativa vigente.</p> <p>Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.</p> <p>Su participación es totalmente voluntaria. Además, si en algún momento usted decide no contestar a algunas preguntas o retirarse definitivamente del estudio lo podrá hacer con total libertad sin necesidad de dar explicaciones.</p> <p>El beneficio personal que usted obtendrá al participar en el estudio será conocer, si así lo desea, el resultado de los análisis de las muestras de sangre, pelo y uñas, así como el de la batería de test neuropsicológicos.</p>	<p>¿Para qué sirve?</p> <p>Los metales presentes en el material particulado (PM) atmosférico constituyen uno de los principales componentes del mismo que pueden conllevar efectos negativos sobre la salud.</p> <p>Los objetivos generales del estudio son:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Sistematizar como evaluar la bioaccesibilidad de metales en matrices atmosféricas (fracciones de PM) mediante muestreadores estacionarios y personales. 2) Determinar mediante la realización de un estudio transversal, la exposición a manganeso y otros metales pesados en población adulta de Cantabria, las posibles correlaciones entre contenido total y bioaccesible de metales presentes en material particulado, y su contenido en matrices biológicas, así como determinar la asociación entre los distintos niveles de exposición a manganeso, y los resultados de los test relativos a la respuesta motora y cognitiva. 	<p>¿Qué implica su colaboración?</p> <p>Si acepta participar en el estudio, su aportación consistirá en donar una muestra de sangre, donar una muestra de pelo y una muestra de uña.</p> <p>Asimismo, se le realizarán una batería de test neuropsicológicos que pretenden medir su respuesta motora y cognitiva, y se le aplicará un cuestionario para recoger unos datos mínimos como edad, sexo, y datos de salud.</p> <p>Por último, se le pedirá que lleve consigo un muestreador personal de partículas en suspensión durante un período aproximado de 48 horas, el cual es un dispositivo que permite recoger el aire de los alrededores de donde se encuentra el participante, para posteriormente filtrarlo, quedando las partículas retenidas en unos filtros para su análisis en el laboratorio.</p> <p>¡Gracias por su colaboración!</p>
--	--	--

Anexo A2. Enrollable usado en la Noche Europea de los Investigadores.



UC
UNIVERSIDAD
DE CANTABRIA

BIONEUROMET



BioNeuroMet

Exposición ambiental a manganeso y otros metales contenidos en material particulado: bioaccesibilidad, biomonitorización, y su asociación con la función neurológica
CTM2017-82636 R

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

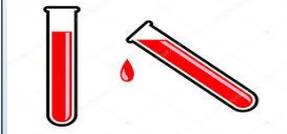
Exposición por inhalación:
Muestreo de partículas en suspensión (PM)



Muestreador personal

PARTICIPANTES

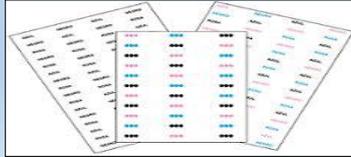
Biomonitorización.
Toma de muestras biológicas:
Sangre, pelo, uñas



↓

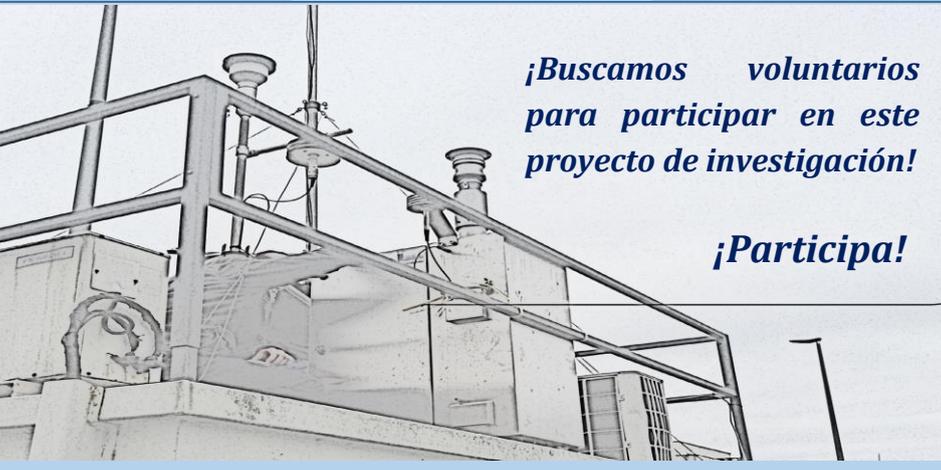
Análisis de Manganeso y otros metales

Respuesta motora y cognitiva:
tests neuropsicológicos



↓

Análisis de Manganeso y otros metales



¡Buscamos voluntarios para participar en este proyecto de investigación!

¡Participa!

