

TESIS DOCTORAL



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A DISRUPTORES
ENDOCRINOS (DEs) PERSISTENTES Y METALES A
TRAVÉS DE LA LECHE MATERNA EN RECIÉN
NACIDOS PREMATUROS DE MUY BAJO PESO EN
UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS
NEONATALES (UCIN)**

**Departamento de Radiología y Medicina Física
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Medicina Clínica y
Salud Pública**

Laura Serrano López

**Directores:
Nicolás Olea Serrano
Carmen Freire Warden**

GRANADA, Octubre 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Laura Serrano López
ISBN: 978-84-1117-622-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79141>

Esta tesis doctoral fue apoyada por las siguientes **fuentes de financiación**:

1. **“Exposición del recién nacido de muy bajo peso a disruptores endocrinos (DEs) en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) y evaluación de las consecuencias sobre el desarrollo”**, financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (código de expediente: PI16/01820).
2. **European Project Human Biomonitoring for Europe Initiative (HBM4EU)**, co-financed by Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement (código: #733032).



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

ibs.GRANADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA


Instituto de Salud Carlos III



A mis padres

*“Nada en este mundo debe ser temido...solo entendido.
Ahora es el momento de comprender más,
para que podamos temer menos”*

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo y la ayuda de cada una de las personas a las que me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento.

A mis directores:

Al Profesor Dr. Nicolás Olea, por haber confiado en mí para emprender este apasionante camino, por su incansable labor, su entusiasmo y sabiduría. Por contagiarme su pasión por la investigación.

A la Dra. Carmen Freire, por su esfuerzo, su rigor científico, su dedicación con tan cuidadosas revisiones y por el apoyo que me ha brindado en todo momento con empatía, amabilidad y paciencia cuando lo he necesitado.

A Profesora Dra. Marieta Fernández, Dr. Fran Artacho, Dra. Luz Iribarne, Dr. Fernando Vela y resto del equipo investigador, por vuestro entusiasmo para poner en marcha el proyecto, vuestra ayuda y disponibilidad.

A mis compañeros y amigos, el Dr. José Antonio Hurtado por creer en mí, guiarme como neonatóloga, por impulsarme a afrontar nuevos y apasionantes retos. A la Dra. Manuela Peña, por su ayuda incondicional para que este proyecto se pusiera en marcha, por su dedicación y sus consejos. Al resto de compañeros de la Unidad Neonatal por apoyarme en mi trayectoria como clínica e investigadora.

A las enfermeras y técnicos de la Unidad Neonatal y al personal del Banco de Leche, por su inestimable colaboración para la recogida de muestras y por mostrarse siempre dispuestos a ayudarme.

Por supuesto, agradecer a las madres donantes de leche al Banco de Leche y a los padres de niños prematuros por su generosidad y su contribución para mejorar el cuidado de nuestros pacientes.

Por último, agradecer a los que me han permitido ser quien soy y llegar hasta aquí: mi familia.

A mis padres, por su amor incondicional, por guiar cada paso de mi vida, por ser un ejemplo e inculcarme los valores de respeto, generosidad, trabajo y humildad, por cada abrazo y palabra de aliento cuando creía que me faltaba. No hay palabras para poder agradecerles tanto.

A mi hermana Lolita, mi hermana mayor, mi referente de constancia, perseverancia, trabajo bien hecho y superación continua.

A mi hermana Vero, por ser mi ejemplo de fortaleza, por tener la palabra adecuada en cada momento, por tu ánimo continuo y tu bondad.

A mis hermanos José Manuel y Rafa por ayudarme siempre, por sus palabras de apoyo, por enseñarme que el trabajo tiene su recompensa.

A mi niño David, la alegría y el amor que me trasmite ha sido un impulso para poder hacerlo posible.

A David, gracias por apoyarme en mis sueños, por tu amor, tu paciencia, por caminar juntos, por haberme hecho este camino más fácil.

INDICE

RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIACIONES	7
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	9
1.INTRODUCCIÓN	10
1.1. Contaminantes ambientales	11
1.1.1. Biomonitorización humana	12
1.1.2. Marco legislativo	13
1.1.3. Disruptores endocrinos	14
1.1.4. Sustancias perfluoroalquiladas	16
1.1.5. Metales no esenciales	23
1.1.5.1. Arsénico	25
1.1.5.2. Plomo	26
1.1.5.3. Mercurio	27
1.1.5.4. Cadmio	29
1.1.5.5. Aluminio	29
1.1.5.6. Antimonio	30
1.1.5.7. Litio	31
1.2. Exposición materno infantil a contaminantes ambientales	32
1.2.1. Vías de exposición	32
1.2.1.1. PFAS	33
1.2.1.2. Metales no esenciales	34
1.2.2. Periodo neonatal. Recién nacidos prematuros	35
1.2.3. Ambiente hospitalario. Unidades cuidados intensivos neonatales	38
1.3. Leche materna	40
1.3.1. Beneficios de la leche materna sobre el recién nacido	40
1.3.2. Leche materna como vía de eliminación de contaminantes de la madre	42

1.3.2.1. PFAS en leche materna	43
1.3.2.2. Metales no esenciales en leche materna	44
1.3.3. Bancos de leche humana donada	47
1.3.3.1. Leche materna donada	47
1.3.3.2. Bancos de leche humana en España	48
1.3.3.3. Legislación de bancos de leche humana	50
1.3.3.4. Donantes de leche materna	53
1.3.3.5. Receptores de leche humana donada	55
2. HIPÓTESIS	56
3. OBJETIVOS	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS	62
4.1. Artículo 1	63
4.1.1. Tratamiento de las muestras de leche	63
4.2. Artículos 2,3 y 4	64
4.2.1. Diseño del estudio	64
4.2.2. Población de estudio	64
4.2.3. Extracción, manejo y almacenamiento de leche humana para donación	66
4.2.3.1. Extracción de la leche materna para donación	67
4.2.3.2. Instrucciones para la conservación de la leche extraída	69
4.2.3.3. Procesamiento de la leche donada	69
4.2.3.4. Procesamiento de muestras de leche donada para el estudio	71
4.2.4. Tratamiento muestras de leche materna	72
4.2.4.1. Artículo 2. Método determinación PFAS en leche materna	72
4.2.4.2. Artículo 3 y 4. Método determinación metales no esenciales en leche materna	74
4.2.5. Variables independientes	75
4.2.6. Análisis estadístico	77

4.2.6.1. Artículo 2. Concentración PFAS en leche y factores asociados	77
4.2.6.2. Artículo 3 y 4. Concentración de metales no esenciales en leche y factores asociados	78
5. RESULTADOS	80
5.1. Resultado Objetivo 1: “HPLC-MS/MS method for the determination of perfluoroalkyl substances in breast milk by combining salt-assisted and dispersive liquid-liquid microextraction”	81
5.2. Resultado Objetivo 2: “Concentrations of perfluoroalkyl substances in donor breast milk in Southern Spain and their potential determinants”	109
5.3. Resultado Objetivo 3: “Concentrations and determinants of lead, mercury, cadmium, and arsenic in pooled donor breast milk in Spain”	152
5.4. Resultado Objetivo 4: “Concentrations and predictors of aluminum, antimony, and lithium in breast milk: a repeated-measures study of donors”	194
6. DISCUSIÓN	231
7. CONCLUSIONES	240
8. BIBLIOGRAFÍA	245
9. ANEXOS	278
Anexo I	280
Anexo II	283
Anexo III	287
Anexo IV	299
Anexo V	302
Anexo VI	307
Anexo VII	317
Anexo VIII	321

RESUMEN

El constante crecimiento del consumo global y la producción de sustancias químicas conllevan a la liberación de las mismas al medio ambiente, convirtiéndose en fuente de exposición humana. Muchas de ellas actúan como disruptores endocrinos (DEs) capaces de causar efectos adversos en la salud de un organismo vivo o su progenie, especialmente en los grupos poblacionales más susceptibles a su efecto.

Los recién nacidos prematuros menores de 1500 g constituyen uno de los grupos más vulnerables al efecto de los contaminantes ambientales debido a sus características anatómicas y funcionales: poseen gran inmadurez de los sistemas enzimáticos hepático y renal encargados de la detoxificación de sustancias, además tiene una relación peso/talla/masa corporal desfavorable, de forma que precisan de un volumen de ingesta mayor para cubrir sus altos requerimientos nutricionales. Es por ello que la alimentación constituye la principal vía de exposición a contaminantes ambientales.

La leche materna por sus incuestionables beneficios es el alimento de elección para los recién nacidos. Cuando ésta no está disponible, la leche materna donada a un banco de leche humana es el alimento recomendado para este grupo poblacional. La leche donada está sometida a estrictos controles microbiológicos y organolépticos por la susceptibilidad de los receptores a los que va destinada, sin embargo, no existe control y legislación en cuanto a contaminantes químicos ambientales presentes en la misma. Los contaminantes ambientales persistentes y los metales no esenciales pueden acumularse en la fase grasa de la leche materna, o bien unirse a proteínas y desplazar componentes de la misma, constituyendo la leche materna una fuente de exposición infantil a dichos contaminantes.

En la presente tesis doctoral se ha evaluado la exposición a sustancias perfluoroalquiladas (PFAS), DEs persistentes, y metales no esenciales como mercurio, arsénico y aluminio, en recién nacidos prematuros extremos en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales a través de la principal fuente de exposición de los mismos, la leche materna, mediante el estudio de leche humana donada a un banco de leche hospitalario.

El primer objetivo de la misma fue el desarrollo y validación de un procedimiento analítico para la determinación de PFAS en muestras de leche materna, mediante la

combinación de técnicas de extracción líquido-líquido con micro-extracción dispersiva y cromatografía de masas en tándem. Para ello, se recogieron 20 muestras de leche materna donada y se aplicaron estrategias que optimizaran los parámetros experimentales previos en la determinación de PFAS en leche. El límite de cuantificación fue 20 pg/mL. El método fue desarrollado de forma satisfactoria, encontrándose con mayor frecuencia el ácido perfluorooctanoico (PFOA), el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorohexanoico (PFHxA).

El segundo objetivo específico de esta tesis doctoral fue determinar las concentraciones de PFAS en muestras de leche (pools) de 83 madres donantes del Banco de Leche Humana del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), Granada, evaluando diferentes determinantes de las concentraciones, incluyendo tiempo transcurrido desde el parto, características nutricionales de las muestras de leche y perfil socio-demográfico, factores reproductivos, dieta y uso de productos de cuidado personal (PCPs) de las madres donantes. Tras el análisis de 11 PFAS con la técnica desarrollada en el primer objetivo, se evidenció la presencia de PFAS en 24-100% de las muestras de leche materna analizadas, en diferentes concentraciones. Se detectó PFHpA en el 100% de las muestras, seguido de PFOA (84%), PFNA (71%), PFHxA (66%) y PFTTrDA (62%). El PFOS se detectó en el 34% de las muestras de leche. Las concentraciones medianas oscilaron entre <0,66 ng/L (PFHxS) y 19,39 ng/L (PFHpA). La mediana de la suma de las concentraciones de todos los PFAS analizados fue 87,67 ng/L y fue mayor para las PFAS de cadena corta que para los de cadena larga. Los factores asociados con mayores concentraciones de PFAS incluyeron la ingesta de alimentos de origen animal y el uso de PCPs, como productos para el cuidado de la piel y maquillaje. A pesar del pequeño tamaño muestral, los datos muestran una presencia generalizada de PFAS en leche de madres donantes, posiblemente influenciada por ciertos factores relacionados con el estilo de vida.

El tercer y cuarto objetivo de la tesis doctoral fue determinar las concentraciones de varios metales no esenciales en muestras de leche de sucesivas donaciones realizadas por las mismas donantes al Banco de Leche Humana del HUVN, identificando factores asociados con la exposición. Se determinaron las concentraciones de mercurio, arsénico, plomo, cadmio, aluminio, antimonio y litio en 242 muestras de leche materna de las 83 donantes y los factores asociados. El metal más frecuentemente detectado fue arsénico

(97%), seguido de aluminio (94%), mercurio (81%), litio (79%), antimonio (72%), plomo (51%) y cadmio (38%). La mediana de las concentraciones de metales fueron 57,63 µg/L para aluminio, 1,49 µg/L para arsénico, 0,58 µg/L para litio, 0,26 µg/L para mercurio, 0,14 µg/L para plomo, 0,08 µg/L para antimonio y <0,04 µg/L para cadmio. Las concentraciones de arsénico fueron mayores en las muestras de leche de madres primíparas, mientras que el mercurio se encontró en mayor concentración en aquellas con mayor consumo de pescado graso y carne y menor en muestras recogidas más tardíamente en el postparto y con mayor contenido de lactosa. La detección de plomo fue mayor en madres múltiparas, exfumadoras y con ganancia de peso desde antes del embarazo. La detección de cadmio fue mayor para donantes con educación universitaria, mayor ingesta de alimentos fritos y enlatados y uso más frecuente de PCPs como crema de manos. Las concentraciones de aluminio se asociaron positivamente con el contenido de lípidos de las muestras de leche, el cambio de peso desde antes del embarazo y el consumo de café y mantequilla. Las concentraciones de antimonio se asociaron positivamente con la ingesta de pescado graso, yogur, arroz y alimentos fritos y con el uso de sombra de ojos. Finalmente, el litio se asoció de forma positiva con la ingesta de chocolate y el uso de crema para manos y delineador de ojos.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto la amplia presencia de contaminantes ambientales como los PFAS y metales tóxicos no esenciales en muestras de leche materna donada, representando una fuente de exposición para los recién nacidos más vulnerables, con la necesidad urgente de adoptar medidas preventivas mediante una rigurosa regulación de estas sustancias en una matriz tan valiosa.

ABSTRACT

The constant growth of global consumption and production of chemical substances leads to their release into the environment, becoming a source of human exposure. Many of them act as endocrine disruptors (EDs) capable of causing adverse effects on the health of a living organism or its progeny, especially in the population groups most susceptible to their effect.

Premature newborns under 1500 g are one of the most vulnerable groups to the effect of environmental pollutants due to their anatomical and functional characteristics: they have great immaturity of the hepatic and renal enzyme systems responsible for the detoxification of substances, they also have an unfavorable weight/height/body mass ratio, so that they require a larger volume of intake to cover their high nutritional requirements. For this reason, diet is the main route of exposure to environmental pollutants.

Because of its unquestionable benefits, breast milk is the food of choice for newborns. When it is not available, breast milk donated to a human milk bank is the recommended food for this population group. Donated milk is subject to strict microbiological and organoleptic controls due to the susceptibility of the newborns for whom it is intended; however, there is no a strict control and legislation regarding environmental chemical contaminants present in it. Persistent environmental pollutants and non-essential metals can accumulate in the fatty fraction of breast milk, or bind to proteins and displace components of it, making breast milk a source of infant exposure to these pollutants.

In the present Doctoral Thesis, exposure to perfluoroalkylated substances (PFAS), persistent DEs, and nonessential metals such as mercury, arsenic and aluminum, in extremely premature newborns in a Neonatal Intensive Care Unit has been evaluated through the main source of exposure, breast milk, by means of the study of human milk donated to a hospital milk bank.

The first objective was the development and validation of an analytical procedure for the determination of PFAS in breast milk samples, by combining liquid-liquid extraction techniques with dispersive micro-extraction and tandem mass chromatography. For this purpose, 20 samples of donated breast milk were collected and strategies were applied to optimize previous experimental parameters in the

determination of PFAS in milk. The limit of quantification was 20 pg/mL. The method was satisfactorily developed, with perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexanoic acid (PFHxA) being found most frequently.

The second specific objective of this Doctoral Thesis was to determine PFAS concentrations in milk samples (pools) from 83 donor mothers from the Human Milk Bank of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), Granada, evaluating different determinants of the concentrations, including time since delivery, nutritional characteristics of the milk samples and socio-demographic profile, reproductive factors, diet and use of personal care products (PCPs) of the donor mothers. After the analysis of 11 PFAS with the technique developed in the first objective, the presence of PFAS was evidenced in 24-100% of the breast milk samples analyzed, in different concentrations. PFHpA was detected in 100% of the samples, followed by PFOA (84%), PFNA (71%), PFHxA (66%) and PFTTrDA (62%). PFOS was detected in 34% of the milk samples. Median concentrations ranged from <0.66 ng/L (PFHxS) to 19.39 ng/L (PFHpA). The median sum of the concentrations of all PFAS analyzed was 87.67 ng/L and was higher for short-chain PFAS than for long-chain PFAS. Factors associated with higher PFAS concentrations included intake of foods of animal origin and use of PCPs, such as skin care products and makeup. Despite the small sample size, the data show a widespread presence of PFAS in milk from donor mothers, possibly influenced by certain lifestyle factors.

The third and fourth objective of the Doctoral Thesis was to determine the concentrations of several nonessential metals in milk samples from successive donations made by the same donors to the HUVN Human Milk Bank, identifying factors associated with exposure. The concentrations of mercury, arsenic, lead, cadmium, aluminum, antimony and lithium were determined in 242 breast milk samples from the 83 donors and the associated factors. The most frequently detected metal was arsenic (97%), followed by aluminum (94%), mercury (81%), lithium (79%), antimony (72%), lead (51%), and cadmium (38%). Median metal concentrations were 57.63 µg/L for aluminum, 1.49 µg/L for arsenic, 0.58 µg/L for lithium, 0.26 µg/L for mercury, 0.14 µg/L for lead, 0.08 µg/L for antimony, and <0.04 µg/L for cadmium. Arsenic concentrations were higher in milk samples from primiparous mothers, while mercury was found in higher concentration in those with higher fatty fish and meat consumption and lower in samples collected later in the postpartum period and with higher lactose content. Lead

detection was higher in multiparous mothers, exsmokers and with weight gain before pregnancy. Cadmium detection was higher for donors with university education, higher intake of fried and canned foods and more frequent use of PCPs such as hand cream. Aluminum concentrations were positively associated with lipid content of milk samples, weight change since before pregnancy, and coffee and butter consumption. Antimony concentrations were positively associated with the intake of fatty fish, yogurt, rice and fried foods and with the use of eye shadow. Finally, lithium was positively associated with chocolate intake and the use of hand cream and eyeliner.

The results obtained in this Doctoral Thesis highlight the widespread presence of environmental contaminants such as PFAS and nonessential toxic metals in samples of donated breast milk, representing a source of exposure for the most vulnerable newborns, with an urgent need for preventive measures through rigorous regulation of these substances in such a valuable matrix.

LISTA DE ABREVIACIONES

AAP Academia Americana de Pediatría
AEBLH Asociación Española de Bancos de Leche Humana
AM Media Aritmética
Al Aluminio
As Arsénico
ATSDR Agencia de sustancias tóxicas y registro de enfermedades
BLH Banco de Leche Humana
BMH Biomonitorización Humana
BPA Bisfenol A
CAS Chemical Abstracts Service
Cd Cadmio
CDC Centers for Disease Control and Prevention
COPs Compuestos Orgánicos Persistentes
DDT Diclorodifeniltricloroetano
DE Disruptor Endocrino
DLLME Microextracción líquido-líquido dispersiva
DOHaD Developmental Origins of Health and Disease
EEUU Estados Unidos de América
EFSA European Food Safety Authority
EMBA European Milk Bank Association
EPA Environmental Protection Agency
ESPGHAN Sociedad Europea de gastroenterología y Hepatología y Nutrición Pediátrica
GC-MS/MS Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem
G Gramos
HERAG Health Risk Assessment Guidance for Metals
Hg Mercurio
HPLC-MS/MS Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
HTLV Virus Linfotrópico de células T Humanas
HUVN Hospital Universitario Virgen de las Nieves
IARC International Agency for Research on Cancer
IMC Índice de masa corporal
INMA Infancia y Medio Ambiente
ITRC Interstate Technology and Regulatory Council
JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC-MS/MS Cromatografía líquida con espectrofotometría de masas
Li Litio
LOD Límite de detección
LMD Leche Materna Donada
LOQ Límite de cuantificación

OMS Organización Mundial de la Salud
OR Odds Ratio
Pb Plomo
PBDE Éteres de difenilo polibromados
PBB Bifenilos polibromados
PCBs Bifenilos policlorinados
PCPs Productos de cuidados personal
PFAS Sustancias Perfluoroalquiladas
PFBS Ácido sulfónico perfluorobutano
PFD_oDA Ácido perfluorododecanoico
PFDA Ácido Perfluorodecanoico
PFOA Ácido perfluorooctanoico
PFOS Sulfonato de Perfluorooctano
PFHpA Ácido perfluoroheptanoico
PFHxA Ácido perfluorohexanoico
PFHxS Ácido sulfónico perfluorohexano
PFNA Ácido Perfluorononanoico
PFT_rDA Ácido perfluorotridecanoico
PFUnDA Ácido perfluoroundecanoico
PFCAs Ácidos Carboxílicos Perfluoroalquilados
PTWI Ingesta semanal tolerable provisional
REACH Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RN Recién nacido
RSD Desviación estándar relativa
SALLE Extracción líquido-líquido asistida por sales
Sb Antimonio
SCENIHR Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SeNeo Sociedad Española de Neonatología
SVHC Sustancias Candidatas extremadamente preocupantes
UNICEF Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
WHO World Health Organization
UCIN Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
UE Unión Europea
VIH Virus inmunodeficiencia Humano

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los PFAS de cadena corta/larga

Tabla 2. Clasificación biológica de los elementos metálicos

Tabla 3. Características de As, Pb, Hg, Cd

Tabla 4. Número Donantes /Donaciones al banco de leche humana hospitalario.

FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de los PFAS

Figura 2. Estructura de los PFAS

Figura 3. Fuentes y vías de exposición a PFAS

Figura 4. Efectos adversos sobre la salud asociados a exposición a PFAS

Figura 5. Fuentes y vías de exposición prenatal y Neonatal/ Infantil

Figura 6. Dosis de exposición estimada y vía de exposición de PFOS y PFOA en lactantes y adultos.

Figura 7. Evidencia sobre la exposición en el desarrollo a DEs y resultados en salud.

Figura 8. Distribución de los Bancos de leche en Europa.

Figura 9. Regulación de los Bancos de leche humana en Europa

Figura 10. Etiquetado de leche donada

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminantes ambientales

El estilo de vida actual y el constante crecimiento del consumo conduce a una producción creciente de sustancias químicas cada vez más diversas, diseñadas en la mayoría de los casos para mejorar la calidad de vida, pero que representan una fuente de contaminantes ambientales, liberados al medio ambiente de forma continuada, y que en muchos casos pueden presentar riesgos para la salud humana.

El número de sustancias químicas en el comercio global crece de forma continua. Actualmente el registro *Chemical Abstracts Service* (CAS) contiene 155 millones de sustancias, de las cuales, entre 5000 y 6000 representan más del 99% del total producido. Como consecuencia de la liberación al medio ambiente, la población se encuentra fundamentalmente expuesta (Landrigan et al., 2018). En la Unión Europea (UE) en 2016 se produjeron casi 350 millones de toneladas de sustancias químicas, estimándose un crecimiento hasta del 30% en los próximos 10 años (Eurostat, 2020).

Una de las prioridades de Salud Pública es el estudio de los potenciales efectos sobre la salud humana de la exposición de la población a sustancias químicas que se liberan al medio ambiente, cuestionando paradigmas aceptados y actuaciones que hasta el momento no habían sido discutidas. Por ejemplo, la literatura científica y los estudios disponibles sobre los riesgos para la salud humana de las sustancias químicas empleadas en los productos de consumo ha ido creciendo en las dos últimas décadas, pero aun así son insuficientes, dada la gran velocidad de producción en volumen y diversidad de estas sustancias. Existiendo, pues, una brecha cada vez mayor entre la creciente dependencia de estas sustancias y el conocimiento sobre los riesgos para la salud derivados de la exposición (Li y Suh, 2019).

De forma resumida podemos decir que las sustancias químicas utilizadas en los productos de consumo suponen un problema creciente para la salud por diversos motivos. En primer lugar, por que llegan a una gran parte de la población en un corto periodo de tiempo. En segundo lugar, porque están en contacto estrecho y diario con los consumidores, existiendo además una co-exposición a muchas sustancias químicas, lo que podría provocar efectos adversos en salud por la activación combinada, en muchas ocasiones no bien caracterizada. En tercer lugar, porque una vez comercializados los productos manufacturados, resulta muy difícil dejar de utilizarlos y su uso se transmite de generación en generación, generando una fuente de exposición

humana continua. Por último, porque la misma sustancia química puede presentar niveles de riesgo muy diferentes según la utilidad y uso particular del producto (Li y Suh, 2019).

Para conocer la exposición humana y los riesgos potenciales para la salud de las sustancias químicas presentes en los productos de consumo es fundamental el estudio de la relación entre estas sustancias y el uso por parte del consumidor, definiendo las vías de exposición y las características y los riesgos correspondientes a cada una de las sustancias (Li y Suh, 2019).

Las vías de exposición a sustancias químicas y contaminantes ambientales se agrupan en tres categorías:

1. Ingestión a través de la dieta y el agua de bebida, es decir, la exposición vía digestiva.
2. La exposición vía dérmica
3. La exposición vía respiratoria a través de la inhalación de gases y partículas.

1.1.1. Biomonitorización humana

La *Biomonitorización Humana (BMH)* es una herramienta de utilidad para la protección de la salud proporcionando información sobre la exposición a sustancias químicas a través de la medición de los biomarcadores de exposición (la propia sustancia o sus metabolitos) en muestras biológicas humanas como sangre, orina, cabello, dientes, leche materna, tejido adiposo o uñas (Casteleyn et al., 2015). La BMH permite el conocimiento de niveles de exposición bien de la población general o de grupos específicos, identificando los factores determinantes de la misma y constituyendo un instrumento para detección de riesgos en salud pública y ambiental. La BMH realiza una medición integrada de las sustancias químicas, contaminantes ambientales, absorbidas por el organismo a través de las distintas vías de exposición (ingestión, dérmica y respiratoria) y desde las distintas fuentes de contaminación, teniendo en cuenta tanto el estilo de vida como la variabilidad interindividual (Joas et al., 2012).

Muchos gobiernos pretenden integrar los programas de BMH en los planes de control de contaminación ambiental y alimentaria, permitiendo evaluar la exposición y caracterizar los riesgos derivados. Los programas más consolidados se encuentran en Estados Unidos y Canadá. En Europa, Alemania y Francia son los pioneros en su

desarrollo. En España los programas BIOAMBIENT.ES, realizado por el Centro Nacional de Sanidad ambiental del ISCIII (Pérez-Gómez et al., 2013), e INMA (Infancia y Medio Ambiente) (Guxens et al., 2012) evalúan los efectos de la exposición a sustancias químicas ambientales en población adulta y embarazo e infancia, respectivamente. No obstante, actualmente en España no existe un programa estable y sostenible de BMH que permita el estudio y vigilancia de la exposición a sustancias químicas en la población. El Plan Nacional de Salud y Medio Ambiente elaborado por el Ministerio de Sanidad contempla el desarrollo de una estructura de BMH para estimar la exposición a contaminantes ambientales y así implementar medidas destinadas a disminuir la exposición (Yusà et al., 2020).

La Iniciativa Europea de Biomonitorización Humana (HBM4EU) (2017-2022), que tiene su continuación en PARC (*European Partnership for the Assessment of Risk from Chemicals*) (2022-2028), es un proyecto cuyo objetivo es generar conocimiento sobre la exposición humana a contaminantes químicos en Europa y su potencial impacto sobre la salud. Comenzó en 2017 y a lo largo de 5 años se han reclutado 26 países que desarrollan y coordinan un plan de análisis de datos de biomonitorización para eliminar posibles fuentes de exposición a contaminantes e identificar grupos vulnerables de población, con el fin de implementar políticas efectivas que salvaguarden la salud de la población (Apel et al., 2020; Jones et al., 2022; Louro et al., 2022; Scheepers et al., 2021).

1.1.2. Marco legislativo

El marco legislativo europeo en materia de protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los riesgos derivados de la exposición a sustancias químicas se ha desarrollado en los últimos 20 años a través de varias normas que incluyen el registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* [REACH], 2006), la clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas químicas (Reglamento (CE) nº1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, 2008), así como los requisitos generales de la legislación alimentaria (Reglamento (CE) no 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 2002), el registro, autorización y comercialización de biocidas (Reglamento (UE) no 528/2012), reglamento sobre contaminantes orgánicos

persistentes (Reglamento UE 2019/1021) y sobre el mercurio (Reglamento UE 2017/1021).

A pesar del marco legal existente, el conocimiento de los efectos de las sustancias químicas sobre la salud sigue suponiendo un reto debido al alto número de sustancias y contaminantes existentes, a la complejidad de situaciones de exposición, el impacto de la exposición global, la exposición a combinación de sustancias y sustancias emergentes que surgen continuamente, existiendo una falta de regulación legal en muchos casos que permita limitar tanto las sustancias como la dosis máxima permitida. Esta situación ha motivado a las Naciones Unidas a establecer como objetivo de agenda 2030, la reducción de muertes y enfermedades atribuibles a sustancias químicas y contaminantes ambientales (UNEP, 2019).

1.1.3. Disruptores endocrinos

El término “disruptor endocrino” (DE) define un conjunto diverso y heterogéneo de compuestos químicos o mezclas capaces de alterar el sistema endocrino, pudiendo acarrear efectos adversos sobre la salud de un organismo vivo o su progenie (WHO/PCS/ECD/02.2, 2002). Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EEUU, un DE es cualquier agente que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión o eliminación de hormonas presentes en el organismo las cuales son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y crecimiento (Kabir et al., 2015).

Por tanto, la disrupción endocrina se refiere al efecto adverso derivado de la exposición a DEs, cuyas características descritas hasta la actualidad son las siguientes (Anway y Skinner, 2006; Kortenkamp et al., 2007; Skinner y Guerrero-Bosagna, 2009):

- Actúan a bajas concentraciones y de forma combinada o competitiva con las hormonas endógenas, no pudiéndose establecer un nivel de no efecto ni existiendo dosis seguras.
- Las curvas dosis dosis-respuesta no son lineales ya que la respuesta no siempre aumenta en la misma proporción que la dosis de exposición y no siempre son monotónicos, observándose respuestas paradójicas en forma de U y de U-invertida.

- Las personas no sólo están expuestas a un tipo de DE sino a combinaciones o mezclas de ellos, por lo que los efectos en salud no son predecibles, ya que los efectos pueden resultar en acciones sinérgicas, aditivas o antagónicas.
- Si la exposición ocurre durante periodos de alta susceptibilidad, como el embarazo, lactancia, infancia o pubertad, puede producir efectos adversos en la salud irreversibles que pueden manifestarse a lo largo de toda la vida.
- Los efectos derivados de la exposición pueden ocurrir tras largos periodos de latencia, resultando extremadamente difícil establecer la asociación casual.
- La repercusión a la exposición a un determinado DE en un individuo se puede observar en generaciones posteriores, por afectación genómica o mecanismos epigenéticos. La exposición de la mujer embarazada es un ejemplo de exposición multigeneracional.

El término DE define un grupo de sustancias químicas muy heterogéneo. Todos ellos son moléculas con pequeña masa molecular (<1000 Dalton) que presentan similitudes con muchas hormonas endógenas (Diamanti-Kándarakis et al., 2009).

Existen diversas clasificaciones de los DEs. Según la resistencia a la degradación física, química, biológica y según su grado de liposolubilidad, los DEs se clasifican en:

- **DEs persistentes:** en general, son estructuras moleculares grandes, con numerosos enlaces que los convierten en sustancias polares con vida media larga (Arrebola et al., 2013). Se caracterizan por ser muy resistentes a la degradación fotolítica, química y biológica, poseer baja solubilidad en agua y alta liposolubilidad, difícilmente son metabolizados por los sistemas de detoxificación humano característica, lo cual determina que sean sustancias que se metabolizan muy lentamente, que tienden a acumularse en los tejidos de los organismos vivos, incluido el ser humano (Arrebola et al., 2013; Fernandez et al., 2008; Schettgen et al., 2015) de ahí su importancia en la implicación de la patogenia de múltiples enfermedades y alteraciones endocrino metabólicas. A medida que son consumidas y almacenadas por un organismo tras otro, estas sustancias se bioacumulan en la cadena trófica. Debido a que los humanos están en la cima de la cadena alimentaria se convierten en los últimos receptores (Nickerson, 2006). Los DEs persistentes comprenden una amplia variedad de plaguicidas

organoclorados como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), compuestos industriales usados en industria pesada como los bifenilos policlorinados (PCBs), bifenilos polibromados (PBB), dioxinas, furanos y éteres de difenilo polibromados (PBDE) utilizados como retardantes de llama. Además, se incluyen entre estos los compuestos perfluorados y sus derivados, y algunos elementos metálicos como mercurio (Hg), plomo (Pb), cadmio (Cd) y arsénico (As) (Lenters et al., 2019). Su principal ruta de exposición es a través de la ingesta dietética (Porta et al., 2008b). La población está expuesta a estos contaminantes generalmente a dosis bajas, pero de manera continua.

- **DEs no persistentes:** son compuestos con estructuras moleculares más pequeñas y bajo número de enlaces, lo que los convierte en sustancias polares de vida corta. Son menos liposolubles que los DEs persistentes, y por lo tanto se eliminan del organismo de forma rápida, siendo metabolizados y excretados en orina, donde se pueden medir con facilidad (Frederiksen et al., 2007). Entre los DEs no persistentes, encontramos compuestos químicos ampliamente utilizados por la industria como son los bisfenoles, ftalatos, benzofenonas, parabenos, insecticidas organofosforados y fungicidas, entre otros.

1.1.4. Sustancias perfluoroalquiladas

Las sustancias perfluoroalquiladas (PFAS) comprenden una amplia familia de compuestos orgánicos persistentes ampliamente utilizadas en procesos industriales y en la producción de bienes de consumo. Desde su síntesis en la década de 1940 se han encontrado PFAS en diferentes compartimentos ambientales, animales y humanos (Calafat et al., 2007, Domingo y Nadal, 2019). La exposición humana a PFAS se ha asociado con efectos adversos en la salud en todas las etapas de la vida, como lo demuestra la creciente evidencia científica y clínica (ATSDR, 2018; Bach et al., 2016; Fenton et al., 2020; Kashino et al., 2020; Sinisalu et al., 2020; Vuong et al., 2019).

Los PFAS contienen uno o más átomos de carbono con átomos de flúor en lugar de hidrógeno, de modo que el compuesto contiene la fracción $C_nF_{2n+1}-R$, donde R representa grupos funcionales adicionales (por ejemplo, sulfonato o carboxílico) (Figura 1) (ITRC, 2020).

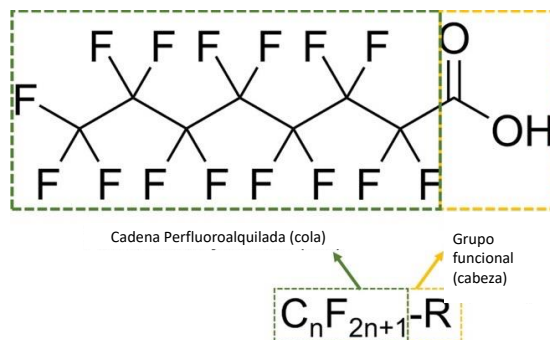


Figura 1. Estructura básicos de los PFAS (Adaptado de Blake y Fenton, 2020)

Estos compuestos son química y térmicamente estables con enlaces carbono-flúor extremadamente fuertes, presentando propiedades tanto lipofílicas como hidrofílicas. Estas propiedades físicas y químicas los convierten en ideales como tensioactivos y como productos de protección de superficies (Blake and Fenton, 2020). Las propiedades químicas de los PFAS les confieren propiedades biológicas y ambientales indeseables como son la persistencia ambiental indefinida y vidas medias prolongadas en muchos organismos vivos, incluidos los humanos.

Cada PFAS se caracteriza por la longitud de la cadena de carbono y la estructura del grupo lateral, así como su historial de uso: de larga evolución o heredados, como el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), o aquellos de sustitución o alternativos, como el ácido perfluoroheptanoico (PFHpA) o el ácido perfluorononanoico (PFNA) (tabla 1, figura 2).

