

## Aplicación Aérea de Mancozeb y Concentraciones Urinarias de Etileno Tiourea (ETU) en Mujeres Embarazadas en Costa Rica: El Estudio Infantes y Salud Ambiental (ISA)

Berna van Wendel de Joode,<sup>1</sup> Ana María Mora,<sup>1,2</sup> Leonel Córdoba,<sup>1</sup> Juan Camilo Cano,<sup>1</sup> Rosario Quesada,<sup>1</sup> Moosa Faniband,<sup>3</sup> Catharina Wesseling,<sup>1</sup> Clemens Ruepert,<sup>1</sup> Mattias Öberg,<sup>4</sup> Brenda Eskenazi,<sup>2</sup> Donna Mergler,<sup>5</sup> y Christian H. Lindh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa Infantes y Salud Ambiental (ISA), Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica; <sup>2</sup>Center for Environmental Research and Children's Health (CERCH), School of Public Health, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA; <sup>3</sup>Division of Occupational and <sup>3</sup>Environmental Medicine, Institute of Laboratory Medicine, Lund University, Lund, Sweden; <sup>4</sup>Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; <sup>5</sup>Centre de recherche interdisciplinaire sur la biologie la santé et l'environnement (CINBIOSE), Université du Québec a Montréal, Montréal, Québec, Canada

**ANTECEDENTES:** El Mancozeb y su principal metabolito de etileno tiourea (ETU) puede alterar la función tiroidea; las hormonas de la tiroides son esenciales para el desarrollo del cerebro fetal. En Costa Rica, Mancozeb es aplicado vía aérea semanalmente en plantaciones de banano a gran escala.

**OBJETIVOS:** Nuestros objetivos fueron (1) evaluar concentraciones urinarias de ETU en mujeres embarazadas que viven cerca de las plantaciones de banano de larga escala, (2) comparar su ingesta diaria estimada (IDE) con dosis de referencia establecidas (DdRe), e identificar factores que predicen las concentraciones urinarias de ETU.

**MÉTODOS:** Incluimos 451 mujeres embarazadas desde el condado de Matina, Costa Rica, el cual tiene producción de banano a gran escala. Visitamos 445 mujeres hasta tres veces durante el embarazo para obtener muestras de orina (n=872) e información de factores que posiblemente influyen en la exposición. Determinamos concentraciones urinarias ETU utilizando cromatografía líquida con espectrometría de masas.

**RESULTADOS:** La mediana de las concentraciones urinarias de ETU de las mujeres embarazadas fue más de cinco veces mayor que las concentraciones reportados para otras poblaciones generales de otros países. Setenta y dos por ciento de las mujeres tuvo IDEs por encima de la DdRe. Las mujeres que vivían más cercanas a las plantaciones de banano (1<sup>er</sup> cuartil, < 48 m) tenían concentraciones urinarias de ETU más altas en comparación con las mujeres que vivían más lejos (4ta cuartil, ≥ 565 m), en promedio fueron un 45% más altas (95% CL: 23, 72%). Comparado con las otras mujeres, mujeres que lavaban su ropa de trabajo de agricultura durante el día antes del muestreo tenían concentraciones urinarias de ETU más altas (11%; 95% CL: 4.9, 17%). Además, las mujeres que trabajaron en agricultura durante el embarazo y las mujeres inmigrantes tenían concentraciones elevadas: un 19% (95% IC: 9.3, 29%) y un 6.2% (95% IC: 1.0, 13%), respectivamente.

**CONCLUSIONES:** Las concentraciones urinarias de ETU en las mujeres embarazadas son motivo de preocupación, y la principal fuente de exposición probablemente es la fumigación aérea de mancozeb. Los factores que predicen ETU proporcionan información sobre posibilidades para reducir la exposición a mancozeb.

**CITA:** van Wendel de Joode B, Mora AM, Córdoba L, Cano JC, Quesada R, Faniband M, Wesseling C, Ruepert C, Öberg M, Eskenazi B, Mergler D, Lindh CH. 2014. Aerial application of mancozeb and concentraciones urinarias de Etilentiourea (ETU) entre mujeres embarazadas en Costa Rica: El estudio de salud ambiental de los infantes (ISA). *Environ Health Perspect* 122:1321–1328; <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307679>

Dirección de correspondencia a B. van Wendel de Joode, Programa infantes y Salud Ambiental (ISA), Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, Teléfono: 506 2263 6375. Correo electrónico: [berendina.vanwendel.dejoode@una.cr](mailto:berendina.vanwendel.dejoode@una.cr) Material suplementario está disponible en línea (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307679>). Estamos agradecidos con los participantes del estudio y sus familias, personal del Ministerio de Educación y miembros de la comunidad por sus colaboraciones, C. Hernández por la administración de cuestionarios, y J. Debbsen por darnos consejos de estadística. Agradecemos M. Maxe por realizar los análisis químicos. Este trabajo fue financiado por una beca de investigación 105296-001 de parte de Canada's International Development Research Center y por becas 2010-1211 and 2009-2070 de Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning. Los autores declaran que ellos no compiten intereses financieros reales o potenciales. Recibido: 21 de Setiembre 2013; Aceptado: 18 de agosto; Avance de publicación: 8 de septiembre 2014; Publicación Final: 1 de diciembre 2014.

### Introducción

La exportación de banano, principalmente a Estados Unidos y Europa, es una importante actividad económica en Costa Rica, que constituye el 2.2 % del producto interno bruto del país y es fuente de empleo para más de 40,000 trabajadores [Corporación Bananera Nacional (CORBANA) 2012]. Para proteger las plantas de banano de enfermedades como la Sigatoka Negra, > 2 millones de kg de plaguicidas son aplicados anualmente en 40,000 hectáreas (Bravo et al. 2013; CORBANA 2012). El fungicida Mancozeb, un complejo de manganeso-zinc de etileno-bis-ditiocarbamato (EBDC) comprende aproximadamente la mitad de los plaguicidas utilizados y es aplicado semanalmente por avionetas (Imagen 1) (Barraza et al. 2011; Bravo et al. 2013). Hasta donde sabemos, no hay otras EBDC que se estén utilizando en estas plantaciones (Bravo et al. 2013). Mancozeb es un fungicida de uso común en todo el mundo, registrado para su uso en casi 120 países (Gullino et al. 2010). En los Estados Unidos, aproximadamente 3.4 millones de kg de mancozeb son aplicados anualmente en agricultura (EPA, 2011). El EBDC es absorbido por medio de la piel, membranas mucosas, vías respiratorias y tractos gastrointestinales y se metaboliza a través de enzimas microsomales hepáticas para producir etilentiourea (ETU) (Houeto et al., 1995). El ETU es rápidamente absorbido vía del tracto gastrointestinal, por consecuencia es filtrado por los riñones y expulsado en la orina (World Health Organization 1988). El ETU está también presente como impureza (0.01-4.5%) en formulaciones de EBDC (Camoni et al. 1988; Lindh et al. 2008).

Aunque tanto el mancozeb como el ETU poseen una baja toxicidad aguda [(OPPTS 2005)], la necrosis neuroblástica e hidrocefalia han sido reportados en embriones de rata ETU-expuestos a dosis mucho más bajas que las que causaron signos tóxicos observables en las madres ratas (Khera 1987). El ETU también es

un conocido inhibidor de la actividad peroxidasa de la tiroides y alteraciones en el peso de la tiroides, las células, hormonas, y la absorción de yodo, y se han reportado tumores en la tiroides en ratas, ratones y perros con exposiciones crónicas de ETU y mancozeb (Axelstad et al. 2011; Belpoggi et al. 2002; Chhabra et al. 1992; International Agency for Research on Cancer 2001).

Dos estudios transversales en aplicadores de bomba de espalda en México expuestos a EBDC (n=49) (Steenland et al. 1997) y trabajadores de plantaciones de banano en Filipinas (n=57) (Panganiban et al. 2004) han reportado niveles elevados de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en el suero de los trabajadores expuestos, en comparación con los trabajadores no expuestos, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa para los trabajadores filipinos de banano. Adicionalmente, los aplicadores mexicanos presentaron más intercambios de cromátidas hermanas y translocaciones cromosómicas que aquellos quienes no fueron expuestos (n= 31), sugiriendo que los efectos citogénicos pueden estar asociados con exposición de EBDC (Steenland et al. 1997). Panganiban et al. (2004) reportaron una correlación positiva entre medidas de concentraciones de ETU en la sangre y el tamaño de los nódulos tiroideos solitarios medidos con ultrasonidos de la glándula tiroides. Los posibles efectos del mancozeb y ETU sobre la función de la tiroides son de particular preocupación para el desarrollo cerebral del feto, el cual requiere de la adecuada secreción de hormona de tiroides: Incluso alteraciones maternas leves pueden afectar el desarrollo neurológico del feto (Kester et al. 2004; Patel et al. 2011).

La concentración urinaria de ETU es considerada un biomarcador bien establecido para evaluar las exposiciones ocupacionales, ambientales y dietarias de mancozeb y ETU (Lindh et al. 2008). Las medianas de las concentraciones urinarias de ETU en trabajadores expuestos de EBDC en viñedos, invernaderos, y fincas de papas varía entre 2 y 45  $\mu\text{g}$  por gramo de creatinina (g.cr) (Colosio et al. 2002; Fustinoni et al. 2005, 2008; Kurttio and Savolainen 1990; Sottani et al. 2003). Las concentraciones urinarias de ETU en poblaciones generales en Italia, El Reino Unido, y los Estados Unidos se encuentran habitualmente por debajo del límite de detección (LdD) ( $< 0.5 \mu\text{g/g.cr}$ ) (Aprea et al. 1996; Castorina et al. 2010; Colosio et al. 2006; Jones et al. 2010; Saieva et al. 2004). Concentraciones urinarias detectables de ETU en una población general generalmente son atribuidas a la exposición a EBDC y ETU por

consumo de alimentos con residuos de plaguicidas (Aprea et al. 1997).