Contacta con nosotros:

➤ **Dr. Ignacio Fernández Olmo**
Grupo DePro, ETSIIyT, UC 
✉: ignacio.fernandez@unican.es

➤ **Dr. Miguel Santibáñez Margüello**
Grupo Salud Global, Fac. Enfermería, UC
✉: miguel.santibanez@unican.es

Proyecto CTM2017-82636 R


 GOBIERNO DE ESPAÑA


 MINISTERIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y UNIVERSIDADES


 AGENCIA ESTADAL DE INVESTIGACIÓN


 UNIÓN EUROPEA
"Una manera de hacer Europa"


 Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Anexo A3. Cartel empleado para el reclutamiento de voluntarios en los edificios municipales de la zona.



**DePRO: Desarrollo de Procesos Químicos
y Control de Contaminantes, ETSII y T, UC**
Salud Global, Facultad de Enfermería, UC

BIONEUROMET



“EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MANGANESO Y OTROS METALES CONTENIDOS EN MATERIAL PARTICULADO: BIOACCESIBILIDAD, BIOMONITORIZACIÓN, Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA”, CTM2017-82636 R

¡ESTAMOS COMENZANDO EL PROYECTO DE INVESTIGACION BIONEUROMET!

Buscamos voluntarios para participar en este proyecto de investigación

¡Conozca los niveles de metales pesados a los que está expuesto y los que quedan en su cuerpo!

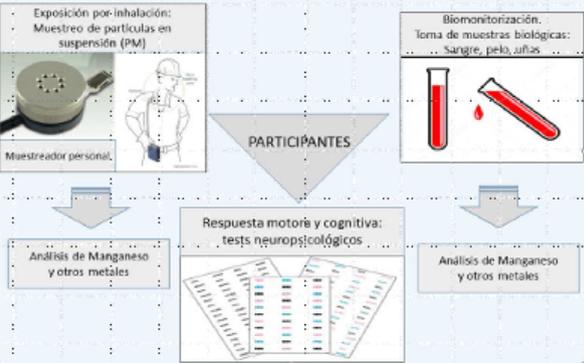
Si quiere participar como voluntario o tiene alguna duda...

Si desea participar pida mas información sobre el estudio a los investigadores responsables.

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación.

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar a los investigadores principales del estudio a los siguientes teléfonos 942 206745 (Dr. Ignacio Fernandez Olmo) o al 942 201698 (Dr. Miguel Santibáñez Margüello); o si lo prefiere puede contactar por e-mail:

- ignacio.fernandez@unican.es
- miguel.santibanez@unican.es








Anexo A4. Invitación para la participación en el proyecto BIONEUROMET.



INVITACION PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO BIONEUROMET:

“EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MANGANESO Y OTROS METALES CONTENIDOS EN MATERIAL PARTICULADO: BIOACCESIBILIDAD, BIOMONITORIZACIÓN, Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA”

La Universidad de Cantabria, a través de un equipo formado por investigadores de los Departamentos de Ingenierías Química y Biomolecular y de Enfermería, desea invitarle a participar en el estudio titulado “**EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MANGANESO Y OTROS METALES CONTENIDOS EN MATERIAL PARTICULADO: BIOACCESIBILIDAD, BIOMONITORIZACIÓN, Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA**”.

Este estudio está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), en el marco del Plan Estatal de Investigación, y tiene como objetivos generales:

- 1) Sistematizar como evaluar la bioaccesibilidad de metales en matrices atmosféricas (fracciones de PM) mediante muestreadores estacionarios y personales.
- 2) Determinar mediante la realización de un estudio transversal, la exposición a manganeso y otros metales pesados en población adulta de Cantabria, las posibles correlaciones entre contenido total y bioaccesible de metales presentes en material particulado, y su contenido en matrices biológicas, así como determinar la asociación entre los distintos niveles de exposición a manganeso, y los resultados de los test relativos a la respuesta motora y cognitiva.

Para alcanzar los objetivos propuestos, en este estudio, se desarrollará una metodología para evaluar la bioaccesibilidad de metales en diferentes fracciones de material particulado a partir de muestras recogidas con un muestreador estacionario, para posteriormente aplicarla a muestras recogidas con muestreadores personales que portarán un grupo de voluntarios participantes en el estudio. Sobre estos mismos participantes se tomarán muestras biológicas (pelo, sangre y uñas), y se les aplicarán test neurológicos diseñados para evaluar la asociación con la respuesta motora y cognitiva.

Esperamos contar con alrededor de 200 participantes residentes en Cantabria, por lo que su participación en el estudio será de gran importancia para disponer de una muestra significativa. Si acepta participar en el estudio, su aportación consistirá en **donar una muestra de sangre, donar una muestra de pelo y una muestra de uña**. Así mismo se le realizarán una **batería de test neuropsicológicos** que pretenden medir su función motora y cognitiva, y se le aplicará un **cuestionario** para recoger unos datos mínimos como edad, sexo, datos de salud, dieta y ocupación. Por último, se le pedirá que lleve consigo un muestreador personal de partículas en suspensión durante un período aproximado de 24-48 horas, el cual es un dispositivo que permite recoger el aire de los alrededores de donde se encuentra el participante, para posteriormente filtrarlo, quedando las partículas retenidas en unos filtros para su análisis en el laboratorio.