Tabla 1. Clasificación de PFAS de cadena corta y larga

Cadena corta (<8 carbonos)		Cadena larga (≥8 carbonos)	
Nombre	Abreviación	Nombre	Abreviación
Ácido Sulfónico Perfluorobutano	PFBS	Sulfonato de Perfluorooctano	PFOS
Ácido Perfluorohexanoico	PFHxA	Ácido perfluorooctanoico	PFOA
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	Ácido perfluorononanoico	PFNA
Ácido Sulfónico perfluorohexano	PFHxS	Ácido Perfluorodecanoico	PFDA
		Ácido Perfluoroundecanoico	PFUnDA
		Ácido PerfluoroDodecanoico	PFDoDA
		Ácido perfluorotridecanoico	PFTrDA

Fuente: elaboración propia

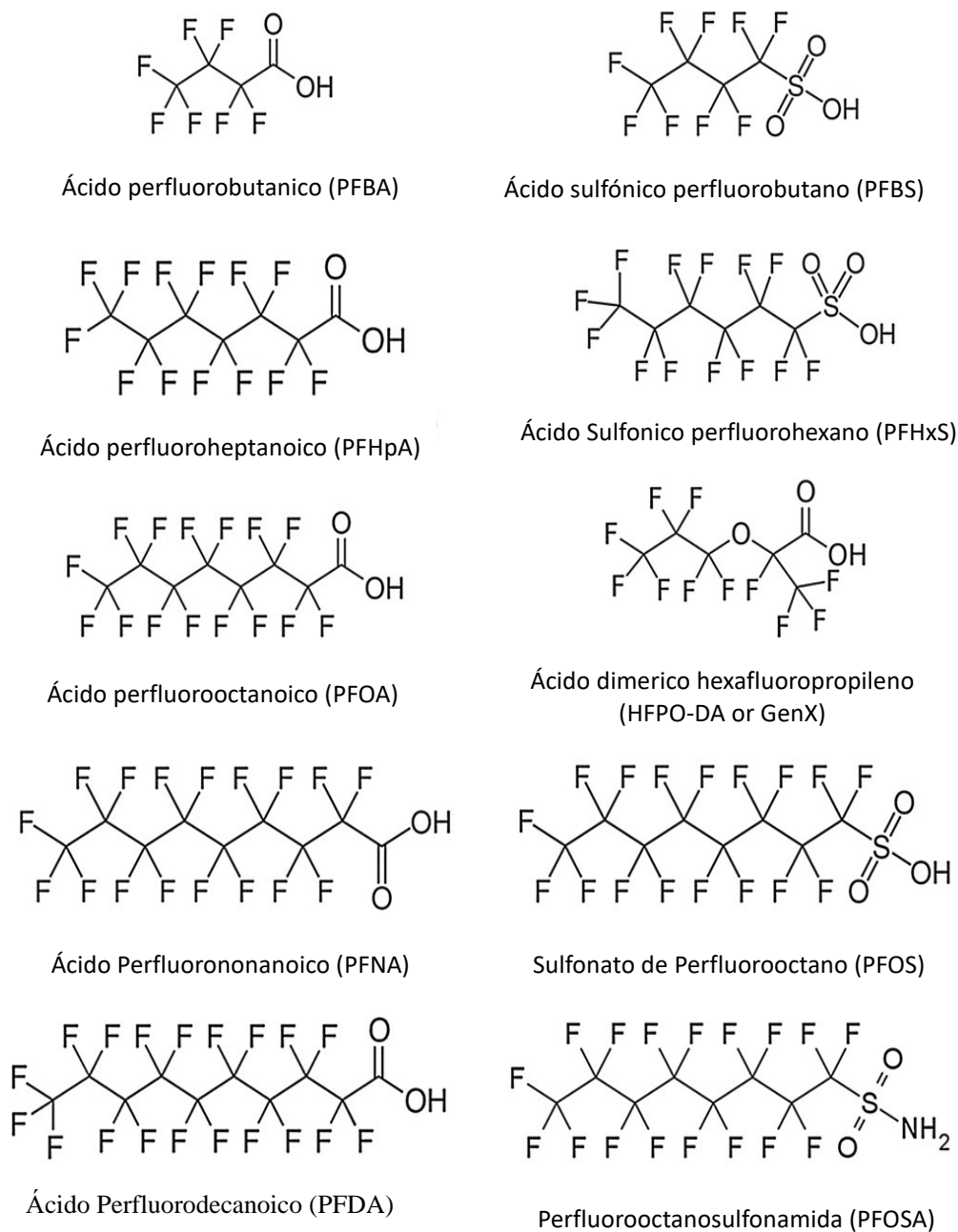


Figura 2: Estructura de los PFAS (Adaptado de Blake y Fenton, 2020)

Desde su síntesis a mediados de la década de 1900, los PFAS se han incorporado a numerosos productos industriales y de consumo debido a sus excelentes propiedades repelentes de grasa y agua, resistencia a las manchas, empleándose como recubrimientos o mediante pulverización, en productos para el hogar y en vehículos, productos de limpieza o para el cuidado personal. En las décadas de 1940 y 1950, se

comenzaron a utilizar en la fabricación de recubrimientos antiadherentes y revestimientos protectores. Posteriormente comenzaron a aplicarse en utensilios de cocina y en la formación de espumas formadoras de película acuosa clase B (AFFF) que son utilizadas en espumas anti incendios en aeropuertos y otras instalaciones (ATSDR, 2019).

En el siglo XXI muchos productos de consumo y fuentes de agua potable contienen mezcla de PFAS. Según la fuente de producción, la mezcla y volumen de PFAS emitidos al medio ambiente varían (Xu et al., 2019). Así, por ejemplo, las fuentes de agua potable que se encuentren cerca de una planta de fabricación de textiles probablemente contengan una mezcla de PFAS (Hopkins et al., 2018).

Los seres humanos están expuestos a PFAS a través de múltiples vías, que incluyen la digestiva, a través del agua y la dieta, la respiratoria, aire y polvo tanto de interiores como exteriores, la transferencia materna al feto a través de la placenta y a los recién nacidos a través de la lactancia materna y de fórmula láctea artificial (Sunderland et al., 2019). Algunos PFAS son estructuralmente parecidos a los ácidos grasos naturales y se ha demostrado que los PFAS se acumulan principalmente en el suero, pulmones, riñones, hígado y cerebro (Pérez et al., 2013).

Los alimentos, agua potable y el ambiente interior se consideran las principales fuentes de exposición humana a los PFAS (Cornelis et al., 2012; Haug et al., 2011), incluyendo cosméticos y textiles, entre otros productos (EFSA, 2020; Schultes et al., 2018). Los mariscos, carne y productos lácteos pueden ser las principales fuentes de exposición dietética, especialmente para PFOA y PFOS (Domingo y Nadal, 2017; Titlemier et al., 2007), por lo que se cree que la dieta es la principal vía de exposición a PFAS (Sunderland et al., 2019) (figura 3). Factores sociodemográficos como la ocupación, sexo masculino, incremento de edad y baja paridad se han relacionado con una mayor carga interna de PFAS (Bartolomé et al., 2017; Colles et al., 2020).

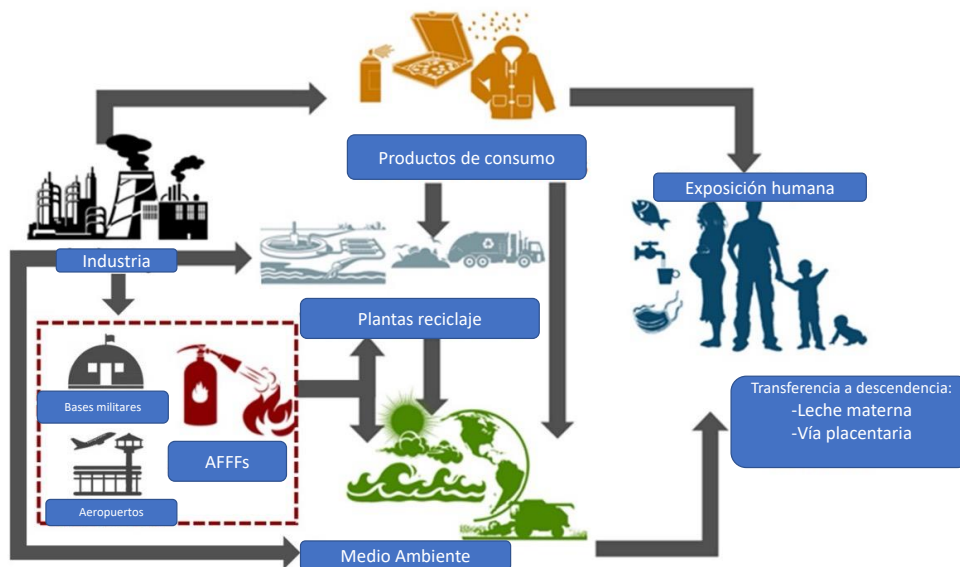


Figura 3. Fuentes y vías de exposición a PFAS (Adaptado de Blake y Fenton, 2020)

Aunque el uso industrial de los PFAS comenzó en la década de los '40, no fue hasta veinte años más tarde cuando se identificaron los efectos sobre la salud humana relacionada con la exposición, los cuales se asociaban a los trabajadores expuestos ocupacionalmente, cuando los PFAS se producían ya a escala industrial. Posteriormente, los estudios de exposición industrial y ocupacional a PFAS han mostrado mayor incidencia de cáncer (vejiga, renal, hepático, prostático y leucemia) (Alexander et al., 2003; Consonni et al., 2013), enfermedad renal y metabólica (Costa et al., 2009) en trabajadores expuestos a estas sustancias.

En España, un estudio de BMH realizado por Bartolomé et al. (2017) evaluó la exposición a seis PFAS diferentes en una amplia muestra de población de base española de ambos sexos de 18 a 65 años de edad. Se analizaron muestras de suero de 775 trabajadores, detectándose PFOA, PFOS y PFNA en el 100%, 99,7% y 99,9% de las muestras de suero, respectivamente, mientras que PFHxS y PFDA se detectaron en el 84,8% y 86,4% de las muestras. Este trabajo demostró la exposición generalizada a PFAS en la población adulta, con patrones de exposición similares a los de otras poblaciones europeas.

Tras la realización del estudio “*C8 Health Study*” para evaluar la exposición a PFAS en EEUU (Frisbee et al., 2009), se identificó la existencia de un probable vínculo entre la exposición a PFOA y el aumento de los niveles de colesterol, cáncer de riñón y de testículo, colitis ulcerosa, enfermedad tiroidea e hipertensión en el embarazo (C8 Science Panel, 2020). Tras este trabajo pionero, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos sobre los efectos para la salud asociados con exposición a PFAS, incluyendo efectos derivados de la exposición en el embarazo e infancia, tales como retraso del crecimiento intrauterino (Kashino et al., 2020), aborto (Liew et al., 2020), obesidad (Braun, 2017), deterioro cognitivo (Vuong et al., 2019) y alteración de la función tiroidea (López-Espinosa et al., 2012; Preston et al., 2020) y del sistema inmune (Abraham et al., 2020; Grandjean et al., 2012). Estas asociaciones se apoyan en los resultados de estudios con animales mostrando que determinados PFAS actúan como disruptores endocrinos y metabólicos y ejercen efectos inmunotóxicos, reprotóxicos y/o carcinogénicos (ATSDR, 2018; Fenton et al., 2020; Street et al., 2018).

Los estudios epidemiológicos disponibles sobre los efectos adversos en salud derivados de la exposición a PFAS presentan distintos desafíos ya que se desconocen los posibles efectos sinérgicos de las mezclas de PFAS. La exposición humana a los mismos también varía según factores sociodemográficos, además de la ausencia de una población control no expuesta (Fenton y Blake, 2020). Otro de los retos es la posibilidad de que los efectos adversos en salud relacionados con los PFAS en población adulta sean manifestaciones de exposiciones que ocurrieron en períodos sensibles del desarrollo, como el período intrauterino o la primera infancia (Barker, 2004). En la figura 4 se muestra un resumen de los efectos adversos en salud derivados de la exposición a PFAS.

Dado el interés y la preocupación existente, en la presente tesis doctoral se decidió investigar la exposición materno-infantil a PFAS a través de leche materna, como fuente alimentaria.

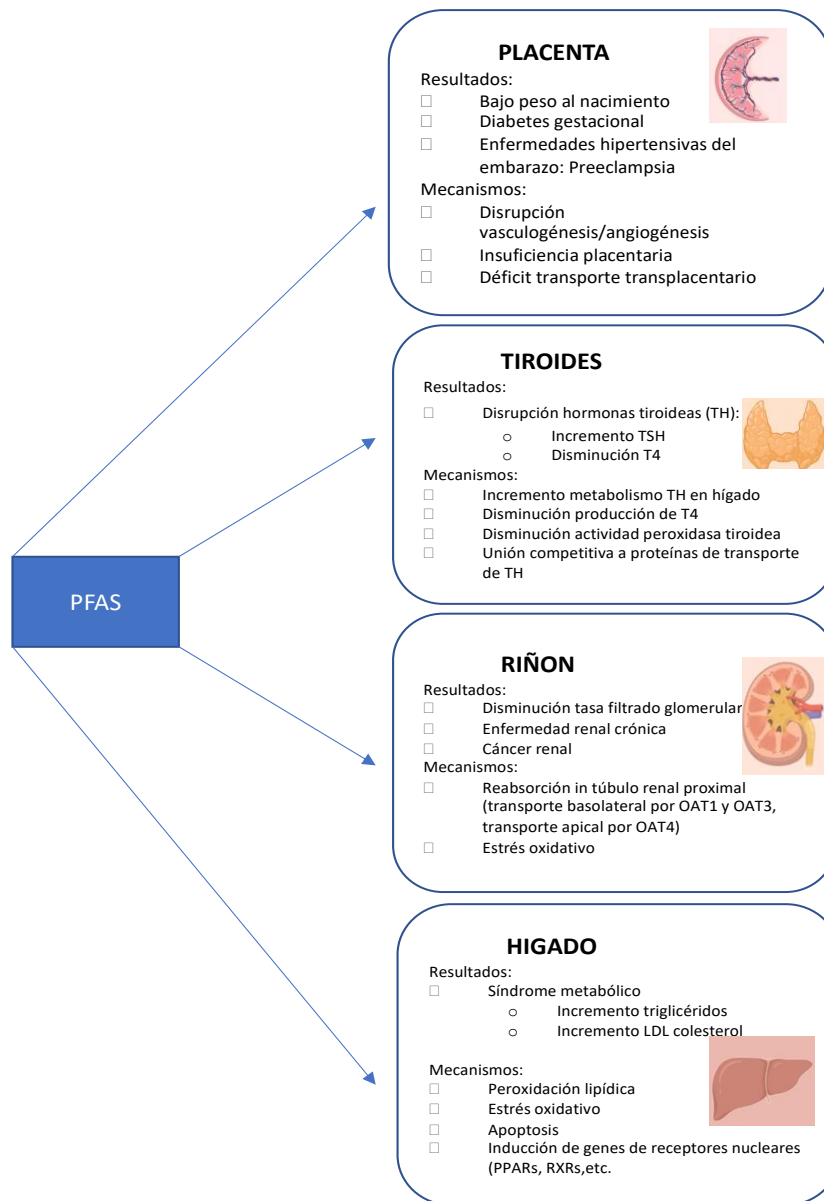


Figura 4. Resumen de los efectos adversos sobre la salud asociados con la exposición a PFAS (Adaptado de Blake y Fenton, 2020)

En el ámbito europeo, los PFAS, incluidos en la lista de sustancias extremadamente preocupantes (SVHC) según REACH, están regulados por una serie de leyes que implementan convenios y acuerdos internacionales sobre productos químicos, de consumo, de exposición ocupacional y del medio ambiente, como son las emisiones al aire y al agua.

En junio de 2019, el Consejo Europeo de Ministros destacó la presencia generalizada de PFAS en el medio ambiente, productos de consumo y seres humanos, solicitando un plan de acción para la eliminación de todos los usos no esenciales de los mismos. La Comisión Europea aceptó la necesidad de acciones regulatorias y no regulatorias dentro de la línea estratégica “Medio ambiente de Unión Europea (UE) libre de tóxicos” y el Pacto Verde Europeo.

Cinco estados europeos (Alemania, Noruega, Países Bajos, Suecia y Dinamarca) acordaron preparar una propuesta conjunta de restricción REACH con el objetivo de limitar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente derivados de la producción y el uso de una amplia gama de PFAS para usos no esenciales (EFSA, 2020).

Las medidas reglamentarias dentro de la UE restringen el uso, comercialización y fabricación del PFOS y sus derivados desde 2008 (Reglamento sobre COP, Reglamento (UE) nº 757/2010 de la Comisión, Directiva 2006/122/EC del Parlamento Europeo y del Consejo), así como del PFOA y las sustancias relacionadas, estando sujetos a una restricción de fabricación, comercialización y uso (UE 2017/1000). Del mismo modo, las sustancias precursoras de los mismos también están determinadas por las restricciones de la UE. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha reconocido a las PFAS como contaminantes emergentes en la cadena alimentaria y ha establecido ingesta semanal tolerable de 4.4 ng/kg de peso corporal (EFSA 2020).

Dado que los patrones de exposición a PFAS están cambiando, es necesario investigar la actual exposición de las poblaciones vulnerables, haciendo necesaria una regulación que obligue a la industria a proporcionar estándares analíticos para fines de “investigación en salud y medio ambiente” y así facilitar la aplicación de estudios futuros.

1.1.5. Metales no esenciales

Los metales se encuentran en la naturaleza en la corteza terrestre y pueden ser clasificados en función de sus características químicas en metales alcalinos, alcalino-térreos, de transición, semi-metales o metaloides, lantanídeos y actinídeos (Geiger y Cooper, 2010), y en función de su actividad biológica en esenciales y no esenciales (Prashanth et al., 2015). En la tabla 2 se muestran algunos elementos metálicos clasificados según su actividad biológica en el organismo humano.

Tabla 2. Clasificación biológica de los elementos metálicos

Esenciales	No esenciales
Calcio	Aluminio
Cobalto	Antimonio
Cobre	Arsénico
Cromo	Berilio
Hierro	Cadmio
Magnesio	Estroncio
Manganeso	Litio
Sodio	Mercurio
Potasio	Níquel
Zinc	Plomo

Fuente: elaboración propia

Los metales esenciales son imprescindibles para el funcionamiento y mantenimiento de procesos fisiológicos, mientras que los metales no esenciales no ejercen función biológica conocida. Muchos de estos elementos metálicos no esenciales, como aluminio (Al), arsénico (As), mercurio (Hg), plomo (Pb) y cadmio (Cd), son altamente tóxicos y constituyen contaminantes ambientales de distribución global (Prashanth et al., 2015), representando un riesgo para la salud humana. Incluso la exposición a bajas dosis de estos elementos puede acarrear problemas de salud crónicos e irreversibles. La Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) realiza un listado donde prioriza sustancias en función de su toxicidad y potencial exposición humana, en el cual, el As ocupa el primer lugar, seguido de Pb, Hg y Cd (ATSDR, 2015).

La exposición humana a los metales puede ocurrir durante actividades ocupacionales generalmente a través de la vía inhalatoria y cutánea en la minería y la industria y a través de la vía alimentaria por el consumo de agua, alimentos y exposición al suelo, polvo y aire (ATSDR, 2007a, 2007b, Carlin et al., 2016).

En la tabla 3 se describen las principales características de los metales no esenciales As, Pb, Cd y Hg.

La presencia de metales tóxicos en la leche humana está bien documentada, con el riesgo de los recién nacidos alimentados con la misma, los cuales son especialmente vulnerables y sensibles a sus efectos químicos. Por esta razón, también fueron elegidos como motivo de estudio en este trabajo de tesis doctoral.

Tabla 3. Características del As, Pb, Hg y Cd

	As	Pb	Hg inorgánico	Metil-Hg	Cd
CLASIFICACIÓN IARC DE CARCINOGENICIDAD	Grupo 1	Grupo 2B	Grupo 3	Grupo 2B	Grupo 1
PTWI (mg/kg/semana)	-	-	PTWI: 4	PTWI: 1,6	PTWI: 2,5
BMDL (mg/kg/día)	3.0	0.5	-	-	-
ABSORCIÓN ORAL	75%	Adultos 3-15% Niños 30-50%	20%	>90%	5%
VIDA MEDIA (PLASMA)	3-4h	20-40 días	20-66 días	44-88 días	3-4 meses 12 a (riñón)
ATRAVIESA PLACENTA	Sí	Sí	Poco	Sí	Sí
NEUROTOXICIDAD	Sí	Sí	No concluyente	Sí	No concluyente
GENOTOXICIDAD	Sí	Débil	No concluyente	No concluyente	Indirectamente
EMBRIOTOXICIDAD	Sí	No concluyente	No concluyente	Sí	No

Grupo 1. Carcinogénico humano; Grupo 2A: probablemente carcinogénico; Grupo 2B: posiblemente carcinogénico; Grupo 3: No clasificable como carcinogénico a humanos.

PTWI: Ingesta semanal tolerable. BMDL: Límite inferior a la dosis de referencia.

Fuente: Adaptado de Rebelo y Caldas, 2016

1.1.5.1. Arsénico

El As se encuentra de forma natural en cenizas y rocas volcánicas, arcilla, óxidos de hierro, azufre mineral y materia orgánica. Se encuentra en el medio ambiente en las formas orgánicas monometilarsénico (MMA), dimetilarsénico (DMA), arsenobetaína y arsenocolina, así como en formas inorgánicas: AsIII y AsV (Lynch et al., 2014; Rebelo y Caldas, 2016).

La exposición humana a As ocurre principalmente a través del consumo de agua y mariscos (EFSA, 2009a). Las formas inorgánicas de As son solubles en agua, de ahí su

propagación en el medio ambiente. En consecuencia, provoca la contaminación del suelo y conduce a la acumulación de As en los alimentos (arroz y otros granos y sus productos) (Cubadda et al., 2017; Ohno et al., 2007). En productos de origen marino, el As está presente en la forma orgánica (Taylor et al., 2017).

Más del 80% del AI se absorbe a través del tracto gastrointestinal humano y la excreción ocurre principalmente a través de la orina (ATSDR, 2007a). La exposición a concentraciones elevada de As en el agua de bebida, donde se encuentra predominantemente en forma inorgánica, se ha asociado con mayor riesgo de cáncer de pulmón, vejiga, riñón o piel (WHO, 2001). Los mecanismos de carcinogenicidad del As no son del todo conocidos aunque se considera genotóxico ya que induce micronúcleos, rotura de cadenas de ADN, intercambios de cromátidas humanas, aneuploidía y estrés oxidativo (Bustaffa et al., 2014). Existe un largo periodo de latencia para el cáncer de pulmón y otras enfermedades crónicas relacionadas con el As, incluso cuando la exposición se limitó a un corto periodo en la infancia o intraútero (McClintock et al., 2012).

A su vez, se ha demostrado que el As inorgánico y los metabolitos metilados MMA y DMA cruzan la barrera placentaria, pudiendo provocar cambios funcionales, fundamentalmente en el desarrollo cerebral, que conduzcan al desarrollo de otras enfermedades a lo largo de la vida (Carignan et al., 2015; Vahter, 2008). La exposición a As también puede causar toxicidad reproductiva, pudiendo llevar a bajo peso al nacer, aborto espontáneo, eclampsia y defectos al nacimiento (WHO, 2001).

En 2010, el Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA, 2011a) concluyó que la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) adoptada previamente para el As (15 mg/kg/día ó 2,1 mg/kg/día) dejó de considerarse segura para humanos, estableciendo una dosis de confianza inferior de 3 mg/kg/día como punto de referencia para la evaluación del riesgo.

1.1.5.2. Plomo

El Pb es un metal altamente tóxico ampliamente presente en la naturaleza, principalmente en forma inorgánica, y se produce en actividades como la minería y fundición y en fabricación de baterías (WHO, 2010a).

En el pasado, la principal fuente de exposición al Pb, además de la ocupacional, era por inhalación de partículas aéreas por el uso de gasolinas con plomo. Tras el Real Decreto 403/2000 se suprimió el Pb en la gasolina, por lo que los niveles de exposición han disminuido notablemente desde finales de los '90.

Actualmente, la población está expuesta al Pb principalmente a través del consumo de alimentos, particularmente con la ingesta de vegetales y cereales (Martí-Cid et al., 2018), con 5-15% de la ingesta oral absorbida por el tracto gastrointestinal, tasa que se incrementa en niños menores de 6 años, lo cual está relacionado con las vías de captación de minerales esenciales, más activas que en adultos (HERAG, 2007). Además, existen otras fuentes de exposición como son la inhalatoria a través del humo del cigarro (Bernhard et al., 2005).

Los compuestos inorgánicos del Pb están clasificados como potencialmente carcinógenos para los humanos. Los compuestos orgánicos se metabolizan a Pb iónico, ejerciendo toxicidad asociado al Pb inorgánico (IARC, 2016).

Los eritrocitos tienen gran afinidad por el Pb, más del 90% del Pb absorbido pasa a torrente sanguíneo tras la exposición al mismo. El Pb se acumula a lo largo de los años en el tejido óseo, con una vida media de 10-30 años (WHO, 2010a). En adultos, los sistemas cardiovascular y renal son los más afectados por exposición al Pb. En lactantes y niños el efecto sobre el sistema nervioso central son los efectos más críticos (Sanders et al., 2009), pudiendo llevar a encefalopatía y déficit cognitivos. Esta vulnerabilidad en fetos y niños puede deberse en parte a la inmadurez de la barrera hematoencefálica y la falta de la proteína de unión al Pb de alta afinidad en la astrogliá (Schnaas et al, 2006). Además, existen otros mecanismos de neurotoxicidad por Pb incluyendo la inducción de estrés oxidativo y la interferencia en enzimas dependientes del calcio (como por ejemplo óxido nítrico reductasa), amplificando la apoptosis de neuronas (Nemsadze et al., 2009).

1.1.5.3. Mercurio

El Hg es un metal que se encuentra en el medio ambiente en forma inorgánica, orgánica y elemental. El Hg elemental se utiliza en la producción de cloro gaseoso y sosa cáustica de uso industrial, así como en equipos eléctricos, termómetros, manómetros y amalgamas dentales. El Hg inorgánico se presenta como sales de sus formas catiónicas divalentes y monovalentes, principalmente de cloro y azufre. Los empastes de

amalgama son la fuente más importante de exposición al mercurio elemental por parte de la población en general. Se ha encontrado una asociación entre el Hg encontrado en el meconio y el Hg inorgánico de la placenta con el número de amalgama dental materno (Ask et al., 2002).

El efecto principal de la exposición crónica al Hg es el daño renal y puede incluir daños morfológicos y daño tubular (WHO, 2003). El metil-Hg (MeHg) se forma por metilación del Hg inorgánico en el medio acuático. Posee una propiedad lipofílica, es absorbido por el plancton y al ser consumido por peces y mariscos son incorporados a la cadena alimentaria. Hasta el 95% del MeHg ingerido es absorbido y se difunde por los tejidos corporales, con una vida media larga (CDC, 2009). El consumo de pescado y otros alimentos marinos contribuyen a los niveles de Hg corporales (Castaño et al., 2015). El MeHg tiende a unirse a hemoglobina en los hematíes, además forma enlace estable con la cisteína, siendo este complejo MeHg-Cys responsable de los altos niveles de Hg que se encuentran en el cerebro tras la exposición (Farina et al., 2011). No se conocen con exactitud los mecanismos por los que MeHg causan neurotoxicidad aunque sí que se ha demostrado que puede alterar expresión de genes implicados en el crecimiento y proliferación celular, pudiendo inducir apoptosis en cerebros en desarrollo (Antunes dos Santos et al., 2016).

El MeHg atraviesa la barrera hematoencefálica y la placenta, pudiendo afectar, por tanto, el desarrollo neurológico de los fetos, correlacionándose las concentraciones de Hg encontradas en sangre de cordón con las concentraciones de Hg en cerebro fetal (Poulin y Gibb, 2008). Diversos estudios epidemiológicos han descrito asociaciones entre la exposición prenatal al Hg, medida como niveles de Hg en madres, y déficit en el desarrollo neuropsicológico en niños (Davidson et al., 1998; Grandjean et al., 1997; Grandjean y Landrigan, 2006; Marques et al., 2013; Valent et al., 2013), a partir de los cuales, el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (JECFA), estableció una ingesta semanal tolerable de 1,6 mg/kg/día para MeHg en mujeres en edad fértil para protección del feto (JECFA, 2004).

1.1.5.4. Cadmio

El uso predominante del Cd es la producción de baterías, tintes, revestimientos, estabilizadores de plástico y aleaciones sin hierro. La presencia de Cd en los alimentos puede tener su origen en los suelos contaminados por agua de riego, fertilizantes de fosfato o estiércol. Las concentraciones más altas se pueden encontrar en legumbres, cereales y patatas (0,02-0,13 mg/kg) (EFSA, 2009b). Las hojas de tabaco también acumulan altos niveles de Cd del suelo, siendo el humo del cigarrillo la principal fuente de exposición para fumadores (ATSDR, 2012). Según el estudio de Guney y Zagury (2012), las joyas y juguetes pueden ser también fuente de exposición al Cd.

El tracto gastrointestinal absorbe entre 5-10% del Cd ingerido, afectando la absorción varios factores, incluida la vitamina D, déficit de calcio o hierro e interacciones metal-metal (hierro, plomo y cromo) y metal-proteína (metalotioneína) e interacción con glutatión. Según la IARC, el Cd está clasificado como cancerígeno para humanos (Grupo 1). El Cd absorbido se acumula principalmente en riñón e hígado, con larga vida media en el organismo (JECFA, 2011b), estableciéndose una ingesta semanal tolerable de 2,5 mg/kg de peso corporal para garantizar un alto nivel de protección para los consumidores.

Kippler et al. (2009) encontraron asociación significativa entre la concentración de Cd en los eritrocitos y en la leche materna, indicando que no existe barrera contra el Cd del plasma hasta la leche materna. Concluyeron, además, que el Cd comparte transportadores con el hierro y el manganeso para transferirse a la leche materna, pero inhibe el transporte de Cd a la leche materna.

1.1.5.5. Aluminio

El Al es el metal más abundante en la tierra, siendo componente natural del agua y los alimentos. Está presente en numerosos productos manufacturados como son los equipos eléctricos y utensilios en contacto con los alimentos como sartenes, ollas y otros recipientes. Así mismo, forman parte de la composición de productos farmacéuticos, vacunas (Dórea y Marques, 2010; Sanajou et al., 2021) y productos de cuidado personal (PCP), utilizándose como agente antitranspirante activo. Las fuentes más importantes

de exposición humana son la ingesta de alimentos y el uso de PCP (Sanajou et al., 2021; Sander et al., 2018).

Se trata de un metal con potencial carcinógeno debido a sus efectos genotóxicos. Las sales de Al antitranspirante aplicadas tópicamente a través de la piel en forma de cloruro de Al o clorhidrato de Al son capaces de interferir con la función de los receptores de estrógeno de las células cancerígenas de la mama humana, modificando tanto la unión de los ligandos como la expresión génica regulada por estrógenos (Darbre, 2006, 2013).

Además, el Al es considerado como un metal neurotóxico debido a distintos mecanismos no del todo conocidos: el estrés oxidativo es uno de los principales, junto a la alteración de la inmunidad innata y al incremento de señales pro-inflamatorias (Ullah et al., 2021). La exposición humana al Al se ha asociado con enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurodegenerativos, al distribuirse y acumularse en distintas regiones cerebrales relacionadas con la dopamina, las cuales aumentan con el envejecimiento. (Ullah et al., 2021).

1.1.5.6. Antimonio

El metaloide Sb está presente principalmente en el medio ambiente en dos estados de oxidación como Sb (III) y Sb (V). Las fuentes de Sb ambiental incluyen eventos naturales y actividades humanas, particularmente las emisiones en minería, fundición, incineradores, centrales eléctricas y el tráfico (Bukowiecki et al., 2009; Sundar y Chakravarty, 2010). Se utiliza ampliamente en la fabricación de aleaciones metálicas, láminas y tuberías de metal, esmaltes, baterías, cerámica, pinturas, vidrio, caucho, productos farmacéuticos, tabaco y productos de papel. Así mismo encontramos compuestos de Sb en retardadores de llama en textiles, alfombras y fibras sintéticas (NHANES, 2009; Zumbado et al., 2019). La población general está expuesta principalmente al Sb a través de los alimentos, y en menor medida, del aire y agua potable (Cooper y Harrison, 2009).

El Sb está considerado por la ATSDR como sustancia peligrosa prioritaria, encontrándose ampliamente en muestras biológicas de adultos y niños (ATSDR, 2017). La toxicidad del Sb viene determinada por su conocida capacidad para producir mutaciones, teratogenicidad y carcinogénesis producida por la exposición inhalatoria,

incrementando el riesgo de cáncer de pulmón y otras enfermedades pulmonares (Cooper y Harrinson, 2009).

En un estudio de BMH realizado en España (Henríquez-Hernández et al., 2020) se encontró que el Sb estaba presente en el plasma de todos los participantes, además en otros estudios se encontró amplia presencia de Sb en muestras de sangre de cordón umbilical (Cabrera-Rodríguez et al., 2018), en orina de mujeres embarazadas (Forns et al., 2014) y en orina de niños y adultos (Saravanabhavan et al., 2017; Schulz et al., 2009). No obstante, existen pocos estudios publicados sobre la presencia de Sb en leche materna (Björklund et al., 2012; Wappelhorst et al., 2002).

1.1.5.7. Litio

El ion Li se utiliza y se libera al medio ambiente por el uso de baterías, lo cual motiva la exposición ambiental (Robinson et al., 2018). Además, se encuentra en grasas y cerámicas y se utiliza como medicamento para tratar diversas enfermedades psiquiátricas, fundamentalmente enfermedad bipolar (Grandjean y Aubry, 2009). En la población general, el agua potable es la principal fuente de exposición, aunque los datos sobre las concentraciones de Li en el agua de bebida son escasos (Harari et al., 2015).

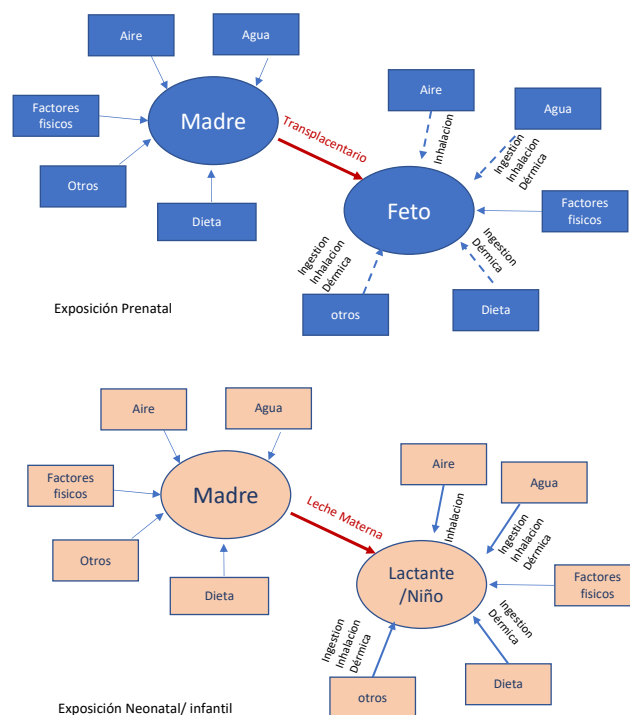
El Li ha sido clasificado como teratogénico, y la exposición fetal a altos niveles del mismo a través del agua potable o del consumo materno de medicamentos con Li se ha asociado con mayor riesgo de defectos cardiovasculares, prematuridad, retraso en el crecimiento fetal intrauterino, abortos espontáneos, hipotiroidismo y alteraciones en el neurodesarrollo (Brogerg et al., 2011; Grandjean y Aubry, 2009; Harari et al., 2015; McKnight et al., 2012; Oyebode et al., 2012; Poels et al., 2018).

Estudios realizados con madres que reciben tratamiento con Li han demostrado que este elemento se excreta en la leche materna (Poels et al., 2018), pero hay muy pocos datos sobre las concentraciones de Li en madres de la población general (Björklund et al., 2012).

1.2. Exposición materno-infantil a contaminantes ambientales

1.2.1. Vías de exposición

La necesidad de una aproximación a la exposición a contaminantes ambientales y sustancias tóxicas en niños, así como la evaluación de riesgos asociados a la misma, se plasmó en un informe realizado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EEUU en 2006, titulado “A framework for assessing health risk of environmental exposures to children” (en adelante, el “Marco”). El objetivo principal del Marco fue la caracterización de la exposición en cada etapa de la vida, basándose en el conocimiento y vías de exposición, identificación de las fuentes y las ventanas críticas del desarrollo de los órganos, la anatomía y fisiología, lo cual es relevante para la evaluación de los riesgos derivados de la exposición infantil a contaminantes del medio ambiente. De ello se derivó un modelo conceptual que caracterizó las fuentes potenciales, vías y patrón de exposición (magnitud y duración), así como las etapas más vulnerables (figura 5) (Cohen Hubal et al., 2000). Esta información hace posible una caracterización integral del riesgo en niños (Brown et al., 2008).



La línea continua representa la exposición relevante al feto/neonato. La línea discontinua representa exposición que no es relevante en cada etapa.