La dosimetría reversa permite la interpretación de concentraciones de biomarcadores urinarios a través de comparaciones con la dosis de referencia (DdR) (Clewell et al. 2008). Una DdR es un estimado de exposición diaria en la población humana que se cree que no representa un riesgo apreciable de efectos nocivos durante toda la vida (U.S. EPA 1996). En Estados Unidos, IRIS (Sistema integrado de información sobre riesgo, por sus siglas en inglés) de EPA ha establecido la DdR para exposición oral crónica de ETU a  $0.08 \mu\text{g/kg/día}$  (U.S. EPA 1996). Esta DdR se derivó del nivel más bajo efecto observado (LOAEL) de  $0.25 \text{ mg/kg/día}$  para la hiperplasia de la tiroides en ratas (Graham et al. 1975) e incluye un factor de incertidumbre total de 3,000 para dar cuenta de las diferencias inter e intra-especie (100x), datos limitados sobre efectos toxicológicos durante el desarrollo y multigeneracionales (3x), y efectos observados a la dosis más baja analizada (10x). La Oficina de Prevención, Plaguicidas y Sustancias Tóxicas de la EPA en los Estados Unidos (OPPTS) ha determinado una DdR alternativa – la dosis crónica ajustada para poblaciones (cPAD) – al  $0.18 \mu\text{g/kg/day}$  (U.S. EPA 2005). Esta cPAD está basada en un nivel sin efecto observado (NOAEL) de  $0.18 \text{ mg/kg/día}$  para toxicidad tiroidea en perros e incluye un factor incierto total de 1,000: 100x para la variación inter e intra-especie y 10x por falta de datos. U.S. EPA (2005) también ha establecido un PAD para exposición aguda (aPAD) al  $5 \mu\text{g/kg/day}$ . Esta aPAD está basado en un NOAEL de migración de las células de Purkinje del cerebelo en embriones de rata después de una exposición materna al  $5 \text{ mg ETU/kg/day}$  (Khera 1973) e incluye un total de factor incierto de 1,000: 100x para la variación inter e intraespecie, 10 x debido a la falta de datos sobre estudios de

neurotoxicidad en el desarrollo. Hasta donde sabemos, sólo un estudio anterior (CHAMACOS; Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas) ha medido las concentraciones urinarias de ETU en mujeres embarazadas que vivían en un área de agricultura con fumigación de suelos mancozeb y maneb, y cuyas concentraciones de orina ETU estuvieron por debajo de LdD de  $0.1 \mu\text{g/L}$  (Castorina et al. 2010). En países en desarrollo, donde los métodos de aplicación extensiva de pesticidas como la fumigación aérea son comunes, se carece de información. Debido a que el feto y el recién nacido puede tener un riesgo particular en los efectos en la salud de mancozeb y la exposición ETU, realizamos un estudio para a) evaluar concentraciones urinarias de ETU en mujeres embarazadas que viven cerca de plantaciones de banano a larga escala con uso extensivo de mancozeb, b) evaluar si se excede la DdR diaria estimada en mujeres embarazadas, y c) identificar factores que predigan sus concentraciones urinarias de ETU.

#### Materiales y Métodos

**Población en estudio.** The Infants' Environmental Health Study [Infantes y Salud Ambiental (ISA)] es un estudio de cohorte de nacimientos en el cantón de Matina, Limón, Costa Rica, dirigido a examinar los posibles efectos de la exposición prenatal a plaguicidas y manganeso sobre el crecimiento y neurodesarrollo infantil. La población del cantón de Matina es de aproximadamente 37,700 [Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) 2011], y las plantaciones a larga escala de banana constituyen la principal actividad económica, representando el 34% del uso del área para agricultura y el pastoreo de ganado (Imagen 2). En estas plantaciones, el mancozeb es aplicado semanalmente por medio de una avioneta.



Imagen 1. Aplicación aérea de mancozeb en una plantación de banana en Costa Rica (fotografía de Marcus Winterbauer, © Längengrad Filmproduktion GmbH; reproducida con permiso).

Las mujeres embarazadas fueron elegibles si ellas vivían en uno de los 40 poblados del cantón de Matina que estaban a 5 km o menos de una plantación de banano, que tuvieron al menos 15 años de edad, y con <33 semanas de embarazo con feto único.

Las mujeres fueron identificadas entre marzo del 2010 y junio del 2011 por medio de escuelas locales, grupos comunales, anuncios y referencias. Un total de 480 mujeres embarazadas elegibles fueron identificadas; de estas, 451 (94%) estuvieron de acuerdo con participar. Para cada una de ellas se obtuvo un consentimiento informado por escrito. En caso de las mujeres menores de edad, se obtuvo un asentimiento por parte de estas, y un consentimiento informado por parte de sus representantes legales. Las mujeres no recibieron ningún tipo de incentivo por su participación. Todas las actividades de estudio fueron aprobadas por el Comité de Ética de Ciencias de la Universidad Nacional en Costa Rica (CECUNA-11-2009).

**Procedimientos de estudio.** Las mujeres fueron entrevistadas en sus hogares de una a tres veces durante su embarazo, dependiendo de la edad gestacional en el momento de inscripción. En promedio ( $\pm$  SD) el tiempo entre la primera y segunda, y segunda y tercera visita fue de  $10.6 \pm 4.0$  y  $9.6 \pm 3.6$  semanas, respectivamente. Se obtuvo una muestra de orina en cada visita. También se recolectaron muestras de sangre y cabello durante cada visita; los resultados de estas muestras han sido reportadas por separado (Mora et al. 2014). Adicionalmente, se obtuvo información clínica transcribiendo la tarjeta de control prenatal, la cual fue entregada a las mujeres embarazadas por parte del Seguro Social de Costa Rica (CCSS) y es completado por médicos y enfermeros en cada cita prenatal. La edad gestacional en el día de la visita fue calculada en base al primer día de la última menstruación (PUM) según reportado por cada mujer. Cuando se desconocía el PUM ( $n=18$ ), la edad de gestación fue basada en los resultados de un ultrasonido ( $n=5$ ) o reportes médicos de la altura uterina ( $n=10$ ). Tres mujeres carecían de cualquier información sobre la edad gestacional y fueron excluidas del análisis de datos. Adicionalmente, tres mujeres no proporcionaron ninguna muestra de orina, y por ende fueron excluidas de los análisis de datos. Obtuvimos 872 muestras de orina de las restantes 445 mujeres. La media de la edad de gestación en la primera, segunda y tercera colección de orina fue  $18.3 \pm 6.5$  ( $n = 440$ ),  $28.7 \pm 5.9$  ( $n = 330$ ), y  $32.9 \pm 2.7$  ( $n=102$ ) semanas, respectivamente.

**Entrevista.** En cada visita, los entrevistadores usaron cuestionarios estructuradas para obtener información sobre características

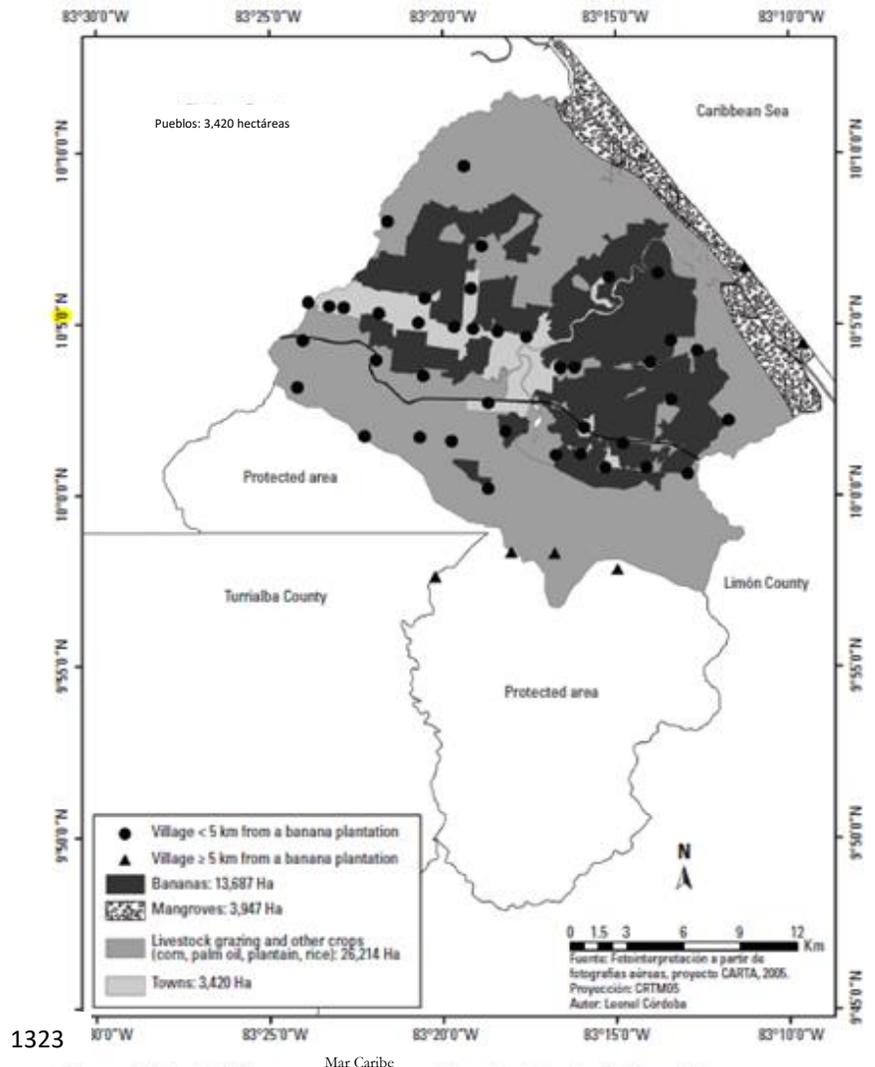
socioeconómicas, médicas e historia ocupacional de las mujeres, ocupación de su pareja, uso de plaguicidas en casa y trabajo, hábitos de estilo de vida, tipo y calidad de casa, información básica sobre la dieta (incluyendo la frecuencia de ingesta de frutas y vegetales), y fuente de consumo del agua. Para propósitos de comparación, nuestros cuestionarios fueron basados en instrumentos utilizados en el estudio CHAMACOS (Eskenazi et al. 2003) y adaptado al uso local español. También les preguntamos a las mujeres sobre si ellas habían lavado ropa de trabajadores agrícolas, aplicaciones aéreas, uso de plaguicidas en/al rededor de su casa el día antes o el mismo día de la recolección de la muestra de orina.