Las muestras recogidas serán utilizadas exclusivamente con fines científicos relacionados con los objetivos del estudio. Así pues, con las muestras de sangre, uñas y pelo se realizarán análisis de cara a biomonitorizar el contenido en las mismas de manganeso y otros metales pesados. Las

muestras biológicas serán identificadas con un código para no ser identificables con el participante. Estas muestras se guardarán en congeladores o almacenes adecuados hasta su análisis. En caso de retirada del consentimiento del participante, serán destruidas.

Beneficios potenciales

El beneficio personal que usted obtendrá al participar en el estudio será conocer, si así lo desea, el resultado de los análisis de las muestras de sangre, pelo y uñas, así como el de la batería de test neuropsicológicos. Su participación es muy importante ya que contribuirá a aumentar el conocimiento acerca de la exposición a manganeso y otros metales pesados en Cantabria y sus efectos sobre la salud.

Riesgos

Es poco probable que, al hacer la extracción de sangre, le salga un hematoma (“morado”).

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, y almacenada en un fichero de datos automatizados, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD). Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

Su participación es totalmente voluntaria. Además, si en algún momento usted decide no contestar algunas preguntas o retirarse definitivamente del estudio lo podrá hacer con total libertad sin necesidad de dar explicaciones. Si así lo desea, deberá solicitarlo al investigador/a que le atiende en este estudio.

Cómo participar como voluntario en este estudio

Si desea participar como voluntario en este estudio deberá contactar con cualquiera de los investigadores principales del estudio, bien por teléfono o por email: Dr. Ignacio Fernandez Olmo (tfno. 942 206745; e-mail: fernandi@unican.es) o Dr. Miguel Santibáñez Margüello (tfno. 942 201698; e-mail: miguel.santibanez@unican.es), y tras una entrevista previa se comprobará por parte del equipo de investigación el cumplimiento de unos criterios de idoneidad necesarios para asegurar la calidad del estudio.

A la espera de su cooperación en este proyecto de investigación.

Atentamente,

Dr. Ignacio Fernández Olmo

Dpto Ingenierías Química y Biomolecular
Universidad de Cantabria

Dr. Miguel Santibáñez Margüello

Dpto Enfermería
Universidad de Cantabria

Anexo A5. Consentimiento informado para los participantes en este estudio.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE

Por la presente le solicitamos su participación en el estudio que está desarrollando la Universidad de Cantabria titulado “**EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MANGANESO Y OTROS METALES CONTENIDOS EN MATERIAL PARTICULADO: BIOACCESIBILIDAD, BIOMONITORIZACIÓN, Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA**”.

Los metales presentes en el material particulado atmosférico constituyen uno de los principales componentes del mismo que pueden conllevar efectos negativos sobre la salud.

Los objetivos generales del estudio son:

- 1) Sistematizar como evaluar la bioaccesibilidad de metales en matrices atmosféricas (fracciones de PM) mediante muestreadores estacionarios y personales.
- 2) Determinar mediante la realización de un estudio transversal, la exposición a manganeso y otros metales pesados en población adulta de Cantabria, las posibles correlaciones entre contenido total y bioaccesible de metales presentes en material particulado, y su contenido en matrices biológicas, así como determinar la asociación entre los distintos niveles de exposición a manganeso, y los resultados de los test relativos a la respuesta motora y cognitiva.

Para alcanzar los objetivos propuestos, en este estudio, se desarrollará una metodología para evaluar la bioaccesibilidad de metales en diferentes fracciones de material particulado a partir de muestras recogidas con un muestreador estacionario, para posteriormente aplicarla a muestras recogidas con muestreadores personales que portarán los participantes del estudio. Sobre estos mismos participantes se tomarán muestras biológicas (pelo, sangre y uñas), y se les aplicarán test neurológicos diseñados para evaluar la asociación con la respuesta motora y cognitiva.

Si acepta participar en el estudio, su aportación por tanto consistirá en **donar una muestra de sangre, donar una muestra de pelo y una muestra de uña**. Asimismo se le realizarán una **batería de test neuropsicológicos** que pretenden medir su respuesta motora y cognitiva, y se le aplicará un **cuestionario** para recoger unos datos mínimos como edad, sexo, y datos de salud. Por último, se le pedirá que lleve consigo un muestreador personal de partículas en suspensión durante un período aproximado de 24 horas, el cual es un dispositivo que permite recoger el aire de los alrededores de donde se encuentra el participante, para posteriormente filtrarlo, quedando las partículas retenidas en unos filtros para su análisis en el laboratorio.

Las muestras recogidas serán utilizadas exclusivamente con fines científicos relacionados con los objetivos del estudio. Así pues, con las muestras de sangre, uñas y pelo se realizarán análisis de cara a biomonitorizar el contenido en las mismas de manganeso y otros metales pesados. Las muestras biológicas serán identificadas con un código para no ser identificables con el participante. Estas muestras se guardarán en congeladores o almacenes adecuados hasta su análisis. En caso de retirada del consentimiento del participante, serán destruidas.