Figura 5. Fuente y vías de exposición prenatal y neonatal/infantil

(Adaptado de Cohen Hubal et al., 2008)

Es necesario identificar las vías de exposición potencialmente significativas para realizar un análisis de exposición específico en cada ventana crítica del desarrollo (Ferguson et al., 2017). Para un contaminante ambiental determinado, las fuentes y las vías de exposición pueden cambiar en cada etapa de la vida: el feto estará expuesto a través de la placenta, mientras que el recién nacido está expuesto a los contaminantes ambientales principalmente a través de la vía alimentaria: leche materna y fórmulas artificiales, siendo las sustancias a las que se expone la madre una fuente de exposición para el recién nacido (Cohen Hubal et al., 2000a).

1.2.1.1. PFAS

Los recién nacidos y lactantes alimentados con fórmula artificial son los más expuestos de la población humana debido a la alta relación entre ingesta de agua y peso corporal (Goeden, 2018; Goeden et al., 2019). La transferencia placentaria y la lactancia son rutas potenciales de exposición a las PFAS en fetos y recién nacidos, como lo demuestra la detección de PFAS en muestras de sangre de cordón umbilical, placenta, leche materna y plasma de bebés amamantados (Abraham et al., 2020; Cariou et al., 2015; Lien et al., 2013; Vela-Soria et al., 2021). Se ha demostrado que una proporción sustancial de PFAS en la madre se transfiere al recién nacido durante la lactancia, contribuyendo a disminuir las concentraciones en suero materno y en la leche materna durante el periodo de lactancia (Bartolomé et al., 2017; Ghassabian et al., 2022; Macheka-Tendenguwo et al., 2018; Mondal et al., 2014). La identificación de la leche materna como vía de exposición de PFAS en lactantes amamantados (Haug et al., 2011) ha sido demostrada por los hallazgos de su presencia en muestras de leche materna en mujeres de todo el mundo (Hu et al., 2021; Lee et al., 2018; Macheka-Tendenguwo et al., 2018) (figura 6).

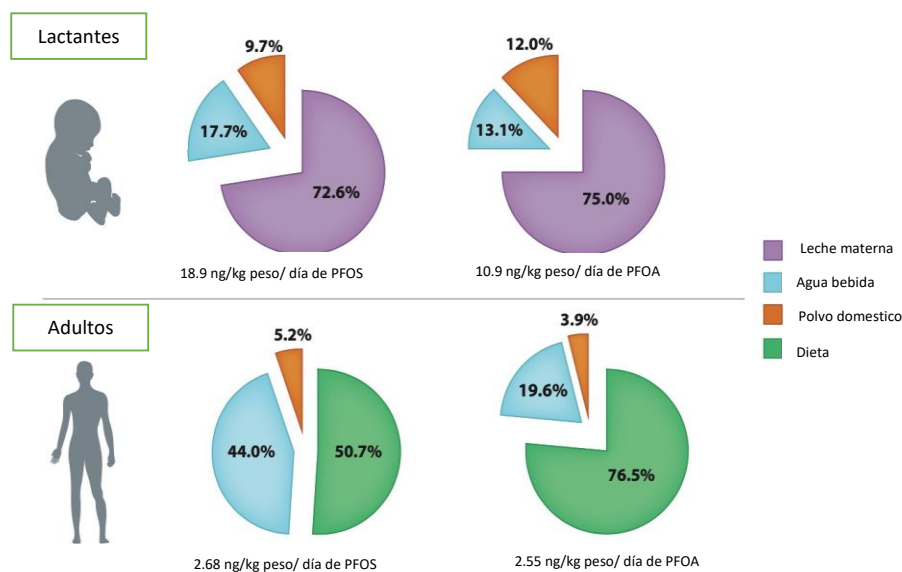


Figura 6. Dosis de exposición estimada y vía de exposición de PFOS y PFOA en lactantes (6kg) y adultos (70kg). Datos de EEUU. (Adaptado de Ghassabian et al., 2022)

1.2.1.2. Metales no esenciales

Los elementos metálicos, incluidos los metales pesados, pueden movilizarse durante el embarazo y atravesar la barrera placentaria, lo que representa un riesgo para la salud del feto (ATSDR, 2007). El Pb, Hg, As y en menor grado, Cd pasan fácilmente a través de la barrera placentaria desde el torrente sanguíneo materno hasta la circulación fetal (Esteban-Vasallo et al., 2012; Freire et al., 2018; Iyengar y Rapp, 2001). En el estudio de Freire et al., 2019, que forma parte del proyecto INMA, se determina la asociación de exposición prenatal a metales a través del estudio de la placenta y resultados adversos al nacimiento (bajo peso, longitud, parto pretérmino, etc.).

La exposición a metales como Pb, Hg, As y Cd en la etapa postnatal e infancia temprana a través de la leche humana está bastante documentada (Gil y Hernández, 2015; Gürbay et al., 2012; Rebelo y Caldas, 2016). Los elementos metálicos pueden excretarse a través de la leche materna después del nacimiento, cantidad que depende de su forma química y distribución en sangre materna (Gundacker y Zödl, 2005). Pb, Hg, Cd y As se consideran contaminantes persistentes, aunque a diferencia de los contaminantes orgánicos persistentes, no se unen a la grasa, por tanto, no se suelen acumular en concentraciones más altas en la leche materna que en sangre (Solomon y

Weiss, 2002). No obstante, hay escasos estudios sobre la exposición pre y postnatal a otros metales tóxicos como Al, Sb y Li.

1.2.2. Periodo neonatal. Recién nacidos prematuros

Es ampliamente aceptado que los niños son biológicamente más vulnerables que los adultos a la exposición a sustancias tóxicas. La exposición a compuestos químicos medioambientales durante el periodo neonatal puede causar impacto a lo largo de la vida e incluso en futuras generaciones a través de cambios epigenéticos (Perera y Herbstaman, 2011). La especial susceptibilidad del periodo neonatal viene determinada por la inmadurez anatómica y funcional en esta etapa de la vida: los órganos se encuentran en fase tanto de maduración anatómica con hiperplasia (incremento del número celular) e hipertrofia (incremento del tamaño celular) como fisiológica con inmadurez metabólica. Por ello, existe mayor riesgo de aparición de efectos adversos ante la exposición a sustancias químicas que los adultos por gran variedad de factores, los cuales se acentúan y multiplican en recién nacidos prematuros de muy bajo peso al nacimiento, es decir, menor a 1500 g, que generalmente son aquellos nacidos antes de la semana 28 de gestación.

Los recién nacidos prematuros son aquellos nacidos antes de las 37 semanas de edad gestacional. Actualmente, según la Sociedad Española de Neonatología, el límite de la viabilidad se encuentra en las 24 semanas de edad gestacional, actuándose en estos casos de forma activa en la reanimación al nacimiento. Entre los recién nacidos prematuros, existen subgrupos, siendo los recién nacidos prematuros extremos, los nacidos antes de las 28 semanas de edad gestacional, el grupo poblacional más vulnerable. Se estima que aproximadamente un 10% de los recién nacidos vivos nacen prematuramente. Cada año, a nivel mundial, nacen aproximadamente 15 millones de niños prematuros (Vogel et al., 2016). En España se estima el nacimiento anual de 28.000 recién nacidos prematuros, siendo una de las tasas más altas de Europa (APNP, 2018). La prematuridad constituye la principal causa de mortalidad y morbilidad entre los niños menores de 5 años (Liu et al., 2012; Rysavy et al., 2015).

El parto prematuro extremo se asocia con un incremento de la mortalidad perinatal y neonatal (hasta el 40%) y morbilidad a largo plazo (Manuck et al., 2016; Slama et al., 2014), los cuales constituyen uno de los grupos poblacionales más susceptibles a la exposición a DEs (Nicole, 2018) por las siguientes características:

- Poseen gran inmadurez de vías metabólicas, sistemas enzimáticos hepático y renal encargados de detoxificación de sustancias, con lo cual presentan menor capacidad de metabolizar y excretar tóxicos (Ginsberg et al., 2004).
- Presentan crecimiento y desarrollo orgánico rápido en un ambiente extrauterino, pudiéndose alterar estos procesos de desarrollo fácilmente, como el sistema nervioso, sistema reproductor y sistema inmunológico, los cuales necesitan el óptimo desarrollo de sus estructuras para un adecuado funcionamiento, creando ventanas de extrema vulnerabilidad a los tóxicos ambientales (Safe, 2005).
- Superficie corporal más elevada. Relación peso/longitud desfavorable para el acúmulo de sustancias, precisando un volumen de ingesta mayor que en adultos, lo cual significa mayor exposición relativa a cualquier contaminante ambiental vía digestiva, conllevando mayor absorción intestinal (Landrigan et al., 1998). Los menores de 6 meses poseen un tiempo de tránsito intestinal prolongado y de vaciado, con lo que se aumenta el potencial de absorción a DEs. Así mismo, los recién nacidos tienen un pH gástrico menos ácido, por lo que puede incrementar o disminuir la absorción de determinados contaminantes químicos (Ortega et al., 2021).
- Precisan numerosas intervenciones técnicas en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) durante un periodo de tiempo prolongado, lo cual constituye una fuente muy importante de exposición a DEs (Iribarne-Durán et al., 2019) y en los cuales hay un deficiente sistema de inmunovigilancia (Vilahur et al., 2014). Este punto será abordado en detalle con posterioridad.
- Deficiencia del sistema de inmunovigilancia en Unidades de Cuidados Intensivos (Vilahur et al., 2014).

El feto y el recién nacido, por las características descritas son especialmente vulnerables a los efectos de los contaminantes ambientales, que pueden interrumpir los procesos del desarrollo, con posibles consecuencias para etapas posteriores. La exposición a estos factores puede cambiar de forma permanente la estructura, fisiología y metabolismo orgánico, predisponiendo al posterior desarrollo de patologías crónicas, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares, metabólicas, respiratorias y neurodegenerativas (Heindel et al., 2015; Vrigheid et al., 2016). Los contaminantes ambientales inducen, así mismo, cambios en la estructura del sistema inmunitario y en su función al alterar la homeostasis. Los contaminantes ambientales provocan la estimulación o supresión de los componentes inmunomoduladores y pueden influir indirectamente en los diversos órganos y sistemas (Bahadar et al., 2015; Ghassabian et al., 2022; Mocarizadeh et al., 2015).

En la figura 7 se muestra la evidencia sobre la exposición en el desarrollo y crecimiento a distintos DEs y los resultados en salud.

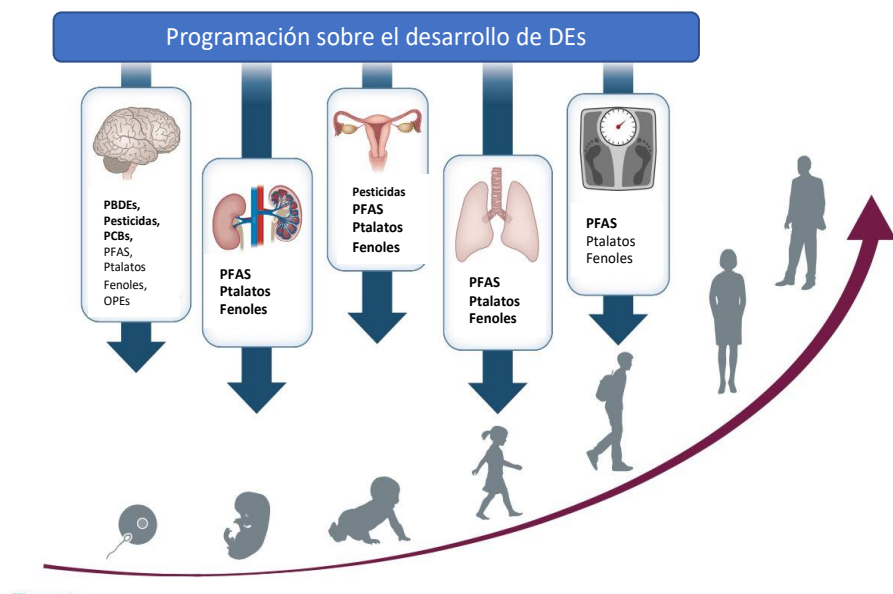


Figura 7. Evidencia epidemiológica sobre la exposición en el desarrollo a DEs y resultados en salud infantil. Texto más oscuro representa evidencia más fuerte.

(Adaptado de Gassabian et al., 2022)

1.2.3. Ambiente hospitalario. Unidades de cuidados intensivos neonatales

Las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) son las organizaciones de profesionales sanitarios ubicadas en el hospital que, cumpliendo unos requisitos funcionales, estructurales y organizativos, ofrecen asistencia multidisciplinar, garantizando las condiciones de seguridad, calidad y eficiencia adecuadas para atender las necesidades asistenciales de los neonatos (Ley 16/2003 de 28 mayo de 2003 y el Real Decreto 1277/2003 de 10 de octubre de 2014, Ministerio de Sanidad, 2014).

Para lograr la mejor atención neonatal, se proponen unidades de distintos niveles asistenciales. La Sociedad Española de Neonatología (SeNeo) propone una división de niveles en función de los pacientes atendidos y los cuidados y prestaciones ofertados, recomendando concentrar la atención de los recién nacidos de mayor riesgo en las unidades que dispongan de recursos suficientes para la atención de pacientes con mayor necesidad de cuidados (Rite et al., 2013).

Las UCIN de mayor complejidad deben realizar la siguiente actividad mínima y contar con dotación adecuada de recursos:

- a) Atención en su área de influencia de al menos 2.500 partos.
- b) Ingresos hospitalización >500 recién nacidos/año.
- c) Ingresos en UCIN >150/año.
- d) Al menos 25 recién nacidos de peso <1.500 g.
- e) Al menos 40 pacientes/año que precisen ventilación mecánica invasiva.

Así, la división en niveles asistenciales permite dotar de los recursos materiales y humanos para la mejor atención integral neonatal, clasificándose como nivel asistencial III aquel hospital regional, de referencia en el que los pacientes atendidos son neonatos gravemente enfermos que requieren sistemas de órganos de apoyo, como ventilación mecánica, tratamientos especializados y/o intervención quirúrgica. Los neonatos susceptibles de ingreso en este tipo de unidades son aquellos:

- Provenientes de gestaciones complicadas seleccionadas.
- Menores de 32 semanas de edad gestacional y menor a 1.500 g de peso al nacer.
- Afectos de anomalías congénitas.

- Aquellos neonatos que requieren un espectro completo de cuidados médicos y quirúrgicos pediátricos sub-especializados, incluidos aquellos que requieren tratamientos para soportar insuficiencias multi-orgánicas.

La atención multidisciplinar en UCIN juega un papel fundamental, no solo para tratamiento de la patología aguda neonatal sino también para asegurar el mejor desarrollo neurológico y maduración a corto y largo plazo. Además de los facultativos responsables, especialistas en pediatría, idealmente con capacitación específica en neonatología y enfermería capacitada para la continuidad del cuidado de estos pacientes, se debe contar con el apoyo de profesionales especializados en otras áreas como cardiología, radiología, oftalmología, neurología, rehabilitación y neurofisiología (Rite et al., 2013).

Los recién nacidos prematuros extremos requieren ingresos prolongados en UCIN, desarrollándose y creciendo en unas condiciones que simulan el ambiente intrauterino aunque muy distinto a éste (Harrison y Goodman, 2015). Estos recién nacidos hasta su maduración y crecimiento, son sometidos a numerosos procedimientos médicos y colocación de dispositivos que se mantienen en contacto íntimo con ellos, vía digestiva, inhalatoria y dérmica durante tiempo prolongado en una etapa especialmente vulnerable al efecto de contaminantes ambientales.

Numerosos dispositivos utilizados en la UCIN están realizados con policarbonato y/o plásticos de PVC, en los que puede existir BPA residual y puede filtrarse al producto (Gimeno et al., 2015; Pak et al., 2007), dejando de ser productos inertes, para convertirse en fuentes de exposición (Duty et al., 2013), siendo su liberación mayor con un tiempo de contacto más largo, temperatura más alta y pH elevado (soluciones acuosas de hidróxido) (Geens et al., 2012). En respuesta a las crecientes preocupaciones sobre la exposición a contaminantes ambientales como los DEs en el entorno hospitalario, la Comisión Europea publicó opiniones sobre el riesgo de exposición oral, subcutánea e intravenosa a BPA (SCENIHR, 2015) y ftalatos (SCENIHR, 2016) de dispositivos médicos hechos de materiales que potencialmente pueden filtrarse. El informe indica que la exposición diaria más alta a BPA ocurre en recién en las UCIN (3 mg/kg peso corporal), lo que llevó al comité de expertos a solicitar investigación sobre composición y liberación de BPA en dispositivos médicos SCENIHR (2015).

Debido a los altos requerimientos nutricionales de estos pacientes, reciben altas cantidades de leche materna, la cual constituye la principal fuente de exposición a contaminantes ambientales (Hadders-Algra et al., 2007; Koletzko et al., 2008), como veremos en el apartado correspondiente. Por tanto, los recién nacidos ingresados en UCIN pueden exponerse inadvertidamente a contaminantes ambientales por vía dérmica, ingestión, inhalación e intravenosa, haciendo necesaria una actuación al respecto.

1.3. Leche materna

1.3.1. Beneficios de la leche materna sobre el recién nacido

“...la leche humana es el alimento de elección durante los 6 primeros meses de la vida para todos los niños, incluidos los prematuros, los gemelos y los niños enfermos salvo rarísimas excepciones y se debería prolongar al menos durante todo el primer año y más allá de dicha edad si lo desean tanto la madre como el niño” (WHO/UNICEF, 2003).

Es ampliamente reconocido que la leche materna es el alimento ideal para los recién nacidos otorgando beneficios tanto al recién nacido como a la madre. Ya en 1997, en la estrategia global para alimentación en niños, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) la recomendaban de forma exclusiva hasta los 6 meses y de forma complementaria durante los dos primeros años de vida.

La leche materna es un fluido de extrema complejidad variando su composición en cada mujer y a lo largo del periodo de lactancia. A lo largo de la evolución de la especie humana, su composición ha ido cambiando para proporcionar al niño un balance entre nutrición y protección contra potenciales patógenos mediante el desarrollo del sistema inmunológico. Los numerosos componentes antimicrobianos e inmunomoduladores de la leche materna compensan las deficiencias del sistema inmunitario neonatal y dificultan la translocación de patógenos infecciosos a través del tracto gastrointestinal (Hanson et al., 2002). Además, los lactantes amamantados poseen una microbiota intestinal más estable que los alimentados con fórmula, pero contienen más del doble de células bacterianas, lo cual puede ser debido a las

alteraciones a nivel de la mucosa intestinal por sustancias bioactivas de la leche materna (Beasley y Saris, 2004).

La lactancia materna confiere protección al lactante contra una variedad de enfermedades como infecciones del tracto gastrointestinal, enterocolitis necrosante e infecciones del tracto respiratorio. Además, se ha demostrado que los lactantes amamantados tienen menor riesgo de muerte súbita del lactante y de enfermedades crónicas como alergia, asma, diabetes, obesidad, intestino irritable y enfermedad de Crohn en la vida adulta (Eidelman y Schanler, 2012; León-Cava et al., 2002; Scholtens et al., 2008). Además, la lactancia materna prolongada se ha asociado con mejor desarrollo cognitivo en la infancia (Ibrahim et al., 2019; Heiman y Schanler, 2007).

Por todo ello, la alimentación con leche materna es el patrón oro de alimentación en recién nacidos, de ahí el reconocimiento y énfasis cada vez mayor en la promoción de la lactancia materna.

La leche materna está compuesta de una serie de nutrientes y compuestos bioactivos que proporcionan una nutrición completa al recién nacido, además de un microbioma que protege el sistema inmunológico vulnerable en esta etapa de la vida (Vass et al., 2019). Es un fluido dinámico que a lo largo del periodo de amamantamiento, cambia la composición para satisfacer las necesidades del lactante, las cuales, como veremos a continuación, están influenciadas por los requisitos de acuerdo a su edad, tiempo de lactancia, duración de la gestación, enfermedades maternas, genotipo, dieta y ambiente materno (Andreas et al., 2015).

La leche es clasificada, según el momento de lactancia, en calostro, leche de transición y leche madura, refiriéndose al cambio de composición de la leche a lo largo de la lactancia adaptándose a las necesidades del lactante en cada momento (Pons et al., 2000).

El calostro es la leche que se produce en pequeñas cantidades los primeros dos a cuatro días tras el parto, diferenciándose de la leche madura tanto en propiedades organolépticas (color, composición y consistencia) como a nivel nutricional ya que contiene concentraciones más altas de seroproteínas y minerales (sodio, cloruro y magnesio) mientras que la caseína es casi indetectable. Posee bajas cantidades de lactosa y grasa comparadas con la leche madura. Respecto a su función protectora inmunológica, contiene altas concentraciones de inmunoglobulinas secretoras y

oligosacáridos que alcanzan el doble que la concentración en leche madura. Además, el calostro por su función como promotor del crecimiento, posee muchos factores de crecimiento en comparación con la leche madura (Castellote et al., 2011).

La leche de transición representa el periodo desde los cinco días hasta las dos semanas tras el parto, con incremento en la producción de leche, lo cual cubre las necesidades nutricionales del recién nacido.

A partir de las dos semanas tras el parto, se considera leche madura, la cual contiene de media, 4,5 g/100 mL de lípidos, 7-8 g/100 mL de carbohidratos, 0,8-1,1 g/100 mL de proteínas y 0,2% de componentes minerales (Gidrewicz y Fenton, 2014).

1.3.2. Leche materna como vía de eliminación de contaminantes de la madre

Una de las principales vías de exposición química ambiental para los recién nacidos es a través de la dieta, ya sea a través de la lactancia materna o la alimentación con fórmula (Lehmann et al., 2014). La demostración de que los contaminantes ambientales se encuentran en la leche materna comenzó en 1951 con el descubrimiento en la misma del pesticida DDT, un compuesto orgánico persistente (COPs), y desde entonces, se ha analizado la leche materna buscando la presencia de múltiples contaminantes de muy diferente origen. La farmacocinética de la transferencia de compuestos orgánicos persistentes de la madre al recién nacido a través de la lactancia es un proceso complejo fuertemente influenciado por una característica química particular de todos ellos: su afinidad por la grasa. Cuando se consumen los COPs se concentran en el tejido adiposo y debido a su larga vida media, se acumulan con la edad y la exposición. La excreción ocurre de forma rápida a través de la leche (Solomon y Weiss, 2002; Nickerson, 2006). Para producir la leche materna, el cuerpo moviliza las reservas de grasa, transmitiendo, por tanto, una parte de los COPs almacenados al recién nacido durante la lactancia. El contenido lipídico en la leche materna puede contener concentraciones de contaminantes persistentes 10 veces más altas que los lípidos de los alimentos comunes (Jorissen et al., 2007; Man et al., 2017; Nickerson, 2006).

Los contaminantes ambientales persistentes tipo COP lipofílicos pasan más fácilmente a la leche materna si presentan las siguientes características (Ortega et al., 2021):

1. Bajo porcentaje de fijación a proteínas plasmáticas.
2. Bajo peso molecular (Si presentan peso molecular mayor a 700-800 Da difícilmente pasan a la leche materna)
3. Elevada liposolubilidad.
4. pH básico.

Desafortunadamente sabemos poco del comportamiento de otros COPs no lipofílicos como PFAS y metales, de hecho, la información sobre la presencia de contaminantes ambientales en leche humana aún es todavía limitada. Por ello, y debido a la creciente preocupación por la presencia de contaminantes en las matrices biológicas, conocer los niveles de exposición resulta necesario. Teniendo en cuenta que la leche materna es la principal fuente de exposición a sustancias químicas ambientales por vía digestiva para los lactantes, es importante controlar y monitorizar sus niveles para estimar la exposición de los recién nacidos a los contaminantes y establecer medidas preventivas en caso necesario.

Aunque el peso de la evidencia científica indica que las ventajas de la lactancia materna superan cualquier riesgo de los contaminantes en la leche materna, es importante identificar las tendencias temporales y señalar las poblaciones particularmente expuestas y tomar medidas para disminuir la contaminación y minimizar la presencia de contaminantes ambientales de la leche materna (Solomon y Weiss, 2004) y monitorizar la eficacia de las acciones preventivas.

1.3.2.1. PFAS en leche materna

Una vez en el organismo, los PFAS se acumulan en órganos ricos en proteínas como riñones, sangre, e hígado (MacManus-Spencer et al., 2010; Martin et al., 2004). En sangre se ha observado que los PFAS forman fuertes enlaces con la albúmina, lo cual explica su persistencia en suero (Liu et al., 2011; Jones et al., 2003) y su transferencia durante la lactancia parece deberse a la unión a la proteína de la leche (Fromme et al.,

2010). Además de la unión de PFAS a las proteínas, se cree que el mecanismo de transporte de membrana podría ser responsable de la transferencia de PFAS libres de la sangre a la leche materna, implicando el paso de sustancias químicas de bajo peso molecular a través de la membrana del epitelio mamario (Black, 1996). Esto podría explicar la prevalencia de PFAS de cadena corta en la leche materna en comparación con los de cadena larga, jugando un papel importante la longitud de la cadena en dicha transferencia (Kim et al. 2011; Fujii et al. 2012; Kang et al. 2016).

La presencia de PFAS en leche materna solo se ha estudiado en la última década en mujeres de Asia, Europa y América del Norte (Hoffman et al., 2009; Liu et al., 2010; Lankova et al., 2013). De todos los PFAS, el PFOS y PFOA son los compuestos más investigados, principalmente debido a su presencia en diferentes matrices ambientales, su persistencia y toxicidad, siendo los encontrados con mayor frecuencia en leche materna (Kärman et al., 2007; Bossi et al., 2008; Tao et al., 2008a). No obstante, se ha demostrado que las concentraciones de PFAS en leche materna son más bajas que en plasma y suero materno (Kärman et al., 2007; Liu et al., 2010).

1.3.2.2. Metales no esenciales en leche materna

Los metales tóxicos ingresan a la leche a través de mecanismos similares a los de los elementos traza esenciales (Oskarsson et al., 1998). Los mecanismos de regulación de los oligoelementos en la leche involucran la captura de metales por transportadores específicos en las células epiteliales mamarias y su posterior descarga en la luz alveolar de las glándulas mamarias (Kelleher y Lönnerdal, 2005; Bressler et al., 2007). Estudios de laboratorio realizados con ratones indicaron que el Pb se encuentra casi exclusivamente en la fracción de caseína, las proporciones más altas de Cd y MeHg se encuentran en la grasa y el Hg inorgánico en las fracciones del suero (Oskarsson et al., 1998). En la leche humana, el Hg posee una mayor capacidad para interactuar con la proteína de la leche, mientras que el Cd y el Pb se distribuyen por igual entre componentes de bajo peso molecular (Gundacker y Zödl, 2005).

El AsIII es la única forma de As que se ioniza a pH fisiológico y es transportado por las acuagliceroporinas presentes en las glándulas mamarias durante la lactancia (Liu et al., 2004; Matsuzaki et al., 2005). El mecanismo y factores que pueden afectar la excreción de As en la leche materna no se conocen por completo, pero es probable que

los fetos y los bebés estén protegidos por una mayor metilación del As durante el embarazo y la lactancia, conduciendo a menor excreción de As en la leche materna, que contendría esencialmente As inorgánico, principalmente como AsIII, protegiendo la lactancia materna exclusiva al lactante de la exposición al As (Fängström et al., 2008; Gürbay et al., 2012). El As inorgánico es la única forma toxicológicamente relevante de As para los humanos (IARC, 2016).

En el estudio de Rebelo y Caldas (2016) se revisaron los estudios realizados sobre la presencia de metales en leche materna. Desde el año 2000, dieciocho trabajos se publicaron que medían los niveles de As en leche materna. Los niveles más altos de As se encontraron en Bengala (India) (hasta 149 mg/L) (Samanta et al., 2007), una región con niveles de As en el agua de bebida superiores a 50 mg/L. Los recién nacidos de esta área que tomaban fórmula que se reconstituía con agua, estando expuestos a mayores niveles de As. Los niveles medios más altos de As se han encontrado en el calostro (3,6-14 mg/L) (Almeida et al., 2008), disminuyendo en la leche intermedia y madura.

Hay numerosos estudios publicados que han investigado los niveles de Pb en leche materna. Los primeros estudios datan de la década de 1980 y tenían como objetivo recopilar datos de distintos países para establecer un nivel de exposición ambiental a metales en fluidos humanos (Iyengar, 1984). La movilización de Pb desde el hueso se ve reducida por la ingesta de calcio durante el embarazo y la lactancia. Durante el periodo posterior al embarazo se moviliza mayor cantidad de Pb desde el compartimento óseo, lo cual constituye la principal fuente de Pb en leche materna, además de la dieta y otros factores exógenos (Gulson et al., 2003). Distintos estudios demuestran la correlación significativa entre los niveles de Pb en la sangre de cordón umbilical, sangre y leche materna (Li et al., 2000; Ettinger et al., 2014). Los niveles de Pb en el calostro suelen ser más altos que en la leche madura debido a su mayor contenido en proteínas (Rothenberg et al., 2000). En la revisión de Rebelo y Caldas, 2016, se recopilaron 43 estudios. Los niveles medios de Pb más altos se encontraron en muestras de calostro de leche turca (391 µg/L) (Gürbay et al., 2012).

En la revisión de Rebelo y Caldas (2016) fueron identificados 34 estudios publicados desde el año 2000 que analizaron el Hg en la leche materna. En general, las muestras de leche materna de grandes consumidoras de pescado en el Amazonas tenían los niveles más altos de Hg (Viera et al., 2013). Otros estudios realizados en Europa

encontraron una correlación entre el Hg en leche materna y el consumo de pescado materno después de ajustar los niveles de Hg por el contenido de lípidos en la leche (Valent et al., 2013; Miklavcic et al., 2013). En otro estudio, se encontró relación significativa del incremento de Hg en leche materna con el número de empastes de amalgama en las madres (Costa et al., 2005). En el estudio de Gundacker et al. (2002) se encontraron mayores niveles de Hg en la leche materna de madres austriacas de menos de 60 kg y en aquellas que tenían recién nacidos prematuros.

El Cd en leche materna se ha correlacionado significativamente con la concentración urinaria del metal, reflejando la carga corporal de las madres, y se ha relacionado inversamente con la concentración de calcio en la leche materna, indicativo de que el Cd afecta a la secreción de calcio en la misma (Honda et al., 2003). La presencia de Cd en leche materna se ha relacionado con el hábito tabáquico de las madres (Rahimi et al., 2009) y con el consumo de arroz y zanahoria (Goncalves et al., 2010). En el estudio de Cardoso et al. (2014) se encontró correlación entre las concentraciones de Cd en leche materna, en suelo y agua. Por otro lado, los niveles de Cd en leche materna se han asociado inversamente con el tiempo transcurrido desde el parto (Chao et al., 2014; Leotsinidis et al., 2005).

No obstante, existen pocos datos disponibles en la literatura científica sobre las concentraciones en leche materna de otros metales o metaloides como Al, Sb y Li. Los pocos estudios disponibles sobre concentraciones de Al en leche materna (Chao et al., 2014; Mannello et al., 2009; Taravati Javad et al., 2018) incluyen dos investigaciones en España (Fernandez-Lorenzo et al., 1999; Motas et al., 2021). Los datos sobre las concentraciones de Sb en leche materna son escasos (Björklund et al., 2012; Iyengar et al., 1982; Parr et al., 1991; Wappelhorst et al., 2002). Respecto al Li, existen estudios clínicos que demuestran la excreción de Li en leche materna en las madres sometidas a dicho tratamiento (Poels et al., 2018b) pero son escasos los datos en la población general (Björklund et al., 2012).

1.3.3. Bancos de leche humana

1.3.3.1. Leche materna donada

Según la OMS, “Cuando no se disponga de leche de la propia madre, la leche pasteurizada de madres donantes seleccionadas es la mejor opción para la alimentación de los recién nacidos, sobre todo si se trata de enfermos o de alto riesgo” (OMS /UNICEF, 2003).

Cualquier recién nacido que no disponga de leche de su propia madre para cubrir sus necesidades podría beneficiarse de la leche materna donada (LMD). Sin embargo, dado que la leche materna donada es un recurso escaso, se han establecido una serie de indicaciones prioritarias para los grupos de pacientes especialmente vulnerables con mayor riesgo de padecer complicaciones, como son, los recién nacidos prematuros de bajo peso y muy bajo peso (Quigley et al., 2019; Parker et al., 2021).

Se ha demostrado la importancia del inicio precoz de la alimentación con leche materna en los recién nacidos prematuros, ya que estimula el desarrollo del sistema gastrointestinal, modifica la actividad enzimática y hormonal, incrementa el flujo sanguíneo, influye en la calidad de la microbiota intestinal mejorando la tolerancia digestiva posterior, reduce la incidencia de sepsis, acortando la estancia hospitalaria, con lo cual mejora el crecimiento postnatal y, con ello, el desarrollo psicomotor (Bertino et al., 2009; Mosqueda et al., 2008). En comparación con la leche de fórmula, la leche materna donada e asocia con menor riesgo de desarrollar entidades graves en los recién nacidos prematuros y enfermos como la enterocolitis necrosante, se alcanza alimentación enteral completa más rápidamente, al mejorar la tolerancia digestiva, logrando la retirada de los accesos vasculares y así disminuyendo así la incidencia de sepsis de aparición tardía (Boyd et al., 2007). Además se ha demostrado mejor crecimiento y mejores resultados del desarrollo neurológico, menos retinopatía del prematuro y mejor desarrollo visual (Quigley et al., 2018; Maffei y Schanler, 2017; Hylander et al., 2001).

Según la OMS, la Academia Estadounidense de Pediatría (AAP) y la Sociedad Europea de Gastroenterología y Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN), se recomienda como primera opción la alimentación de los recién nacidos prematuros con leche materna y si esta no está disponible, leche materna donada pasteurizada de Banco

de Leche Humana (BLH) debería ser la alternativa (OMS, 2003; AAP, 2012; ESPGHAN, 2013).

Para la mayoría de los recién nacidos, la leche humana procedente de un BLH es un paso intermedio hasta que se dispone de la leche de su propia madre, pero durante este periodo, la leche materna donada proporciona los beneficios referidos, en muchos casos determinantes para su supervivencia.

Cuando un Servicio de Neonatología tiene acceso a un BLH o posibilidad de administrarla a partir de otro, dispone de profesionales expertos en apoyar, promover y proteger la lactancia materna y el amamantamiento (Shenker et al., 2021), involucrando y sensibilizando a las madres en una lactancia exitosa para sus recién nacidos enfermos o prematuros.

1.3.3.2. Bancos de leche humana en España

Un BLH es un centro especializado que recolecta, analiza, procesa, almacena y distribuye leche materna donada a aquellos recién nacidos prematuros o enfermos que la precisan. Los bancos de leche promueven y apoyan la lactancia materna, proporcionando leche donada a recién nacidos prematuros que no disponen de leche de su propia madre suficiente para cubrir sus necesidades (De Marchis et al., 2016; Weaver et al., 2019). El funcionamiento de un BLH depende de la coordinación de los siguientes puntos:

- Promoción y apoyo a la lactancia materna.
- Selección de las donantes y recepción de leche donada.
- Procesamiento de la leche materna donada.
- Distribución de la leche pasteurizada.
- Registro de la información generada por el banco de leche.

Según la Asociación Europea de Bancos de Leche (EMBA), actualmente hay 280 BLH ubicados en 26 países europeos, como se puede observar en la figura 8 (EMBA, 2021).



Figura 8. Bancos de Leche Humana en Europa (EMBA, 2021)

En el año 2001 se creó el primer BLH de España. Desde entonces han ido apareciendo por toda nuestra geografía, hasta un total de 16 que funcionan actualmente en 13 de las 17 comunidades autónomas. Existen distintos modelos de actividad de bancos de leche, unos ubicados en las propias Unidades de Neonatología, otros integrados en los Centros de Donación de Órganos y Tejidos regionales y otros en modelos mixtos.

Para garantizar la seguridad microbiológica y la calidad de la leche, estos bancos siguen estrictos protocolos de funcionamiento, siguiendo los principios de buenas prácticas de higiene alimentaria y la regulación de la donación de hemoderivados. Los protocolos excluyen la distribución de leche materna fuera de este ámbito, como por ejemplo a través de internet, cuya distribución se ha extendido en los últimos años, práctica que expone a los receptores de leche donada a importantes riesgos para la salud ya que no existe control de donantes ni del procedimiento (García y Peña, 2017)

En Palma de Mallorca, en 2008, durante la primera Reunión Nacional de Bancos de Leche, se constituyó la Asociación Española de Bancos de Leche Humana (AEBL).

Entre los objetivos de esta destacan la creación de nuevos bancos de leche en el territorio nacional, puesta en común de estándares de calidad nacional de los bancos de leche y cooperación entre bancos de leche nacionales y europeos.

1.3.3.3. Legislación de Bancos de Leche Humana

Existen diferencias entre países en cuando a práctica, regulación y organización de los BLH. La consideración de la LMD a nivel mundial es variable, según el país, ya que admite la clasificación como un alimento, un producto sanitario o un tejido. La Comisión Europea se refiere a la leche materna donada como una sustancia que no está regulada o está regulada de manera muy distinta, lo que puede dar lugar a niveles de seguridad variables, tanto para donantes como para receptores, y muy distinta a como se hace para otras sustancias o tejidos (Comisión Europea, 2019).