**Georreferenciación.** Documentamos las coordenadas de las residencias de las participantes, usando un GPS, receptor (Garmin Etrex Venture HCto). Las coordenadas fueron localizadas en un mapa de geocodificado del cantón de Matina, usando ArcGIS 10.0 software (ESRI, Redlands, CA, USA). También grabamos las coordenadas de plantaciones de

banano en un radio de 5 km de cada casa, usando fotografías aéreas [CARTA (Costa Rica Airborne Research and Technology Applications) proyecto 2005; Centro Nacional de Alta Tecnología 2011]. Las plantaciones fueron medidas como áreas estáticas de al menos cuatro puntos cuando era posible. Distancias euclidianas fueron medidas desde la residencia hasta el límite más cercano de la plantación de banano más cercana.

**Muestras de orina y análisis de ETU.** Las muestras de orina fueron recolectadas en frascos de 100 ml (Vacuette®, sterile), transferidas a tubos de 15 mL (PerformR™ Centrifuge tubes, Labcon®, sterile), y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el embarque ( $4^{\circ}\text{C}$ ) a la Universidad Lund, Suecia, para su respectivo análisis.

Las muestras fueron hidrolizadas en 0.09 M NaOH por 1 hora a  $100^{\circ}\text{C}$  y alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  fueron analizadas usando un espectrómetro de masas de triple cuádruplo/ Trampa de Iones lineal (QTRAP 5500; AB Sciex, Foster City, CA, USA) acoplado a un sistema de cromatografía



1323

Imagen 2. Uso de la tierra en el cantón de Matina, donde las plantaciones de banano a gran escala constituyen la principal actividad económica

líquida de dos dimensiones (UFLCRX; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Ekman et al. 2013). Los análisis fueron realizados en modo de ionización química a presión atmosférica positiva (Ekman et al. 2013). A cada lote analítico, para el control de calidad, se añadieron tres muestras de orina con concentraciones de ETU conocidas ( $n = 28$ ). Los coeficientes de variación (CVs) fueron 12, 8 y 6% por 2.5, 7.6, y 32.7  $\mu\text{g}$  ETU/L, respectivamente. El LdD fue de 0.1  $\mu\text{g}$  ETU/L de orina, el cual fue estimado mediante la inyección de muestras de orina con bajas, conocidas concentraciones de ETU y calculado mediante el nivel máximo promedio dentro del 0.1 minuto de tiempo esperado de retención de ETU estimado más tres veces la desviación estándar del máximo. (Miller and Miller 2005). Todas las muestras fueron preparadas por duplicado; se trabajaron, y se analizaron en diferentes días. Una precisión en medio de lotes fue determinada desde 300 duplicar los valores cuantificados con CVs de 12, 9, y 8% al 1.0 ( $n = 100$ ), 2.3 ( $n = 100$ ), y 8.5 ( $n = 100$ )  $\mu\text{g}$  ETU/L, respectivamente. El promedio de concentración ETU urinaria fue calculado para cada duplicado y usado en los respectivos análisis estadísticos. Determinamos también la densidad urinaria (refractómetro de mano) (kilogramos por litro) y concentraciones de creatinina (gramos de creatinina por litro) (Mazzachi et al. 2000). Calculamos las concentraciones de ETU corregidas por gravedad específica (ETU-sg) expresadas como  $\mu\text{g}$  ETU/L<sub>gravedad-especifica-correcta</sub> así como también concentraciones de ETU corregidas por creatinina (ETU-cr) expresadas como  $\mu\text{g}$  ETU/g creatinina.

**EDIs.** Para comparación con las DdR crónicas, se estimó la ingesta diaria ETU (EDI) de cada mujer (microgramos ETU/kilogramos de peso corporal por día), por dosimetría inversa a partir de su promedio urinaria ETU-cr, usando un modelo cinético de primer orden de un compartimento y suponiendo estado estacionario (Clewel et al. 2008):

$$EDI_{crónica} = ETU-cr \times BW^{-1} \times C \times (\ln 2/t_{1/2}) \times AR^{-1} \times E^{-1} [1]$$

donde  $ETU-cr$  es el promedio de la concentración de ETU creatinina corregido de las mujeres (microgramos por gramos de creatinina)  $BW$  es su peso corporal antes del embarazo (kg),  $C$  la liberación de creatinina diaria estimada en mujeres embarazadas (1.21 g) (Chattaway et al. 1969),  $t_{1/2}$  es la vida media estimada de ETU (0.83 días) (Lindh et al. 2008),  $AR$  es la proporción de absorción gastrointestinal (50%) (European Commission 2009), y  $E$  es la proporción de excreción urinaria para ETU [90%, con base en estudios en monos de Rhesus y ratas por Allen et al. (1978)].

Así mismo, para comparación de los EDIs de las mujeres con el aPAD, también estimamos el  $EDI_{lagado}$  de cada urinaria ETU-cr separadamente ( $n=872$ ).

**Análisis estadístico.** Usamos estadísticas descriptivas para examinar las relaciones de características generales, ocupacionales, y ambientales. Comprobamos si las variables continuas seguían una distribución normal (Shapiro–Wilk  $W$ -test). Comparamos asociaciones entre variables categóricas con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ); prueba utilizada para mediciones categóricas. Determinamos asociaciones entre variables categóricas y continuas con la prueba  $t$ -Student para variables continuas con distribuciones normales (educación), y la prueba de suma de rangos Wilcoxon / Kruskal-Wallis para las variables continuas que no presentaron distribuciones normales (edad, ingreso per cápita, distancia, y concentraciones urinarias de ETU). Las correlaciones entre variables continuas fueron estimadas usando el coeficiente de correlación  $r$  de Spearman. Todas las muestras de orina tenían concentraciones de ETU por encima del LOD. Debido a que las concentraciones urinarias de ETU siguieron una distribución lognormal, fueron usadas las concentraciones de ETU transformadas al logaritmo natural en los modelos estadísticos. Una muestra de orina con una concentración extremadamente alta de 207  $\mu\text{g}/\text{L}$  de ETU fue excluida de los análisis estadísticos. Se utilizaron análisis de componentes de

varianza con intercepciones al azar ('variance components models with random intercepts') para cada una de las participantes con el fin de estimar la variabilidad de inter e intra mujeres, los coeficientes de correlación intra-clase (ICCs) de las concentraciones de ETU, ETU-cr, y ETU-sg de muestras duplicadas recolectadas de la misma mujer. Los ICCs son usualmente usados para estimar la confiabilidad temporal de biomarcadores (Rosner 2006).

Examinamos posibles diferencias en ETU, ETU-cr, y ETU-sg entre trimestres usando modelos de regresión de efectos mixtos con intercepciones al azar para cada participante e incluye un trimestre como una variable independiente. Además, se utilizó la prueba  $t$  pareada de concentraciones de InETU para comparar las diferencias de la media entre la primera, segunda, y tercera muestra de orina.

Para identificar factores que predicaban concentraciones urinarias InETU ( $p < 0.1$ ) y fueron reportados por al menos 5% de las mujeres, usamos modelos de regresión de efectos mixtos con intercepciones al azar, tomando en cuenta la correlación entre repetidas muestras colectadas de la misma mujer (Peretz et al. 2002). Para corregir por la dilución de orina, incluimos concentraciones de creatinina (microgramos por litro) como una variable independiente en todos los modelos. Este último permite el ajuste apropiado de ETU urinaria de creatinina, mientras asegura la estadística significativa de otras variables en los modelos para ser independiente de efectos en las concentraciones de orina (Barr et al. 2005). Primero, se corrieron modelos bivariados mixtos de los siguientes factores: edad de gestación en la muestra (semanas), la edad de las mujeres (años en el momento de inscripción), nivel educacional de las mujeres y sus compañeros (años completados de educación), estado civil (casada, unión libre, soltera), ingreso familiar per capita (US\$ por cápita), país de nacimiento (Costa Rica u otros países centroamericanos), distancia de residencia a una plantación de banano (metros, agrupados en cuartiles), trabajo en agricultura durante el embarazo (si/no), ocupación de pareja en agricultura (si/no), vivir con trabajadores agrícolas (si/no), lavó ropa de trabajadores agrícolas el día antes o el mismo día de la toma de muestras (si/no, como variables separadas), estuvo cerca de aplicaciones áreas el día antes o el mismo día del muestreo (si/no, como variables separadas),

Cuadro 1. Descripción de mujeres embarazadas del estudio de cohorte de nacimiento de ISA con al menos una muestra de orina ( $n = 445$ )

Características	$n$	Media $\pm$ SD	P50 (P25, P75)	Mínimo	Máximo
Edad de inscripción (años)	445	24 $\pm$ 6.5	22 (19, 28)	15	44
Edad de gestación en la inscripción (Semanas)	445	18 $\pm$ 6.4	18 (13, 24)	6	33
Nivel educativo (años completos)	445	7.0 $\pm$ 2.8	6.0 (6.0, 9.0)	0	15
Ingreso per cápita (US\$/mes)	412	140 $\pm$ 93	120 (80, 173)	16	1,080
Edad de las parejas (años)	438	28 $\pm$ 9.0	26 (22, 33)	15	54
Nivel educativo de la pareja (años completos)	391	6.6 $\pm$ 2.9	6.0 (6.0, 9.0)	0	16
Distancia residencial de plantación de banano al momento de la inscripción (metros)	445	453 $\pm$ 657	216 (48, 565)	0.3	4,115

P. Percentiles

Cuadro 2. Características generales, laborales, medioambientales y alimentarias de las mujeres embarazadas del estudio de cohorte con al menos una muestra de orina (n = 445).