Por último, deseáramos poder contactar en el futuro con usted o alguno de sus familiares para recabar información adicional que no se ha recogido en esta entrevista.

Beneficios potenciales

El beneficio personal que usted obtendrá al participar en el estudio será conocer, si así lo desea, el resultado de los análisis de las muestras de sangre, pelo y uñas, así como el de la batería de test neuropsicológicos. Su participación es muy importante ya que contribuirá a aumentar el

conocimiento acerca de la exposición a manganeso y otros metales pesados en Cantabria y sus efectos sobre la salud.

Riesgos

Es poco probable que, al hacer la extracción de sangre, le salga un hematoma (“morado”).

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, y almacenada en un fichero de datos automatizados, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD). Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

Su participación es totalmente voluntaria. Además, si en algún momento usted decide no contestar algunas preguntas o retirarse definitivamente del estudio lo podrá hacer con total libertad sin necesidad de dar explicaciones. Si así lo desea, deberá solicitarlo al investigador/a que le atiende en este estudio. También queremos informarle que los resultados del estudio son totalmente confidenciales de acuerdo a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se le requieren (p.ej. edad, sexo, datos de salud) son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos en condiciones de seguridad.

El acceso a dicha información quedará restringido al personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

Es importante que usted sepa que las muestras de sangre, pelo y uña que nos proporcione sólo se utilizarán para los fines específicos del estudio.

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar a los investigadores principales del estudio a los siguientes teléfonos 942 206745 (profesor Ignacio Fernandez Olmo) o al 942 201698 (Dr. Miguel Santibáñez Margüello).

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: “EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MANGANESO Y OTROS METALES CONTENIDOS EN MATERIAL PARTICULADO: BIOACCESIBILIDAD, BIOMONITORIZACIÓN, Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA”.

INVESTIGADORES PRINCIPALES: IGNACIO FERNANDEZ OLMO. MIGUEL SANTIBAÑEZ MARGUELLO.

CENTRO:UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Yo, _____

(Nombre y apellidos del voluntario en MAYÚSCULAS)

Declaro que,

- ✓ He leído y comprendido la hoja de información sobre este estudio.
- ✓ He hablado con el D/D^a. con quien he clarificado las posibles dudas.
- ✓ He realizado todas las preguntas que he precisado sobre el estudio.
 - ✓ Comprendo el fin para el que se utilizarán mis datos personales (estudios que cumplan todos los requisitos que exigen la ley y los comités científicos y éticos).
- ✓ Comprendo que mi participación es voluntaria.
- ✓ Comprendo que puedo retirarme del estudio, cuando quiera, sin dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos.
- ✓ Comprendo que la información personal y familiar que aporte será confidencial y no se mostrará a nadie sin mi consentimiento.

CONSIENTO EN LA PARTICIPACIÓN EN TODAS PARTES DEL ESTUDIO:

(Redondear la respuesta que proceda)

SÍ NO

En caso de que la respuesta sea “NO”, **CONSIENTO EN LA PARTICIPACIÓN EN SIGUIENTES PARTES DEL ESTUDIO:**

(Redondear la respuesta que proceda)

Cuestionario	SÍ	NO
Batería de test neuropsicológicos	SÍ	NO
Recogida de muestra de sangre	SÍ	NO
Recogida de muestra de uña	SÍ	NO
Recogida de muestra de pelo	SÍ	NO
Muestreador personal	SÍ	NO

Para dejar constancia de todo ello, firmo a continuación:

Fecha

Firma del participante

Fecha

Firma del Investigador

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo,revoco el consentimiento de participación en el proceso, arriba firmado.

Firma y Fecha de la revocación:

Firma del Investigador

Anexo A6. Cuestionario empleado para determinar el cumplimiento de los criterios de inclusión exclusión, así como las características de los voluntarios

CUESTIONARIO PROYECTO BIONEUROMET

ID:.....

.....



COMPROBACION DE CRITERIOS DE INCLUSION & EXCLUSION

-Edad mayor de 18 años

No Sí

-Enfermedad física o psiquiátrica importante, trastornos degenerativos.

¿Padece usted alguna de las siguientes enfermedades degenerativas, neurológicas, o psiquiátricas?

- Demencia No Sí
- Deterioro cognitivo No Sí
- Parkinson No Sí
- Esclerosis múltiple No Sí
- Corea de Huntington No Sí
- Esquizofrenia No Sí
- Trastorno de la conducta alimentaria No Sí
- Trastorno bipolar No Sí
- Depresión mayor No Sí (en la actualidad)

¿Alguna vez le han derivado al especialista en neurología o psiquiatría?

No Sí

Motivo (en caso afirmativo): _____

-Antecedentes de exposición laboral previa al manganeso que requiera tratamiento médico.

¿Recuerda usted haber requerido tratamiento médico por exposición laboral al manganeso?