En Europa, los BLH tienen antecedentes históricos diferentes, y en la mayoría de los casos, han operado independientemente unos de los otros. No existen guías a nivel europeo sobre las prácticas dentro de los BLH. Tan solo recientemente se ha añadido un capítulo sobre LMD a la “Guía sobre la calidad y seguridad de tejidos y células para aplicación humana publicada en 2009 por la Dirección Europea para la calidad de Medicamentos y atención sanitaria” (EDQM, 2019). Los procedimientos para emitir un marco legislativo unificado para leche materna donada en todos los estados miembros de la Unión Europea están en curso (Comisión Europea, 2021), por lo que la información derivada de este trabajo de tesis doctoral puede ser de una enorme oportunidad para ello.

Un estudio realizado por Klotz et al. (2021) describió las diversas regulaciones de la leche materna donada dentro de los países europeos, evaluando su contexto legislativo. Participaron 26 países en el estudio. La leche materna donada está regulada legalmente en 9/26 países europeos, clasificándola como producto alimenticio, producto de origen humano o medicamento (figura 9). En la mayoría de los países las legislaciones son un procedimiento de los distintos ministerios de salud nacionales.

Es interesante tener en cuenta que el uso de leche materna donada en recién nacidos prematuros extremos ha sido considerado más que como fuente de alimentación como tratamiento médico (OMS, 2017). En este sentido, Klotz et al. (2021) sostienen que existe una falta de directrices médicas que orienten las respectivas

normativas en torno al uso de leche materna donada para prematuros. Además, el número de BLH es limitado e irregularmente distribuido, resultando en un acceso limitado de donaciones en comparación con el número de prematuros que la requieren (Klotz et al., 2021).

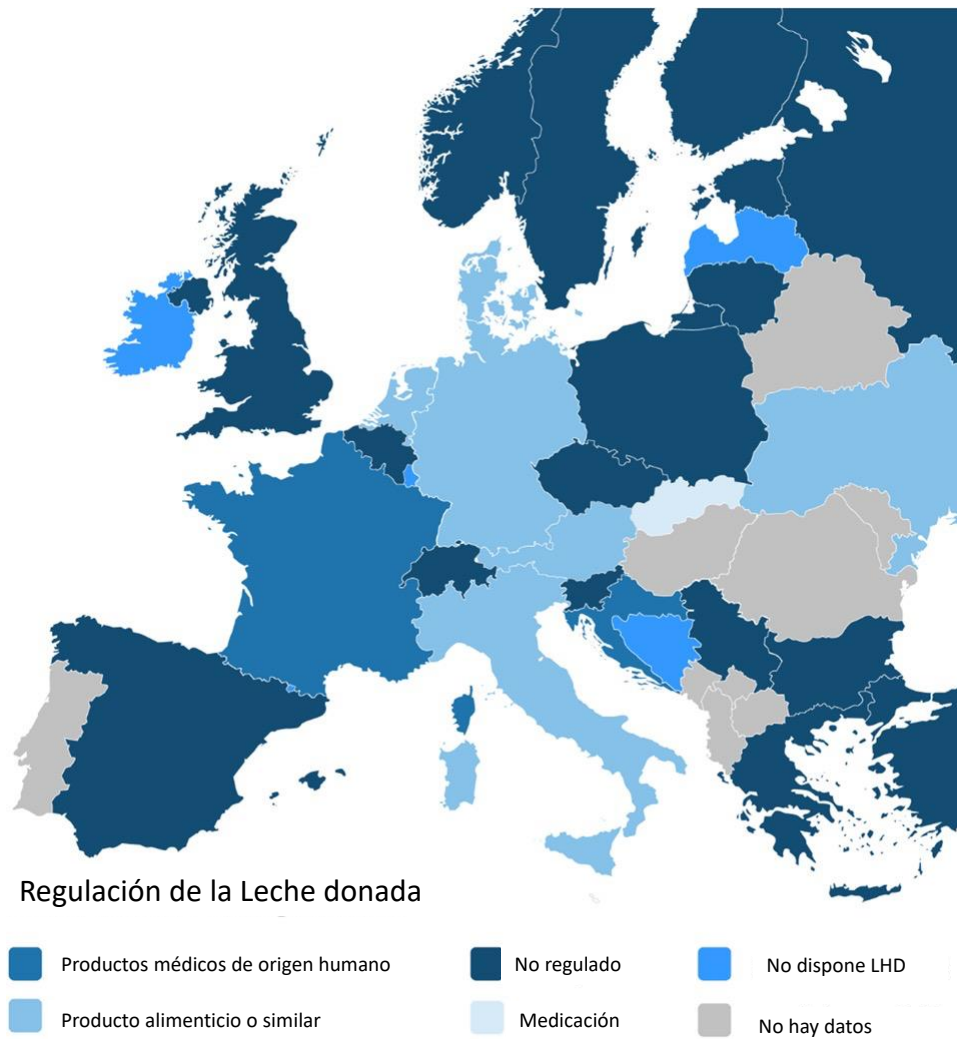


Figura 9. Regulación de los bancos de leche en Europa.

Los BLH han de ofrecer leche materna donada con las máximas garantías de calidad nutricional y seguridad tanto microbiológica como toxicológica. Los peligros potenciales para la seguridad de la leche de donante varían según las poblaciones (Cohen, 2019). Actualmente la seguridad toxicológica se limita a la investigación en el uso materno de medicamentos, ingesta de café o alcohol y consumo de tabaco.

Uno de los objetivos de la EMBA ha sido desarrollar recomendaciones a nivel europeo para los BLH para optimizar la seguridad de la LMD. Esto es especialmente importante para aquellos países sin experiencia en BLH o el uso de LMD (Weaver et al., 2019). El grupo de trabajo de directrices de EMBA se formó en 2015, con tres tareas principalmente:

- Completar encuestas de las prácticas dentro de los bancos de leche nacionales.
- Utilizar directrices para lograr consenso.
- Estudiar la evidencia en investigación para respaldar recomendaciones.

Basado en ello, se elaboró una lista de recomendaciones para los BLH a nivel europeo especialmente relacionadas con el control de calidad de la LMD (Weaver et al., 2019):

1. Se debe implementar un plan sólido de garantía de calidad para garantizar el funcionamiento seguro del BLH.
2. El equipo debe mantenerse de acuerdo a instrucciones de fabricantes verificados y calificados anualmente que garantice las recomendaciones.
3. Los recipientes contenedores de leche no deben sobrellenarse ya que la LMD se expandirá al congelarse.
4. Los envases de LMD deben estar etiquetados en todo momento con la identificación de la donante y la fecha de extracción de la leche. Las etiquetas del BLH deben indicar si la leche es cruda, procesada y la fecha de caducidad de la misma.
5. Los BLH deben minimizar la exposición de LMD a la luz solar o luces de fototerapia.
6. El personal del BLH debe someterse a los controles salud y de inmunización de acuerdo con los protocolos del servicio nacional de salud.
7. El personal del BLH debe recibir capacitación por parte de un miembro del personal con experiencia antes de realizar trabajo sin supervisión en un BLH.
8. La LMD debe manipularse de forma higiénica con lavado de manos del personal de acuerdo a los protocolos locales.
9. El personal del BLH debe considerar implicaciones éticas de su trabajo con donantes, padres, cuidadores y recién nacidos.
10. Se deben mantener registros de las donantes y donaciones (trazabilidad).

11. La priorización de los receptores de LMD debe determinarse localmente.
12. Se deben tomar medidas para control óptimo de la temperatura de la LMD durante el transporte, para lo cual se precisan adecuados contenedores. Se debe mantener registro de la temperatura. Las neveras de transporte deben estar aisladas y ser fáciles de limpiar. Evitar el mismo contenedor de transporte para leche cruda y pasteurizada.

1.3.3.4. Donantes de leche materna

Las donantes de leche materna han de ser mujeres sanas, con hábitos de vida saludables, que lactan satisfactoriamente a su hijo y deciden de forma altruista donar leche para beneficio de otros recién nacidos (Weaver et al., 2019; Miracle et al., 2011).

La EMBA estableció unos criterios para el reclutamiento y selección de las donantes:

1. El reclutamiento de donantes debe realizarse utilizando un lenguaje claro, sin tecnicismos.
2. La selección de donantes debe incluir tanto entrevista oral como realización de un cuestionario de salud, obteniéndose datos sobre el estado de salud y hábitos de vida (Sierra et al., 2013).
3. Se precisa la realización de pruebas serológicas previas a la donación, que incluya enfermedades infecciosas potencialmente transmisibles a través de la leche (virus linfotrópico T humano (HTLV), sífilis, VIH, hepatitis B y C, y Chagas) en mujeres potencialmente expuestas.
4. En cuanto al consumo de alcohol, no hay consenso sobre las cantidades seguras consumidas antes de extraer leche humana para la donación. La EMBA recomienda que las donantes eviten ingesta de alcohol y nunca donar leche extraída mientras estén bajo la influencia del alcohol. También se deben considerar pautas locales sobre el consumo de alcohol por parte de las madres que amamantan.
5. Las donantes deben informar al BLH sobre cualquier cambio de salud o en su comportamiento que afecte a la donación de leche humana según lo explicado en la entrevista personal.
6. Antes del inicio de la donación, se debe recibir el consentimiento informado por escrito de acuerdo con los protocolos del BLH, incluida la investigación, si procede.

7. Se excluirán:
- Fumadoras o usuarias de productos que contienen nicotina, incluidos “vapeo”, chicles u otros productos.
 - Consumidoras de cualquier tipo de droga.
 - Aquellas con serología positiva para los virus arriba mencionados.
 - Usuarias de medicamentos diferentes a los aprobados por la EMBA.
 - Aquellas que hayan recibido recientemente una transfusión de sangre, tatuaje o acupuntura o lesión por pinchazo de aguja. El término “reciente” se determina localmente, en cada BLH, de acuerdo con los servicios de donación/ transfusión de sangre y métodos utilizados para las pruebas serológicas.
 - Las que sigan una dieta vegana sin suplementación de vitamina B12.
 - Aquellas que tengan una pareja sexual que tenga o esté en riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual.
8. El BLH debe capacitar a todas las nuevas donantes en los requisitos de higiene y lavado de manos para extraer, manipular, almacenar, congelar y transportar la LMD, así como brindar apoyo continuo a las donantes, incluidas aquellas rechazadas por el BLH, y entrenamiento adicional y apoyo a las donantes que donan repetidamente leche que no cumple los criterios microbiológicos.
9. No se debe excluir a las madres en duelo si cumplen los requisitos de reclutamiento.
10. Una vez reclutada la donante, se debe excluir la donación de leche de manera temporal en cualquiera de los siguientes supuestos:
- Presencia de mastitis.
 - Uso temporal de algunos medicamentos registrados en <http://ukamb.org/medication-and-breastfeeding>.
 - Presencia de enfermedades infecciosas agudas y enfermedades de la piel como virus herpes simple o varicela zóster.
 - Infección fúngica del pezón, areola mamaria o región torácica.
 - Haber recibido vacuna con virus vivos atenuados en las últimas 4 semanas (Calvo et al., 2018)

La donación se puede iniciar en cualquier momento de la lactancia, pero se recomienda esperar entre 3 y 8 semanas una vez bien establecida la lactancia del hijo

propio. Para corroborar que cumplen los criterios, se realiza una entrevista personal sobre su estado de salud y hábitos de vida (Anexo).

1.3.3.5. Receptores de leche donada

Los receptores de leche materna donada distribuida por los BLH son fundamentalmente neonatos que, por sus condiciones, tienen alto riesgo de padecer enterocolitis necrosante, como son (Parker et al., 2021):

- Recién nacidos grandes prematuros (menores a 32-34 semanas de gestación) y muy bajo peso al nacimiento (menor a 1.500 g).
- Retraso de crecimiento intrauterino con alteración en la ecografía doppler obstétrica.
- Patología intestinal congénita.
- Alimentación tras cirugía digestiva.
- Cardiopatías graves (cianóticas o de bajo gasto sistémico).
- Compromiso de la perfusión sanguínea intestinal secundaria a eventos hipóxico-isquémicos (asfixia, parada cardiorrespiratoria tras nacimiento, shock grave).
- Determinadas metabolopatías.

De todos ellos, el mayor volumen de leche materna donada administrada va dirigida a los recién nacidos prematuros de la UCIN.

Con carácter general, se intenta identificar la leche que mejor se adapte a la edad gestacional del recién nacido y a sus necesidades, clasificándose la leche para su posterior administración, atendiendo a sus características en macronutrientes y al momento en que se produjo la donación en:

- Leche calostro de prematuro.
- Leche calostro.
- Leche intermedia.
- Leche madura.

El hospital receptor debe registrar el uso de la leche materna donada en cada receptor. Antes de la administración de la leche donada, se requiere el consentimiento informado de la madre/padre/cuidador del receptor de acuerdo con los protocolos locales de cada unidad de neonatología.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

La exposición a compuestos químicos ambientales como son los DEs afecta a la salud humana. Esta exposición constituye un problema emergente de Salud Pública que trasciende a la escena clínica, pudiendo afectar a los grupos más vulnerables, como son los recién nacidos hospitalizados.

Estudios previos de exposición prenatal y postnatal a contaminantes ambientales han demostrado la vulnerabilidad del organismo durante las ventanas de susceptibilidad biológica, con consecuencias que se pueden manifestar en efectos adversos en la salud del niño durante su crecimiento y desarrollo.

Los recién nacidos prematuros se establecen como uno de los grupos poblacionales más susceptibles al efecto de los contaminantes ambientales al encontrarse en fase crítica del desarrollo y presentar una fragilidad particular. Los recién nacidos en general y los prematuros en particular poseen gran inmadurez de los sistemas enzimáticos encargados de la detoxificación de compuestos exógenos y una mayor superficie corporal, con lo cual precisan un mayor volumen de ingesta para cubrir los altos requerimientos nutricionales. De esta forma, la vía alimentaria constituye una vía importante de exposición a contaminantes ambientales para los recién nacidos.

La leche materna, por sus incuestionables beneficios, constituye el alimento de elección en todos los recién nacidos, especialmente en los recién nacidos prematuros. Cuando la leche de la madre no está disponible, la leche donada de madres al BLH se establece como la mejor fuente de alimento para el recién nacido hospitalizado. Los contaminantes ambientales persistentes pueden acumularse en el organismo de la mujer lactante, constituyendo la leche materna una posible vía de excreción por el organismo materno. Los PFAS y los metales no esenciales como mercurio y arsénico son contaminantes ambientales persistentes, de distribución global, a los que la población se expone principalmente a través de la dieta. La exposición temprana (pre- y postnatal) a estos compuestos se ha asociado con diversos problemas de salud infantil, como trastornos del neurodesarrollo y efectos reproductivos y en el sistema inmune. No obstante, actualmente no existen guías dirigidas a reducir la presencia de estos y otros contaminantes ambientales en leche humana donada.

El estudio de la presencia de este tipo de sustancias nocivas en leche materna donada al BLH, así como la identificación de posibles vías y fuentes de exposición, permitirá establecer de forma precisa programas de monitorización y la elaboración de recomendaciones sobre hábitos de vida saludables a las madres donantes y al BLH encaminadas a disminuir su exposición y la del recién nacido hospitalizado, mejorando así la calidad asistencial integral a estos pacientes pediátricos y evaluar la efectividad de las medidas y protocolos puestos en marcha.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis doctoral es identificar y cuantificar las concentraciones de compuestos ambientales persistentes, perfluorados y metales no esenciales, en muestras de leche de madres donantes del BLH hospitalario, y describir los factores socio-demográficos, reproductivos y de estilo de vida asociados con la presencia de estos compuestos en la leche.

Para este propósito, se postulan los siguientes objetivos específicos:

1. Cuantificar las concentraciones de PFAS en muestras de leche de primera donación de madres donantes del BLH hospitalario.
2. Cuantificar las concentraciones de arsénico, mercurio, plomo, cadmio, aluminio, antimonio y litio en muestras de sucesivas donaciones de leche de madres donantes.
3. Identificar los determinantes de las concentraciones de PFAS y metales no esenciales en las muestras de leche donada, incluyendo factores socio-demográficos, de estilo de vida, dieta, uso de productos de cuidado personal, y reproductivos de las madres donantes.

De acuerdo con los objetivos propuestos, los resultados de la tesis se recogen en cuatro artículos científicos, con los siguientes objetivos:

1. Desarrollar y validar un método para la determinación de PFAS en muestras de leche materna mediante la combinación de técnicas de extracción líquido-líquido con micro-extracción líquido-líquido dispersiva y el uso de cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem.
2. Determinar las concentraciones de once PFAS en muestras de leche donada al BLH hospitalario e identificar factores asociados con la exposición.
3. Determinar las concentraciones de arsénico, mercurio, plomo y cadmio en muestras repetidas de leche materna donada al BLH hospitalario e identificar factores asociados con la exposición.

4. Determinar las concentraciones de aluminio, antimonio y litio en muestras repetidas de leche materna donada al BLH, identificando posibles determinantes de la exposición.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Artículo 1: Desarrollar y validar un método para la determinación de PFAS en muestras de leche materna mediante la combinación de técnicas de extracción líquido-líquido con micro-extracción líquido-líquido dispersiva y el uso de cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem.

Los estudios de biomonitorización y la investigación epidemiológica a gran escala requieren métodos analíticos fiables, económicos, rápidos, simples y fáciles de aplicar. Dada la complejidad inherente a las muestras biológicas como la leche materna, su tratamiento adecuado es fundamental para detectar con precisión los contaminantes ambientales que pueden estar presentes en concentraciones muy bajas. En este sentido, el uso combinado de la extracción líquido-líquido asistida por sales (SALLE) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es una muy buena alternativa, de acuerdo con la capacidad bien conocida de SALLE para la extracción de infinidad de sustancias y los factores de enriquecimiento elevados obtenidos con DLLME para la mayoría de los compuestos no hidrofílicos. Además, los tiempos de extracción son cortos con SALLE y particularmente con DLLME, y no se necesitan dispositivos de extracción específicos ni sistemas de vacío, lo que permite el procesamiento diario de un gran número de muestras y por ende su implementación en análisis de rutina.

4.1.1. Tratamiento de las muestras de leche

Después de colocar 1 mL de la muestra de leche en un tubo de centrífuga de polipropileno, se agregó 1 mL de agua Milli-Q y 5,0 mL de acetonitrilo y se aplicó una agitación corta (vortex) de 30 s. El proceso SALLE posterior se realizó mediante la adición de una mezcla de sales constituida como sigue: 600 mg de NaCl, 200 mg de citrato de hidrógeno disódico y 200 mg de citrato trisódico. Una agitación manual durante 60 s y una centrifugación a 4000 rpm durante 10 min dio como resultado un sobrenadante que se transfirió a un vial de vidrio de 7 mL, concentrado a 1 mL bajo corriente de nitrógeno y vertido en un tubo de ensayo de vidrio con tapa roscada de 15 mL. Luego se agregaron diez mililitros de solución acuosa de NaCl al 10% (p/v) a pH 2, preparando así la muestra

para el proceso DLLME. A continuación, se inyectaron rápidamente 1500 µL de triclorometano con una jeringa, y la mezcla se agitó suavemente durante 40 s y luego se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm. Todo el volumen de la fase sedimentada se transfirió a un vial de vidrio limpio, la fase orgánica se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el residuo se disolvió con 100 µL de una mezcla de acetato de amonio 5 mM (pH 4.5) y acetonitrilo 30:70 (v/v) y luego se agitó durante 30 s, preparando así la muestra para inyección en el sistema de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). El análisis HPLC-MS/MS se realizó con un instrumento de cromatografía líquida NexeraXR LC-20A (Shimadzu, Japón) y un espectrómetro de masas 4500 QTRAP MS/MS4500 (ABSciex, EE. UU.). Se usaron una columna Gemini C18 (100 mm × 2 mm d.i., partícula de 3 µm) de Phenomenex (Torrance, CA, EE. UU.) y una fase móvil en gradiente conformada por una solución acuosa de acetato de amonio 5 mM con pH de 4,5 (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Los compuestos se determinaron en modo de ionización negativa. El espectrómetro de masas en tándem operó en modo de monitorización de reacción seleccionada (SRM).

4.2. Artículos 2, 3 y 4: Determinación de PFAS y metales no esenciales en muestras de leche donada al BLH hospitalario y factores asociados con la exposición.

4.2.1. Diseño del estudio

Se trata de tres estudios observacionales en los que se describen y se analizan los posibles determinantes de: 1) las concentraciones de PFAS en muestras de leche recogidas en la primera donación realizada por las madres participantes; 2) las concentraciones de metales/metaloides no esenciales (arsénico, mercurio, plomo, cadmio, aluminio, antimonio y litio) en muestras de leche recogidas longitudinalmente, medidas repetidas, en las sucesivas donaciones realizadas por las participantes.

4.2.2. Población de estudio

Entre 2015 y 2018 se reclutó una muestra constituida por 83 madres donantes de leche al Banco de Leche Regional del Hospital Universitario Virgen de las Nieves

(HUVN) de Granada. La selección de las donantes se realizó siguiendo los criterios de inclusión propios del BLH del Hospital, los cuales son comunes a los establecidos por la Asociación Española de Bancos de Leche Humana (AEBLH) y la Asociación Europea de Bancos de Leche (EMBA) (Weaver et al., 2019).

El Banco Regional de leche del HUVN comenzó su funcionamiento en 2010. El objetivo de su creación era disponer de leche materna para los neonatos prematuros y enfermos de la Unidad de Neonatología de dicho centro cuando sus madres no disponían aún de leche materna. En la tabla 4 se muestran las donantes de leche humana desde su creación. Desde el año 2011, distribuye leche pasteurizada a Unidades de Neonatología de otros centros hospitalarios de la Comunidad Autónoma de Andalucía, lo que ha sido posible por la elevada cantidad de donantes y volumen de leche disponible desde su apertura. Toda la actividad generada por el Banco queda registrada en una base de datos, que permite el control de todos los procedimientos, de las donantes y de los receptores, lo que permite certificar la trazabilidad y seguridad del procedimiento.

Tabla 4. Número de donantes de leche humana en BLHVN desde su creación. El sombreado más oscuro muestra la etapa correspondiente al estudio.

	Nuevas Inscripciones	Donantes Activas	NUEVAS BLHVN	ACTIVAS BLHVN
2010	19	19	19	19
2011	71	69	72	73
2012	64	67	62	68
2013	93	110	87	99
2014	116	134	80	87
2015	161	143	134	134
2016	173	160	142	153
2017	140	130	102	117
2018	149	165	40	42
2019	202	208	66	74
2020	229	241	92	98
2021	224	254	61	71

Una vez que las madres donantes realizaron su inscripción al BLH, fueron informadas de los objetivos y procedimientos del estudio, solicitando su participación.

Una vez confirmada su colaboración, firmaron el consentimiento informado para recogida y manipulación de muestras biológicas. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los establecidos por el BLH para la selección de donantes de leche (ver sección 1.3.3.4). Entre febrero 2015 y noviembre 2018, 83 madres donantes, con donación de leche al BLH de forma regular, aceptaron participar en el estudio.

La información epidemiológica se obtuvo mediante el cuestionario inicial de inscripción al BLH y un cuestionario epidemiológico ampliado diseñado para el estudio. El cuestionario epidemiológico se realizó a 78 de las 83 madres donantes participantes.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Biomédica de Granada con fecha 29 de marzo de 2017 (número de protocolo 1552-N-16).

4.2.3. Extracción, manejo y almacenamiento de la leche humana para donación

La EMBA realiza una serie de recomendaciones para la óptima extracción, manejo y almacenamiento de la leche humana donada previo a su procesamiento por el banco de leche humana (Weaver et al., 2019). Dichas recomendaciones son comunes con el Banco del HUVN:

1. Aconsejar a las donantes la extracción de leche en lugar de recolección por goteo.
2. Se acepta la extracción manual, con sacaleches manual y eléctrico.
3. Asegurar la limpieza y desinfección del equipo de extracción de acuerdo con las recomendaciones del fabricante o de los protocolos del hospital.
4. Enfatizar sobre la importancia de la higiene y el lavado de manos en la extracción de leche.
5. Desalentar sobre el uso compartido de extractores de leche fuera del hospital o el uso de extractores de segunda mano o prestados, a menos que sean procedentes del hospital o proveedor de atención médica.
6. Solicitar a las donantes la congelación de leche para la donación lo antes posible, pero en un máximo de 24 horas (48h si se recoge y se conserva en frigorífico/congelador hospitalario).

7. Sólo se deben utilizar los contenedores proporcionados por el BLH para la recolección de leche o los aprobados por el mismo.
8. Asegurarse de que se verifique el etiquetado de la leche donada a su entrega al BLH.
9. A su llegada al BLH, colocar la leche materna donada en un congelador de mantenimiento adecuado (congelador exclusivo para leche cruda y mantenimiento a -20°C). Todos los equipos de refrigeración y congelación deben ser exclusivos para la leche materna donada. Se deben supervisar y registrar los equipos de forma continua o al menos cada 24 h.
10. Almacenar leche materna donada cruda y pasteurizada en congeladores separados bien etiquetados. Si no es posible, en compartimentos separados de refrigeradores y congeladores.
11. Descongelar la leche cruda congelada en un refrigerador para evitar que la temperatura ascienda por encima de los 8°C.

4.2.3.1. Extracción de la leche materna para donación

La extracción de leche puede realizarse en la Unidad Neonatal si el hijo se encuentra ingresado o bien en el domicilio de la donante. Si se realiza en domicilio, el BLH facilita a la madre el material necesario para la extracción, conservación y transporte de la leche. Debe hacerse siguiendo unas normas higiénicas:

- La ducha diaria es suficiente para mantener el pecho limpio sin que precise lavarlo antes de la extracción.
- Antes de iniciar la extracción es necesario lavarse bien las manos con abundante agua y jabón.
- Se utilizarán directamente los recipientes proporcionados por el banco.

Material facilitado por el BLH para la recogida de leche:

- Extractor de leche eléctrico o manual con embudo de la talla adecuada (anexo). En nuestro estudio, la mayoría de mujeres extrajo su leche usando un extractor eléctrico de la marca Medela Swing®, Estados Unidos.

- Recipientes estériles de polipropileno de 130 mL (Beldico Belgium, model HPG37528), para depositar la leche. Estos recipientes fueron pre-testados para comprobar que estaban libres de los contaminantes estudiados, incluyendo PFAS, bisfenol A y metales.
- Etiquetas para la identificación.
- Contenedores isotermos y acumuladores de frío para el transporte de la leche recogida.

Limpieza y mantenimiento de los extractores utilizados para la donación de leche materna

La contaminación de los residuos de leche en el extractor es muy frecuente y el crecimiento microbiano puede multiplicarse rápidamente, con la repercusión que de ello se deriva para que la leche extraída cumpla unos criterios de calidad y así poder ser procesada en los BLH, por lo que es crítico mantener limpias las piezas del extractor.

Se indican los siguientes pasos a las madres donantes para que la leche extraída sea apta para el procesamiento:

1. Antes de la extracción para la donación: Limpiar con toallitas desinfectantes los diales del extractor, botón de encendido y la superficie donde lo pondrá. Al menos una vez al día, antes de la extracción para la donación, descontaminar las piezas del extractor que toman contacto con la leche, hirviéndolas en agua durante 10 minutos o utilizando bolsa de desinfección para microondas. Secar cuidadosamente las piezas sobre una toalla de papel y dejar secar al aire o bien secar cada pieza con toalla de papel de un solo uso. No utilizar paños de tela ya que pueden contener gérmenes. Mantener igualmente limpios y secos el cepillo y recipiente donde se lavan las piezas.
2. Inmediatamente después de cada uso:
 - Lavado del extractor. Desmontar el extractor y enjuagar bajo el grifo cada pieza lo antes posible. Si se lavan a mano, no colocar las piezas en el fregadero ni lavarlas junto a la vajilla. Lavar cada pieza con jabón detergente para vajilla y abundante agua templada bajo el grifo o sumergiéndolas en un recipiente que use solo para lavar el extractor. Si se precisa, utilizar un cepillo solo para este uso. Asegurarse de que no quedan restos de leche tras el lavado. Aclarar cada pieza

bajo el grifo. También se pueden lavar las piezas en lavavajillas (en bandeja superior) si el fabricante indica que son aptas para ello.

- Secar las piezas como se ha indicado anteriormente.
- Guardar las piezas. Para guardar las piezas esperar a que estén completamente secas, lavarse las manos antes de tocarlas. Guardarlas en un lugar limpio y seco (se recomienda usar recipiente para alimentos con tapa).

4.2.3.2. Instrucciones para la conservación de la leche extraída

Una vez extraída la leche, los recipientes son etiquetados con las pegatinas de identificación destinadas a ello, en las que figura el número de donante, fecha de extracción y el volumen, y se procede a su conservación en congelador doméstico a -20°C . Las madres que realizan la extracción en domicilio no pueden mezclar volúmenes de distintas extracciones.

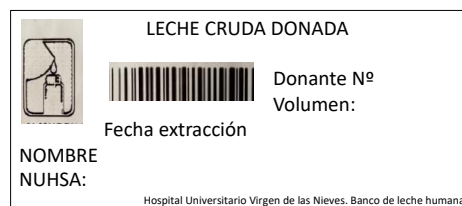


Figura 10. Etiquetado leche materna donada

4.2.3.3. Procesamiento de la leche donada

Una vez recepcionada la leche donada (denominada leche cruda) en el BLH, la misma permanece almacenada, congelada a -30°C , hasta el momento de su procesamiento, que ocurre siempre antes de cumplir 6 semanas desde su extracción. Para su procesamiento, la leche se descongela controlando en todo momento la T° , bien al baño maría o en frigorífico a 4°C . Se comprueban las características organolépticas de cada bote: color, aroma, presencia de cuerpo extraño, desechando aquellas que no cumplan los criterios establecidos, ya que puede indicar manipulación, conservación o almacenamiento inadecuados. En cada bote de leche cruda se mide la acidez titulable: La acidez Dornic se relaciona positivamente con la contaminación, siendo rechazada aquella leche que supera los 8 grados Dornic (Novac et al., 2007). Así mismo, la acidez

proporciona información sobre la calidad de la leche, ya que la leche ácida es de peor calidad, siendo más osmolar.

En Europa, así como a nivel mundial, no hay consenso para las recomendaciones de las pruebas microbiológicas de la LMD antes o después de la pasteurización. Las directrices locales y nacionales varían tanto en el momento y la frecuencia de dichas pruebas como en los criterios de aceptación de la LMD que se somete a estas pruebas. Hay falta de evidencia publicada para informar de la toma de decisiones y los miembros del grupo de trabajo concluyeron que para maximizar la seguridad de los receptores inmunocomprometidos vulnerables a los que va dirigida esta leche, las mejores prácticas sugieren (Weaver et al., 2019):

- Antes de la pasteurización: Todos los lotes de leche deben analizarse. Criterios de aceptación de la misma: 105ufc/ml o menos de organismos no patógenos y ningún patógeno para la mezcla de leche analizada antes de la pasteurización. Se desecharían las muestras de leche que no cumplan este estándar.
- Post-pasteurización: Cada lote de leche se analiza tras la pasteurización. Desechar el lote si se detecta algún crecimiento microbiano en una muestra aleatoria tomada tras la pasteurización.

Pasteurización de la leche materna donada

Previo a la pasteurización, se prepara un pool de leche procedente de la misma donante y donación, realizando a esta mezcla el análisis de la acidez y de macronutrientes a través de analizador Miris®, permitiendo conocer el contenido calórico, de lípidos, proteínas y lactosa de la leche del lote preparado. Una vez analizado el lote, se fracciona en alícuotas y pasa a pasteurizarse.

La pasteurización de las alícuotas de leche se realiza mediante tratamientos térmicos cuyo objetivo es eliminar las bacterias contaminantes y asegurar ausencia de virus. El tratamiento térmico utilizado por la mayoría de bancos de leche es la pasteurización mediante el método Holder. La Tª y el tiempo recomendado actualmente para el tratamiento térmico/pasteurización son 62,5°C durante 30 minutos, seguido de enfriamiento rápido a por lo menos 10°C y preferiblemente, 4°C antes de transferirlos a un congelador (Wesolowska et al., 2019; Picaud y Buffin, 2017). Se debe supervisar el proceso y registrar las temperaturas. Este tipo de pasteurización destruye las formas

vegetativas de las bacterias y la mayoría de los virus. Los macronutrientes permanecen relativamente intactos pero varios componentes beneficiosos como son enzimas y células inmunitarias se destruyen por completo o se ven comprometidos. Concluida la pasteurización, se realiza control microbiológico de la leche pasteurizada, que certifica que el proceso ha sido adecuado. Se desecha cualquier leche pasteurizada con algún contenido bacteriano. Tras el procedimiento de pasteurización, la leche se congela y se almacena hasta su distribución. El tiempo máximo de almacenamiento de la leche pasteurizada se establece en 3 meses a -20°C y de un año a -80°C .

4.2.3.4. Procesamiento de muestras de leche donada para el estudio

Las muestras de leche empleadas en este estudio se obtuvieron del pool de leche de cada donación, del cual se obtuvo una alícuota de leche cruda (no pasteurizada) con un volumen de entre 5 y 30 mL, que se volvía a congelar a -20°C en crioviales estériles de polipropileno (Deltalab ref. 409003.2) hasta su traslado al Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada para el análisis de los contaminantes ambientales. Allí igualmente las muestras se congelaban a -20°C .

El día en que se obtenía la alícuota, que es el mismo de la pasteurización del resto de la leche cruda, es el que se registraba como fecha de donación. Así, el intervalo de tiempo máximo entre la extracción de la leche por parte de la madre y la obtención de la alícuota nunca excedía las 6 semanas.

Todo el proceso, desde la admisión de la leche en el BLH, queda registrado en el programa destinado a ello, pudiendo realizar la trazabilidad de la leche desde su extracción hasta su administración en todo momento.

En el periodo de tiempo de reclutamiento, entre 2015 y 2018, se obtuvieron un total de 242 muestras o pools de leche donada por las 83 madres participantes en el estudio. La media de donaciones por madre donante fue 2, oscilando entre 1 y 13 donaciones (25% de las mujeres realizaron más de 4 donaciones y 10% más de 7 donaciones).

4.2.4. Tratamiento de muestras de leche materna

4.2.4.1. Artículo 2: Método de determinación de PFAS en leche materna

Preparación de las muestras

Para el análisis de PFAS, las muestras de leche fueron procesadas en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, donde se procedió al tratamiento para su análisis, mediante el método propuesto (objetivo 1 de la presente tesis doctoral).

Estándares, disolventes y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, a menos que se especifique lo contrario. Los PFAS fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los estándares internos ($^{13}\text{C}_5$ - PFHxA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDoDA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS) fueron suministrados por Wellington Laboratories (Ontario, Canadá). Se prepararon soluciones patrón madre de los compuestos (200 mg/L) en acetonitrilo y se almacenaron a 4°C en la oscuridad. Las soluciones eran estables durante al menos cuatro meses. Los estándares de trabajo se prepararon inmediatamente antes de los análisis. El triclorometano y la acetona se compraron a Merck (Darmstadt, Alemania), y el cloruro de sodio, el citrato de hidrógeno di-sodio 1,5 hidratado, el citrato trisódico 2 hidratado, el acetato de amonio, el acetonitrilo (grado LC-MS) y el ácido fórmico a Sigma-Aldrich (Madrid, España). El agua (18,2 MΩ cm) se purificó utilizando un sistema Milli-Q propio (Millipore).

Tratamiento de las muestras

El método de extracción de la muestra se basó en los resultados del método del objetivo 1 (Vela-Soria et al., 2020), con pequeñas modificaciones. Una de las modificaciones que se realizó al método fue la adición de 50 µL de ácido fórmico antes de la extracción líquido-líquido asistida por salificación. A 1 mL de leche materna se le añadió el estándar interno (IS), 1 mL de agua Milli-Q, 5 mL de acetonitrilo y 50 µL de ácido fórmico. A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido asistida por sal, añadiendo una mezcla de sal de 600 mg de NaCl, 200 mg de citrato de hidrógeno de di-sodio y 200 mg de citrato de tri-sodio, seguido de un vórtex, y luego centrifugando a

4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se transfirió a un vial de vidrio de 7 mL, se concentró a 1 mL bajo corriente de nitrógeno, y se vertió en un tubo de ensayo de vidrio de 15 mL, seguido de la adición de 10 mL [solución acuosa de NaCl al 10% (p/v) a pH 2], y 1,5 mL de una mezcla de TCM/Acetona 4:1(v/v), y la mezcla se agitó suavemente y se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm. A continuación, todo el volumen de la fase orgánica se transfirió a un vial de vidrio limpio y se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió con 100 µL de una mezcla de acetato de amonio 5 mM (pH 4,5) y acetonitrilo 30:70 (v/v), y se inyectaron 15 µL en el sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplado a espectrometría de masas (UHPL-MS).