Características	n (%)	Características	n (%)
<b>Estado marital</b>		<b>Ropa de trabajo agrícola lavada el día de recolección de la muestra</b>	
Casada/viviendo con pareja	336 (76)	Si	87 (20)
Soltera	109 (24)	No	345 (80)
<b>País de nacimiento</b>		<b>Ropa de trabajo agrícola lavada un día antes de la recolección de muestra</b>	
Costa Rica	361 (81)	Si	84 (20)
Otro Centroamericano*	84 (19)	No	341 (80)
<b>Fumar durante el embarazo</b>		<b>Residencia cerca de fumigación aérea el día de colección de muestra</b>	
Si	18 (4)	Si	106 (25)
No	426 (96)	No	323 (75)
<b>= 1 vaso consumido de alcohol durante el embarazo</b>		<b>Residencia cerca de fumigación aérea el día antes de la colección de muestra</b>	
Si	14 (3)	Si	104 (25)
No	428 (97)	No	311 (75)
<b>Uso de drogas durante el embarazo</b>		<b>Consumo de bananos verdes o plátanos</b>	
Si	5 (1)	< 5 veces/semana	167 (38)
No	438 (99)	= 5 pero < 10 veces/semana	169 (39)
		= 10 veces/semana	99 (23)
<b>Fuente de agua potable para beber</b>		<b>Consumo de otros vegetales</b>	
Acueducto	348 (78)	< 5 veces/semana	89 (20)
Otro: pozo, agua de lluvia, río	97 (22)	= 5 pero < 10 veces/semana	126 (29)
		= 10 pero < 15 veces/semana	192 (44)
		= 15 veces en una semana	31 (7)
<b>Ocupación al momento de inscripción</b>		<b>Consumo de arroz y frijoles</b>	
Trabajo en plantaciones de banano	33 (7)	< 10 veces/semana	168 (38)
Otro trabajo de agricultura	3 (1)	= 10 pero < 15 veces/semana	139 (32)
Otro trabajo (no de agricultura)	78 (16)	= 15 veces/semana	134 (30)
Amas de casa y/o no trabajando	331 (76)		
<b>Ocupación del padre al momento de inscripción</b>		<b>Consumo de frutas</b>	
Trabajo en plantaciones de banano	245 (57)	< 1 veces/semana	61 (14)
Otro trabajo de agricultura	25 (6)	1-2 veces/semana	181 (41)
Otro trabajo (no de agricultura)	132 (31)	= 3 pero < 5 veces/semana	95 (22)
No trabaja	25 (6)	= 5 veces/semana	103 (23)
<b>Vivieron con agricultores durante el embarazo</b>			
Si	347 (78)		
No	98 (22)		

Hubo información faltante por muchas mujeres con al menos una muestra de orina: (n=1), uso de alcohol (n=3), uso de drogas (n=2), ocupación de la pareja (n=18), la vado de ropa de trabajo el día antes (n=13) y el de la muestra (n=20), fumigación aérea el día antes (n=16) y el día de la muestra (n=20), consumo de vegetales (n=7), consumo de banano y plátano (n=10), consumo de arroz y frijoles (n=4), consumo de frutas (n=5). \*Todas las mujeres migrantes fueron nacidas en Nicaragua, excepto una que nació en El Salvador.

el uso de plaguicidas dentro o alrededor de la casa el día antes o el mismo día de la toma de muestras (sí/no, como variables separadas), fuente de agua potable para consumo [acueducto/otro (bueno, agua de lluvia o río)], variables en la dieta como el consumo materno de frutas (< 5 o ≥ 5 veces/semana), consumo de banano verde o plátano (< 10 o ≥ 10 veces/semana), vegetales (< 5, ≥ 5–10, or ≥ 10 veces/semana), y arroz y frijoles (< 15 or ≥ 15 veces/semana). Incluimos todos los factores con  $p < 0.2$  en un modelo multivariado lineal de efectos mixtos y usamos un manual de selección paso a paso para retener factores con  $p < 0.05$  en el modelo multivariable final.

Para las variables categóricas los coeficientes estimados fueron expresados como el porcentaje de diferencia del promedio de la categoría de referencia mediante  $\exp(\beta)$  (Kennedy 1981). Por ejemplo, para las mujeres que trabajaron en agricultura durante el embarazo la condición de referencia fueron las mujeres que no trabajaron en agricultura durante el embarazo. Para las variables continuas, calculamos el porcentaje de diferencia en concentraciones de ETU urinario asociadas con el incremento en una unidad en la variable independiente mientras que todas las demás variables del modelo se mantuvieron constantes, por medio de  $[\exp(\beta) - 1] \times 100$  (Halvorsen and Palmquist 1980). Para verificar si existía una tendencia continua entre la distancia residencial plantación de plátanos y ETU urinaria, también agregamos distancia (metros) a un modelo como una variable continua después transformación logarítmica natural. Esta transformación logarítmica fue realizada para asegurar la homoscedasticidad de los residuos. El estimado de  $\beta$  representa el porcentaje de cambio in y (variable dependiente) mientras x (variable independiente) incrementa por el 1% (Institute for Digital Research and Education 2014). Revisamos si los residuos de los modelos de regresión siguieron una distribución normal (Shapiro–Wilk W test) y si contenían valores atípicos. Para evaluar la influencia de los valores atípicos sobre las estimaciones de los valores de los coeficientes de beta, realizamos análisis adicionales excluyendo el 1% de observaciones con la distancia de valores de Cook más alta (Zuurbier et al. 2011). Para todas las pruebas estadísticas, el nivel de significancia fue fijado en 5%. Usamos JPM 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para análisis estadísticos.

### Resultados

En general, las mujeres eran jóvenes, el 25% tuvo ≤ 19 años de edad al momento de inclusión, y económicamente empobrecidas, con un ingreso medio por debajo de la línea de pobreza de Costa Rica de US\$ 142 per cápita

por mes (INEC 2012) (Cuadro 1). Veinticinco por ciento de las mujeres vivían a 50 m de una plantación de banano o menos (Cuadro 1). Al momento de inclusión, el 7% de las mujeres y el 57% de sus parejas trabajaban en plantaciones de banano, el 1% de las mujeres y el 6% de sus parejas realizaban otro trabajo agrícola (Cuadro 2). Ninguna de las mujeres reportó aplicar mancozeb en el trabajo. Además, ninguna de ellas reportó el uso residencial de mancozeb o algún otro EBDcs. Diecinueve por ciento de las mujeres eran inmigrantes, casi exclusivamente de Nicaragua (Cuadro 2).

Las mujeres frecuentemente consumían arroz y frijoles, el 30% más de 15 veces por semana (Cuadro 2). Las concentraciones de ETU, ETU-sg, y ETU-cr de las mujeres embarazadas se distribuyeron similares con una concentración mediana de 2.9 µg/L [rango inter-cuartil (RIC) = 1.8 – 4.6], 3.1 µg/L-sg (RIC = 2.0–4.5), y 3.0 µg/g-cr (RIC = 1.9–4.6), respectivamente (Cuadro 3). No hubo diferencias significativas en la media geométrica de las concentraciones según el trimestre en el cual las muestras fueron recolectadas (Cuadro 3). Por ejemplo, comparadas con las muestras recolectadas el primer trimestre, la media geométrica de las otras concentraciones fue 3.8% (95% CI: –12, 22) y 4.7% (95% CI: –11, 24) más alta para las muestras recolectadas en el segundo y tercer trimestre, respectivamente (datos nos mostrados). Cuando se restringió el análisis a las mujeres con tres muestras repetidas (n=90), tampoco detectamos diferencias significativas en la media geométrica de concentración de ETU entre trimestres, o entre la primera, segunda, o tercera muestras de orina. Por ejemplo, comparado con la primera muestra, las diferencias fueron -0.6% (95% CI: –17, 20) y -5.0% (95% CI: –22, 16) para la segunda y tercera muestra, respectivamente. Las concentraciones de ETU variaron más en mujeres que entre las mujeres, el cual fue reflejado por los ICCs relativamente bajos de 15% a 19% (Cuadro 3).