No Sí

-¿Ha trabajado o trabaja usted en la fábrica Ferroatlántica-¿Grupo Ferroglobe (antiguamente llamada Fiesa), de Maliaño?

No Sí

IDENTIFICACIÓN / DATOS PERSONALES

Nº Identificación del paciente (ID de la Base de Datos): _____

Nombre y Apellidos de persona entrevistada: _____

Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa): _____ ¿Cuántos años tiene?: _____

¿Cuál es el grado o nivel de estudios más alto que usted completó?:

- Ninguno (No sabe leer ni escribir)
- Sin estudios, pero sabe leer y escribir
- Primaria (Primer ciclo EGB)
- Bachiller elemental/ ESO/ FP ciclo medio
- Bachiller superior/ F.P. superior
- Universitarios título medio
- Universitarios título superior

¿Cuál es la dirección de su domicilio actual?

- Dirección: _____
- Localidad: _____
- Provincia: _____
- Código postal: _____

¿Cuánto tiempo lleva viviendo usted en esta misma dirección?

_____ Semanas _____ Meses _____ Años

En caso de llevar viviendo menos de 1 año, especificar en el siguiente apartado información más detallada (Localidad & Código postal / Provincia / N° de meses/años de residencia / Fecha de traslado de domicilio)

A. HISTORIA MÉDICA:

¿Alguna vez le han realizado un TAC o Resonancia magnética craneal?

No Sí

Motivo (en caso afirmativo): _____

¿Está en la actualidad en tratamiento anticoagulante con heparina?

No Sí

Especificar nombre comercial y dosis (en caso afirmativo):

¿Está tomando en la actualidad algún tratamiento farmacológico?

No Sí

Especificar cuál (en caso afirmativo):

(Recoger tratamientos que interfieran en función cognitiva o motora, antihistamínicos fármacos neurológicos o psiquiátricos).

B. SITUACIÓN LABORAL / OCUPACIÓN:

Con relación a su situación laboral actual, está usted:

- Trabajando fuera de casa
- Trabajando, pero desde casa
- Sin trabajo
- Ama de casa desde hace más de un año
- Jubilado/a desde hace más de un año

A causa de la pandemia mundial provocada por el Covid-19. ¿Está usted teletrabajando?

No Sí

En caso afirmativo, ¿Desde cuándo? _____

Ciertas ocupaciones pueden aumentar sus probabilidades de exposición a niveles altos de manganeso. A continuación, le citamos algunas fuentes de exposición laboral, para que nos especifique si en las últimas semanas, o meses ha podido usted estar expuesto.

Ha trabajado usted en las siguientes industrias locales

Global Steel Wire (al lado del corte ingles) No Sí
Saint Gobain PAM (al lado del corte ingles) No Sí
Hergom (en Soto de la Marina) No Sí

Nota: recordar de nuevo que Ferroatlántica en Maliaño, es criterio de exclusión

En alguna otra industria metalúrgica o fundición.

(El Mn se usa en la producción de acero o aluminio, o en relación con la producción de aleaciones de cobre).

No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]

Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación _____
- Actividades o principales tareas _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido):

- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

¿Como soldador?

(El Mn se usa como recubrimiento de electrodos en varillas de soldadura).

No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]

Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación _____

- Actividades o principales tareas _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido): _____
- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

¿En la industria de las pilas o baterías, usando dióxido de Mn?

(El dióxido de Mn se usa como despolarizador en la fabricación de baterías de celda seca).

No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]

Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación _____
- Actividades o principales tareas _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido): _____
- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

¿En la industria química, usando productos químicos derivados del manganeso?

(El permanganato potásico por ejemplo tiene múltiples aplicaciones en la industria química, y existen muchos productos químicos derivados del manganeso)

No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]

Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación _____
- Actividades o principales tareas _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido): _____
- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

¿En la fabricación de cerámica, cerillas, vidrio y tintes?

(Se emplean diferentes sales de manganeso en la fabricación de vidrio, como decolorantes de textiles y en el curtido de pieles).

- No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]
- Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación _____
- Actividades o principales tareas _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido):

- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

¿Manipulando fertilizantes?

(El sulfato de manganeso se usa ampliamente como producto final en fertilizantes y alimentos para animales).

- No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]
- Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación _____
- Actividades o principales tareas _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido):

- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

¿Manipulando fungicidas (plaguicidas)?

(El Maneb o Mancozed es un polvo amarillo usado con fines fungicidas en la agricultura que contiene Manganeso).

- No [Saltar a siguiente fuente de exposición laboral]
- Sí

En caso afirmativo, especificar en siguiente apartado información laboral más detallada:

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación: _____
- Actividades o principales tareas: _____
- Productos que usa o maneja (especificar si productos relacionados con Manganeso como el anteriormente referido):

- ¿A qué edad empezó a trabajar allí?: _____
- ¿A qué edad dejó de trabajar allí? _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

Para acabar de descartar exposición laboral a manganeso u otros metales pesados, ahora voy a preguntarle por las principales ocupaciones que usted ha tenido.