Análisis de PFAS

Se determinaron los siguientes PFAS en las muestras de leche:

- Siete de cadena larga: seis ácidos carboxílicos perfluoroalquilados (PFCAs) con más de 7 carbonos perfluorados, entre ellos PFOA, ácido perfluorononanoico (PFNA), ácido perfluorodecanoico (PFDA), ácido perfluoroundecanoico (PFUnDA), ácido perfluorododecanoico (PFDoDA) y ácido perfluorotridecanoico (PFTrDA); y un ácido sulfónico con más de 9 carbonos perfluorados (PFOS).
- Cuatro PFAS de cadena corta: dos PFCAs, PFHxA y ácido perfluoroheptanoico (PFHpA); y ácido sulfónico perfluorobutano (PFHxS).

Para el análisis se utilizó un sistema Ultimate UHPLC 3000 (Thermo Fischer) con espectrometría de masas Q Exactive Focus (Thermo Fischer). Se empleó una columna Kinetex 2,6 µm PS C18 100 Å (100 x 3 mm) (Phenomenex) para la separación cromatográfica de los compuestos. La fase móvil del gradiente consistió en una solución acuosa de acetato de amonio 5 mM (pH 4,5) (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El volumen de inyección fue de 15 µL y La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. La espectrometría de masas se operó en modo ESI negativo con parámetros optimizados de monitorización de iones seleccionados (SIM). Los PFAS tienden a asociarse con proteínas como la albúmina, presentes en la leche materna. Al acidificar la muestra, se rompe esta asociación por lo que los PFAS quedan libres y la extracción es completa y cuantitativa.

La exactitud, medida como recuperación media, la precisión, reproducibilidad, en términos de desviación estándar relativa, %RSD, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se evaluaron usando muestras en blanco de leche humana fortificada. Los LODs oscilaron entre 0,66 y 0,86 ng/L y los LOQs entre 2,19 y 2,87 ng/L. La precisión del método se verificó mediante control de calidad usando diferentes concentraciones cada 20 muestras.

4.2.4.2. Artículos 3 y 4: Método de determinación de metales no esenciales en leche materna

Preparación de las muestras

Los metales se analizaron en alícuotas con el remanente después de haber analizado los PFAS (Serrano et al., 2021) y contaminantes no persistentes (Iribarne-Durán et al., 2022). En primer lugar, se puso a punto la preparación de las muestras para su determinación: 0,5 mL de leche se digirieron con microondas en recipientes de cuarzo con 0,5 mL de HNO₃ (Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemania). El sistema de digestión por microondas (Ethos UP, Milestone, Shelton, CT, EE.UU.) se programó a 1800 W y 210°C como límites de potencia y temperatura respectivamente, utilizando un tiempo de rampa de 20 minutos, tras lo cual un tiempo de espera de 15 minutos y posterior enfriamiento de 60 minutos. La solución resultante digerida se transfirió a un tubo descontaminado para su posterior análisis. Antes de su utilización, los recipientes de cuarzo se limpiaron sumergiéndolos durante 24 horas en HNO₃ al 10% y se aclararon con agua Milli-Q® antes de su uso y se secaron a 80°C durante aproximadamente 2 horas. Como control de calidad se utilizó un material de referencia certificado (ERM-BD151 leche desnatada en polvo). Se reconstituyeron aproximadamente 0,5 g de material de referencia certificado con 4,5 mL de agua Milli-Q®. A continuación, la leche líquida resultante se digirió con el resto de las muestras del estudio. Finalmente, las muestras se diluyeron 1:5 con HCl al 1% (Suprapur, Merck).

Análisis de metales no esenciales

La cuantificación de las concentraciones de As, Hg, Pb, Cd, Al, Sb y Li en leche materna se realizó mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento

inductivo (ICP-MS) en un equipo de ICP-MS triple cuadrupo Agilent 8900 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) en el laboratorio del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la Universidad de Granada. Se preparó una curva de calibración para cada elemento en agua ultrapura (Milli-Q) con 2% de HNO₃ (Suprapur, Merck) y HCl al 1% (Suprapur, Merck), utilizando soluciones estándar metálicas (Agilent Technologies). Se analizaron muestras que se utilizaron como blanco para poner a punto la técnica verificando los parámetros antes de cada análisis.

Para garantizar la calidad de los resultados, se añadió a las muestras una solución estándar multielemento de 400 µ/L con Sc, Ge, Ir y Rh. Además, se volvieron a analizar los materiales de referencia certificados (Material de referencia estándar agua natural SRM 1640a y ERM-BD151 leche desnatada en polvo del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología NIST, Estados Unidos) junto con un blanco y un estándar de calibración intermedio cada 12 muestras. Además, una de cada 12 muestras se volvió a analizar al final de cada sesión. Las concentraciones de leche se expresaron como µg/L. Los LODs fueron 0,10 µg/L para Pb, 0,05 µg/L para Hg, 0,04 µg/L para Cd y 0,40 µg/L para As, 2 µg/L para Al, 0.02 µg/L para Sb y 0.2 µg/L para Li.

4.2.5. Variables independientes

Una vez la donante había aceptado participar en el estudio, completó el cuestionario epidemiológico diseñado para el proyecto que recopilaba información sociodemográfica, reproductiva y sobre estilo de vida, incluyendo información sobre dieta y uso de productos de cuidado personal (PCPs).

A continuación, se describen las variables consideradas en las publicaciones que componen esta tesis doctoral, todas ellas obtenidas a partir de la información recogida por el BLH para la inscripción de la donante y del cuestionario epidemiológico realizado para el estudio de contaminantes ambientales en leche.

Características sociodemográficas

Edad materna en años (actualizada en el momento de cada donación).

Estudios: universitarios/no universitarios.

Ocupación: desempleada/trabajadora manual/trabajadora no manual.

Área de residencia: urbana/semiurbana/rural.

Vivienda cercana a área agrícola: sí/no.

Vivienda cercana a actividad industrial: sí/no.

Características antropométricas y reproductivas

Paridad: múltipara/primípara.

Cambio de peso respecto a antes del embarazo: ganancia/pérdida/sin cambio.

Índice de masa corporal (IMC) actual (kg/m²): bajo peso (<18,5 kg/m²)/normal (18,5-24,9 kg/m²)/sobrepeso/obesidad (mayor a 24,9 kg/m²).

Peso (g) y longitud (cm) al nacimiento del recién nacido.

Edad gestacional (semanas).

Tiempo total acumulado de lactancia, tanto exclusiva como mixta: ≤6/>6-12/ >12-24/≥24 meses.

Hábitos de vida

Hábito tabáquico: exfumadora/nunca fumadora.

Empastes dentales: sí/no.

Ingesta café: 1 taza al día/menos

Ingesta de alcohol: ≥ 1 bebida al mes/nunca.

Uso de medicamentos: ninguno / suplementos / ibuprofeno / hipertensión / heparina / conceptivos orales.

Hábitos dietéticos

Origen del agua utilizada para beber y cocinar: grifo/embotellada.

Frecuencia media de consumo (raciones al día o a la semana) referida a los 12 meses previos a la entrevista, de: pescados (grasos o magros), mariscos, carne (carne roja y embutidos), lácteos (yogur, leche, mantequilla, queso), legumbres,

huevos, pan, chocolate, cereales, arroz, pasta, fruta, verdura (cruda y cocinada), frituras, conservas.

Uso de PCPs y cosmética

Frecuencia media de uso referida a los 12 meses previos a la entrevista: protector solar, protector labial, gel corporal, tratamientos faciales (crema, leche, tónico), leche corporal, crema de manos, mascarilla capilar, tinte para el cabello, champú, laca/ mousse/gel capilar, productos de maquillaje (base, lápiz labial, delineador de ojos, sombra de ojos), laca de uñas, perfume, desodorante, pasta de dientes y enjuague bucal, así como si se realizó o no tratamientos de manicura y pedicura.

Características de la leche donada recogida

Año de recogida de la leche: 2015/2016/2017/2018.

Intervalo de tiempo entre la fecha de donación y la fecha del parto: ≤ 3 / $>3-6$ / $>6-9$ / ≥ 9 meses.

Características nutricionales de las muestras de leche: Contenido proteico (g/100 mL), lípidos (g/100 mL), lactosa (g/100 mL) y contenido calórico (kcal/100 mL).

4.2.6. Análisis estadístico

4.2.6.1. Artículo 2: Concentraciones de PFAS en leche y factores asociados

Se calculó la frecuencia de detección de cada PFAS en las 83 muestras de leche y los percentiles 50, 75 y 95 de sus concentraciones, incluida la concentración total de PFAS de cadena corta (\sum_{SC} PFAS), de cadena larga (\sum_{LC} PFAS), PFCAs (\sum_{PFCA}), PFSAs (\sum_{PFSA}), PFAS más abundantes en estudios de biomonitorización humana (\sum_{4} PFAS= PFOA + PFOS + PFNA + PFHxS) (EFSA, 2020), PFAS más abundantes incluyendo PFHpA (\sum_{5} PFAS= 4 PFAS + PFHpA) (Cousins et al., 2020) y la concentración total de los 11 PFAS analizados (\sum_{PFAS}). Las concentraciones totales se calcularon como la suma de las concentraciones molares de los compuestos en función del peso molecular y se expresaron como PFOA (\sum_{PFAS} , \sum_{4} PFAS, \sum_{5} PFAS, \sum_{LC} PFAS, \sum_{PFCA}), PFOS (\sum_{PFSA}) o PFHpA (\sum_{SC} PFAS). Para aquellos PFAS detectados en al menos 70% de las muestras, a las concentraciones por debajo del LOD se les asignó un valor de $LOD/\sqrt{2}$ y se trataron

como variables continuas, al igual que las sumas de los diferentes grupos de PFAS. Los PFAS detectados en menos del 70% de las muestras de leche se clasificaron como detectados o no detectados (variables binarias). Se utilizó la prueba de correlación de Spearman para evaluar las correlaciones entre las concentraciones de PFAS.

Para la identificación de factores determinantes de la exposición, se realizaron análisis de regresión multivariante con las concentraciones de PFAS en continuo (regresión lineal) o binarias (regresión logística). En los modelos de regresión lineal, las concentraciones de PFAS se transformaron en logaritmo natural para obtener distribuciones más próximas a la normalidad. Posteriormente, se utilizó un procedimiento paso a paso para introducir variables independientes en los modelos.

Todas las variables descritas en el punto 1.2.6 fueron examinadas como posibles variables explicativas. Las asociaciones se expresaron como coeficientes de regresión exponenciados ($\text{Exp}[\beta]$) y *odds ratio* (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Se calculó el R-cuadrado general de cada modelo para la determinación del porcentaje de variabilidad en la exposición explicado por las variables independientes.

Dado el pequeño tamaño muestral, se consideró un valor de $p=0,10$ como criterio para retener las variables explicativas en el modelo.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software R versión 4.0.4 (The R Project for Statistical Computing, [https:// www.r-project.org](https://www.r-project.org)).

4.2.6.2. Artículos 3 y 4: Concentraciones de metales no esenciales en leche y factores asociados

Para describir las concentraciones de metales en leche, tanto en las 242 muestras como la media por donante ($n=83$), se calcularon medias geométricas, medianas y percentiles 5, 25, 75 y 95. As, Hg, Al, Sb y Li fueron detectados en, al menos, 70% de las muestras y, por tanto, los valores por debajo del LOD fueron sustituidos por $\text{LOD}/\sqrt{2}$. Se empleó la prueba de Spearman para examinar las correlaciones entre las concentraciones de metales y la prueba de Kolmogorov Smirnov para evaluar su normalidad.

El análisis de posibles determinantes de las concentraciones de As, Hg, Al, Sb y Li en las 242 muestras de leche se realizó mediante modelos de regresión lineal de efectos

mixtos, previa transformación de las concentraciones de metales en logaritmo natural. Debido al alto porcentaje de valores no detectados de Pb y Cd (49,5% y 62,0%, respectivamente), se empleó regresión logística de efectos mixtos para evaluar factores asociados con la probabilidad de presentar concentraciones detectables de Pb o Cd. En los modelos mixtos, la variable de identificación de la donante se trató como variable aleatoria para tener en cuenta la correlación entre las medidas de las muestras repetidas de cada donante, mientras que las posibles variables explicativas se introdujeron como variables fijas. Al igual que para PFAS, las asociaciones se expresaron como coeficientes de regresión exponenciados ($\exp[\beta]$) y *odds ratio* (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Finalmente, se realizaron análisis de sensibilidad excluyendo los valores extremos de las concentraciones de As (n=7) y Hg (n=1), y los valores de Sb y Li que se encontraban por debajo del límite de detección. El valor de significación estadística establecido fue $p=0,05$. El análisis se realizó utilizando el paquete “nlme” del programa estadístico R, versión 4.1.0 (The R Project for Statistical Computing, [https:// www.r-project.org](https://www.r-project.org)).

5. RESULTADOS

5.1. Resultado objetivo 1. Desarrollar y validar un método para la determinación de PFAS en muestras de leche materna

HPLC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF PERFLUOROALKYL SUBSTANCES IN BREAST MILK BY COMBINING SALT-ASSISTED AND DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION

F. Vela-Soria, L. Serrano-López, J. García-Villanova, T. de Haro, N. Olea, C. Freire

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020; 412:7913–7923

Factor de Impacto: 4,478; 2º Cuartil

DOI: 10.1007/s00216-020-02924-x

RESUMEN

El uso generalizado de las sustancias perfluoroalquiladas ha dado lugar a la exposición universal de los seres humanos a estas sustancias químicas disruptoras del sistema endocrino, incluida la exposición de los neonatos a través de la lactancia materna. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método para determinar 10 sustancias perfluoroalquiladas en la leche materna (alícuota de 1 mL) combinando la extracción líquido-líquido asistida por sal con la microextracción líquido-líquido dispersiva y utilizando la cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas en tándem. Se aplicaron estrategias quimiométricas para optimizar los parámetros experimentales. El límite de cuantificación fue de 20 pg mL⁻¹ para todos los analitos, y la variabilidad interdiaria (evaluada como desviación estándar relativa) osciló entre el 8,2% y el 13,8%. El método se validó mediante un ensayo de recuperación con muestras enriquecidas. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre el 85,9% y el 110,8%. El método se aplicó satisfactoriamente para evaluar los compuestos diana en 20 muestras de leche materna de donantes. El ácido perfluorooctanoico, el sulfonato de perfluorooctano y el ácido perfluorohexanoico fueron los analitos más frecuentemente detectados. Este procedimiento analítico puede proporcionar información útil sobre la exposición de los recién nacidos a estos xenobióticos.

ABSTRACT

The widespread use of perfluoroalkyl substances has resulted in the universal exposure of humans to these endocrine disrupting chemicals, including the exposure of neonates through breastfeeding. The objective of this study was to develop a method to determine 10 perfluoroalkyl substances in breast milk (1 mL aliquot) by combining salt-assisted liquid-liquid extraction with dispersive liquid-liquid microextraction and using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chemometric strategies were applied to optimize experimental parameters. The limit of quantification was 20 pg mL⁻¹ for all analytes, and inter-day variability (evaluated as relative standard deviation) ranged from 8.2% to 13.8%. The method was validated by a recovery assay with spiked samples. Percentage recoveries ranged from 85.9% to 110.8%. The method was satisfactorily applied to assess target compounds in 20 breast milk samples from donors. Perfluorooctanoic acid, perfluorooctane sulfonate and perfluorohexanoic acid were the most frequently detected analytes. This analytical procedure can provide useful information on newborn's exposure to these xenobiotics.

Keywords: Perfluoroalkyl substances; Breast milk; Dispersive liquid liquid microextraction; HPLC–MS/MS.

Introduction

Per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) have been widely used since the mid-20th century [1] as ingredients and intermediates of surfactants and surface protectors for multiple industrial and consumer applications, e.g., firefighting foams and impregnation agents/surface coatings for furniture, textiles, paper products, and kitchenware, among others. Their chemical structure (fluorinated alkyl chain with hydrophilic functional group) endows PFAS with a striking capacity to lower surface tension and a high thermo stability, making them extremely persistent and bioaccumulative [2]. The widespread use of PFAS has led to their detection in the environment, biota, food items, and humans throughout the world [3-7]. Regulations have been passed by the European Union and United States Environmental Protection Agencies to minimize their presence [8-11], but their persistence and bioaccumulation result in continuous human exposure. This has been implicated in various health dysfunctions, including subfecundity in women [12], altered cholesterol levels [13,14], and hormonal alterations in men [15]. The two most common PFAS,

perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS), are considered endocrine disrupting chemicals (EDCs) [16-18,] and have been associated with kidney and testicular cancer [19], fetal growth anomalies [20,21], child behavior disorders [22] and thyroid function disruption [23], among other adverse effects.

The sources of exposure to PFAS are the diet, drinking water, and dust, with some variations among geographic regions and age groups. Various studies have reported their presence in air [24] and tap water [25], and they have been found in foods (e.g., fish, dairy products, meat, and eggs) and in food packaging materials [26-28]. PFAS, defined as persistent organic pollutants (POPs), are broken down slowly and biologically accumulate because of their difficult metabolism in humans [29], taking several years to be excreted [29]. The degree of bioaccumulation generally increases with perfluoroalkyl chain length, and the elimination kinetics is highly species-dependent. For instance, perfluorohexanoic acid (PFHxA) is able to be excreted in urine, whereas serum concentrations of PFOA and PFOS are much higher than urine concentrations [30,6].

The European Human Biomonitoring initiative HBM4EU (<https://www.hbm4eu.eu>) is seeking to improve the evidence on the exposure of Europeans to PFAS, among other priority chemicals, and their impact on health. The exposure of neonates to these environmental chemicals is of particular concern, given the potential effects on brain development by interference with normal thyroid metabolism [31]. PFAS can accumulate in breast milk [32], and PFOA and PFOS, among other perfluorinated compounds, have been detected in the breast milk of women in Asia [33-35], Europe [36-40], and the USA [41]. These findings suggest that breastfeeding may be a major PFAS exposure pathway for breastfed infants [32] and underline the need for further high-quality research to explore the extent and health impact of this exposure.

Biomonitoring studies and large-scale epidemiological research require reliable, inexpensive, fast, and simple analytical methods that are easy to apply. Given the inherent complexity of biological samples such as breast milk, their appropriate treatment is essential to accurately detect xenobiotics, which may be present in very low concentrations. In

recent years, the most widespread technique has been solid phase extraction (SPE), separating and quantifying PFAS by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [31]. Various SPE cartridges have been used for extraction and/or clean-up after the pre-treatment of samples, based on hydrolysis and protein precipitation with solvents or freeze-drying. These include hydrophile-lipophile balance (HLB) [42,43], silicon and weak anion exchange (WAX) [44,45], or STRATA polymeric reverse phase [39] sorbents, among others. These procedures offer low limits of detection (LODs) and accurate and reliable results; however, they require several conditioning, washing, and preconcentration steps and one or more SPE cartridges, limiting their usefulness for the analysis of a large number of samples.

An alternative to SPE procedures is offered by the combined use of salt-assisted liquid-liquid extraction (SALLE) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). Regarding SALLE, many chemicals species can be extracted from a highlighted variety of matrices, as it has been well reported over the last years [46-48]. DLLME has also achieved good results in complex samples

and has been widely used to evaluate the presence of numerous pollutants in environmental and biological compartments [49,50]. Their joint application combines the well-documented capacity of SALLE to extract chemicals with the high enrichment factors obtained with DLLME and has demonstrated excellent extraction efficacy for most non-hydrophilic compounds. DLLME also contributes a striking capacity for the clean-up of polar species, producing a lesser ionization suppression effect and therefore enhancing the sensitivity of detection by mass spectrometry [49]. Finally, extraction times are short with SALLE and particularly with DLLME, and there is no need for specific extraction devices or vacuum systems, allowing the daily assessment of a large number of samples and favoring application in routine analyses [49, 50]. However, the SALLE-DLLME combination has been scarcely used to determine EDCs in human biomonitoring programs and has not been exploited to analyze PFAS in human milk. The objective of the present study was to develop a method to determine 10 PFAS in breast milk using SALLE coupled to DLLME with HPLC-MS/MS. After validation of this procedure,

it was applied to 20 breast milk samples from anonymous donors.

Materials and methods

Chemicals and reagents

All reagents were analytical grade unless otherwise specified. Water (18.2 M Ω cm) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA). Eight perfluoroalkyl carboxylic acids with 6-13 carbon atoms in the alkyl chain (PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFTrA) and two perfluoroalkane sulfonates (PFHxS and PFOS) were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Mass-labeled internal standards (¹³C₅-PFHxA, ¹³C₄-PFOA, ¹³C₂-PFDA, ¹³C₂-PFDoA, ¹³C₄-PFOS) were supplied by Wellington Laboratories (Ontario, Canada). Stock standard solutions of compounds (200 mg L⁻¹) were prepared in acetonitrile and stored at 4 °C in the dark. Solutions were stable for at least four months. Working standards were prepared by mixing and diluting with acetonitrile. A set of solutions from 2 to 50 μ g L⁻¹ were prepared for calibration and validation purposes. Acetonitrile (HPLC-grade), hexane, and trichloromethane (TCM) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride,

magnesium sulfate, di-sodium hydrogen citrate 1,5 hydrate, trisodium citrate 2 hydrate, ammonium acetate, LC-MS grade acetonitrile, and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Instruments and software

Sample collection and storage

Human mature milk samples were collected from 20 donors to the Human Milk Biobank of Granada (Granada University Hospital Complex, Spain). All women signed their informed consent, and the study was approved by the Research Ethics Committee of the hospital. Samples were coded and stored at -86 °C until their analysis.

Preparation of positive control (spiked) samples

The method was optimized and validated using a pool of five breast milk samples. Pooled samples were spiked at 250 pg mL⁻¹ for optimization purposes and at concentrations ranging from 20 to 500 pg mL⁻¹ for validation purposes (calibration curves and recovery assay). Spiking was carried out by adding 10 µL of the corresponding solution (see section “chemical and reagents”) to 1 mL aliquots

of the pooled sample. In the case of mass-labelled internal standards, samples were spiked at 250 pg mL⁻¹ with 25 µL of a solution containing ¹³C₅-PFHxA, ¹³C₄-PFOA, ¹³C₂-PFDA, ¹³C₂-PFDoA, and ¹³C₄-PFOS at 10 µg L⁻¹.

Sample treatment

After placing 1 mL of milk sample in a polypropylene centrifuge tube, 1 mL milliQ water and 5.0 mL of acetonitrile were added and a short agitation (vortex) of 30 s was applied. The subsequent SALLE process was performed by addition of a salt mixture constituted as follows: 600 mg NaCl, 200 mg di-sodium hydrogen citrate and 200 mg tri-sodium citrate. A manual agitation for 60 s and centrifugation at 4000 rpm for 10 min resulted in a supernatant which was transferred to a glass 7 mL vial, concentrated to 1 mL under nitrogen stream and poured into a 15 mL screw-cap glass test tube. 10 mL 10 % NaCl aqueous solution (w/v) at PH of 2 were then added, thereby preparing the sample for the DLLME process. Next, 1500 µL of TCM were rapidly injected by syringe, and the mixture was gently shaken for 40 s and then centrifuged for 5 min at 4000 rpm. The entire sedimented phase volume was transferred to a clean glass vial, the

organic phase was evaporated under a nitrogen stream., and the residue was dissolved with 100 μ L of a mixture of 5 mM ammonium acetate (pH 4.5) and acetonitrile 30:70 (v/v) and then vortexed for 30 s, thereby preparing the sample for injection into the HPLC-MS/MS system.

Chromatography and mass spectrometry conditions

HPLC-MS/MS analysis was performed with a NexeraXR LC-20A liquid chromatography instrument (Shimadzu, Japan) and 4500 QTRAP MS/MS4500 mass spectrometer (AB Sciex, USA).

A Gemini C18 column (100 mm \times 2 mm i.d., 3 μ m particle) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) was used as stationary phase device. The injection volume was 10 μ L, and the column temperature was maintained at 25 $^{\circ}$ C. PFAS were separated using a gradient mobile phase consisting of 5 mM ammonium acetate aqueous solution with pH of 4.5 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). Gradient conditions were as follows: 0.0–1.0 min, 30 % B; 1.0–5.0 min, 30–60 % B; 6.0–8.0 min, 70 % B; 8.0–8.50, 70–90 % B; 8.50–9.50, 90 % B and back to 30 % in 0.1 min. Flow rate was 0.35 mL min⁻¹. Total run time was 12.0 min.

Compounds were determined in negative ion mode. The tandem mass spectrometer was operated in selected reaction monitoring (SRM) mode, and Q1 and Q3 quadrupoles were set at unit mass resolution. Mass spectrometry conditions were optimized for each compound by continuously infusing standard solutions (50 μ g L⁻¹). The ion source temperature was maintained at 400 $^{\circ}$ C, and capillary voltage was set at -4.5 kV. Nitrogen was used as curtain gas at 35 psi and as ion source gas 1 and 2 at 40 and 40 psi, respectively. Every spectrometric potential was also optimized for each compound. Dwell time was set at 50 ms. The selected values for each compound and the mass transitions are listed in Table 1.

Quality control

Background contamination was controlled by analyzing procedural blanks (obtained from 1 mL aliquots of milliQ water treated as real samples). No detectable concentrations of target PFAS were recorded. In addition, a pool of blank samples spiked at 250 pg mL⁻¹ and 500 pg mL⁻¹ was processed in triplicate every 15 real samples aliquots.

Software and statistical analysis

Statgraphics Centurion XVI16.0.07 (Manugistics Inc., Rockville, MD) was used for statistical analyses, from performing multivariate experimental design to method validation and sample analysis.

Results and Discussion

Optimization of SALLE conditions and DLLME conditions

Regarding SALLE, the volume of acetonitrile (saturated with hexane) and the shaking time were optimized by conducting univariate experiments. First, 1 mL aliquots of milk spiked with 250 pg mL⁻¹ of target PFAS were treated with 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, or 6.0 mL of the solvent, obtaining an extraction efficiency close to 100% with a volume of 5.0 mL (see Figure S1). Next, shaking times of 30, 45, 60, 75 and 90 s were assayed using 5.0 mL as optimal acetonitrile volume, and an extraction efficiency of > 90 % was obtained with a shaking time of 60 s and did not increase with a time of 90 s. Therefore, 60 s was selected as the optimal shaking time (see Figure S2).

In a second set of experiments, the effect on the extraction efficiency of masses of NaCl, MgSO₄, di-sodium hydrogen citrate and tri-sodium citrate

were studied by a two-level 2⁴ factorial experimental design with six replicates of the central point, processing aliquots of 1 mL of human milk spiked with 250 pg mL⁻¹ according to the selected experimental conditions (Table S1). This procedure was conducted twice. The standardized effects of each factor for three representative target analytes are illustrated in Figure 1, showing that none of those experimental variables significantly influenced the results. However, minimal values of the experimental domain for NaCl, di-sodium and tri-sodium citrate salts produced a poorly defined interface after centrifugation and a semi-cloudy acetonitrile extract. Hence, 600 mg NaCl, and 200 mg each of MgSO₄, di-sodium citrate, and tri-sodium citrate were adopted as suitable values.

After establishing that extraction efficiencies were close to 100% for SALLE under the optimized conditions, experiments were performed to maximize the absolute instrumental responses for each PFA compound and examine the influence of DLLME conditions on the chromatographic peak area. In this way, the effects of TCM volume, pH and percentage NaCl of the aqueous solution, and extraction time were studied by a two-

level 2⁴ factorial experimental design, with six replicates of the central point. The experimental range and domain of this design are shown in Table S2. Given that the P-values of lack-of-fit tests were >0.05 for the selected PFAS, this linear model was used not only for diagnostic purposes but also for optimization. As shown in Figure 2, the percentage NaCl always demonstrated a significant positive influence. However, inconsistent results were obtained for the effects of TCM volume, pH and extraction time, and their optimal values were obtained using a desirability function approach. This chemometric procedure is used to yield optimal compromise values of experimental factors for multiple simultaneous responses, with a desirability value of 1 indicating an ideal solution in which all individual responses are optimized. In the present study, a maximum desirability value of 0.77 was obtained with 1500 µL TCM, pH 2, 10 % NaCl, and 40 s extraction time. Figure 3 displays the estimated response surface of desirability for TCM volume and percentage NaCl.

Analytical performance and method validation

The linearity, sensitivity, accuracy (trueness and precision), and selectivity of the proposed method was tested according to US Food and Drugs Administration (FDA) guidelines for bioanalytical method validation [51], as well as the criteria specified in EU Commission Decision 2002/675/EC [52].

A calibration curve was built for each analyte, with ten concentration levels (four replicates) ranging from 20 to 500 pg mL⁻¹. The curves were constructed by plotting the analyte/mass-labelled surrogate peak area ratio against the concentration of analyte. Calibration graphs were made using the selected reaction monitoring (SRM) mode. Mass-labelled surrogates were added at a concentration of 250 pg mL⁻¹. Figure 4 depicts SRM chromatograms for a spiked sample (250 pg mL⁻¹).

The matrix effect (ME) was evaluated by comparing the slopes of two calibration curves for each compound, one in milliQ water (W) and the other in breast milk (M), calculating the percentage ME as follows:

$$\text{ME (\%)} = [1 - (\text{calibration slope in M/calibration slope in W})] \times 100$$

Negligible ME values were obtained for all PFAs, ranging from -3.2 to 3.5 %.

A recovery assay with a milk samples pool spiked at four levels (20, 100, 250, or 500pg mL⁻¹) was performed on three consecutive days in order to evaluate the trueness and precision of the proposed procedure. As reported in Table 2, relative standard deviation (RSD) values never exceeded 15 %, and recovery values for all analytes were within 15 % of the spiked concentration, indicating the accuracy of the method.

The limit of quantification (LOQ) was determined as the lowest concentration at which trueness and precision were within $\pm 20\%$. The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration at which signals were three times greater than background noise. In the proposed method, the LOQ was 20 pg mL⁻¹ and the LOD was 6 pg mL⁻¹ for all analytes (Table 3).

Concentrations from the LOQ to 500 pg mL⁻¹ were established as the linear dynamic range (LDR) (Table 3). The determination coefficient (R^2) values obtained ranged from 99.2 % to 99.7 %; p-values of the lack-of-fit test (% P_{lof}) were $> 5\%$ in all cases, indicating good linearity within the stated ranges.

The selectivity of the method was examined by analyzing chromatograms of the procedure blank and corresponding pooled blank sample. No interferences from endogenous substances were observed at the retention times of the analytes under study.

Method application and comparison with previous methods

The method was used to determine the target PFAS in 20 breast milk samples. Table 4 summarizes the concentrations obtained, expressed as the mean of three determinations. Seven of the studied PFAS were detected in at least one of the samples.

PFOA and PFOS were detected in all samples at median concentrations of 30 and 45 pg mL⁻¹, respectively, and PFHxA was detected in 15 of the 20 samples at a median concentration of 22 pg mL⁻¹. PFHxS was detected in 8 of the samples, while no detectable levels of PFHpA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, and PFTrA were mostly reported. A much higher prevalence of PFOA and PFOS in comparison to other PFAS has previously been reported [33-41]. Studies in Korea [33-35], France [36,37], Spain [38,39], Norway [40], and USA [41] reported median concentrations

of PFOA and PFOS in breast milk ranging from 32 to 72 pg mL⁻¹ and 47 to 137 pg mL⁻¹, respectively. Reports on the prevalence of other congeners have varied among regions and populations. Thus, PFHxA, PFHpA, PFNA, PFDA, PFUnA, and PFDoA were practically undetected in French and Spanish studies [36-40], whereas some of these compounds were found in > 70% of Asian populations [33-35]. Some studies point out estimated daily intake values higher than 120 ng [kg body weight]⁻¹day⁻¹ in the first 30 days of life, decreasing to 70 ng [kg body weight]⁻¹day⁻¹ at 1 year of age [39].

Measures are therefore required to reduce exposure to these contaminants, especially in relation to mothers and infants. The European Food Safety Authority [52] recently proposed a reduction in the tolerable weekly intake (TWI) to 13 ng [kg body weight]⁻¹ week⁻¹ for PFOS and to 6 ng [kg body weight]⁻¹ week⁻¹ for PFOA. These intakes are exceeded by a large part of the population, as shown above.

Table 5 summarizes the main characteristics of previous methods used and of the proposed SALLE-DLLME technique, which requires a shorter extraction time and usually a lesser solvent

consumption in comparison to the former procedures. Although it is not possible to estimate the overall time needed for SPE-based procedures [37, 39, 43-45], these involve several conditioning, drying, washing and eluting steps, suggesting long extraction times (except for automated SPE procedures on-line with LC-MS/MS [42]). The proposed method does not require pre-treatment, the volume of sample required is lower than or the same as in existing methods, with no differences in LODs. These practical benefits may facilitate the implementation of large-scale biomonitoring studies. A technique published by Beser et al. [53], which combines QuEChERS with LC-MS/MS and uses high-resolution mass spectrometry, also offers adequate LODs and short extraction times, but it requires more amount of sample in comparison to the proposed method.

Conclusions

Ten PFAS were successfully determined in human milk samples from 20 donors using SALLE-DLLME with HPLC-MS/MS. Experimental parameters were optimized by chemometric strategies, and the procedure was validated. The operational advantages of this method

make it highly appropriate for biomonitoring studies to improve evidence on the exposure of babies to these widespread EDCs from breast milk.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge editorial assistance provided by Richard Davies.

Funding information

This study was supported in part by research grants from the European Union Commission (H2020-EJP-HBM4EU), Biomedical Research Networking Center-CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (FIS-PI16/01820 and FIS-PI16/01858). The authors are also grateful to the ISCIII and the “Fondo Europeo de Desarrollo Regional” (ISCIII/FEDER) for the Sara Borrell postdoctoral research contract granted to F. Vela-Soria (grant no. CD17/00212) and the Miguel Servet Type I Program granted to C. Freire (grant no. CP16/00085). The funders had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol.* 2005;40:32–4.
- [2] OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Risk reduction approaches for PFASs – a cross country analysis. Series on Risk Management. Environment Directorate. 2015;29 Accessible from: https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-management/Risk_Reduction_Approaches%20for%20PFASS.pdf. Accessed 9 May 2020.
- [3] Yeung LW, Robinson SJ, Koschorreck J, Mabury SA. PartII. A temporal study of PFOS and its precursors in human plasma from two german cities in 1982-2009. *Environ Sci Technol.* 2013;47:3875-82.
- [4] Toms LM, Thompson J, Rotander A, Hobson P, Calafat AM, Kato K, Ye X, Broomhall S, Harden F, Mueller JF.