La mediana de la EDI crónica, calculada del promedio de la concentración ETU-cr urinaria de cada mujer, fue de 0.12 µg ETU/kg/día (RIC = 0.08 – 0.17 µg/kg/día) (Cuadro 3). La variabilidad en las EDI's crónicas fue relativamente pequeña: un factor de 2.9 entre el percentil 95 y 50. Más del 72% de las mujeres tenía una EDI crónica que sobrepasaba la DdR de 0.08 µg/kg/day (U.S. EPA 1996), y el 23% de las mujeres tenía una EDI que también sobrepasaba la cPAD de 0.18 µg/kg/día (U.S. EPA 2005). El valor del percentil 95 de la distribución de EDI's crónicas (0.33 µg/kg/day) sobrepasó la DdR más de cuatro veces, y fue el doble del cPAD. En cuanto a la exposición aguda, solamente para una mujer su valor

EDI<sub>aguda</sub> (7.71 µg/kg/día) excedió la aPAD of 5 µg/kg/día (U.S. EPA 2005). Esta mujer tenía una concentración urinaria de 196.6 µg ETU/g-cr al momento de inclusión. La segunda muestra de orina obtenida de la misma mujer 6 semanas después tenía una concentración de ETU mucho más baja (2.6 µg ETU/gr-cr). La mujer vivía a 10 metros de una plantación bananera y en una pregunta abierta, ella expresó su preocupación acerca de la fumigación aérea tan cercana. Aparte de vivir cerca de una plantación de banano, ella no reportó factores adicionales que pudieran explicar este alto ETU-cr. El percentil 95 de la EDI<sub>aguda</sub> fue de 0.37 µg/kg/día, más de 10 veces más bajo que el aPAD.

Las mujeres frecuentemente consumían arroz y frijoles, el 30% más de 15 veces por semana (Cuadro 2). Las concentraciones de ETU, ETU-sg, y ETU-cr de las mujeres embarazadas se distribuyeron similares con una concentración mediana de 2.9 µg/L [rango inter-cuartil (RIC) = 1.8 – 4.6], 3.1 µg/L-sg (RIC = 2.0–4.5), y 3.0 µg/g-cr (RIC = 1.9–4.6), respectivamente (Cuadro 3). No hubo diferencias significativas en la media geométrica de las concentraciones según el trimestre en el cual las muestras fueron recolectadas (Cuadro 3). Por ejemplo, comparadas con las muestras recolectadas el primer trimestre, la media geométrica de las otras concentraciones fue 3.8% (95% CI: –12, 22) y 4.7% (95% CI: –11, 24) más alta para las muestras recolectadas en el segundo y tercer trimestre, respectivamente (datos nos mostrados). Cuando se restringió el análisis a las mujeres con tres muestras repetidas (n=90), tampoco detectamos diferencias significativas en la media geométrica de concentración de ETU entre trimestres, o entre la primera, segunda, o tercera muestras de orina. Por ejemplo, comparado con la primera muestra, las diferencias fueron -0.6% (95% CI: –17, 20) y -5.0% (95% CI: –22, 16) para la segunda y tercera muestra, respectivamente. Las concentraciones de ETU variaron más en mujeres que entre las mujeres, el cual fue reflejado por los ICCs relativamente bajos de 15% a 19% (Cuadro 3).

La mediana de la EDI crónica, calculada del promedio de la concentración ETU-cr urinaria de cada mujer, fue de 0.12 µg ETU/kg/día (RIC = 0.08 – 0.17 µg/kg/día) (Cuadro 3). La variabilidad en las EDI's crónicas fue relativamente pequeña: un factor de 2.9 entre el percentil 95 y 50. Más del 72% de las mujeres tenía una EDI crónica que sobrepasaba la DdR de 0.08 µg/kg/day (U.S. EPA 1996), y el 23% de las mujeres tenía una EDI que también sobrepasaba la cPAD de 0.18 µg/kg/día (U.S. EPA 2005). El valor del percentil 95 de la distribución de EDI's crónicas (0.33 µg/kg/day) sobrepasó la DdR más de cuatro veces, y fue el

Cuadro 3. Distribución y variabilidad de concentraciones urinarias de ETU en mujeres embarazadas en el estudio de nacimiento cohorte de ISA

ETU	No. De muestras (No. mujeres)	Media $\pm$ SD	MG (DSG)	Mínimo	P10	P25	P50	P75	P90	Máximo	S <sup>2</sup> <sub>e</sub> <sup>a</sup>	S <sup>2</sup> <sub>w</sub>	ICC
<b>Sin corregir (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>													
En total	872 (445)	4.2 $\pm$ 8.0	2.9 (2.2)	0.3	1.1	1.8	2.9	4.6	7.5	207.0	1.12	1.63	0.18
1er trimestre <sup>b</sup>	118 (117)	4.6 $\pm$ 6.3	3.1 (2.2)	0.5	1.3	1.9	2.6	4.7	8.2	42.0	-----	-----	-----
2do trimestre	404 (417)	3.6 $\pm$ 2.9	2.8 (2.1)	0.3	1.1	1.8	2.9	4.4	6.9	23.9	1.05	1.59	0.10
3er trimestre	350 (306)	4.7 $\pm$ 11.7	2.9 (2.4)	0.3	1.0	1.7	3.1	4.7	8.4	207.0	1.23	1.60	0.31
<b>Corregidos (<math>\mu\text{g/L}_{\text{gravedad específica corregida}}</math>)</b>													
En total	872 (445)	4.1 (8.6)	3.1 (1.9)	0.2	1.5	2.0	3.0	4.5	6.8	236.3	1.06	1.40	0.15
1er trimestre <sup>c</sup>	118 (117)	4.1 (4.2)	3.1 (2.0)	0.6	1.3	2.0	2.7	4.9	6.8	29.2	-----	-----	-----
2do trimestre	404 (367)	3.6 (2.5)	3.0 (1.8)	0.2	1.5	2.0	2.9	4.3	6.3	20.1	1.10	1.26	0.28
3er trimestre	350 (306)	4.7 (13.0)	3.2 (1.9)	0.5	1.4	2.0	3.1	4.7	7.3	236.3	1.16	1.35	0.33
<b>Corregidos (<math>\mu\text{g/g creatinina}</math>)</b>													
En total	870 (445)	4.1 $\pm$ 7.5	3.0 (2.0)	0.1	1.3	1.9	2.9	4.5	6.9	196.6	1.09	1.46	0.19
1er trimestre <sup>d</sup>	117 (117)	3.9 $\pm$ 3.7	2.8 (2.1)	0.6	1.1	1.7	2.8	4.8	7.4	20.4	-----	-----	-----
2do trimestre	404 (367)	3.8 $\pm$ 3.0	3.0 (2.0)	0.1	1.4	1.9	2.9	4.5	6.8	21.1	1.14	1.32	0.32
3er trimestre	349 (306)	4.6 $\pm$ 11.1	3.1 (2.1)	0.4	1.3	2.0	3.0	4.6	6.9	196.6	1.16	1.42	0.30

Abreviaciones: MG- media geométrica. DSG- desviación estándar geométrica. P- percentiles. S<sup>2</sup><sub>e</sub>- variación entre mujeres. S<sup>2</sup><sub>w</sub>- variación en mujeres.

<sup>a</sup>La muestra con la máxima concentración de ETU (207  $\mu\text{g/L}$ , 236.3  $\mu\text{g/Lsg}$ , y 196.6  $\mu\text{g/g cr}$ ) fue excluida del análisis por estimación de componentes de variación, ICC, y estimación del porcentaje de diferencia entre trimestres de embarazo. <sup>b</sup>La diferencia de porcentaje en ETU fue de -13% (95% CI: -35, 6.3%) y -8.0% (95% CI: -0.30, 11%) para el segundo y tercer trimestre comparado con el primer trimestre, respectivamente. <sup>c</sup>La diferencia de porcentaje en ETU-sg fue de 3.8% (95% CI: -12, 22%) y 4.7% (95% CI: -11, 24%) para el segundo y tercer trimestre comparado con el primer trimestre, respectivamente. <sup>d</sup>La diferencia de porcentaje en ETU-cr fue de 3.8% (95% CI: -12, 22%) y 4.7% (95% CI: -11, 24%) para el segundo y tercer trimestre comparado con el primer trimestre, respectivamente.

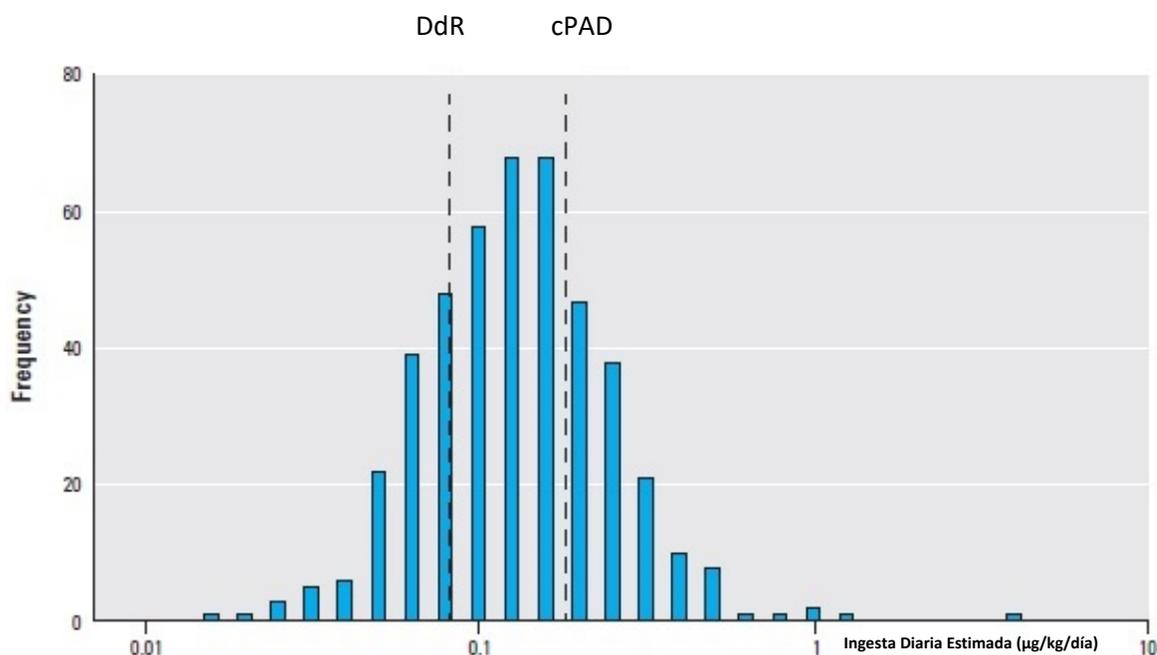


Imagen 3. Histograma de la ingesta diaria estimada (escala log), expresada como  $\mu\text{g ETU/kg}$  peso corporal por día, en las mujeres embarazadas del estudio ISA, en relación con dosis de referencia crónicas de 0.08  $\mu\text{g/kg}$  por día (U.S. EPA 1996) y 0.18  $\mu\text{g/kg}$  por día (U.S. EPA 2005)