Empezaremos anotando el nombre o la actividad de la empresa, el cargo y los años trabajados de su último trabajo y seguiremos por cada uno de los principales trabajos que ha tenido hasta recoger al menos los últimos 5 años laborales.

Profesión actual

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación: _____
- Actividades o principales tareas: _____
- Productos que usa o maneja: _____
- A qué edad empezó a trabajar allí: _____
- A qué edad dejó de trabajar allí: _____
- N° de años: _____
- Continúa en la actualidad: No Sí

Profesión anterior más importante (en caso necesario)

- Nombre de la empresa/Ciudad: _____
- Actividad de la empresa: _____
- Cargo y ocupación: _____
- Actividades o principales tareas: _____
- Productos que usa o maneja: _____
- A qué edad empezó a trabajar allí: _____
- A qué edad dejó de trabajar allí: _____
- N° de años: _____

C. ENCUESTA TABACO

¿Ha fumado usted alguna vez de forma habitual, es decir, al menos un cigarrillo por día durante seis meses o más?

No Sí No sabe

¿Qué edad tenía cuando empezó a fumar? _____ años

[SOLO PARA FUMADORES]

¿Fuma usted ahora?

No Sí

En caso afirmativo (*Contestar al que explique el participante*):

¿Cuánto ha fumado durante última semana?

Rubio. Número de cigarrillos: |_|_| por día / semana
Negro. Número de cigarrillos: |_|_| por día / semana
Número de puros por semana: |_|_| 0 si <1 puro/semana
Tabaco de pipa en: |_|_|_| gramos / semana

¿Cuánto ha fumado durante el último mes?:

Rubio. Número de cigarrillos: |_|_| por día/semana/mes/
Negro. Número de cigarrillos: |_|_| por día/semana/mes/
Número de puros por semana: |_|_| 0 si <1 puro/semana
Tabaco de pipa en: |_|_|_| gramos / semana

[SOLO PARA EXFUMADORES]

¿En qué año dejó de fumar? _____

¿Qué edad tenía cuando dejó de fumar? _____

A continuación, recogeremos su hábito tabáquico:

¿Cuánto fumaba, de promedio?

Desde (Edad).....Hasta (Edad).....

Desde (Año)..... Hasta (Año).....

Rubio. Número de cigarrillos: |_|_| por día/semana/mes/año
Negro. Número de cigarrillos: |_|_| por día/semana/mes/año
Número de puros por semana: |_|_| 0 si <1 puro/semana
Tabaco de pipa en: |_|_|_| gramos / semana

D. COMPLEMENTOS DIETÉTICOS & DIETA

El modo principal a través del cual usted puede exponerse al manganeso a través de la dieta es ingiriendo suplementos dietéticos o alimentos o que contienen manganeso.

¿En el último año, ha tomado usted algún tipo de complemento alimenticio como pastillas o jarabes de vitaminas?

- No.
- Sí, en la última semana.
- En el último mes
- De 1 a 6 meses atrás
- En el último año, hace más de 6 meses.

En caso afirmativo, recoger nombre comercial, dosis y tiempo tomado:

Los vegetarianos que consumen alimentos ricos en manganeso tales como granos, guisantes, alubias y nueces, como también las personas que toman mucho té, pueden ingerir cantidades de manganeso más altas que la persona promedio.

¿Es usted vegetariano?

No Sí

A continuación, recogeremos su consumo de estos productos:

- ¿Consume habitualmente (al menos 5 veces por semana) granos (trigo, centeno, quinoa, maíz, arroz)? Se incluye también aquí el consumo de pasta, pan...
 - No.
 - Sí, en la última semana. Especificar nº de veces/semana durante última semana.
Trigo |_|; centeno |_|; quinoa |_|; maíz |_|; Otros _____
- ¿Consume habitualmente (al menos 5 veces por semana) guisantes?
 - No.
 - Sí, en la última semana. Especificar nº de veces/semana |_|
- ¿Consume habitualmente (al menos 5 veces por semana) alubias o garbanzos?
 - No.
 - Sí, en la última semana. Especificar nº de veces/semana.
Alubias |_|; garbanzos |_|
- ¿Consume habitualmente (al menos 5 veces por semana) nueces?
 - No.
 - Sí, en la última semana. Especificar nº de veces/semana |_|
- ¿Consume habitualmente (al menos 5 veces por semana) té?
 - No.
 - Sí, en la última semana. Especificar nº de veces/semana |_|

El pescado azul, o el salmón dado su alto porcentaje de materia grasa favorece la acumulación de metales pesados. Los metales se van acumulando de los peces más pequeños a los más grandes, por lo que los predadores mayores, como los grandes túnidos son los que más metales acumulan. En esta escala creciente de peces grandes que se comen a los pequeños, los metales pesados se van acumulando en el predador final.

¿Ha tomado túnidos (bonito, pez espada), o salmón al menos 3 veces durante la última semana?