- Decline in perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate serum concentrations in an Australian population from 2002 to 2011. *Environ Int.* 2014;71:74-80.
- [5] Okada E, Kashino I, Matsuura H, Sasaki S, Miyashita C, Yamamoto J, Ikeno T, Ito YM, Matsumura T, Tamakoshi A, Kishi R. Temporal trends of perfluoroalkyl acids in plasma samples of pregnant women in Hokkaido, Japan, 2003-2011. *Environ Int.* 2013;60:89-96.
- [6] Zhang T, Sun H, Qin X, Gan Z, Kannan K. PFOS and PFOA in paired urine and blood from general adults and pregnant women: assessment of urinary elimination. *Environ Sci Pollut Res.* 2015;22:5572-9.
- [7] Preston EV, Webster TF, Oken E, Claus Henn B, McClean MD, Rifas-Shiman SL, Pearce EN, Braverman LE, Calafat AM, Ye X, Sagiv SK. Maternal Plasma per- and Polyfluoroalkyl Substance Concentrations in Early Pregnancy and Maternal and Neonatal Thyroid Function in a Prospective Birth Cohort: Project Viva (USA). *Environ Health Perspect.* 2018;126(2):027013.
- [8] Stockholm Convention, United Nations Environment Program's Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2009. Accessible from: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>. Accessed 9 May 2020.
- [9] US EPA, United States Environmental Protection Agency, 2010/2015 PFOA Stewardship Program, 2006. Accessible from: <https://www.epa.gov/assessingand-managing-chemicals-under-tsca/20102015-pfoa-stewardship-program>. Accessed 10 May 2020.
- [10] Commission Regulation (EU) 2017/1000 of 13 June 2017 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related substances (Text with EEA relevance.). Accessible from: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/d14f70da-508b-11e7-a5ca->

- [01aa75ed71a1/language-en](https://www.epa.gov/pfas/epa-actions-address-pfas).
Accessed 15 May 2020.
- [11] US EPA, EPA Actions to Address PFAS, Accessible from <https://www.epa.gov/pfas/epa-actions-address-pfas>. Accessed 15 May 2020.
- [12] Fei CY, McLaughlin JK, Lipworth L, Olsen J. Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod.* 2009;24:1200–5.
- [13] Frisbee SJ, Shankar A, Knox SS, Steenland K, Savitz DA, Fletcher T, Ducatman AM. Perfluorooctanoic acid, perfluorooctanesulfonate, and serum lipids in children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009;164(9):860–9.
- [14] Nelson JW, Hatch EE, Webster TF. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and cholesterol, body weight, and insulin resistance in the general US population. *Environ Health Perspect.* 2010;118(2):197–202.
- [15] Joensen UN, Veyrand B, Antignac JP, Jensen MB, Petersen JH, Marchand P, Skakkebaek NE, Andersson AM, Le Bizec B, Jorgensen N. PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men. *Hum Reprod.* 2013;28(3):599–608.
- [16] Jensen AA, Leffers H. Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances. *Int J Androl.* 2008;31(2):161–9.
- [17] White SS, Fenton SE, Hines EP. Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(1–2):16–26.
- [18] World Health Organization (WHO). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012. Switzerland, 2013.
- [19] Barry V, Winquist A, Steenland K. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposures and incident cancers among adults living near a chemical plant. *Environ Health Perspect.* 2013;121(11-12):1313-8.
- [20] Johnson PI, Sutton P, Atchley DS, Koustas E, Lam J, Sen S, Robinson KA, Axelrad DA, Woodruff TJ. The Navigation Guide - evidence-based medicine meets environmental health: systematic review of human evidence for PFOA effects on fetal

- growth. *Environ health Perspect.* 2014; 122:1028-39.
- [21] Kim S, Choi K, Ji K, Seo J, Kho Y, Park J, Park S, Hwang I, Jeon J, Yang H, Giesy JP. Trans-placental transfer of thirteen perfluorinated compounds and relations with fetal thyroid hormones. *Environ Sci Technol.* 2011;45:7465–72.
- [22] Stein CR, Savitz DA. Serum perfluorinated compound concentration and attention deficit/hyperactivity disorder in children 5-18 years of age. *Environ Health Perspect.* 2011;119:1466-71.
- [23] Bloom MS, Kannan K, Spliethoff HM, Tao L, Aldous KM, Vena JE. Exploratory assessment of perfluorinated compounds and human thyroid function. *Physiol Behav.* 2010;99:240-5.
- [24] Freberg BI, Haug LS, Olsen R, Daae HL, Hersson M, Thomsen C, Thorud S, Becher G, Molander P, Ellingsen DG. Occupational exposure to airborne perfluorinated compounds during professional ski waxing. *Environ Sci Technol.* 2010;44:7723–8.
- [25] Takagi S, Adachi F, Miyano K, Koizumi Y, Tanaka H, Mimura M, Watanabe I, Tanabe S, Kannan K. Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in raw and treated tap water from Osaka, Japan. *Chemosphere.* 2008;72:1409–12.
- [26] Vestergren R, Orata F, Berger U, Cousins IT. Bioaccumulation of perfluoroalkyl acids in dairy cows in a naturally contaminated environment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013;20:7959–69.
- [27] Falandysz J, Taniyasu S, Gulkowska A, Yamashita N, Schulte-Oehlmann U. Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic coast? *Environ Sci Technol.* 2006;40:748–51.
- [28] Tittlemier SA, Pepper K, Seymour C, Moisey J, Bronson R, Cao XL, Dabeka RW. Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *J Agri Food Chem.* 2007;55:3203–10.
- [29] Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. Half-life of serum elimination of perfluorooctane

- sulfonate, perfluoro hexanesulfonate and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect.* 2007;115(9):1298-305.
- [30] Kim DH, Lee MY, Oh JE. Perfluorinated compounds in serum and urine samples from children aged 5-13 years in South Korea. *Environ Pollut.* 2014;192:171-8.
- [31] Chemtrust. No Brainer- The impact of chemicals on children's brain development: a cause for concern and a need for action. Report. Chemtrust 2017. Accesible from: <http://www.chemtrust.org/wp-content/uploads/chemtrust-nobrainer-mar17.pdf>. Accessed 15 May 2020.
- [32] Macheka-Tendenguwo LR, Olowoyo JO, Mugivhisa LL, Abafe OA. Per- and polyfluoroalkyl substances in human breast milk and current analytical methods. *Environ Sci Pollut R.* 2018;25:36064–86.
- [33] Lee S, Kim S, Park J, Kimd HJ, Choi G, Choi S, Kim S, Kimh SY, Kim S, Choi K, Moon HY. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in breast milk from Korea: Time-course trends, influencing factors, and infant exposure. *Sci Total Environ.* 2018;612:286–92.
- [34] Kang H, Choi K, Lee HS, Kim DH, Park NY, Kim S, Kho Y. Elevated levels of short carbon-chain PFCAs in breast milk among Korean women: Current status and potential challenges. *Environ Res.* 2016;148:351–9.
- [35] Kim SK, Lee KT, Kang CS, Tao L, Kannan K, Kim KR, Kim CK, Lee JS, Park PS, Yoo YW, Ha JY, Shin YS, Lee JH. Distribution of perfluorochemicals between sera and milk from the same mothers and implications for prenatal and postnatal exposures. *Environ Pollut.* 2011;159:169-74.
- [36] Cariou R, Veyrand B, Yamada A, Berrebi A, Zalkod D, Durand S, Pollono C, Marchand P, Leblanc JC, Antignac JP, Le Bizec B. Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. *Environ Int.* 2015;84:71–81.
- [37] Antignac JP, Veyrand B, Kadar H, Marchand P, Oleko A, Le Bizec B, Vandentorren S. Occurrence of perfluorinated alkylated substances in breast milk of French women and

- relation with socio-demographical and clinical parameters: Results of the ELFE pilot study. *Chemosphere*. 2013;91:802–8.
- [38] Motas-Guzmán M, Clementini C, Pérez-Cárceles MD, Jiménez Rejón S, Cascone A, Martellini T, Guerranti C, Cincinelli A. Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake. *Sci Total Environ*. 2016;544:595–600.
- [39] Lorenzo M, Farré M, Blasco C, Onghena M, Picó Y, Barceló D. Perfluoroalkyl substances in breast milk, infant formula and baby food from Valencian Community (Spain). *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage*. 2016;6:108–15.
- [40] Forns J, Iszatt N, White RA, Mandal S, Sabaredzovic A, Lamoree M, Thomsen C, Haug LS, Stigum H, Eggesbø M. Perfluoroalkyl substances measured in breast milk and child neuropsychological development in a Norwegian birth cohort study. *Environ Int*. 2015;83:176–82.
- [41] Tao L, Ma J, Kunisue T, Libelo EL, Tanabe S, Kannan K. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ. Sci. Technol*. 2008;42 (22):8597–602.
- [42] Kuklennyik Z, Reich JA, Tully JS, Needham LL, Calafat AM. Automated solid – phase extraction and measurement of perfluorinated organic acids and amides in human serum and milk. *Environ Sci Technol*. 2004;38:3698–704.
- [43] So MK, Yamashita N, Taniyasu S, Jiang Q, Giesy JP, Chen K. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Tech*. 2006;40:2924–9.
- [44] Liu J, Li J, Zhao Y, Wang Y, Zhang Y, Lei Z, Wu Y. The occurrence of perfluorinated alkyl compounds in human milk from different regions of China. *Environ Int*. 2010;36:433–8.
- [45] Liu J, Li J, Liu Y, Chan HM, Zhao Y, Cai Z, Wu Y. Comparison on gestation and lactation exposure of perfluorinated compounds for newborns. *Environ Int*. 2011;37:1206–12.
- [46] González-Curbelo MA, Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV,

- González-Sálamo J, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC-Trend Anal. Chem.* 2015;71:169–85.
- [47] Martínez-Domínguez G, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, Garrido-Frenich A. Analytical approaches for the determination of pesticide residues in nutraceutical products and related matrices by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. *Talanta.* 2014;118:277–91.
- [48] Schmidt ML, Snow NH. Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs. *TrAC-Trend Anal. Chem.* 2016;75:49–56.
- [49] Sajid M, Alhooshani K. Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review. *TrAC-Trend Anal. Chem.* 2018;108:167-82.
- [50] Yang H, Wuang H. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A.* 2013;1295:1–15.
- [51] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.
- [52] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food, *EFSA Journal* 2018; 16(12):5194.
- [53] Beser MI, Pardo O, Beltrán J, Yusà V. Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2019;1049:123-32.

Table 1. Selected transitions and optimized potentials.

Compound	Transitions	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
PFH _x A	313.0→269.0 ^a	-43	-8	-12	-10
	313.0→119.0 ^b	-43	-8	-27	-9
¹³ C ₅ -PFH _x A	318.0→272.9 ^a	-32	-10	-12	-11
	318.0→121.0 ^b	-32	-10	-30	-10
PFHpA	363.0→319.1 ^a	-40	-8	-12	-9
	363.0→169.0 ^b	-40	-8	-25	-11
PFOA	413.0→369.0 ^a	-40	-9	-13	-10
	413.0→219.2 ^b	-40	-9	-24	-10
¹³ C ₄ -PFOA	417.1→371.8 ^a	-44	-10	-12	-9
	417.1→222.1 ^b	-44	-10	-27	-10
PFNA	463.0→419.0 ^a	-40	-10	-13	-10
	463.0→219.2 ^b	-40	-10	-35	-9
PFDA	513.1→469.0 ^a	-51	-9	-13	-10
	513.1→269.2 ^b	-51	-9	-32	-9
¹³ C ₂ -PFDA	515.0→470.1 ^a	-46	-9	-15	-9
	515.0→220.2 ^b	-46	-9	-33	-8
PFUnA	563.0→519.0 ^a	-60	-9	-15	-10
	563.0→269.2 ^b	-60	-9	-31	-10
PFDoA	613.0→569.0 ^a	-62	-10	-15	-8
	613.0→319.1 ^b	-62	-10	-36	-9
PFTrA	662.9→619.0 ^a	-52	-11	-17	-9
	662.9→369.1 ^b	-52	-11	-40	-8
¹³ C ₂ -PFDoA	615.0→570.0 ^a	-54	-9	-14	-11
	615.0→320.2 ^b	-54	-9	-32	-10
PFH _x S	399.1→79.9 ^a	-52	-11	-68	-13
	399.1→98.8 ^b	-52	-11	-54	-10
PFOS	499.0→80.1 ^a	-80	-10	-97	-9
	499.0→98.9 ^b	-80	-10	-80	-11
¹³ C ₄ -PFOS	502.9→80.1 ^a	-81	-10	-97	-11
	502.9→99.1 ^b	-81	-10	-75	-10

^a SRM transition used for quantification; ^b SRM transition used for confirmation; DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential

Table 2. Recovery assay, precision and trueness of the method.

	Spiked (pg mL ⁻¹)	Found ^a (pg mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)		Spiked (pg mL ⁻¹)	Found ^a (pg mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)
PFHxA	20	19	94.5	11.0	PFUnA	20	17	86.8	9.2
	100	102	102.5	11.7		100	103	103.4	8.3
	250	265	106.1	10.7		250	260	104.2	10.8
	500	540	108.1	13.8		500	546	109.2	10.2
PFHpA	20	20	95.5	9.4	PFDoA	20	19	96.5	12.2
	100	97	97.0	8.9		100	100	100.2	11.1
	250	243	97.1	12.4		250	264	105.7	8.8
	500	508	101.7	13.7		500	518	103.7	13.2
PFOA	20	18	88.5	11.0	PFTrA	20	18	91.8	8.4
	100	88	88.5	9.1		100	103	103.2	9.1
	250	224	89.6	10.1		250	256	100.1	11.7
	500	516	103.2	9.6		500	523	104.7	9.7
PFNA	20	20	100.9	12.9	PFHxS	20	22	108.9	8.2
	100	110	110.4	13.2		100	112	112.3	13.9
	250	269	107.7	12.9		250	274	109.7	11.7
	500	554	110.8	13.1		500	533	106.7	8.4
PFDA	20	20	102.1	12.4	PFOS	20	17	85.9	13.3
	100	113	113.5	8.3		100	94	93.7	9.9
	250	282	112.9	13.1		250	244	97.7	13.5
	500	550	110.0	11.5		500	494	98.9	11.1

^a Mean of 18 determinations

Table 3. Analytical and statistical parameters.

	b (mL pg ⁻¹)	s _b (mL pg ⁻¹)	R ² (%)	LOD (pg mL ⁻¹)	LOQ (pg mL ⁻¹)	LDR (pg mL ⁻¹)
PFHxA	4.28	0.13	99.4	6	20	20-500
PFHpA	4.92	0.15	99.1	6	20	20-500
PFOA	5.85	0.10	99.2	6	20	20-500
PFNA	2.08	0.03	99.6	6	20	20-500
PFDA	3.31	0.05	99.3	6	20	20-500
PFUnA	14.7	0.17	99.7	6	20	20-500
PFDoA	4.76	0.14	99.2	6	20	20-500
PDTrA	2.46	0.04	99.5	6	20	20-500
PFHxS	3.97	0.07	99.2	6	20	20-500
PFOS	4.25	0.07	99.3	6	20	20-500

b, slope; s_b, slope standard deviation; R², determination coefficient; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; LDR, linear dynamic range

Table 4. Application of the proposed method to breast milk samples.

Sample	Found concentration, pg mL ⁻¹ (RSD %) ^a									
	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFTTrA	PFHxS	PFOS
M01	40 (7.2)	ND	D	ND	ND	ND	D	D	D	30 (6.7)
M02	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M03	ND	ND	30 (8.5)	ND	ND	ND	ND	ND	D	46 (11.2)
M04	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21 (13.4)
M05	D	ND	33 (7.5)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M06	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M07	ND	ND	32 (11.1)	ND	ND	ND	ND	ND	D	48 (7.1)
M08	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
M09	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
M10	22 (11.4)	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M11	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M12	ND	ND	24 (7.9)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28 (11.3)
M13	D	ND	30 (9.1)	ND	ND	ND	ND	ND	D	52 (7.9)
M14	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M15	D	ND	26 (12.5)	ND	ND	ND	ND	ND	D	45 (8.3)
M16	D	ND	28 (8.9)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M17	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
M18	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M19	D	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
M20	26 (11.8)	ND	D	ND	ND	ND	D	ND	ND	D
Det. (n, (%))^b	15 (75)	1 (5)	20 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10)	1 (5)	8 (40)	20 (100)
Median	22	---	30	---	---	---	---	---	---	45
Range^c	ND-40	---	D-33	---	---	---	---	---	---	D-48

^a Mean of 3 determinations; RSD: relative standard deviation; ^b Detected; ^c Concentration range

ND, not detected (<LOD); D, detected (>LOD and <LOQ)

Table 5. Comparison of this SALLE-DLLME procedure with previous methods for determining PFAS in breast milk samples.

PFAS substances	Sample pre-treatment	Treatment techniques ^a	Sample volume (mL)	Extraction-cleanup global time / solvent consumption	Instrumental technique ^b	LOD ^c (pg mL ⁻¹)	Ref.
PFHxA, PFOA, PFNA, PFDeA, PFUnA, PFDoA, PFHxS, PFOS, others	Formic acid added, vortex mixed and sonicated	Automated SPE	1	2.5 min / 6 mL	LC-MS/MS	100-900	42
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA	Formic acid added, vortex mixed and sonicated	SPE (HLB)	2	--- / 21 mL	LC-MS/MS	10-50	43
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, others	Formic acid added, vortex mixed and sonicated	SPE (WAX)	2	--- / 8 mL	LC-MS/MS	1-15	44-45
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, others	Alkaline digestion, 3 h	SPE (STRATA)	15	--- / 20 mL	LC-MS/MS	0.5-2	39
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFTrA, others	Dilution with ammonium-carbonate buffers	Ion pairing-LLE	2	90 min (3 cycles of 30 min) / 15 mL	LC-MS/MS	3-15	33
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFTrA, others	Enzymatic digestion with protease and lipase, 16 h. Treatment with H ₂ SO ₄ , 2 h.	Ion pairing-LLE	1	30 min / 4 mL	LC-MS/MS	7-57	34
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFTrA, others	---	LLE followed by SPE (HLB-ENVICARB)	3	--- / 30 mL	LC-MS/MS	50-75	37
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, others	---	QuEChERS	10	3 min / 10 mL	LC-MS/MS	1-56	53
PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFTrA	---	SALLE-DLLME	1	1.7 min / 6.5 mL	LC-MS/MS	6	This study

^a LLE: liquid liquid extraction; SPE: solid phase extraction. ^b LC: liquid chromatography; MS: mass spectrometry; ^c LOD: limit of detection.

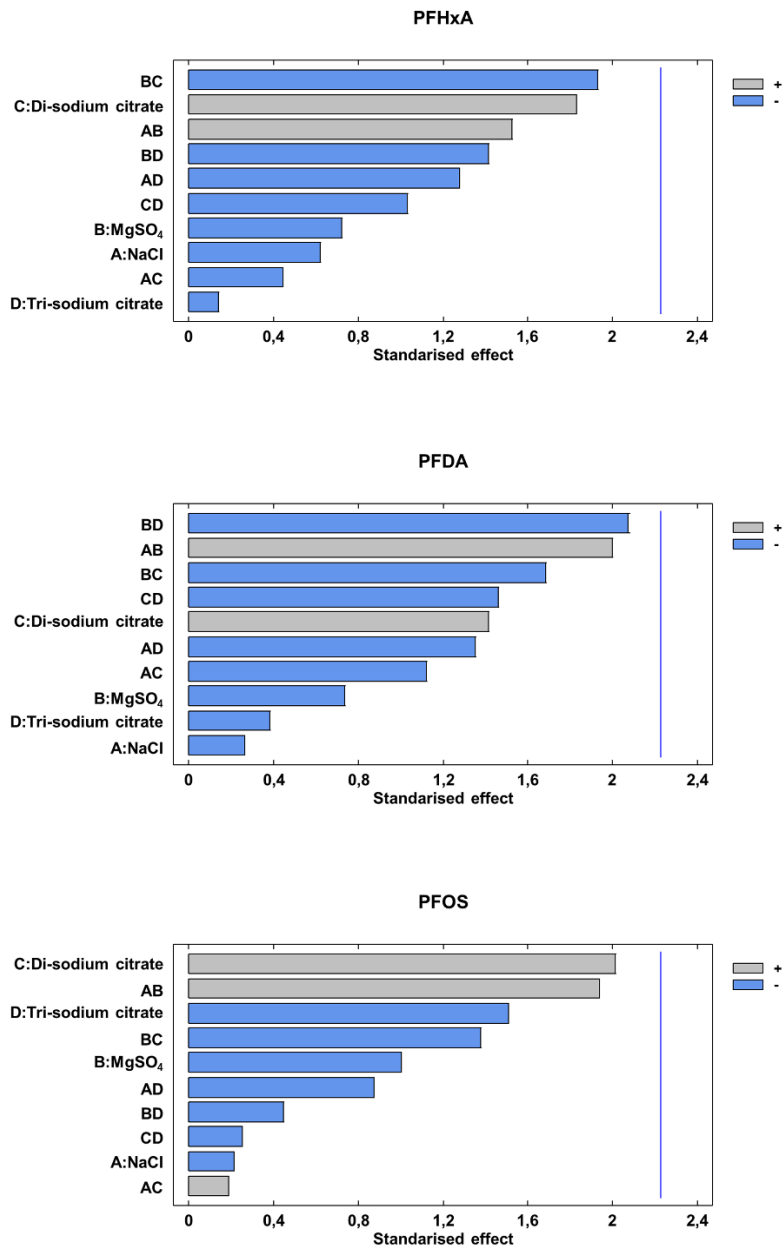


Figure 1

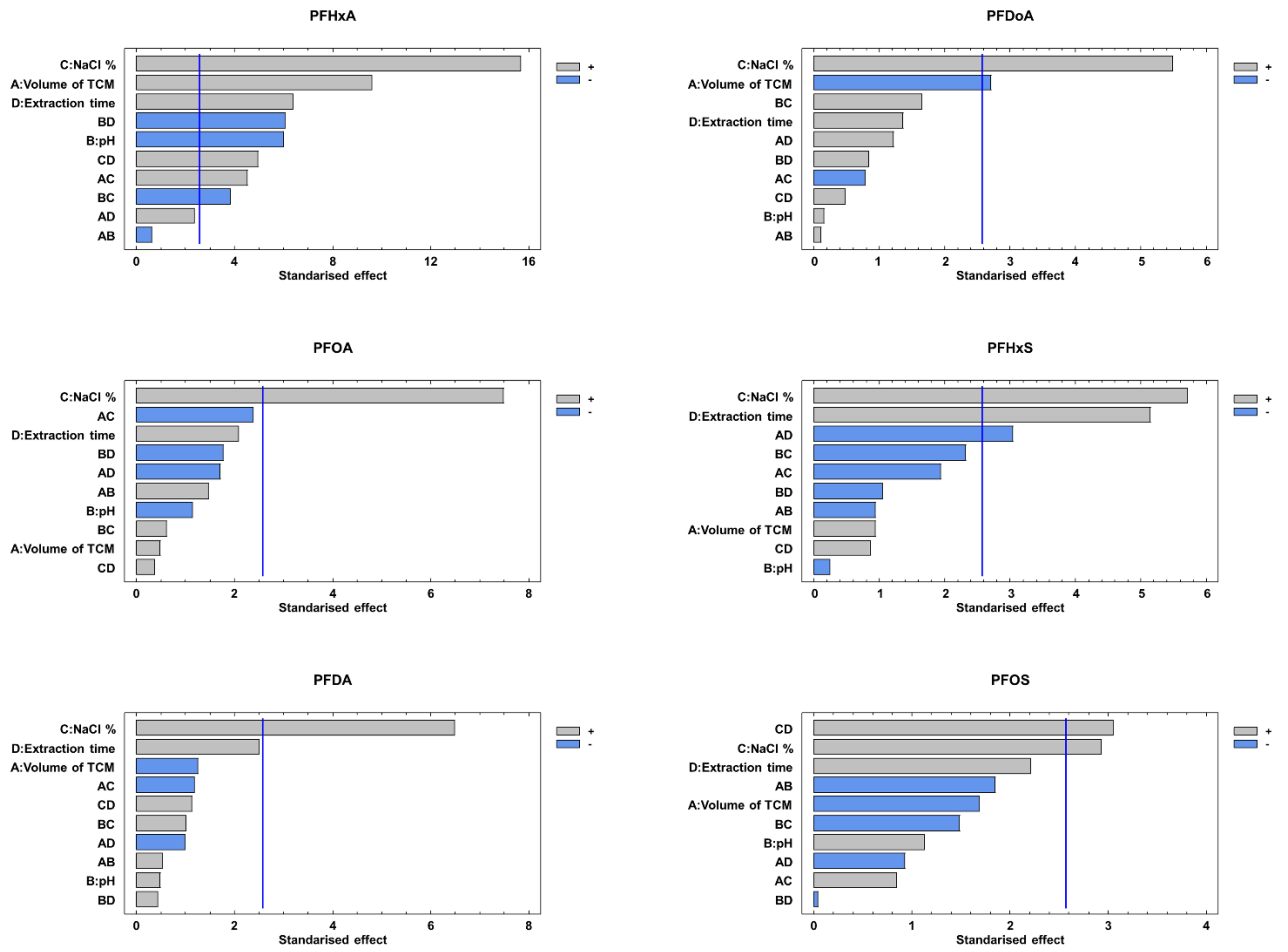


Figure 2

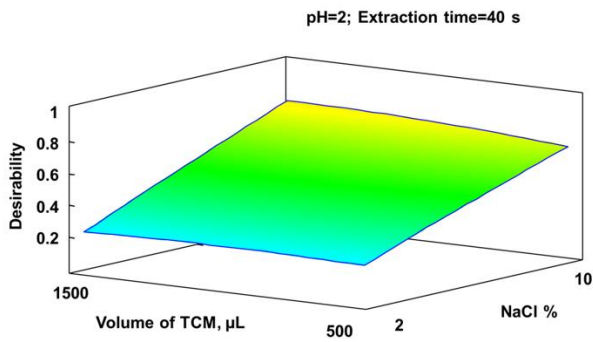


Figure 3

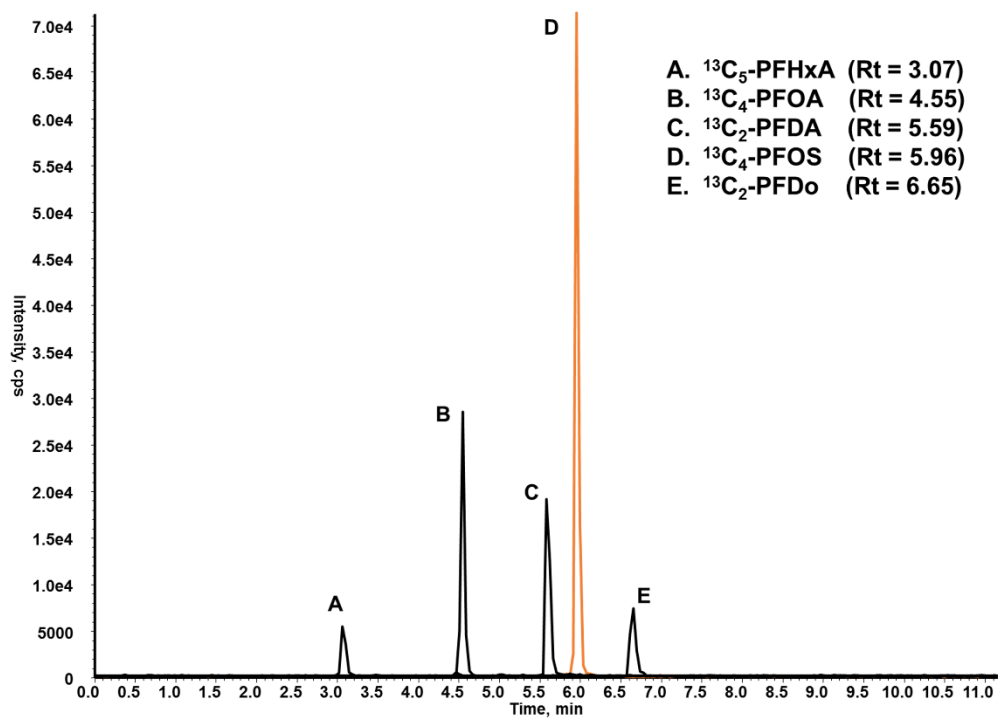
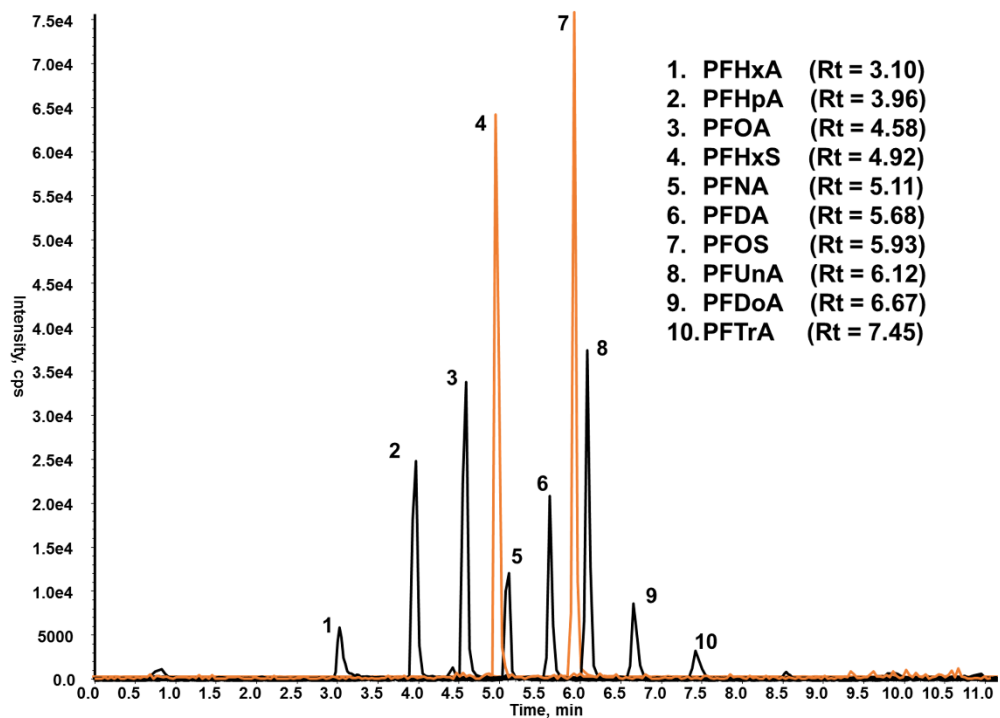


Figure 4

Figure Captions

Fig. 1. Pareto charts for the influence of SALLE salt masses on extraction efficiencies. Factors are named by capital letters, from A to D. Interaction between two factors are represented by coupling the two correspondent capital letters. Blue line represents the minimal standardized effect to consider a factor or interaction as significative. Grey color indicates positive effect of the factor or interaction. Blue color indicates negative effect of the factor or interaction.

Fig. 2. Standardized effects of DLLME conditions on peak areas. Factors are named by capital letters, from A to D. Interaction between two factors are represented by coupling the two correspondent capital letters. Blue line represents the minimal standardized effect to consider a factor or interaction as significative. Grey color indicates positive effect of the factor or interaction. Blue color indicates negative effect of the factor or interaction.

Fig. 3. Estimated response surface for desirability function.

Fig.4. Chromatograms obtained from a spiked milk sample (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each analyte).

Supplementary Material Captions (Anexos)

Fig. S1. Optimization of the acetonitrile volume (mean of three determinations. Error bars represent $\pm 2 \sigma$).

Fig. S2. Optimization of the shaking time (mean of three determination)

5.2. Resultado objetivo 2. Determinar las concentraciones de once PFAS en muestras de leche donada al BLH hospitalario e identificar factores asociados con la exposición

CONCENTRATIONS OF PERFLUOROALKYL SUBSTANCES IN DONOR BREAST MILK IN SOUTHERN SPAIN AND THEIR POTENTIAL DETERMINANTS

Laura Serrano López, Luz M^a Iribarne-Durán, Beatriz Suárez, Francisco Artacho-Cordón, Fernando Vela-Soria, Manuela Peña-Caballero, Jose A. Hurtado, Nicolás Olea, Mariana F. Fernández, Carmen Freire

International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2021; 236, 113796

Factor de impacto: 7,401, Cuartil Q1

DOI: [10.1016/j.ijheh.2021.113796](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113796)

RESUMEN

Antecedentes: Se considera que la leche materna ofrece la mejor nutrición a los lactantes; sin embargo, puede ser una fuente de exposición a sustancias químicas ambientales como los compuestos perfluoroalquilados (PFAS) para los lactantes. Los PFAS son un grupo complejo de sustancias químicas sintéticas cuya gran estabilidad ha llevado a su presencia ubicua en el medio ambiente.

Objetivo: Evaluar las concentraciones y el perfil de PFAS en leche materna de las donantes de un banco de leche humana y explorar los factores potencialmente relacionados con esta exposición.

Métodos: Se recogieron muestras de leche de 82 donantes del Banco de Leche Humana del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España). Se aplicó cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para determinar las concentraciones de 11 PFAS en leche, incluyendo compuestos de cadena larga y de cadena corta. Se utilizó un cuestionario para recoger información sobre las características sociodemográficas de las donantes, su estilo de vida, su dieta y el uso de productos de cuidado personal (PCP). Los factores

relacionados con las concentraciones individuales y totales de PFAS se evaluaron mediante análisis de regresión multivariante.

Resultados: Se detectaron PFAS en el 24-100% de las muestras de leche materna. El PFHpA se detectó en el 100% de las muestras, seguido del PFOA (84%), el PFNA (71%), el PFHxA (66%) y el PFTTrDA (62%). El sulfonato de perfluorooctano (PFOS) se detectó sólo en el 34% de los donantes. La mediana de las concentraciones osciló entre <0,66 ng/dL (ácido perfluorohexano sulfónico [PFHxS]) y 19,39 ng/L (PFHpA). La mediana de la suma de las concentraciones de PFAS fue de 87,67 ng/L y fue mayor para los PFAS de cadena corta que para los de cadena larga. Los factores más frecuentemente asociados con el aumento de las concentraciones de PFAS fueron la ingesta de ciertos alimentos de origen animal y el uso de PCP como productos para el cuidado de la piel y el maquillaje.

Conclusiones: Se detectan varios PFAS, incluidos compuestos de cadena corta, en las muestras de leche de donantes. La leche materna puede ser una vía importante para la exposición a PFAS de los lactantes amamantados, incluidos los prematuros en las UCIN. A pesar del reducido tamaño muestral, estos datos sugieren que varios factores relacionados con el estilo de vida influyen en las concentraciones de PFAS, destacando el uso de PCP.

ABSTRACT

Background: Breast milk is considered to offer the best nutrition to infants; however, it may be a source of exposure to environmental chemicals such as perfluoroalkyl compounds (PFAS) for breastfeeding infants. PFAS are a complex group of synthetic chemicals whose high stability has led to their ubiquitous contamination of the environment.

Objective: To assess the concentrations and profiles of PFAS in breast milk from donors to a human milk bank and explore factors potentially related to this exposure. **Methods:** Pooled milk samples were collected from 82 donors to the Human Milk Bank of the Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain). Ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was applied to determine milk concentrations of 11 PFAS, including long-chain and short-chain

compounds. A questionnaire was used to collect information on donors' socio-demographic characteristics, lifestyle, diet, and use of personal care products (PCPs). Factors related to individual and total PFAS concentrations were evaluated by multivariate regression analysis.

Results: PFAS were detected in 24-100% of breast milk samples. PFHpA was detected in 100% of samples, followed by PFOA (84%), PFNA (71%), PFHxA (66%), and PFTTrDA (62%). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) was detected in only 34% of donors. The median concentrations ranged from <0.66 ng/dL (perfluorohexane sulfonic acid [PFHxS]) to 19.39 ng/L (PFHpA). The median of the sum of PFAS concentrations was 87.67 ng/L and was higher for short-chain than long-chain PFAS. Factors most frequently associated with increased PFAS concentrations included intake of creatin animal food items and use of PCPs such as skin care and makeup products.

Conclusions: Several PFAS, including short-chain compounds, are detected in pooled donor milk samples. Breast milk may be an important pathway for the PFAS exposure of breastfed infants, including preterm infants in NICUs. Despite the reduced sample size, these data suggest that various lifestyle factors influence PFAS concentrations, highlighting the use of PCPs.

Keywords: Perfluoroalkyl substances; PFOA; PFOS; Breast milk; Human milk bank; Preterm infants

Abbreviations

PFCAs: Perfluoroalkyl carboxylic acids

PFSA: Perfluoroalkane sulfonic acids

SC PFAS: Short-chain PFAS

LC PFAS: Long-chain PFAS

NICU: Neonatal intensive care unit

PCPs: Personal care products

1. Introduction

Breast milk is considered the best food for infants in general and for high-risk premature infants in particular, offering proper nutrition, immunological benefits, and growth-promoting components and reducing the risk of complications (American Academy of Pediatrics [AAP], 2012). When preterm infants cannot receive breast milk from their mothers, included those admitted to a neonatal intensive care unit (NICU), the World Health Organization (WHO) and AAP recommend the administration of pasteurized human milk from a milk bank rather than artificial infant formula (AAP, 2012; WHO United Nations Children's Fund [UNICEF], 2003). Donated breast milk delivers essential nutrients and therapeutic benefits to the preterm infant but also has the potential to transmit infectious diseases and transfer toxic chemicals from exposed mothers (Carroll, 2014; Lehmann et al., 2018). Consequently, the European Human Milk Banking Association (Weaver et al., 2019) and other international milk banks have established guidelines for donor selection to ensure the safety of the milk

(Clifford et al., 2020). These take account of pathogenic microorganisms and certain toxic substances (e.g., tobacco, alcohol, medications, caffeine, and drugs of abuse) but do not consider occupational or environmental exposure to hazardous chemicals.

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are a group of thousands of synthetic chemicals that are widely used in commercial and industrial products. They serve as polymerization aids in the production of fluoropolymers, as surfactants in fire-fighting foams, as anti-mist agents in chromium plating, and as water and oil repellents in textiles, leather, food contact materials, and cosmetics. PFAS are also employed in the production of semiconductors, medical devices, plant protection products, biocides, feed additives, pharmaceuticals, and paints (Glüge et al., 2020). Hydrogen atoms are entirely or partially replaced by fluorine atoms in these aliphatic substances (Buck et al., 2011) and the bond between carbon and fluorine is extremely strong and stable; hence, PFAS are highly resistant to thermal, chemical, and biological degradation and can accumulate in living organisms and biomagnify in food webs (Pérez et

al., 2013). The degree of bioaccumulation generally increases with greater length of perfluoroalkyl carbon chain, and the elimination kinetics are highly species-dependent, with humans showing the longest PFAS half-lives, reaching 8.5 years for perfluorohexane sulfonic acid (PFHxS) (Olsen et al., 2009). Over the past decade, exposure to certain PFAS has been associated with lipid and insulin dysregulation (Sinisalu et al., 2020; Sun et al., 2018), infertility (Bach et al., 2016), reduced fetal growth (Kashino et al., 2020), increased miscarriage risk (Liew et al., 2020), obesity (Braun, 2017), impaired cognitive development (Vuong et al., 2019), and altered thyroid (López-Espinosa et al., 2012; Preston et al., 2020) and immune (Abraham et al., 2020; Grandjean et al., 2012) functions. These associations are supported by animal studies indicating that some PFAS are endocrine and metabolic disruptors, immunotoxic, reproductively toxic, and/or carcinogenic (ATSDR, 2018; Fenton et al., 2020; Street et al., 2018).