doble del cPAD. En cuanto a la exposición aguda, solamente para una mujer su valor EDI<sub>aguda</sub> (7.71 µg/kg/día) excedió la aPAD de 5 µg/kg/día (U.S. EPA 2005). Esta mujer tenía una concentración urinaria de 196.6 µg ETU/g.cr al momento de inclusión. La segunda muestra de orina obtenida de la misma mujer 6 semanas después tenía una concentración de ETU mucho más baja (2.6 µg ETU/gr.cr). La mujer vivía a 10 metros de una plantación bananera y en una pregunta abierta, ella expresó su preocupación acerca de la fumigación aérea tan cercana. Aparte de vivir cerca de una plantación de banano, ella no reportó factores adicionales que pudieran explicar este alto ETU-cr. El percentil 95 de la EDI<sub>aguda</sub> fue de 0.37 µg/kg/día, más de 10 veces más bajo que el aPAD.

En el cuadro 4 presentamos los resultados de los análisis bi- y multivariados de los modelos mixtos, de los factores asociados con las concentraciones urinarias de ETU. Los resultados de los análisis bivariados mostraron que las mujeres que vivían más cerca de las plantaciones de banano tenían concentraciones de ETU más altas que las mujeres que vivían a una distancia más larga (Cuadro 4). Las mujeres que trabajaron en agricultura durante el embarazo y las mujeres que lavaron la ropa de trabajo el día de la prueba o el día antes del muestreo igualmente tenían mayor ETU que las mujeres que no lo hicieron (Cuadro 4). La asociación fue más fuerte por el lavado de ropa de trabajo el día antes de la muestra que el lavado de la ropa el día del muestreo (Cuadro 4). Las mujeres que reportaron una fumigación aérea cercana el día del muestreo también tuvieron concentraciones de ETU más altas que las que no lo reportaron (Cuadro 4), pero no se detectó una diferencia significativa para fumigación aérea reportada el día anterior al muestreo (1.1% más alta; 95% CI: -4.2, 7.0,  $p = 0.69$ ). Las mujeres inmigrantes tuvieron mayor ETU comparado con las mujeres nacidas en Costa Rica (Cuadro 4). Las mujeres que reportaron comer arroz y frijoles  $\geq 15$  veces o menos, tuvieron concentraciones de ETU más altas que las mujeres que consumieron arroz y frijoles con menos frecuencia (Cuadro 4), pero no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para los otros factores de dieta (datos no mostrados). Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas por edad, nivel de educación de las mujeres y hombres, estado civil, ingreso per cápita, ocupación de la pareja, convivir con trabajadores agrícolas, fuente de agua potable para beber y uso de plaguicida en el hogar en el día antes o el mismo día de las muestras (datos no mostrados).

En el modelo multivariado, la proximidad residencial a una plantación de banano, la

ocupación de la madre en la agricultura, el lavado de la ropa de trabajo agrícola en el día antes de la visita, y de ser un inmigrante fueron retenidos (todos  $p < 0.05$ ). Las diferencias ajustadas en ETU urinaria de los factores en el modelo multivariado fueron algo más pequeñas en comparación con la diferencia de los modelos bivariados (Cuadro 4).

Los resultados de análisis multivariados mostraron que las mujeres que vivían más cerca de las plantaciones de banano tenían concentraciones más altas que las mujeres que vivían a una distancia más larga (Cuadro 4). De hecho, aquellas que vivían a 48 m de una plantación (1er cuartil) tenía 45% (95% CI: 23, 72%) concentraciones urinarias de ETU más alto comparado con las mujeres que vivían  $\geq 565$  m (4to cuartil) (Cuadro 4).

Detectamos una tendencia negativa entre la proximidad residencial de plantación de plátanos (ln-metros) y concentraciones lnETU:  $\beta = -0.08$  (95% CI: -0.11, -0.05) ( $p < 0.0001$ ) (ver Material Suplementario, Imagen S1). Las mujeres que trabajaron en agricultura durante el embarazo tenían un 19% (95% CI: 9.3, 29%) más alto de concentraciones de ETU comparado con mujeres que no trabajaron ( $p < 0.001$ ).

Las mujeres que lavaron su ropa de trabajo en el día antes de las muestras igualmente concentraciones de ETU más altas que otras mujeres (Cuadro 4) (11% más alto; 95% CI: 4.9, 17%) ( $p < 0.0003$ ). En promedio, las mujeres inmigrantes tenían 6.2% (95% CI: 1.0, 13%) concentraciones de ETU más altas que las mujeres nacidas en Costa Rica ( $p = 0.049$ ).

Porque las mujeres inmigrantes pueden tener características ambientales y sociales comparando con las mujeres nacidas en Costa Rica, analizamos características sociodemográficas, ambientales y nacidos en Costa Rica ( $n = 361$ ) versus inmigrantes ( $n = 84$ ). Las características fueron generalmente similares para ambos grupos, pero las inmigrantes vivieron más cerca de las plantaciones de banano (distancia media 98m (RIC= 19, 366) versus 267m (RIC = 75, 602) ( $p < 0.001$ ) comparado a las mujeres nacidas en Costa Rica, y más mujeres inmigrantes lavaron ropa de trabajo agrícola en el día antes de las muestras comparado con las mujeres nacidas en Costa Rica, 39% versus 15%, respectivamente ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Resultados de modelos multivariados de efectos mixtos de factores asociados ( $p < 0.1$ ) con concentraciones urinarias de ETU de mujeres embarazadas ( $n = 833$  muestras, 437 mujeres), todos los modelos incluyeron creatinina como covariable independiente<sup>a</sup>.

Factor	Bivariado		Multivariado	
	% diferencia (95% CI)	Valor $p$	% diferencia (95% CI)	Valor $p$
Creatinina ( $\mu\text{L}$ )	77 (66, 89)	< 0.0001	80 (69, 92)	< 0.0001
Distancia residencial a plantaciones de banano (m) <sup>b,c</sup>				
< 48 (1er cuartil)	52 (28, 80)	< 0.0001	45 (23, 72)	< 0.0001
$\geq 48$ -216 (2do cuartil)	18 (-1.0, 40)	0.07	12 (-5.4, 38)	0.31
$\geq 216$ -565 (3er cuartil)	17 (-1.1, 39)	0.07	17 (-1.2, 38)	0.08
$\geq 565$ (4to cuartil)	-----	-----	-----	-----
Ocupación en agricultura durante el embarazo	19 (9.0, 30)	< 0.0001	19 (9.3, 29)	< 0.0001
Lavado de ropa de trabajo en el día de la muestra	5.8 (-0.2, 12)	0.06		
Lavado de ropa de trabajo en el día antes de la muestra	13 (6.2, 19)	< 0.0001	11 (4.9, 17)	0.0003
Cercanía a fumigación aérea el día de la recolección de muestra	7.2 (1.4, 13)	0.01		
Consumo de arroz y frijoles $\geq 15$ veces a la semana	5.1 (-0.3, 11)	0.07		
Inmigrantes	10 (3.4, 17)	0.003	6.2 (1.0, 13)	0.049

<sup>a</sup>La información faltante por varias mujeres con al menos una muestra por lavado de ropa de trabajo agrícola en el día de la recolección ( $n = 10$  muestras, 3 mujeres), por cercanía de fumigación aérea del día del muestreo ( $n = 12$  muestras, 3 mujeres) y por consumo de arroz y frijoles ( $n = 5$  muestras, 3 mujeres). <sup>b</sup>Al agrupar segundo y tercer cuartil juntos, la diferencia porcentual fue del 18% (IC del 95%: 2,7, 35%;  $p = 0,01$ ) para el modelos bivariado y 14% (95% CI: 0.3, 30%,  $p = 0.04$ ) para el modelo multivariado, respectivamente. <sup>c</sup>Cuando incluimos la distancia como una variable continua (metros LN) y lnETU; para modelo bivariado:  $\beta = -0.09$  (95% CI: -0.12, -0.06) ( $p < 0.0001$ ), para modelo multivariado:  $\beta = -0.08$  (95% CI: -0.11, -0.05) ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 5.** Características sociodemográficas, ambientales y ocupacionales de las mujeres nacidas en Costa Rica ( $n=361$ ) e inmigrantes ( $n=84$ ).

Características	Nacidas de Costa Rica ( $n=361$ )	Inmigrantes ( $n=84$ )	Valor $p$
Edad (años) [media (RIC)]	22.1 (18.8, 27.3)	23.9 (20.2, 30.1)	0.05
Educación (media $\pm$ SD)	7.1 $\pm$ 2.6	6.5 $\pm$ 3.2	0.08
Distancia a plantaciones de banano (m) [media (RIC)]	98 (19, 366)	267 (75, 602)	0.0007
Ingreso / per cápita (US\$) [media (RIC)]	120 (77, 172)	120 (80, 200)	0.55
Trabajo en agricultura (%)	7.5 %	10.7%	0.33
Cercanía a fumigación aérea			
Día del muestreo	23%	33%	0.08
Día antes del muestreo	26%	23%	0.60
Lavado de ropa de trabajo agrícola			
Día del muestreo	18%	28%	0.05
Día antes del muestreo	15%	39%	<0.0001

## Discusión

Los resultados de este estudio muestran ETU urinario elevado en mujeres embarazadas viviendo en las cercanías de las plantaciones de banano. El ETU urinario fue asociado con la proximidad residencial a una plantación de banano, lavado de ropa de trabajo agrícola el día antes de la toma de muestras y trabajo en agrícola durante el embarazo. Las mujeres inmigrantes tenían un ETU urinario más alto, pero esto se explica en parte por factores ambientales y sociales, ya que, comparado con las mujeres nacidas en Costa Rica, ellas vivían más cerca de las plantaciones, y habían lavado más a menudo ropa de trabajo agrícola el día anterior al muestreo.