No Sí

En caso afirmativo especificar: _____

E. ENCUESTA ALCOHOL

¿Su consumo mensual de las siguientes bebidas alcohólicas es...?

- Cerveza
Nº cervezas |_|_| /día/semana/mes/ durante |_|_| años
- Vino
Nº copas |_|_| /día/semana/mes/; durante |_|_| años
- Licores (Coñac/Whisky)
Nº copas |_|_| /día/semana/mes/; durante |_|_| años
- Otros (combinados)
Nº copas |_|_| /día/semana/mes/ durante |_|_| años

F. TEST COGNITIVOS & MOTORES

En el momento de las pruebas, descartar consumo de alcohol, sustancias psicotrópicas o fármacos que interfieran en función cognitiva o motora.

G. BIOMARCADORES

Recogida muestra de sangre: No SÍ

¿Quién recogió la muestra?:

Recogida muestra de pelo: No SÍ

¿Tiene usted el pelo teñido? No SÍ

¿Quién recogió la muestra?:

Recogida muestra de uñas: No SÍ

¿Las uñas están esmaltadas? No Sí

¿Quién recogió la muestra?:

Durante 24-48 horas ha estado portando un muestreador personal de partículas en suspensión. A continuación, necesitamos que conteste a las siguientes preguntas:

¿Cuánto tiempo ha llevado consigo el muestreador (horas)? _____

¿Durante ese tiempo, en qué lugares ha estado? Indicar lugares y el tiempo aproximado en horas

¿Cuántas horas ha llevado mascarilla mientras portaba el muestreador? _____

¿Qué tipo de mascarilla utilizó?

- Tela Higiénica Quirúrgica FFP1 FFP2 FFP3

¿Quiere que se le envíen sus resultados mediante informe individual una vez obtengamos los resultados?

No Sí

En caso afirmativo indicar e-mail o dirección de envío:

.....

H. CALIDAD DE LA ENTREVISTA

Fecha de la entrevista: _____

Nombre del entrevistador: _____

Nombre del investigador que hace los test cognitivos: _____

Nombre del investigador que hace test motores: _____

Resultado final de la entrevista

- Acabada
- Acabada parcialmente
- Rechazo
- Otras (especificar) _____

La cooperación de la persona entrevistada fue:

- Muy buena
- Buena
- Regular
- Mala

La calidad general de la entrevista es:

- Insatisfactoria
- Cuestionable
- Fiable

Observaciones: _____

Anexo A7. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (CEIC).



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE CANTABRIA
IDIVAL



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Exposición ambiental a manganeso y otros metales contenidos en material particulado: bioaccesibilidad, biomonitorización, y su asociación con la función neurológica.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2017.164)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en la **UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**, actuando como investigadores principales D. **MIGUEL SANTIBÁÑEZ MARGÜELLO** e **IGNACIO FERNÁNDEZ OLMO**.

Como queda reflejado en el Acta: **12/2017**.

Lo que firmo en Santander, a **05 de septiembre de 2017**

T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a de CEIC



Anexo A8. Aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Cantabria (CEUC).



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN HUMANIDADES Y CIENCIAS SOCIALES

D^a MARGARITA SERNA VALLEJO, en calidad de presidenta del citado Comité,

CERTIFICA

Que una vez analizada por este Comité la solicitud del investigador D. Ignacio Fernández Olmo cuyos datos se refieren a continuación:

Título del proyecto: Exposición ambiental a manganeso y otros metales contenidos en material particulado: bioaccesibilidad, biomonitorización y su asociación con la función neurológica

Ámbito (Educación, Económicas, Derecho, Humanidades indicar la que proceda): Ingeniería

Características definitorias (Tesis doctoral, Proyecto, etc.): Proyecto

Código dado por el Comité de Ética de la Investigación en Humanidades y Ciencias Sociales: CE Proyecto 02/2018.

Y valorada la documentación aportada, especialmente el informe favorable al Proyecto de referencia, emitido por el Comité de Investigación Clínica de Cantabria Idival, de fecha 5 de septiembre, se resuelve declarar

- Que el Comité de Ética de la Investigación de la UC tiene conocimiento del contenido del informe emitido por el Comité de Investigación Clínica de Cantabria Idival.

- Que por la superior especialización del Comité de Investigación Clínica de Cantabria Idival, el Comité de Ética de la Investigación de la UC considera que el Proyecto no necesita una nueva valoración ética.

- Y que el Comité de Ética de la Investigación de la UC se da por informado de que el proyecto del profesor Ignacio Fernández Olmo, avalado por el informe emitido por el Comité de Investigación Clínica de Cantabria Idival y que tiene implicaciones éticas, se ejecutará por personal de la UC.