The most widespread PFAS in the environment are perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS), long-chain PFAS that are

frequently detected in sera from populations worldwide (Bartolomé et al., 2017; Calafat et al., 2007; Kannan et al., 2004; Lewis et al., 2015; Thépaut et al., 2021). Current regulations in the European Union (EU) and elsewhere mainly address PFOS and PFOA, which are listed under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) (Regulation (EU) 2019/1021; UNEP, 2009) and have been phased out in the EU since 2008 (European Directive, 2006/112/EC). Restrictions are also in place or planned under EU chemical legislation for other PFAS, including short-chain compounds such as PFHxS and perfluorohexanoic acid (PFHxA) (ECHA, 2019). These are less bioaccumulative than long-chain PFAS but are equally persistent in the environment and may exert similar toxicity (Nian et al., 2020).

Food, drinking water, and the indoor environment are considered to be the principal sources of human exposure to PFAS (Cornelis et al., 2012; Haug et al., 2011), which also include cosmetics and all-weather textiles, among other products made from PFAS (EFSA, 2020; Schultes et al., 2018). Seafood, meat, and dairy products may be the major sources of dietary

exposure, especially to PFOA and PFOS (Domingo and Nadal, 2017; Titlemier et al., 2007). Socio-demographic factors have also been related to a greater internal PFAS burden, including occupation, male sex, higher age, and low parity (Bartolomé et al., 2017; Colles et al., 2020; Guzman et al., 2016).

Several PFAS have been detected in umbilical cord blood, placenta, breast milk, and plasma samples from breastfed infants, indicating that placental transfer and breastfeeding are both potential routes of PFAS exposure (Abraham et al., 2020; Cariou et al., 2015; Lien et al., 2013; Vela-Soria et al., 2021). It has been reported that a substantial proportion of PFAS in the mother is transferred to the infant during breastfeeding, which may contribute to reduce maternal serum and breast milk concentrations over the lactation period (Bartolomé et al., 2017; Macheke-Tendenguwo et al., 2018; Mondal et al., 2014, Thomsen et al., 2010). Identification of breastfeeding as an important pathway for the exposure to PFAS of breastfed infants (Haug et al., 2011) has been supported by findings of their wide presence in breast milk samples from mothers worldwide (Hu et

al., 2021; Lee et al., 2018; Macheke-Tendenguwo et al., 2018).

Human milk banks provide milk for very premature, fragile, and sometimes medically compromised infants who are especially vulnerable to the effects of toxic chemicals. The present study is part of a wider project that aims to assess the potential adverse health impact on neonates in a NICU of exposure to endocrine-disrupting chemicals (EDCs) from their medical care, diet, and environment (Iribarne-Duran et al., 2019). The purpose of this study was to evaluate the concentrations and profiles of eleven long-and short-chain PFAS in milk samples from donors to a human milk bank and to explore factors that influence their concentrations.

2. Material and methods

2.1. Study population

Between 2015 and 2018, 82 donor mothers were recruited from the Regional Human Milk Bank of the Virgen de las Nieves University Hospital in Granada (Southern Spain). In general, donor women are registered at the milk bank after breastfeeding is well-established (*i.e.*, 2-3 weeks post-delivery). Exclusion criteria for donor

milk selection include: positive serology for HIV, syphilis, or hepatitis B or C; risk factor for sexual transmitted disease (e.g., unstable partner, non-utilization of condom, tattooing/piercing in previous three months, acupuncture, and blood transfusion); transplantation in previous 6 months; current smoking or drug habit; and high consumption of alcohol (>2 drinks/day or >20 g/day) or caffeine-containing drinks (>3 cups/day or >30 g/day). All local donors supplying the milk bank between 2015 and 2018 (n=446) were invited to participate in the study and were fully informed of its nature and purpose. Donors who agreed to participate (18.4%) were asked to donate a milk sample for the analysis of environmental chemicals and to complete a structured questionnaire on socio-demographic and reproductive characteristics, lifestyle, diet, and use of personal care products (PCPs). Information on dietary habits and PCP use was available for a subsample of 77 donors. An informed consent form was signed by the donors before collecting personal information and biological samples. The research protocol was approved by the Biomedical Research Ethics Committee of Granada.

2.2. Milk sample collection

Participating donors were asked by the milk bank to collect mature milk over a minimum of 1 week and a maximum of 4 weeks by manual expression and/or breast pump and to keep them frozen (-20 °C) until delivery to the bank. On their arrival at the bank, samples were stored at -30 °C without breaking the cold chain at any time. Before their pasteurization (done within 2 weeks), samples from each donor were thawed and pooled, obtaining an aliquot of 5-30 mL of the pooled milk. This was then stored at -20 °C until analysis at the “UNETE research unit” of the Centro de Investigación Biomédica (University of Granada). The day of pasteurization was recorded as the donation date. Hence, the interval between the start of milk collection by the mother and the donation date never exceeded 6 weeks.

2.3. Laboratory analysis

A modification of a validated ultra-high performance liquid chromatography-with tandem mass spectrometry method (Vela-Soria et al., 2020) was used (see Supplementary material) to determine the concentrations of eleven PFAS in pooled

milk samples, including: seven long-chain PFAS, *i.e.*, six perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) with >7 perfluorinated carbons (PFOA, perfluorononanoic acid [PFNA], perfluorodecanoic acid [PFDA], perfluoroundecanoic acid [PFUnDA], perfluorododecanoic acid [PFDoDA] and perfluorotridecanoic acid [PFTrDA]), and one perfluoroalkane sulfonic acid (PFSA) with ≥ 6 perfluorinated carbons (PFOS); and four short-chain PFAS, *i.e.*, two PFCAs (PFHxA and perfluoroheptanoic acid [PFHpA]), and two PFSAs (perfluorobutane sulfonic acid [PFBS] and PFHxS) (Buck et al., 2011).

Milk aliquots used for the determination of PFAS had not been analyzed before (they were virgin aliquots). Quality control (QC) procedures included the use of blanks, low and high-concentration QC materials prepared from a fortified breast milk pool, analytical standards, and reagent and matrix blanks to ensure the accuracy and precision of the data. We also performed repeated measurements of breast milk QC pools, reflecting inter- and intraday variations. Relative standard deviation (%RSD) values were calculated as a measure of

the precision of the method. Table S2 summarizes the mean accuracy and %RSD values obtained. The accuracy of the method was also verified by injecting QCs of different concentrations every 20 samples. Limits of detection (LD) ranged between 0.66 and 0.86 ng/L and limits of quantification (LQ) between 2.19 and 2.87 ng/L (Table S2).

2.4. Explanatory variables

The questionnaire administered by the milk bank to prospective milk donors and an *ad hoc* questionnaire were used to gather the following socio-demographic, reproductive, and lifestyle data: age (years), parity (multiparous or primiparous), lifetime duration of breastfeeding, either exclusive or mixed (<1, 1-10, or >10 months), birth weight and length and gestational age of the most recent newborn, schooling (university education or not), current occupation (unemployed, manual worker, or non-manual worker), area of residence (urban, sub-urban, or rural), smoking habit (ever smoked in the past or not), and current body mass index (BMI, kg/m²) categorized as underweight/normal (<25 kg/m²) or

overweight/obese (≥ 25 kg/m²). Women were also asked about their weight gain during the most recent pregnancy (kg) and weight change from before pregnancy (gain, loss, or no change). The number of days post-delivery was calculated as the difference between milk donation and birth dates. Dietary information was collected on the main origin of drinking water and the average consumption frequency (servings per day or week) in the previous 12 months of seafood, fish (oily and lean fish), dairy products (yoghurt, milk, butter, cheese), meat (red meat and cold meats), pulses, eggs, bread, chocolate, cereals, rice, pasta, fruit, vegetables (raw and cooked), fried food, canned food, coffee, and alcoholic beverages (Table 2). Data were also gathered on the frequency with which the women used sun screen, lip protector, face treatments (cream, tonic, milk), body lotion, hand cream, hair mask, makeup products (foundation, lipstick, eyeliner, and eye shadow), nail polish, hair dye, shampoo, shower cream, deodorant, hairspray/mousse/gel, perfume, toothpaste, and mouth wash and received manicure and pedicure treatments in the previous 12 months (Table 3).

In addition, the protein content of unpasteurized pooled milk samples (g/100 mL) was determined as a potential explanatory variable, given evidence that perfluorinated compounds are mainly transported bound to human serum albumin (Luo et al., 2012) and their lactational transfer is produced by binding to milk protein (Fromme et al., 2010). The total lipid, lactose (g/100 mL), and caloric (kcal/100 mL) contents of samples were also measured as independent variables.

2.5. Statistical analysis

The detection frequency of PFAS in milk samples and 50th, 75th, and 95th percentiles of their concentrations were calculated, including the total concentration of all PFAS (\sum PFAS), the most abundant PFAS commonly found in human blood samples (\sum 4 PFAS=[PFOA+PFOS+PFNA+PFHxS] and \sum 5 PFAS=[\sum 4 PFAS+PFHpA]) (Cousins et al., 2020; EFSA, 2020), long-chain PFAS (\sum LC PFAS), short-chain PFAS (\sum SC PFAS), PFASs (\sum PFASs), and PFCAs (\sum PFCAs). Total concentrations were calculated as the sum of molar concentrations of the compounds based on molecular weight and were expressed as PFOA (\sum PFAS, \sum 4 PFAS, \sum 5

PFAS, \sum LC PFAS, \sum PFCAs), PFOS (\sum PFASs), or PFHpA (\sum SC PFAS). When PFAS were detected in at least 70% of samples, concentrations below the LD were assigned a value of LD/2 and were treated as continuous variables, as were the sums of the different PFAS groups. PFAS detected in less than 70% of the milk samples were categorized as detected or non-detected (binary variables). Spearman's correlation test was used to assess relationships between PFAS concentrations (Figure 1).

Multivariate regression analyses were performed with natural-logarithm-transformed continuous (linear regression) or binary (logistic regression) PFAS concentrations as dependent variables. A forward stepwise procedure was used to enter independent variables in the models. All variables described in section 2.4, and the year of sample collection (2015, 2016, 2017, or 2018), were tested as potential explanatory variables). Given the modest sample size, the p-value threshold of 0.10 was selected to retain explanatory variables in the model. Associations were expressed as exponentiated regression coefficients ($\exp[\beta]$) or odds ratios (OR) with 95%

confidence intervals (CI). The overall R-squared for each model was calculated to determine the percent variability in exposure explained by explanatory variables. R version 4.0.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for data analyses.

3. Results

General characteristics of the study participants are displayed in **Table 1**. Donors had a median age of 33 years and 45% were multiparous (33 mothers had 1 previous birth). Most of the milk samples were collected in 2015-2017, with only 8% being collected in 2018. The lifetime breastfeeding duration was <1 month for 50% and >10 months for 23%. The median interval between delivery and milk donation was 98 days (3.3 months), ranging from 20 days (<1 month) to 273 days (9 months). In their most recent pregnancy, the birth was preterm (<37 weeks) in 23% of deliveries and the infant had low birth weight (<2500 g) in 18%. Around one-third of donors were overweight or obese; 49% gained weight from before pregnancy and 22% lost weight. More than one-third of the donors resided in the metropolitan urban area of Granada, 66% had completed university

education, 26% were manual workers, and 48% were ex-smokers. Most donors drank tap water and consumed >2 servings/week of meat and >1 serving/week of seafood (44% consumed >1 serving/week of oily fish) (**Table 2**). More than half of donors reported the daily use of face cream, hand cream, shower cream, deodorant, and toothpaste and the frequent use of shampoo (≥ 3 times/week) and perfume (\geq once a day) (**Table 3**).

The median protein content of milk samples was 1.10 g/100 mL (range=0.20-6.80 g/100 mL), their median fat content was 3.70 g/100 mL (range=1.16-8.30 g/100 mL), median lactose content was 7.36 g/100 mL (range=6.54-8.00 g/100 mL), and median energy content was 68 kcal/100 mL (range=44-110 kcal/100 mL).

Table 4 shows that detection frequencies (DF) of PFAS ranged from 24.4 to 100%, with PFHpA being detected in all samples (median concentration=19.39 ng/L), followed by PFOA (DF=84.1%, median=7.17 ng/L), PFNA (DF=70.7%, median=2.59 ng/L), PFHxA (DF=65.9%, median=1.58 ng/L), and PFTrDA (DF=62.2%, median=1.69 ng/L). Remaining compounds were detected in less than 40% of samples.

The median sum of PFAS concentrations was 87.67 ng/L (range=7.57-1899 ng/L) and was higher for short-chain than for long-chain PFAS (median=52.69 [range=2.74-1168] ng/L vs. 20.01 [range=3.06-571.1] ng/L, respectively) and for PFCAs than for PFSA (median=74.97 [range=5.65-1399] ng/L vs. 2.45 [range=0.72-223.2] ng/L, respectively). At least seven PFAS compounds were detected in the breast milk of 24 donors (29%), 5-6 were detected in 38 (46%), and 2-4 in 20 (24%). Positive correlations were observed between all PFCA compounds except for PFDoDA and PFTrDA, while PFSA concentrations were positively correlated with PFHpA, PFOA, PFNA, and PFDA concentrations (**Figure 1**).

Explanatory variables that were associated with PFAS concentrations are exhibited in Table 5 (linear regression models) and Table S3-S10 (logistic regression models). The R-squared value of models ranged from 14% (\sum LC PFAS) to 61% (PFDoDA). Milk samples collected in 2016 or 2017 had lower PFNA, PFDoDA, and \sum LC PFAS but higher PFHxA and \sum SC PFAS concentrations in comparisons to 2015. Multiparous donors had significantly higher concentrations of PFHpA in their milk,

while lifetime duration of breastfeeding was associated with higher concentrations of PFOA, PFDA, Σ PFAS, Σ PFCA, Σ LC PFAS, and Σ PFAS. Weight change from before pregnancy (gain or loss) was associated with higher PFDA, PFOS, Σ 4 PFAS, and Σ 5 PFAS concentrations, and residing in an urban area with higher PFHpA, Σ 5 PFAS, and Σ PFAS concentrations.

With regard to food intake, red meat was associated with higher concentrations of Σ 5 PFAS; oily fish, milk, and cold meat with higher PFHxA; yoghurt with higher PFDODA and Σ PFSA; cheese with higher PFTrDA; butter with higher PFBS; pulses with higher Σ 4 PFAS; chocolate with higher PFHpA; and fried food with higher PFOS concentrations. The PCPs most frequently related to increased PFAS concentrations were hand cream, whose use was related to higher PFNA, PFDA, PFBS, PFHxS, PFOS, Σ 4 PFAS, Σ SC PFAS, Σ PFCA, and Σ PFAS; followed by face treatment, associated with higher PFHpA, PFNA, Σ 5 PFAS, and Σ PFCA; and lipstick use, associated with higher PFOA, PFUnDA and PFDODA. Face cream and body lotion were associated with higher PFUnDA; foundation makeup with higher Σ 4 PFAS; eyeliner with

higher PFHxA and PFHxS; eye shadow with higher PFOA and PFDA; hair dye with higher PFOA and PFOS; shampoo with higher PFOA; hair mask with higher PFHxS; deodorant with higher Σ PFSA; and perfume with higher Σ SC PFAS concentrations.

On the other hand, certain factors such as a higher intake of cheese, eggs, cereals, and fish, and a more frequent use of deodorants were associated with a decrease in the milk concentrations of some individual PFAS or total PFAS (**Table 5 and Tables S3-S10**).

4. Discussion

The concentrations of eleven PFAS were measured in milk samples from 82 donors to a human milk bank in Spain in 2015-2018. More than two-thirds of milk samples had detectable concentrations of PFHpA (100%), PFOA (84%), and PFNA (71%), and almost one-third showed the presence of at least seven PFAS; also, concentrations of short-chain PFAS were higher than of long-chain PFAS, especially in more recently collected samples. These results suggest that breast milk may be an important pathway of PFAS exposure for breastfed infants. Given that donated milk is used for premature

newborns with low or very low birth weight (<1500 g) in NICUs, it appears crucial to monitor concentrations of environmental chemicals such as PFAS in human milk banks. Despite the small sample size, these findings suggest that PFAS concentrations in human milk are influenced by various lifestyle factors, such as intake of certain animal food items and the use of PCPs. Some of these factors were previously reported, as discussed below.

4.1. PFAS concentrations in milk

There has been increasing research into the presence of PFAS in human breast milk over the past decade (Hu et al., 2021; Macheka-Tendenguwo et al., 2018; Supplementary material, Table S11). Studies have indicated a wide variation in the geographical distribution of PFAS concentrations and profiles, revealing a global decline in the concentration of some PFAS congeners, especially in countries where their production and utilization have been restricted, such as the USA and Germany (Bjerregaard-Oelsen et al., 2016; Cerná et al., 2020; Macheka-Tendenguwo et al., 2018). In this regard, the Stockholm Convention (UNEP, 2016) and EU regulations (Commission Regulations

[EU] 2017/1000; 207/2011) have contributed to a gradual decline in levels of PFOS and PFOA. In the present study, PFAS concentrations in the donor milk samples collected in 2015-2018 were generally several times lower than in samples collected between 2012 and 2015 in hospitals or primary health care centers in other Spanish regions (Beser et al., 2019; Lorenzo et al., 2016; Motas Guzman et al., 2016). In the most recent Spanish study by Beser et al. (2019), PFOA, PFOS, and PFNA concentrations in milk samples collected in 2015 were higher than in the present samples, while they did not detect any of the remaining nine PFAS analyzed (Table S11). Likewise, concentrations of PFOS, PFOA, PFNA, and PFHxS in breast milk samples gathered in Catalonia in 2007-2008 were higher in comparison to the present findings (Kärroman et al., 2010; Llorca et al., 2010), although the presence of other PFAS such as PFDA and PFUnDA was not detected (Kärroman et al., 2010). The lower concentrations of PFAS found in donor milk samples from Granada *versus* other Spanish regions may be attributable to the lower level of economic development in the South of Spain, as indicated by the results of a Spanish biomonitoring study

of PFAS concentrations in serum samples from adults in 2009-2010 (Bartolomé et al. 2017).

PFAS concentrations in the present samples are generally comparable or in the lower range of those observed in breast milk from other countries, although the majority of previous studies only measured the most abundant PFAS, *i.e.*, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, and PFHxS (Macheka-Tendenguwo et al., 2018; Table S11). A recent Chinese study of the same eleven PFAS as in the present study reported a higher detection frequency of PFOA, PFOS, and PFDA but a much lower detection frequency of the remaining PFAS in breast milk samples (n= 174) than in the present samples (Jin et al., 2020); for instance, PFHpA was not detected in any sample but was found in all of the present samples. In the same way, Lee et al. (2018) reported higher concentrations of PFOA, PFOS, and PFHxS but lower concentrations of the remaining PFAS in milk from 293 Korean mothers in comparison to the present donors. Overall, the present results suggest a decline in breast milk concentrations of PFOS (detected in only one out of three donors), a continued exposure to PFOA, and

widespread exposure to short-chain PFAS such as PFHpA and PFHxA, whose concentrations were higher than previously reported in breast milk (Macheka-Tendenguwo et al., 2018; Table S11).

Our findings are in line with studies indicating the predominance of short-chain *versus* long-chain PFAS in breast milk (Fujii et al., 2012; Kang et al., 2016; Kim et al., 2011; Lorenzo et al., 2016). Short-chain PFAS are more soluble and have a lower molecular weight, facilitating their passage through the mammary epithelial membrane and their contamination of breast milk. In addition, the widespread and growing use of alternative short-chain PFAS over the last years would have increased human exposure (Kang et al., 2016; Lorenzo et al., 2016). It has also been suggested that the transfer of sulphonates (PFSAs) to human milk is easier than that of carboxylates (PFCAs) (Roosens et al., 2010); however, the latter were more abundant than the former in the present study.

4.2. Determinants of PFAS concentrations in breast milk

PFAS concentrations were not associated with the age of milk donors.

The relationship of breast milk PFAS with age is not clear, with some studies describing higher PFAS concentrations with increasing age (Al-Sheyab et al., 2015; Lee et al., 2018) and others showing no such association (Antignac et al., 2013; Llorca et al., 2010; Motas Guzmán et al., 2016; Nyberg et al., 2018). The BMI of donors was not related to breast milk PFAS concentrations in the present study, except for a suggestive inverse association with PFHpA. Previous reports have been contradictory, showing both positive and negative associations (Berg et al., 2014; Brantsaeter et al., 2013; Cariou et al., 2015; Jensen et al., 2015; Lee et al., 2018; Lorenzo et al., 2016). On the other hand, weight change from before pre-conception appeared to influence the increase the concentrations of PFDA, PFOS, $\Sigma 4$ PFAS, and $\Sigma 5$ PFAS. This finding is not easy to explain, given that weight change may be an indicator of changes in diet or lifestyle that could lead to increased PFAS exposure, as previously suggested (Lee et al., 2018).

Lifetime breastfeeding was associated with higher PFDA, PFOA, Σ PFCA, Σ long-chain PFAS, and total PFAS concentrations, while multiparous

status was associated with lower PFBS but higher PFHpA concentrations. In contrast, various studies reported lower PFAS concentrations in the milk of multiparous mothers in comparison to those who were breastfeeding for the first time (Award et al., 2020; Barbarossa et al., 2013; Croes et al., 2012; Motas Guzman et al., 2016; Thomsen et al., 2010), suggesting a greater transfer (either placental or via breastfeeding) of PFAS to the first newborn. Thus, Thomsen et al. (2010) reported a reduction rate of 7.7 and 3.1% per month in breast milk concentrations for PFOA and PFOS, respectively, while Mondal et al. (2014) estimated that breastfeeding was associated with monthly decrease of 1-3% in maternal serum concentrations of PFOA, PFOS, PFHxS, and PFNA and of 1-8% in breast milk concentrations of PFOA and PFOS. However, is still not well established that breast milk concentrations of PFAS decrease over the lactation period. In line with our results, a Korean study found higher PFOS, PFOA, PFNA, and total PFAS concentrations in breast milk collected at 30 *versus* 6 days after the delivery, which were attributed to changes in the dietary and lifestyle patterns of mothers

throughout the lactational period (Lee et al., 2018). It has also been proposed that the interval between pregnancies may have an impact on the body burden of PFAS, with a longer interval being associated with breast milk concentrations that may be as high as observed for the first breastfeeding episode (Whitworth et al., 2012). Nevertheless, the associations with breastfeeding duration observed in this study remain poorly understood.

Some previous studies observed higher PFAS concentrations in the breast milk of women residing in urban or semi-urban *versus* rural areas (Abdallah et al., 2020; Liu et al., 2010; Tao et al., 2008a, b). In the same line, urban donors in this study showed higher concentrations of PFHpA, Σ 5 PFAS, and total PFAS concentrations, while their education and occupation did not appear to influence PFAS concentrations.

Dietary intake has been identified as a substantial source of PFAS exposure (Domingo and Nadal, 2017). The intake of fish and seafood has been associated with higher internal concentrations of PFAS in several studies (Berg et al., 2014; Rylander et al., 2010; Thépaut et al., 2021; Tyrrell et al., 2013), including

reports of adult serum and breast milk samples (Bartolomé et al., 2017; Motas Guzman et al., 2016). In addition, research on the presence of PFAS in food marketed in Spain found that fish and shellfish were the most contaminated groups, showing the highest concentrations of PFOS, PFOA, PFHpA, and PFHxS (Domingo et al., 2012a, b). However, no positive relationship was found between fish/seafood intake and PFAS concentrations in the present study, although meat consumption was associated with increased total PFAS concentrations, consistent with observations of a higher PFAS content in foods of animal *versus* non-animal origin (Tittlemier et al., 2007). The intake of other food items did not show a clear trend towards an increase in PFAS exposure. Notably, the consumption of fried food was associated with higher PFOS concentrations. This may in part be explained by a greater use of non-stick cookware or PFOS-contaminated oil for frying or by a higher intake of fried processed food contaminated with PFOS. However, no data are available to support these propositions.

Higher concentrations of several PFAS, including long- and short-chain

compounds, were found in the milk from women who more frequently used various PCPs, suggesting that PCPs might be a potential source of PFAS exposure. Few data are available on the presence of PFAS in PCPs; however, nine PFAS, including PFOA and PFNA, were detected in foundation, nail polish, and sunscreen products sold in Japan (Fujii et al., 2013), and twenty-five PFAS, most frequently PFHpA and PFHxA, in foundation and cosmetic powder products sold in Sweden (Schultes et al., 2018). In the present study, the use of foundation was positively associated with the sum of PFOA, PFOS, PFNA, and PFHxS concentrations, and the use of skin care and hair products, cosmetics, perfume, and deodorant was associated with higher concentrations of long-chain and short-chain PFAS, PFCAs, and PFSA. These results support a previous study of 264 Korean women that found the utilization of cosmetics and skin care products to be associated with breast milk concentrations of PFHpA and PFOS, respectively (Kang et al., 2016). In the same line, recent biomonitoring study of adults in Belgium and Norway reported associations between the use of cosmetics (*e.g.*, sunscreen, mouthwash, and lip balm) and serum concentrations

of PFAS (Colles et al., 2020; Thépaut et al., 2021). Dermal exposure to PFAS has been considered negligible in comparison to exposure from diet, drinking water, and ingestion of house dust (Trudel et al., 2008; Vestergren et al., 2008). However, exposure assessment studies have not considered the potential contribution of PCPs to dermal uptake due to the lack of adequate dosage data. Dermal permeability studies have also shown that the skin may be a relevant route of PFAS exposure under certain conditions, underscoring the need to re-assess the potential contribution of dermal exposure (Franko et al., 2012).

4.3. Implications for newborn exposure and health

Literature reports suggest that breast milk is one important pathway for the exposure of breastfed infants to PFAS while also acts as a route for PFAS progressive elimination from the mother's body. In general, PFAS concentrations in the present milk samples were lower than described in these studies; however, it should be taken into account that: 1) exposure may start during the fetal period *via* placental transfer, meaning that the

infant would already have a body burden of PFAS at birth; 2) although epidemiological evidence on the effects of postnatal exposure to PFAS, particularly short-chain PFAS, remains limited, potential effects include thyroid hormone imbalances, altered postnatal growth, and a decreased antibody response to vaccines (Abraham et al., 2020; Grandjean, 2018; Jin et al., 2020; López-Espinosa et al., 2012); 3) there is a lack of knowledge on the toxicological properties of many PFAS in current use and on the combined adverse effects of this complex group of synthetic chemicals; and 4) most importantly, milk donated to the human milk bank is given to highly vulnerable preterm infants in NICUs, for whom the acceptable level of risk should be zero. Interestingly, based on findings of an association between plasma PFAS concentrations and antibodies against diphtheria and tetanus in one-year-olds (Abraham et al., 2020), the EFSA estimated that critical levels in breast milk would be 60 ng/L for PFOA and PFNA, 73 ng/L for PFHxS and PFOS, and 133 ng/L for the sum of the 4 PFAS (EFSA, 2020). These values are comparable to the upper concentrations observed in the present

study. Moreover, a recent study reported that the exposure of preterm infants to PFAS through human breast milk might exceed reference values for older and healthier infants (Aceti et al., 2021).

4.4. Strengths and limitations

The main limitation of this study is the small sample size, which reduced the capacity to detect possible determinants of PFAS exposure, particularly for compounds with a low detection frequency and therefore modeled as binary variables. Nevertheless, similar or even smaller sample sizes were used by most published studies on PFAS in breast milk (Macheka-Tendenguwo et al., 2018; Table S11). In addition, extrapolation of the study findings to lactating women in general is limited, because milk donors tend to be more educated and have higher incomes in comparison to non-donor lactating women (Osbaldiston and Mingle, 2007). Indeed, most donors in this study had a university education and were non-manual workers. Moreover, data were not available to establish whether the socio-demographic profile differed between participating and non-

participating donors. However, neither education nor occupation was associated with milk PFAS concentrations. A further limitation was the use of a questionnaire not specifically designed for an exhaustive investigation of sources of PFAS exposure, and the lack of more detailed data on dietary patterns, occupations, and other potential sources of exposure prevented the identification of additional exposure pathways. Further, the considerable number of explanatory factors assessed may have led to some spurious statistically significant associations. It is also possible that bias may have resulted from the misreporting of dietary intakes and other factors. Nevertheless, misclassification is unlikely to be driven by exposure levels. Finally, the wide time frame for sample collection (ranging from 20 days to 9 months since delivery) may hamper comparisons with other studies on PFAS breast milk concentrations, given that internal PFAS exposure may vary over the lactation period due to toxicokinetics and/or lifestyle changes. In fact, our research group is currently investigating time-dependent variations in breast milk

PFAS concentrations over the lactation period.

The main strength of this study is the assessment of pooled milk samples (over a maximum of 4 weeks) rather than spot samples. It is well established that lactational transfer of PFAS occurs by binding to milk protein. Protein levels decrease linearly in human milk over the first year of lactation, particularly over the first 6 weeks post-partum (Ballard and Morrow, 2013). Hence, PFAS assessments in spot breast milk samples may increase the risk of exposure misclassification in comparison to the assessment of pooled samples. Moreover, some of the eleven PFAS measured (*e.g.*, PFUnDA, PFDoDA, and PFTrDA) have been less well studied in breast milk samples and human biomonitoring studies. To our knowledge, this is the first report on the presence of PFAS in breast milk samples supplied by donor mothers to a human milk bank. The results suggest that requirements for donor selection may not be sufficient to minimize the exposure of breastfed infants to environmental chemicals.

5. Conclusions

This study of the concentrations of eleven PFAS in donor breast milk demonstrated the wide presence of these compounds in milk samples, especially short-chain PFAS such as PFHpA and PFHxA. PFOA and PFNA showed lower concentrations than observed in previous studies but were still detected in a large proportion of samples, whereas the findings for PFOS suggest a decrease in exposure levels. The data also suggest that certain lifestyle patterns, such as the use of PCPs, may have an influence on the presence of PFAS in breast milk; however, these data should be interpreted with caution given the limited sample size. Further studies are required to elucidate the main factors contributing to the increase in PFAS concentrations in breast milk and to determine changes in exposure levels over the lactation period. This issue is especially urgent in relation to the supply of human milk to preterm infants and the need to limit their exposure to harmful chemicals.

Acknowledgements

This research would not have been achieved without the selfless

collaboration of the donors who took part in the study. The authors gratefully acknowledge editorial assistance from Richard Davies and the support of the “UNETE research unit” of the Centro de Investigación Biomédica (University of Granada). This research was funded in part by grants from the European Union Commission (The European Human Biomonitoring Initiative H2020-EJP-HBM4EU), Biomedical Research Networking Center-CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), and the Carlos III Institute of Health (ISCIII) (PI16/01820, PI16/01812, PI16/01858, PI17/01743, and PI17/01526). The authors are also grateful to the ISCIII and the “Fondo Europeo de Desarrollo Regional” (ISCIII/FEDER) for the predoctoral research contract granted to L.M. Iribarne-Durán (FI17/00316), the Sara Borrell postdoctoral research contract granted to F. Vela-Soria (grant no. CD17/00212), the José María Segovia de Arana contract granted to N. Olea (INT18/00060) and the Miguel Servet Type I Program granted to C. Freire (grant no. MS16/00085). This paper is part of the PhD thesis developed by Laura Serrano in the context of the “Clinical Medicine and Public Health

Program” of the University of Granada.
The funders had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no actual or potential competing financial interests.