La fumigación frecuente de mancozeb con avioneta sobre las plantaciones de banano es la fuente probable de estas concentraciones elevadas de ETU urinario y su variación con factores ambientales y ocupacionales. Por lo que sabemos, la fumigación aérea es la única forma en la cual el mancozeb es aplicado en plantaciones de banano a gran escala en Costa Rica; en este estudio, el mancozeb no se reportó ser utilizado para fines residenciales. Porque sólo el 1% de las mujeres y sólo el 6% de sus parejas realizaron otro trabajo agrícola, las elevadas concentraciones de ETU en las mujeres embarazadas que trabajaron en agricultura y lavaron ropa de trabajo agrícola probablemente son una consecuencia de las actividades de fumigación aérea de mancozeb en las plantaciones de banano. Las mujeres trabajando en las plantaciones de banano por lo general eran empleadas en las plantas empacadoras que se encuentran dentro de las plantaciones de banano y pueden ser fácilmente contaminadas cuando los bananos son fumigados por vía aérea. Ninguna de las mujeres de este estudio reportó aplicar mancozeb. La ropa de trabajo agrícola que las mujeres indicaron lavar, es de los miembros familiares que generalmente trabajaban en las plantaciones de banano. Para esta actividad, había una asociación más fuerte entre lavar el día anterior del muestreo y las concentraciones urinarias de ETU, en comparación con lavar el día del muestreo, lo cual puede reflejar una absorción de ETU relativamente lenta, después de una exposición dérmica (Ekman et al. 2013). En contraste, la fumigación aérea cercana reportada el día del muestreo se asoció más fuerte con las concentraciones urinarias de ETU que la fumigación aérea el día antes del muestreo, posiblemente por la rápida absorción de mancozeb y ETU a través de los pulmones después de la exposición respiratoria en comparación con la absorción a través de la exposición dérmica (Ekman et al. 2013).

Estos hallazgos sugieren que tanto las exposiciones respiratorias como las cutáneas, pueden ser rutas relevantes de absorción, consistente con la literatura. Kurttio and Savolainen (1990) reportaron que las concentraciones personales de ETU el aire en los aplicadores EBDC (n = 43) fueron asociadas con las concentraciones urinarias de ETU. Un pequeño estudio de exposición ocupacional (n = 13) reportó asociaciones entre exposiciones dérmicas de mancozeb y concentraciones urinarias de ETU (Colosio et al. 2002). Un estudio reciente de exposición dérmica de ETU en humanos reportó que aproximadamente el 10% de la dosis de ETU aplicada sobre la piel fue excretada en la orina (Ekman et al. 2013).

Las elevadas concentraciones de ETU urinario en mujeres inmigrantes, que fueron explicadas parcialmente porque las mujeres inmigrantes vivieron más cerca de las plantaciones de banano y porque lavaron la ropa de trabajo agrícola con más frecuencia, sugieren una desigualdad en condiciones de vivienda y actividades del hogar entre las mujeres inmigrantes y mujeres nacidas en Costa Rica. Esta desigualdad puede resultar en un incremento en las concentraciones urinarias de ETU en mujeres inmigrantes en comparación con las costarricenses. La condición de inmigrante puede ser un indicador de una amplia gama de factores socioeconómicos y ambientales adicionales determinantes de exposición y salud, ya que se mantuvo significativa después de ajustarla por los otros factores. En estudios futuros, la condición de inmigrante debería ser considerado ya que podría modificar asociaciones entre exposiciones a plaguicidas y salud (Bellinger 2008).

Dado que hay existen muy pocos estudios sobre factores que influyen las concentraciones urinarias de ETU durante el embarazo en mujeres que viven cerca de terrenos agrícolas, utilizamos selección por pasos manual para 21 variables para decidir qué variables se deben incluir en el modelo multivariable. Este procedimiento infla el error tipo 1 porque los resultados finales del modelo de múltiples pruebas con el mismo conjunto de datos, por lo que los p-valores estimados (y los intervalos de confianza) pueden ser demasiados pequeños. Sin embargo, inclusive después de corregir por pruebas de comparación múltiple utilizando el más bien conservador criterio de Bonferroni (Bland and Altman 1995), cuyos resultados en un valor- p corregido para una significancia estadística de  $0.05/21 = 0.002$ , las variables de distancia residencial, lavado de ropa de trabajo agrícola y la ocupación durante el embarazo siguen siendo estadísticamente significativa. La

exposición de ETU en esta población de mujeres embarazadas es preocupante; el 72% de las mujeres embarazadas tuvo su EDI-crónica por encima del DdR establecida por el U.S EPA (1996). También, la mediana de las concentraciones urinarias de ETU de las embarazadas fue más de cinco veces más alto que aquellas que han sido reportadas en otras poblaciones generales (Aprea et al. 1996; Castorina et al. 2010; Colosio et al. 2006; Jones et al. 2010; Saieva et al. 2004), y comparable con las concentraciones de ETU de trabajadores agrícolas italianos al finalizar la jornada (Colosio et al. 2002; Sottani et al. 2003) (véase el material suplementario, Imagen S2). En ocasiones, la EDI-aguda de las mujeres puede llegar el aPAD establecido por el U.S. EPA (2005).

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio en evaluar metabolitos en la exposición a pesticidas en mujeres embarazadas que viven cerca de campos agrícolas con fumigación aérea. En Costa Rica, los pilotos deben mantener una distancia de 100 m de las áreas residenciales en ausencia de alguna barra natural vegetativa, como árboles, y 30 m en presencia de alguna barra natural vegetativa (LA GACETA 2008). Las aeronaves son equipadas con sistemas de información geográfica para incrementar la precisión de la aplicación de plaguicidas y reducir la desviación en la fumigación fuera de los objetivos. No obstante, las aplicaciones aéreas han sido percibidas como amenazas para la población que vive cerca de los campos agrícolas, y las distancias de fumigado son, algunas veces, no respetadas (Barraza et al. 2011, 2013). En otros países, como Los Estados Unidos, las aplicaciones aéreas de plaguicidas han sido asociadas con casos de desviación en el objetivo de fumigación y enfermedades agudas por plaguicidas (Lee et al. 2011).

En resumen, las mujeres embarazadas viviendo cerca de plantaciones de banano tenían elevadas concentraciones urinarias de ETU en comparación con concentraciones reportadas en estudios anteriores y sus EDI's estimadas para exposiciones crónicas frecuentemente exceden las DdRs. Nuestros hallazgos sugieren que las actuales regulaciones gubernamentales para las actividades de fumigación aérea de plaguicidas no protegen a las mujeres embarazadas y fetos de la exposición de ETU, y que la principal fuente de exposición es la fumigación aérea de mancozeb. Los factores que predicen las concentraciones urinarias de ETU proporcionan información sobre cómo se podría reducir la exposición. Debido a la asociación inversa de ETU con la distancia residencial, las siguientes medidas servirán para disminuir probablemente tanto exposiciones

ambientales como ocupacionales: la reducción de la frecuencia de aplicación aérea de pesticidas, la sustitución de fumigación aérea con técnicas de aplicación menos dispersivas, y medidas de implementación de técnicas adicionales para reducir la deriva de la aplicación. Para reducir la contaminación del ambiente en el hogar, al mínimo, la distancia entre las plantaciones de banano y las áreas residenciales deben ser incrementadas, las barreras naturales vegetativas deben ser plantadas, y la ropa de trabajo no debe de ser lavado en los hogares sino en el lugar de trabajo, usando sistemas automatizados para evitar exposición adicional de los trabajadores.