Producción científica derivada del proyecto BIONEUROMET

Artículos científicos

- B. Markiv**, L. Ruiz-Azcona, A. Expósito, M. Santibáñez, I. Fernández-Olmo. “Short- and long-term exposure to trace metal(loid)s from the production of ferromanganese alloys by personal sampling and biomarkers”. *Environmental Geochemistry and Health* (2022). <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01218-8>
- L. Ruiz-Azcona, **B. Markiv**, A. Expósito, A. Pozueta, M. García-Martínez, I. Fernández-Olmo y Miguel Santibáñez. “Poorer cognitive function and environmental airborne Mn exposure determined by biomonitoring and personal environmental monitors in a healthy adult population”. *Science of the Total Environment*, 815 (2022) 152940. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152940>
- L. Ruiz-Azcona, **B. Markiv**, A. Expósito, I. González-Aramburu, M. Sierra, I. Fernández-Olmo y Miguel Santibáñez. “Biomonitoring and bioaccessibility of environmental airborne manganese in relation to motor function in a healthy adult population”. *Neurotoxicology*, 87 (2021) 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.10.005>
- A. Expósito, **B. Markiv**, L. Ruiz-Azcona, M. Santibáñez e I. Fernández-Olmo. “Personal inhalation exposure to manganese and other trace metals in an environmentally exposed population: Bioaccessibility in size-segregated particulate matter samples”. *Atmospheric Pollution Research*, 12 (2021) 101123. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2021.101123>
- L. Ruiz-Azcona, I. Fernández-Olmo, A. Expósito, **B. Markiv**, M. Paz-Zulueta, P. Parás-Bravo, C. Sarabia-Cobo y M. Santibáñez. “Environmental airborne manganese exposure on cognitive and motor functions in adults: a systematic review and meta-analysis”. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (2021) 4075. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084075>
- A. Expósito, **B. Markiv**, L. Ruiz-Azcona, M. Santibáñez e I. Fernández-Olmo. “Understanding how methodological aspects affect the release of trace metal(loid)s from urban dust in inhalation bioaccessibility tests”. *Chemosphere*, 267 (2021) 129181. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129181>
- I. Fernández-Olmo, P. Mantecón, **B. Markiv**, L. Ruiz-Azcona y M. Santibáñez. “A review on the environmental exposure to airborne manganese, biomonitoring, and neurological/neuropsychological outcomes”. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 254 (2021) 85-130. https://doi.org/10.1007/398_2020_46

Comunicaciones a congresos

- L. Ruiz-Azcona, **B. Markiv**, A. Expósito, I. Fernández-Olmo, I. González-Aramburu, A. Pozueta, M. Sierra-Peña, M. García-Martínez y M. Santibáñez. “Environmental exposure to manganese and motor function in adults”. 33rd Annual Conference of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE 2021). 23-26 agosto 2021. Modalidad virtual. Comunicación en formato póster. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/isee.2021.P-050>
- L. Ruiz-Azcona, **B. Markiv**, A. Expósito, I. Fernández-Olmo, A. Pozueta, I. González-Aramburu, M. García Martínez, M. Sierra-Peña y M. Santibáñez. “Environmental exposure to manganese and cognitive function according to the STROOP test”. 33rd Annual Conference of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE 2021). 23-26 agosto 2021. Modalidad virtual. Comunicación en formato póster. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/isee.2021.P-051>
- B. Markiv**, L. Ruiz-Azcona, A. Expósito, M. Santibáñez, I. Fernández-Olmo. “Human whole blood, fingernails and hair as biomarkers of exposure to trace metals near an urban/industrial mixed area”. 20th International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET 2020). 26-28 octubre 2020. Modalidad virtual. Comunicación oral.
- A. Expósito, **B. Markiv**, L. Ruiz-Azcona, M. Santibáñez, I. Fernández-Olmo. “Bioaccessibility of trace metal(loid)s in urban dust: effect of the type of synthetic body fluid and liquid to solid ratio”. 20th International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET 2020). 26-28 octubre 2020. Modalidad virtual. Comunicación en formato póster. **Premio al mejor póster.**
- L. Ruiz-Azcona, **B. Markiv**, A. Expósito, I. Fernández-Olmo, M. Santibáñez. “Environmental exposure to manganese and other trace metal(loid)s in air: associations with cognitive and motor functions”. 32nd Annual Conference of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE 2020). 24-27 agosto 2020. Modalidad virtual. Comunicación en formato póster. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/isee.2020.virtual.P-0509>
- L. Ruiz-Azcona, **B. Markiv**, A. Expósito, M. Paz-Zulueta, P. Paras-bravo, C. Sarabia, I. Fernández-Olmo, M. Santibáñez. “*Environmental exposure to manganese in adults and cognitive and motor function. A systematic literature review and meta-analysis*”. 32nd Annual Conference of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE 2020). 24-27 agosto 2020. Modalidad virtual. Comunicación en formato póster. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/isee.2020.virtual.P-0531>

- I. Fernández-Olmo, **B. Markiv**, M. Santibáñez. “A protocol to assess the bioaccessibility of particulate matter-bound metals”. 3rd International Congress of Chemical Engineering (ANQUE 2019). 19-21 junio 2019. Santander, España. Comunicación en formato póster.