## Referencias

- Allen JR, Van Miller JP, Seymour JL. 1978. Absorption, tissue distribution and excretion of <sup>14</sup>C ethylenethiourea by the rhesus monkey and rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 20(1):109–115.
- Apra C, Betta A, Catenacci G, Collid A, Lottie A, Minoia C, et al. 1997. Urinary excretion of ethylenethiourea in five volunteers on a controlled diet (multicentric study). *Sci Total Environ* 203:167–179.
- Apra C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Minoia C, Passini W, et al. 1996. Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study). *Sci Total Environ* 192(1):83–93.
- Axelstad M, Boberg J, Nellesmann C, Kiersgaard M, Jacobsen PR, Christiansen S, et al. 2011. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol Sci* 120(2):439–446.
- Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. 2005. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect* 113:192–200; doi:10.1289/ehp.7337.
- Barraza D, Jansen K, van Wendel de Joode B, Wesseling C. 2011. Pesticide use in banana and plantain production and risk perception among local actors in Talamanca, Costa Rica. *Environ Res* 111(5):708–717.
- Barraza D, Jansen K, van Wendel de Joode B, Wesseling C. 2013. Social movements and risk perception: unions, churches, pesticides and bananas in Costa Rica. *Int J Occup Environ Health* 19(1):11–21.
- Bellinger DC. 2008. Lead neurotoxicity and socioeconomic status: conceptual and analytical issues. *Neurotoxicology* 29(5):828–832.
- Belpoggi F, Soffritti M, Guarino M, Lambertini L, Cevolani D, Maltoni C. 2002. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann NY Acad Sci* 982:123–136.
- Bland JM, Altman DG. 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310(6973):170; doi: 10.1136/bmj.310.6973.170.
- Bravo V, de la Cruz E, Herrera G, Ramírez F. 2013. Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud [in Spanish]. *Uniciencia* 27(1):351–376.
- Camoni I, Di Muccio A, Pontecorvo D, Citti P. 1988. Survey of ethylenethiourea (ETU) in ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides. *Ecotoxicol Environ Saf* 16(2):176–179.
- Castorina R, Bradman A, Fenster L, Barr DB, Bravo R, Vedar MG et al. 2010. Comparison of current-use pesticide and other toxicant urinary metabolite levels among pregnant women in the CHAMACOS cohort and NHANES. *Environ Health Perspect* 118:856–863; doi:10.1289/ehp.0901568.
- Centro Nacional de Alta Tecnología. 2011. Misiones Aerotransportadas desplegadas en Costa Rica [in Spanish]. Available: <http://www.cenat.ac.cr/gestion-ambiental/programas/prias/misiones> [accessed 13 November 2014].
- Chattaway FW, Hullin RP, Odds FC. 1969. The variability of creatinine excretion in normal subjects, mental patients and pregnant women. *Clin Chim Acta* 26(3):567–576.
- Chhabra RS, Eustis S, Haseman JK, Kurtz PJ, Carlton BD. 1992. Comparative carcinogenicity of ethylene thiourea with or without perinatal exposure in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol* 18(3):405–417.
- Clewell HJ, Mei Tan Y, Campbell JL, Andersen ME. 2008. Quantitative interpretation of human biomonitoring data. *Toxicol Appl Pharmacol* 231:122–133.
- Colosio C, Fustinoni S, Birindelli S, Bonomi I, De Paschale G, Mammone T et al. 2002. Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers. *Toxicol Lett* 134(1–3):133–140.
- Colosio C, Visentin S, Birindelli S, Campo L, Fustinoni S, Mariani F et al. 2006. Reference values for ethylenethiourea in urine in Northern Italy: results of a pilot study. *Toxicol Lett* 162(2–3):153–157.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2012. Estadísticas bananeras [in Spanish]. Available: <https://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras> [accessed 11 August 2014].
- Ekman E, Maxe M, Littorin M, Jönsson BA, Lindh CH. 2013. High-throughput method for the analysis of ethylenethiourea with direct injection of hydrolysed urine using online on-column extraction liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 934:53–59.
- Eskenazi B, Bradman A, Gladstone EA, Jaramillo S, Birch K, Holland N. 2003. CHAMACOS, a longitudinal birth cohort study: lessons from the fields. *J Child Health* 1(1):3–27.
- European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. 2009. Review Report for the Active Substance Mancozeb. Available: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list\\_mancozeb.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_mancozeb.pdf) [accessed 11 August 2014].

- Fustinoni S, Campo L, Colosio C, Birindelli S, Foà V. 2005. Application of gas chromatography-mass spectrometry for the determination of urinary ethylenethiourea in humans. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 25; 814(2):251–258.
- Fustinoni S, Campo L, Liesivuori J, Pennanen S, Vergieva T, van Amelsvoort L, et al. 2008. Biological monitoring and questionnaire for assessing exposure to ethylenebisdithiocarbamates in a multicenter European field study. *Hum Exp Toxicol* 27(9):681–691.
- Graham SL, Davis KJ, Hansen WH, Graham CH. 1975. Effects of prolonged ethylene thiourea ingestion on the thyroid of the rat. *Food Cosmet Toxicol* 13:493–499.
- Gullino ML, Tinivella F, Garibaldi A, Kemmitt GM, Bacci L, Gullino ML, Tinivella F, Garibaldi A, Kemmitt GM, Bacci L.
- Halvorsen R, Palmquist R. 1980. The interpretation of dummy variables in semilogarithmic equations. *Am Econ Rev* 70:474–475.
- Houeto P, Bindoula G, Hoffman JR. 1995. Ethylenebisdithiocarbamates and thiourea: possible human health hazards. *Environ Health Perspect* 103:568–573.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2011. X Censo Nacional de Población y VI de Vivienda 2011: Resultados Generales [in Spanish]. Available: [http://www.cipacdh.org/pdf/Resultados\\_Generales\\_Censo\\_2011.pdf](http://www.cipacdh.org/pdf/Resultados_Generales_Censo_2011.pdf) [accessed 13 November 2014].
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2012. Encuesta Nacional de Hogares Resultados generales [in Spanish]. Vol 1:3. Available: <http://www.inec.go.cr/anda4/index.php/catalog/130/download/798> [accessed 13 November 2014].
- Institute for Digital Research and Education, UCLA. 2014. SAS FAQ: How do I Interpret a Regression Model When Some Variables Are Log Transformed? Available: [http://www.ats.ucla.edu/stat/mult\\_pkg/faq/general/log\\_transformed\\_regression.htm](http://www.ats.ucla.edu/stat/mult_pkg/faq/general/log_transformed_regression.htm) [accessed 12 November 2014].
- International Agency for Research on Cancer. 2001. Some Thyrotropic Agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 79.
- Jones K, Patel K, Cocker J, Bevan R, Levy L. 2010. Determination of ethylenethiourea in urine by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation–mass spectrometry for monitoring background levels in the general population. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(27):2563–2566.
- Kennedy PE. 1981. Estimation with correctly interpreted dummy variables in semilogarithmic Equations. *Am Econ Rev* 71(4):801; doi: 10.2307/1905664.
- Kester MH, Martinez de Mena R, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, et al. 2004. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *J Clin Endocrinol Metab* 89(7):3117–3128.
- Khera KS. 1973. Ethylenethiourea: teratogenicity study in rats and rabbits. *Teratology* 7(3):243–52.
- Khera KS. 1987. Neuronal degeneration caused by ethylenethiourea in neuronal monocell layers in vitro and in fetal rat brain in vivo. *Teratology* 36(1):87–93.
- Kurttio P, Savolainen K. 1990. Ethylenethiourea in air and in urine as an indicator of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides. *Scand J Work Environ Health* 16(3):203–207.
- LA GACETA. 2008. Decreto N° 34202-MAG-S-MINAE-MOPT-G-MSP. Reglamento para las actividades de aviación aérea [in Spanish]. *La Gaceta* 8:3–4. Available: [http://www.gaceta.go.cr/pub/2008/01/11/COMP\\_11\\_01\\_2008.html#\\_Toc187725712](http://www.gaceta.go.cr/pub/2008/01/11/COMP_11_01_2008.html#_Toc187725712) [accessed 13 November 2014].
- Lee SJ, Mehler L, Beckman J, Diebolt-Brown B, Prado J, Lackovic M, et al. 2011. Acute pesticide illnesses associated with off-target pesticide drift from agricultural applications: 11 States, 1998–2006. *Environ Health Perspect* 119:1162–1169; doi:10.1289/ehp.1002843.
- Lindh CH, Littorin M, Johannesson G, Jönsson BA. 2008. Analysis of ethylenethiourea as a biomarker in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(16):2573–2579.
- Mazzachi BC, Peake MJ, Ehrhardt V. 2000. Reference range and method comparison studies for enzymatic and Jaffé creatinine assays in plasma and serum and early morning urine. *Clin Lab* 46(1–2):53–55.
- Miller JN, Miller JC. 2005. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th ed. Harlow, UK: Pearson Education Limited.
- Mora AM, van Wendel de Joode B, Mergler D, Córdoba L, Cano C, Quesada R, et al. 2014. Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from the infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica. *Environ Sci Technol* 48(6):3467–3476.
- National Toxicology Program. 2014. 13th Report on Carcinogens. Available: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc13/index.html> [accessed 12 November 2014].
- Panganiban L, Cortes-Maramba N, Dioquino C, Suplido ML, Ho H, Francisco-Rivera A, et al. 2004. Correlation between blood ethylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environ Health Perspect* 112:42–45; doi:10.1289/ehp.6499.
- Patel J, Landers K, Li H, Mortimer RH, Richard K. 2011. Thyroid hormones and fetal neurological development. *J Endocrinol* 209(1):1–8.
- Peretz C, Goren A, Smid T, Kromhout H. 2002. Application of mixed-effects models for exposure assessment. *Ann Occup Hyg* 46:69–77.
- Rosner B. 2006. *Fundamentals of Biostatistics*. 6th ed. Pacific Grove, CA: Duxbury Press.

- Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, et al. 2004. Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). *Sci Total Environ* 332(1–3):71–80.
- Sottani C, Bettinelli M, Lorena Fiorentino M, Minoia C. 2003. Analytical method for the quantitative determination of urinary ethylenethiourea by liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(20):2253–2259.
- Steenland K, Cedillo L, Tucker J, Hines C, Sorensen K, Deddens J et al. 1997. Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico. *Environ Health Perspect* 105:1126–1130.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1996. Ethylene thiourea (ETU) (CASRN 96-45-7). Available: <http://www.epa.gov/iris/subst/0239.htm> [accessed 3 January 2014].
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2005. Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb, List B Case No. 0643, EPA 738-R-04-012. Washington, DC: U.S. EPA. Available: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/mancozeb\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/mancozeb_red.pdf) [accessed 4 November 2014].
- World Health Organization. 1988. Dithiocarbamate Pesticides Ethylenethiourea, and Propylenethiourea: A General Introduction. *Environmental Health Criteria* 78. Geneva: World Health Organization 17–102.
- Zuurbier M, Hoek G, Oldenwening M, Meliefste K, Krop E, van den Hazel P, Brunekreef B. 2011. In-traffic air pollution exposure and CC16, blood coagulation, and inflammation markers in healthy adults. *Environ Health Perspect* 119:1384–1389; doi:10.1289/ehp.1003151.