References

1. Abdallah, M.A., Wemken, N., Drage, D.S., Tlustos, C., Cellarius, C., Cleere, K., Morrison, J.J., Daly, S., Coggins, M.A., Harrad, S., 2020. Concentrations of perfluoroalkyl substances in human milk from Ireland: Implications for adult and nursing infant exposure. *Chemosphere* 246, 125724.
2. Abraham, K., Mielke, H., Fromme, H., Völkel, W., Menzel, J., Peiser, M., Zepp, F., Willich, S.N., Weikert, C., 2020. Internal exposure to perfluoroalkyl substances (PFASs) and biological markers in 101 healthy 1-year-old children: associations between levels of perfluorooctanoic acid (PFOA) and vaccine response. *Arch. Toxicol.* 94(6), 2131-2147.
3. Aceti, A., Barbarossa, A., Gazzotti, T., Zironi, E., Pagliuca, G., Vitali, F., Beghetti, I., Corvaglia, L., 2021. Exposure to perfluoroalkyl substances through human milk in preterm infants. *Eur J Pediatr.* Apr 10. doi: 10.1007/s00431-021-04073-4.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2018. Toxicological profile for Perfluoroalkyls. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
5. American Academy of Pediatrics (AAP), 2012. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 129(3), e827-e841.
6. Antignac, J.P., Veyrand, B., Kadar, H., Marchand, P., Oleko, A., Le Bizec, B., Vandentorren, S., 2013. Occurrence of perfluorinated alkylated substances in breast milk of French women and relation with socio-demographical and clinical parameters: results of the ELFE pilot study. *Chemosphere* 91(6), 802-808.
7. Awad, R., Zhou, Y., Nyberg, E., Namazkar, S., Yongning, W., Xiao, Q., Sun, Y., Zhu, Z., Bergman, Å., Benskin, J.P., 2020. Emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in human milk from Sweden and China. *Environ. Sci. Process Impacts* 22(10), 2023-2030.
8. Bach, C.C., Vested, A., Jorgensen, K., Bonde, J.P., Henriksen, T.B., Toft, G., 2016. Perfluoroalkyl and

- polyfluoroalkyl substances and measures of human fertility: a systematic review. *Crit. Rev. Toxicol.* 46(9), 735-755.
9. Ballard, O., Morrow, A.L., 2013. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* 60(1), 49-74.
 10. Barbarossa, A., Masetti, R., Gazzotti, T., Zama, D., Astolfi, A., Veyrand, B., Pession, A., Pagliuca, G., 2013. Perfluoroalkyl substances in human milk: a first survey in Italy. *Environ. Int.* 51, 27-30.
 11. Bartolome, M., Gallego-Pico, A., Cutanda, F., Huetos, O., Esteban, M., Perez-Gomez, B., Bioambient, es, Castano, A., 2017. Perfluorinated alkyl substances in Spanish adults: geographical distribution and determinants of exposure. *Sci. Total Environ.* 603-604, 352-360.
 12. Berg, V., Nost, T.H., Huber, S., Rylander, C., Hansen, S., Veyhe, A.S., Fuskevag, O.M., Odland, J.O., Sandanger, T.M., 2014. Maternal serum concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances and their predictors in years with reduced production and use. *Environ. Int.* 69, 58-66.
 13. Beser, M.I., Pardo, O., Beltrán, J., Yusà, V., 2019. Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 1049, 123-132.
 14. Bjerregaard-Olesen, C., Bach, C.C., Long, M., Ghisari, M., Bech, B.H., Nohr, E.A., Henriksen, T.B., Olsen, J., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2016. Determinants of serum levels of perfluorinated alkyl acids in Danish pregnant women. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219(8), 867-875.
 15. Brantsaeter, A.L., Whitworth, K.W., Ydersbond, T.A., Haug, L.S., Haugen, M., Knutsen, H.K., Thomsen, C., Meltzer, H.M., Becher, G., Sabaredzovic, A., Hoppin, J.A., Eggesbo, M., Longnecker, M.P., 2013. Determinants of plasma concentrations of perfluoroalkyl substances in pregnant

- Norwegian women. *Environ. Int.* 54, 74-84.
16. Braun, J., 2017. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13(3), 161-173.
 17. Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 7(4), 513-541.
 18. Calafat, A.M., Wong, L.Y., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2007. Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environ. Health Perspect.* 115, 1596-1602.
 19. Cariou, R., Veyrand, B., Yamada, A., Berrebi, A., Zalko, D., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Leblanc, J.C., Antignac, J.P., Le Bizec, B., 2015. Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. *Environ. Int.* 84, 71-81.
 20. Carroll, C., 2014. Body dirt or liquid gold? How the 'safety' of donated breastmilk is constructed for use in neonatal intensive care. *Soc. Stud. Sci.* 44(3), 466-485.
 21. Černá, M., Grafnetterová, A.P., Dvořáková, D., Pulkrabová, J., Malý, M., Janoš, T., Vodrážková, N., Tupá, Z., Puklová, V., 2020. Biomonitoring of PFOA, PFOS and PFNA in human milk from Czech Republic, time trends and estimation of infant's daily intake. *Environ. Res.* 188:109763.
 22. Clifford, V., Sulfaro, C., Lee, J., Pink, J., Hoad, V., 2020. Development and evaluation of formal guidelines for donor selection for human milk banks. *J. Paediatr. Child Health* 56(8):1242-1248.
 23. Colles, A., Bruckers, L., Den Hond, E., Govarts, E., Morrens, B., Schettgen, T., Buekers, J., Coertjens, D., Nawrot, T., Loots, I., Nelen, V., De Henauw, S., Schoeters, G., Baeyens, W., van

- Larebeke, N., 2020. Perfluorinated substances in the Flemish population (Belgium): Levels and determinants of variability in exposure. *Chemosphere*. 242, 125250.
24. Commission Regulation (EU) 2017/1000 of 13 June 2017 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related substances. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1000&from=EN> (accessed on 18 February 2021).
25. Commission Regulation (EU) No 207/2011 of 2 March 2011 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XVII (Diphenylether, pentabromo derivative and PFOS). Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32011R0207> (accessed on 18 February 2021).
26. Cornelis, C., Hollander, W.D., Roosens, L., Covaci, A., Smolders, R., Van Den Heuvel, R., Govarts, E., Van Campenhout, K., Reynders, H., Bervoets, L., 2012. First assessment of population exposure to perfluorinated compounds in Flanders, Belgium. *Chemosphere* 86(3), 308-314.
27. Cousins, I.T., DeWitt, J.C., Glüge, J., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Miller, M., Ng, C.A., Scheringer, M., Vierke, L., Wang, Z., 2020. Strategies for grouping per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) to protect human and environmental health. *Environ. Sci. Process Impacts*. 22(7), 1444-1460.
28. Croes, K., Colles, A., Koppen, G., Govarts, E., Bruckers, L., Van de Mierop, E., Nelen, V., Covaci, A., Dirtu, A.C., Thomsen, C., Haug, L.S., Becher, G., Mampaey, M., Schoeters, G., Van Larebeke, N.,

- Baeyens, W., 2012. Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: a biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium). *Chemosphere* 89(8), 988-994.
29. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 Amending for the 30th Time Council Directive 76/769/EEC on the Approximation of the Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Relating to Restrictions on the Marketing and Use of Certain Dangerous Substances and Preparations (Perfluorooctane Sulfonates) (Text with EEA Relevance), CELEX1. Available online: <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/612a4b88-51dd-4a86-a3d0-22c33323a493/language-en> (accessed on 28 December 2020).
30. Domingo, J.L., Ericson-Jogsten, I., Perelló, G., Nadal, M., Van Bavel, B., Kärrman, A., 2012a. Human exposure to perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: contribution of drinking water and fish and shellfish. *J. Agric. Food Chem.* 60(17), 4408-4415.
31. Domingo, J.L., Jogsten, I.E., Eriksson, U., Martorell, I., Perelló, G., Nadal, M., Bavel, B.V., 2012b. Human dietary exposure to perfluoroalkyl substances in Catalonia, Spain. Temporal trend. *Food Chem.* 135(3), 1575-1582.
32. Domingo, J.L., Nadal, M., 2017. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in food and human dietary intake: A review of the recent scientific literature. *J. Agric. Food Chem.* 65(3), 533-543.
33. ECHA (European Chemicals Agency), 2019. Candidate list of substances of very high concern for authorisation. Available online: <https://echa.europa.eu/candidate-list-table> (accessed on 28 December 2020).
34. EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific opinion of the

- panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 653, 1-131.
35. EFSA (European Food Safety Authority), 2020. Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 18(9), 6223.
36. Fenton, S.E., Ducatman, A., Boobis, A., DeWitt, J.C., Lau, C., Ng, C., Smith, J.S., Roberts, S.M., 2020. Per- and polyfluoroalkyl substance toxicity and human health review: Current state of knowledge and strategies for informing future research. *Environ. Toxicol. Chem.* 40(3), 606-630.
37. Franco, J., Meade, B.J., Frasch, H.F., Barbero, M., Anderson, S.E., 2012. Dermal penetration potential of perfluorooctanoic acid (PFOA) in human and mouse skin. *J. Toxicol. Health, Part A.* 75(1), 50-62.
38. Fromme, H., Tittlemier, S.A., Völkel, W., Wilhelm, M., Twardella, D., 2010. Perfluorinated compounds-exposure assessment for the general population in western countries. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212, 239-270.
39. Fujii, Y., Yan, J., Harada, K.H., Hitomi, T., Yang, H., Wang, P., Koizumi, A., 2012. Levels and profiles of long-chain perfluorinated carboxylic acids in human breast milk and infant formulas in East Asia. *Chemosphere* 86(3), 315-321.
40. Fujii, Y., Harada, K.H., Koizumi, A., 2013. Occurrence of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) in personal care products and compounding agents. *Chemosphere* 93, 538-544.
41. Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I.T., DeWitt, J.C., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Ng, C.A., Trier, X., Wang, Z., 2020. An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environ. Sci. Process Impacts* 22(12), 2345-2373.
42. Grandjean, P., 2018. Delayed discovery, dissemination, and decisions on intervention in environmental health: a case study on immunotoxicity of perfluorinated alkylate

- substances. *Environ. Health* 17(1), 62.
43. Haug, L.S., Huber, S., Becher, G., Thomsen, C., 2011. Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds--comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. *Environ. Int.* 37(4), 687-693.
44. Hu, L., Luo, D., Wang, L., Yu, M., Zhao, S., Wang, Y., Mei, S., Zhang, G., 2021. Levels and profiles of persistent organic pollutants in breast milk in China and their potential health risks to breastfed infants: A review. *Sci. Total Environ.* 753, 142028.
45. Iribarne-Duran, L.M., Artacho-Cordon, F., Peña-Caballero, M., Molina-Molina, J.M., Jiménez-Díaz, I., Vela-Soria, F., Serrano, L., Hurtado, J.A., Fernández, M.F., Freire, C., Olea, N., 2019. Presence of bisphenol A and parabens in a Neonatal Intensive Care Unit: An exploratory study of potential sources of exposure. *Environ. Health Perspect.* 127(11), 117004.
46. Jensen, T.K., Andersen, L.B., Kyhl, H.B., Nielsen, F., Christesen, H.T., Grandjean, P., 2015. Association between perfluorinated compound exposure and miscarriage in Danish pregnant women. *PLoS One* 10, e0123496.
47. Jin, H., Mao, L., Xie, J., Zhao, M., Bai, X., Wen, J., Shen, T., Wu, P., 2020. Poly- and perfluoroalkyl substance concentrations in human breast milk and their associations with postnatal infant growth. *Sci. Total Environ.* 713, 136417.
48. Kang, H., Choi, K., Lee, H.S., Kim, D.H., Park, N.Y., Kim, S., Kho, Y., 2016. Elevated levels of short carbon-chain PFCAs in breast milk among Korean women: Current status and potential challenges. *Environ Res.* 148, 351-359.
49. Kannan, K., Corsolini, S., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J.H., Aldous, K.M., 2004. Perfluorooctane sulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Tech.* 38, 4489-4495.

50. Kärrman, A., Domingo, J.L., Llebaria, X., Nadal, M., Bigas, E., van Bavel, B., Lindström, G., 2010. Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: concentrations and trends in human liver and milk samples. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17, 750-758.
51. Kashino, I., Sasaki, S., Okada, E., Matsuura, H., Goudarzi, H., Miyashita, C., Okada, E., Ito, Y.M., Araki, A., Kishi, R., 2020. Prenatal exposure to 11 perfluoroalkyl substances and fetal growth: A large-scale, prospective birth cohort study. *Environ. Int.* 136, 105355.
52. Kim, S.-K., Lee, K.T., Kang, C.S., Tao, L., Kannan, K., Kim, K.-R., Kim, C.-K., Lee, J.S., Park, P.S., Yoo, W.Y., Ha, J.Y., Shin, Y.-S., Lee, J.-H., 2011. Distribution of perfluorochemicals between sera and milk from the same mothers and implications for prenatal and postnatal exposures. *Environ. Pollut.* 159, 169-174.
53. Lee, S., Kim, S., Park, J., Kim, H.J., Choi, G., Choi, S., Kim, S., Kim, S.Y., Kim, S., Choi, K., Moon, H.B., 2018. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in breast milk from Korea: Time-course trends, influencing factors, and infant exposure. *Sci. Total Environ.* 612, 286-292.
54. Lehmann, G.M., LaKind, J.S., Davis, M.H., Hines, E.P., Marchitti, S.A., Alcala, C., Lorber, M., 2018. Environmental Chemicals in Breast Milk and Formula: Exposure and Risk Assessment Implications. *Environ. Health Perspect.* 126(9), 96001.
55. Lewis, R.C., Johns, L.E., Meeker, J.D., 2015. Serum biomarkers of exposure to perfluoroalkyl substances in relation to serum testosterone and measures of thyroid function among adults and adolescents from NHANES 2011-2012. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12(6), 6098-6114.
56. Lien, G.W., Huang, C.C., Wu, K.Y., Chen, M.H., Lin, C.Y., Chen, C.Y., Hsieh, W.S., Chen, P.C., 2013. Neonatal-maternal factors and perfluoroalkyl substances in cord blood. *Chemosphere* 92, 843-850.
57. Liew, Z., Luo, J., Nohr, E.A., Bech, B.H., Bossi, R., Arah, O.A., Olsen, J., 2020. Maternal plasma

- perfluoroalkyl substances and miscarriage: A nested case-control study in the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* 128(4), 47007.
58. Liu, J., Li, J., Zhao, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Lei, Z., Wu, Y., 2010. The occurrence of perfluorinated alkyl compounds in human milk from different regions of China. *Environ. Int.* 36:433-438.
 59. Llorca, M., Farré, M., Picó, Y., Teijón, M.L., Alvarez, J.C., Barceló, D., 2010. Infant exposure of perfluorinated compounds: levels in breast milk and commercial baby food. *Environ. Int.* 36, 584-592.
 60. Lopez-Espinosa, M.J., Mondal, D., Armstrong, B., Bloom, M.S., Fletcher, T., 2012. Thyroid function and perfluoroalkyl acids in children living near a chemical plant. *Environ. Health Perspect.* 120, 1036-1041.
 61. Lorenzo, M., Farré, M., Blasco, C., Onghena, M., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Perfluoroalkyl substances in breast milk, infant formula and baby food from Valencian community (Spain). *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage.* 6, 108-115.
 62. Luo, Z., Shi, X., Hu, Q., Zhao, B., Huang, M., 2012. Structural evidence of perfluorooctane sulfonate transport by human serum albumin. *Chem. Res. Toxicol.* 25(5), 990-992.
 63. Macheke-Tendenguwo, L.R., Olowoyo, J.O., Mugivhisa, L.L., Abafe, O.A., 2018. Per- and polyfluoroalkyl substances in human breast milk and current analytical methods. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 36064-36086.
 64. Mondal, D., Hernandez Weldon, R., Armstrong, B.G., Gibson, L.J., Lopez-Espinosa, M.J., Shin, H.M., Fletcher, T., 2014. Breast feeding: a potential excretion route for mothers and implications for infant exposure to perfluoroalkyl acids. *Environ. Health Perspect.* 122(2), 187-192.
 65. Motas Guzmán, M., Clementini, C., Pérez-Cárceles, M.D., Rejón, S.J., Cascone, A., Martellini, T., Guerranti, C., Cincinelli, A., 2016. Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and

- estimation of infant's daily intake. *Sci. Total Environ.* 544, 595-600.
66. Nian, M., Luo, K., Luo, F., Aimuzi, R., Huo, X., Chen, Q., Tian, Y., Zhang, J., 2020. Association between Prenatal Exposure to PFAS and Fetal Sex Hormones: Are the Short-Chain PFAS Safer?. *Environ. Sci. Technol.* 54(13), 8291-8299.
 67. Nyberg, E., Awad, R., Bignert, A., Ek, C., Sallsten, G., Benskin, J.P., 2018. Inter-individual, inter-city, and temporal trends of per- and polyfluoroalkyl substances in human milk from Swedish mothers between 1972 and 2016. *Environ. Sci. Process Impacts* 20(8), 1136-1147.
 68. Olsen, G.W., Chang, S.-C., Noker, P.E., Gorman, G.S., Ehresman, D.J., Lieder, P.H., Butenhoff, J.L., 2009. A comparison of the pharmacokinetics of perfluorobutanesulfonate (PFBS) in rats, monkeys, and humans. *Toxicology* 256, 65-74.
 69. Osbaldiston R., Mingle, L.A., 2007. Characterization of human milk donors. *J. Hum. Lact.* 23(4), 350-357.
 70. Perez, F., Nadal, M., Navarro-Ortega, A., Fabrega, F., Domingo, J.L., Barcelo, D., Farre, M., 2013. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environ. Int.* 59, 354-362.
 71. Preston, E.V., Webster, T.F., Claus Henn, B., McClean, M.D., Gennings, C., Oken, E., Rifas-Shiman, S.L., Pearce, E.N., Calafat, A.M., Fleisch, A.F., Sagiv, S.K., 2020. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and maternal and neonatal thyroid function in the Project Viva Cohort: A mixtures approach. *Environ. Int.* 139, 105728.
 72. Regulation (EU) 2019/1021 of the European Parliament and of the Council of 20 June 2019 on persistent organic pollutants.
 73. Roosens, L., D'Hollander, W., Bervoets, L., Reynders, H., van Campenhout, K., Cornelis, C., van Den Heuvel, R., Koppen, G., Covaci, A., 2010. Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environ. Pollut.* 158, 2546-2552.

74. Rylander, C., Sandanger, T.M., Froyland, L., Lund, E., 2010. Dietary patterns and plasma concentrations of perfluorinated compounds in 315 Norwegian women: the NOWAC Postgenome Study. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5225-5232.
75. Schultes, L., Vestergren, R., Volkova, K., Westberg, E., Jacobson, T., Benskin, J.P., 2018. Per- and polyfluoroalkyl substances and fluorine mass balance in cosmetic products from the Swedish market: implications for environmental emissions and human exposure. *Environ. Sci. Process Impacts* 20(12), 1680-1690.
76. Sinisalu, L., Sen, P., Salihović, S., Virtanen, S.M., Hyöty, H., Ilonen, J., Toppari, J., Veijola, R., Orešič, M., Knip, M., Hyötyläinen, T., 2020. Early-life exposure to perfluorinated alkyl substances modulates lipid metabolism in progression to celiac disease. *Environ. Res.* 188, 109864.
77. Street, M.E., Angelini, S., Bernasconi, S., Burgio, E., Cassio, A., Catellani, C., Cirillo, F., Deodati, A., Fabbri, E., Fanos, V., Gargano, G., Grossi, E., Iughetti, L., Lazzeroni, P., Mantovani, A., Migliore, L., Palanza, P., Panzica, G., Papini, A.M., Parmigiani, S., Predieri, B., Sartori, C., Tridenti, G., Amarri, S., 2018. Current Knowledge on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) from Animal Biology to Humans, from Pregnancy to Adulthood: Highlights from a National Italian Meeting. *Int. J. Mol. Sci.* 19(6), 1647.
78. Sun, Q., Zong, G., Valvi, D., Nielsen, F., Coull, B., Grandjean, P., 2018. Plasma concentrations of perfluoroalkyl substances and risk of type 2 diabetes: A prospective investigation among U.S. women. *Environ. Health Perspect.* 126(3), 037001.
79. Tao, L., Kannan, K., Wong, C.M., Arcaro, A.F., Butenhoff, J.L., 2008a. Perfluorinated compounds in human milk from Massachusetts, U.S.A. *Environ. Sci. Tech.* 42, 3096-3101.
80. Tao, L., Ma, J., Kunisue, T., Libelo, E.L., Tanabe, S., Kannan, K., 2008b. Perfluorinated compounds in

- human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ. Sci. Tech.* 42, 8597-8602.
81. Thépaut, E., Dirven, H.A.A.M., Haug, L.S., Lindeman, B., Poothong, S., Andreassen, M., Hjertholm, H., Husøy, T. 2021. Per- and polyfluoroalkyl substances in serum and associations with food consumption and use of personal care products in the Norwegian biomonitoring study from the EU project EuroMix. *Environ. Res.* 195, 110795.
82. Thomsen, C., Haug, L.S., Stigum, H., Frøshaug, M., Broadwell, S.L., Becher, G., 2010. Changes in concentrations of perfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast-milk during twelve months of lactation. *Environ. Sci. Tech.* 44, 9550-9556.
83. Tittlemier, S.A., Pepper, K., Seymour, C., Moisey, J., Bronson, R., Cao, X.L., Dabeka, R.W., 2007. Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *J. Agric. Food Chem.* 55(8), 3203-3210.
84. Trudel, D., Horowitz, L., Wormuth, M., Scheringer, M., Cousins, I.T., Hungerbühler, K., 2008. Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal.* 28(2), 251-269.
85. Tyrrell, J., Melzer, D., Henley, W., Galloway, T.S., Osborne, N.J., 2013. Associations between socioeconomic status and environmental toxicant concentrations in adults in the USA: NHANES 2001-2010. *Environ. Int.* 59, 328-335.
86. UNEP Stockholm Convention, SC-4/17: Listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride, 2009.
87. Vela-Soria, F., García-Villanova, J., Mustieles, V., de Haro, T., Antignac, J.P., Fernandez, M.F., 2021. Assessment of perfluoroalkyl substances in placenta by coupling salt assisted liquid-liquid extraction with

- dispersive liquid-liquid microextraction prior to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 221, 121577.
88. Vela-Soria, F., Serrano-López, L., García-Villanova, J., de Haro, T., Olea, N., Freire, C., 2020. HPLC-MS/MS method for the determination of perfluoroalkyl substances in breast milk by combining salt-assisted and dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 412(28), 7913-7923.
89. Vestergren, R., Cousins, I.T., Trudel, D., Wormuth, M., Scheringer, M., 2008. Estimating the contribution of precursor compounds in consumer exposure to PFOS and PFOA. *Chemosphere* 73(10), 1617-1624.
90. Vuong, A.M., Yolton, K., Xie, C., Dietrich, K.N., Braun, J.M., Webster, G.M., Calafat, A.M., Lanphear, B.P., Chen, A., 2019. Prenatal and childhood exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) and cognitive development in children at age 8 years. *Environ. Res.* 172, 242-248.
91. Weaver, G., Bertino, E., Gebauer, C., Grovslie, A., Mileusnic-Milenovic, R., Arslanoglu, S., Barnett, D., Boquien, C.Y., Buffin, R., Gaya, A., Moro, G.E., Wesolowska, A., Picaud, J.C., 2019. Recommendations for the establishment and operation of human milk banks in Europe: A consensus statement from the European Milk Bank Association (EMBA). *Front. Pediatr.* 7, 53.
92. Whitworth, K.W., Haug, L.S., Baird, D.D., Becher, G., Hoppin, J.A., Skjaerven, R., Thomsen, C., Eggesbo, M., Travlos, G., Wilson, R., Longnecker, M.P., 2012. Perfluorinated compounds and subfecundity in pregnant women. *Epidemiology* 23(2), 257-263.
93. World Health Organization (WHO) United Nations Children's Fund (UNICEF), 2003. Global Strategy for Infant and Young Child Feeding. Geneva. Available online: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562218.pdf> (accessed on 15 January 2021).

Table 1. General characteristics of milk donors (N=82)

Variables	n (%)	Median	Range
Age (years)		33	19-42
Year of sample collection			
2015	25 (30.5)		
2016	27 (32.9)		
2017	23 (28.0)		
2018	7 (8.5)		
Multiparous	37 (45.1)		
Lifetime duration of breastfeeding (months)			
<1	41 (50.0)		
1-10	22 (26.8)		
>10	19 (23.2)		
Time since delivery (days)		71	20-273
Length of gestation (weeks)		39	26-41
Birth weight (g)		3,130	840-4,500
Birth length (cm)		50	16-56
Current BMI (kg/m²)		22.86	17.30-36.09
Overweight/obese	26 (33.8)		
Weight gain during pregnancy (kg)		12	1-36
Weight change from before pregnancy			
Weight loss	19 (22.1)		
Weight gain	39 (49.4)		
No weight change	24 (28.6)		
Area of residence			
Rural	26 (31.2)		
Sub-urban	24 (29.9)		
Urban	32 (39.0)		
Maternal university education	51 (66.2)		
Occupation			
Unemployed	6 (6.3)		
Manual worker	22 (26.3)		
Non-manual worker	54 (67.5)		
Ex-smoker	39 (47.6)		

BMI: Body mass index.

Table 2. Food intake frequency of milk donors (N=77)

Variables	n (%)	Variables	n (%)
Coffee intake=1 cup/day	17 (20.7)	Pulse	
Alcohol intake≥1 drink/month	4 (4.9)	1 sv/week	13 (16.9)
Origin of drinking water		2 sv/week	29 (37.7)
Tap water	53 (68.8)	>2 sv/week	35 (45.5)
Bottled water	24 (31.2)	Eggs	
Seafood		1 sv/week	16 (20.8)
<1 sv/week	11 (14.3)	2 sv/week	28 (36.4)
1 sv/week	19 (24.7)	>2 sv/week	33 (42.9)
>1 sv/week	47 (57.3)	Bread	
Lean fish		<1 sv/day	15 (19.5)
<1 sv/week	18 (23.4)	1 sv/day	25 (32.5)
1 sv/week	37 (48.1)	>1 sv/day	37 (48.1)
>1 sv/week	22 (28.6)	Chocolate	
Oily fish		Never	10 (13.0)
<1 sv/week	29 (37.7)	<1 sv/day	44 (57.1)
1 sv/week	34 (44.2)	≥1 sv/day	23 (28.0)
>1 sv/week	14 (18.2)	Cereals	
Yoghurt		Never	27 (35.1)
<1 sv/day	31 (40.3)	<1 sv/day	35 (45.5)
≥1 sv/day	46 (59.7)	≥1 sv/day	15 (19.5)
Milk		Rice	
<1 glass/day	14 (18.2)	1 sv/week	66 (85.7)
≥1 glass/day	63 (81.8)	>1 sv/week	11 (14.3)
Cheese		Pasta	
Never/rarely	22 (28.6)	1 sv/week	66 (85.7)
>2 sv/week	34 (44.2)	>1 sv/week	11 (14.3)
≥1 sv/day	21 (27.3)	Fruit	
Butter		≤2 sv/week	12 (15.6)
Never	23 (29.9)	>2 sv/week	65 (84.4)
1 sv/week	36 (46.8)	Raw vegetables	
>1 sv/week	18 (23.4)	≤2 sv/week	15 (19.5)
Meat		>2 sv/week	62 (80.5)
≤1 sv/week	11 (14.3)	Cooked vegetables	
2 sv/week	13 (16.9)	≤2 sv/week	17 (22.1)
>2 sv/week	53 (68.8)	>2 sv/week	60 (77.9)
Cold meat		Fried food	
<2 sv/week	43 (55.8)	<1 sv/week	37 (48.1)
2 sv/week	34 (44.2)	1 sv/week	25 (32.5)
Red meat		>1 sv/week	15 (19.5)
Never	20 (26.0)	Canned food (ever)	62 (80.5)
<1 sv/week	33 (42.9)		
≥1 sv/week	34 (31.2)		

sv: serving

Table 3. Use of personal care products among milk donors (N=77)

Variables	n (%)	Variables	n (%)
Sunscreen (ever)	37 (48.1)	Eye shadow	
Sunscreen application		Rarely/never	49 (63.6)
None	40 (51.9)	<once a day	18 (23.4)
Face	26 (33.8)	≥once a day	10 (13.0)
Entire body	11 (14.3)	Nail polish (traditional)	
Sunscreen protection factor		Rarely/never	65 (84.4)
None	40 (51.9)	≥once a week	12 (15.6)
<50	12 (15.6)	Acrylic nail polish	
50	25 (32.5)	<once a month	70 (90.9)
Lip protector (ever)	30 (39.0)	once a month	7 (9.1)
Face cream		Manicure	
<once a day	24 (31.2)	<once a month	67 (87.0)
once a day	31 (40.3)	once a month	10 (13.0)
>once a day	22 (28.6)	Pedicure	
Face tonic		<once a month	66 (85.7)
Rarely/never	60 (77.9)	once a month	11 (14.3)
≥once a week	17 (22.1)	Hair dye	
Face milk		Never	36 (46.8)
Rarely/never	70 (90.9)	<once a month	23 (29.9)
≥once a week	7 (9.1)	once a month	18 (23.4)
Face treatment		Shampoo	
Never	59 (76.6)	<3 times/week	25 (32.5)
<once a month	12 (15.6)	≥3 times/week	52 (67.5)
Once a month	6 (7.8)	Shower cream	
Body lotion		<once a day	6 (7.8)
Rarely/never	28 (36.4)	≥once a day	71 (92.2)
<once a day	15 (19.5)	Hairspray/mousse/gel	
≥once a day	34 (44.2)	Rarely/never	58 (75.3)
Hand cream		≥once a day	19 (24.7)
<once a day	43 (55.8)	Deodorant	
once a day	19 (24.7)	<once a day	8 (10.4)
>once a day	15 (19.5)	once a day	52 (67.5)
Hair mask		>once a day	17 (22.1)
Rarely/never	38 (49.4)	Perfume	
≥once a week	39 (50.6)	Rarely/never	12 (15.6)
Foundation makeup		<once a day	24 (31.2)
Rarely/never	41 (53.2)	≥once a day	41 (53.2)
<once a day	19 (24.7)	Toothpaste	
≥once a day	17 (22.1)	≤once a day	17 (22.1)
Lipstick		>once a day	60 (77.9)
Rarely/never	39 (50.6)	Mouthwash	
<once a day	24 (31.2)	Rarely/never	47 (61.0)
≥once a day	14 (18.2)	<once a day	11 (14.3)
Eyeliner		≥once a day	18 (23.4)
Rarely/never	36 (46.8)		
<once a day	21 (27.3)		
≥once a day	20 (26.0)		

Table 4. Concentrations (ng/L) of PFAS in donor breast milk (N=82)

	<i>Compound</i>	LOD	DF (%)	Median	P75	P95	Max.
PFHxA	Perfluorohexanoic acid	0.73	65.9	1.58	26.15	152.3	322.4
PFHpA	Perfluoroheptanoic acid	0.79	100	19.39	55.71	232.3	743.9
PFOA	Perfluorooctanoic acid	0.86	84.1	7.17	23.86	55.12	251.8
PFNA	Perfluorononanoic acid	0.69	70.7	2.59	10.69	25.48	136.5
PFDA	Perfluorodecanoic acid	0.72	24.4	<0.72	1.57	23.01	210.3
PFUnDA	Perfluoroundecanoic acid	0.74	39.0	<0.74	1.60	3.29	14.01
PFDoDA	Perfluorododecanoic acid	0.77	35.4	<0.77	1.66	1.66	131.8
PFTTrDA	Perfluorotridecanoic acid	0.78	62.2	1.69	1.69	8.84	13.34
PFBS	Perfluorobutane sulfonic acid	0.80	35.4	<0.80	1.73	66.35	195.0
PFHxS	Perfluorohexane sulfonic acid	0.66	24.4	<0.66	0.74	16.01	45.45
PFOS	Perfluorooctane sulfonic acid	0.86	34.1	<0.86	6.26	26.01	64.75
	Sum of PFAS	P5	P25	Median	P75	P95	Max.
Σ4 PFAS^a	PFOA+PFOS+PFNA+PFHxS ^b	<2.04	5.51	14.66	39.69	104.7	437.8
Σ5 PFAS^a	PFOA+PFOS+PFNA+PFHxS+PFHpA ^c	2.19	5.88	53.31	103.9	280.5	1284
ΣLC PFAS^a	PFOA+PFOS+PFNA+PFDA+ PFUnDA+PFDoDA+PFTTrDA ^d	3.81	7.32	20.01	47.03	155.1	571.1
ΣSC PFAS^a	PFHpA+PFHxA+PFBS+PFHxS ^e	<2.74	13.75	52.69	125.1	398.4	1168
ΣPFSA^a	PFBS+PFHxS+PFOS	<0.72	<0.72	2.45	8.09	136.6	223.2
ΣPFCA^a	PFHxA+PFHpA+PFOA+PFNA+ PFDA+PFUnDA+PFDoDA+PFTTrDA	7.11	30.16	74.97	141.8	450.1	1399
ΣPFAS^a	Sum of all 11 PFAS	11.46	44.58	87.67	208.2	475.4	1899

LOD: Limit of detection; DF: Detection frequency; P75, P95: 75th and 95th percentiles.

^aWeighted molar sum of PFAS concentrations (sum of molar concentrations of PFAS based on molecular weight); ^bMost abundant PFAS in human serum (EFSA, 2020); ^cMost abundant PFAS in human serum including PFHpA (Cousins et al., 2020); ^dLong-chain PFAS; ^eShort-chain PFAS. LC: long-chain PFAS; SC: short-chain PFAS; PFSA: Perfluoroalkyl sulfonic acids; PFCA: Perfluoroalkyl carboxylic acids.

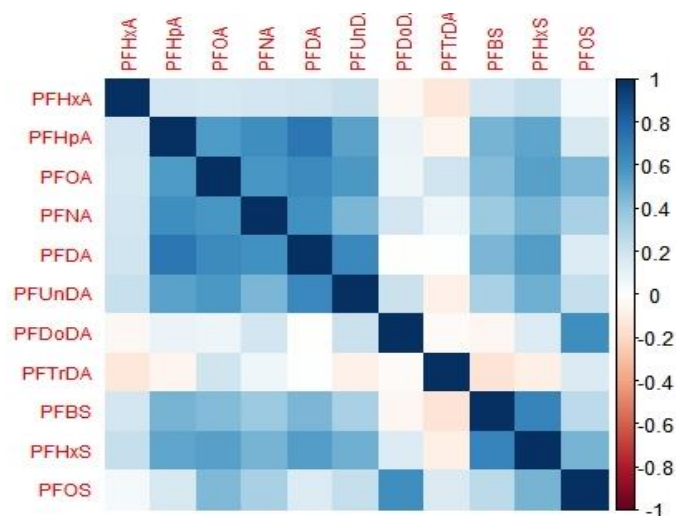


Figure 1. Correlation heatmap for PFAS concentrations in breast mil

Table 5
 Significant explanatory variables for breast milk concentrations of most prevalent PFAS and summed concentrations of PFAS groups (n = 777).

Predictors	PFHpA	PFOA	PFNA	∑4PFAS	∑5PFAS	∑PFASs	∑PFCAs	∑Long-chain PFAS	∑Short-chain PFAS	∑PFAS
Year of sample collection (ref: 2015)										
2016			0.23 (0.10-0.53)					0.39 (0.21-0.73)	2.91 (1.36-6.17)	
2017			0.65 (0.27-1.53)					0.64 (0.34-1.18)	2.75 (1.22-6.22)	
2018			0.32 (0.09-1.05)					0.55 (0.22-1.38)	0.73 (0.24-2.23)	
Multiparous vs. primiparous	2.12 (0.96-4.72)									
Total breastfeeding (ref: <1 month)										
1-10 months		2.75 (1.31-5.79)			2.99 (1.72-5.21)		2.27 (1.26-4.11)	1.80 (1.01-3.19)		2.61 (1.49-4.96)
>10 months		1.11 (0.51-2.42)			1.01 (0.54-1.89)		0.90 (0.48-1.67)	1.04 (0.58-1.89)		1.31 (0.75-2.29)
BMI (kg/m ²)	0.91 (0.82-1.01)									
Weight change from pre-conception										
Weight gain				2.22 (1.02-4.81)	1.66 (0.89-3.09)					
Weight loss				3.03 (1.58-5.78)	1.71 (1.01-2.89)					
Area of residence (ref: rural)										
Sub-urban	1.20 (0.44-3.30)				1.32 (0.72-2.42)				0.48 (0.23-0.99)	0.62 (0.34-1.12)
Urban	4.04 (1.51-10.8)				3.08 (1.77-5.36)				1.68 (0.80-3.55)	1.82 (1.06-3.11)
Ex-smoker										
Coffee intake: 1 vs. <1 cup/day				0.44 (0.21-0.90)						
Lean fish intake (ref: <1 sv/week)										
1 sv/week										
>1 sv/week										0.46 (0.26-0.84)
Only fish intake (ref: <1 sv/week)										
1 sv/week										0.64 (0.34-1.19)
>1 sv/week										0.56 (0.34-0.93)
Yoghurt intake: ≥1 vs. <1 sv/day						2.09 (1.02-4.29)				
Cheese intake (ref: rarely/never)										
>2 sv/week	0.30 (0.11-0.76)				0.46 (0.26-0.81)					0.51 (0.29-0.86)
≥1 sv/day	0.32 (0.10-0.99)				0.51 (0.27-0.95)					0.50 (0.27-0.93)
Red meat intake (ref: ≤1 sv/week)										
2 sv/week					0.94 (0.52-1.69)					
>2 sv/week					1.85 (1.07-3.21)					
Pulses intake (ref: 1 sv/week)										
2 sv/week				1.33 (0.60-2.93)						
>2 sv/week				2.53 (1.17-5.45)						

Table 5 (continued)

Predictors	PFHpA	PFOA	PFNA	Σ4PFAS	Σ5PFAS	ΣPFASs	ΣPFCAs	ΣLong-chain PFAS	ΣShort-chain PFAS	ΣPFAS
Egg intake (ref: 1 sv/week)										
2 s/week	0.30 (0.10-0.92)									
>2 sv/week	0.46 (0.15-1.38)									
Chocolate intake (ref: never)										
<1 sv/day	3.27 (0.93-11.5)									
≥1 sv/day	2.98 (0.74-12.0)									
Cereal intake (ref: never)										
<1 sv/day				0.38 (0.21-0.70)						0.53 (0.32-0.89)
≥1 sv/day				0.36 (0.16-0.80)						0.65 (0.35-1.22)
Face treatment (ref: never)										
<once a month	1.99 (0.98-2.38)		2.12 (0.85-5.26)		1.65 (0.89-3.06)		1.57 (0.78-3.14)			
once a month	3.13 (1.26-7.80)		4.26 (1.26-14.42)		4.02 (1.71-9.47)		3.59 (1.38-9.36)			
Body lotion use (ref: rarely/never)										
<once a day										0.95 (0.48-1.89)
≥once a day										0.53 (0.29-0.98)
Hand cream use (ref: <once a day)										
once a day										2.07 (1.23-3.49)
>once a day				2.05 (1.07-3.92)			1.77 (0.95-3.29)		2.03 (1.00-4.19)	2.07 (1.23-3.49)
Foundation makeup use (ref: never)										
<once a day				1.74 (0.86-3.52)			1.62 (0.79-3.33)		1.30 (0.58-2.91)	1.20 (0.69-2.07)
≥once a day										
Lip protector use: ever vs. never										
Lipstick use (ref: rarely/never)										
<once a day		3.42 (1.50-7.84)								
≥once a day		0.47 (0.18-1.25)								
Eye shadow use (ref: rarely/never)										
<once a day		0.60 (0.25-1.44)								
≥once a day		6.39 (2.32-17.6)								
Hair dye use (ref: never)										
<once a month		1.03 (0.46-2.32)								
once a month		2.24 (1.01-4.98)								
Shampoo use: ≥ vs. <3 times/week		2.01 (1.01-4.00)								

Table 5 (continued)

Predictors	PFHpA	PFOA	PFNA	Σ 4PFAS	Σ 5PFAS	Σ PFSAs	Σ PFCAs	Σ Long-chain PFAS	Σ Short-chain PFAS	Σ PFAS
Shower cream use: \geq vs. <once a day					0.37 (0.16-0.89)					
Deodorant use (ref: <once a day) once a day		0.24 (0.10-0.65)			0.40 (0.19-0.86)	1.17 (0.36-3.86)				
>once a day		0.85 (0.26-2.77)			0.81 (0.35-1.87)	4.30 (1.13-16.3)				
Perfume use (ref: rarely/never) <once a day									3.35 (1.25-8.95)	
>once a day	24%	35%	21%	26%	43%	16%	15%	14%	1.81 (0.75-4.39)	34%
R²									40%	

PFSAs: Perfluoroalkyl sulfonic acids; PFCAs: Perfluoroalkyl carboxylic acids.

Associations are reported as exponentiated regression coefficients (exp[β]) with 95% confidence intervals (CI).

Bold: p-value < 0.05.

5.3. Resultado objetivo 3. Determinar las concentraciones de arsénico, mercurio, plomo y cadmio en muestras repetidas de leche materna donada al BLH hospitalario e identificar factores asociados con la exposición

CONCENTRATIONS AND DETERMINANTS OF LEAD, MERCURY, CADMIUM, AND ARSENIC IN POOLED DONOR BREAST MILK IN SPAIN

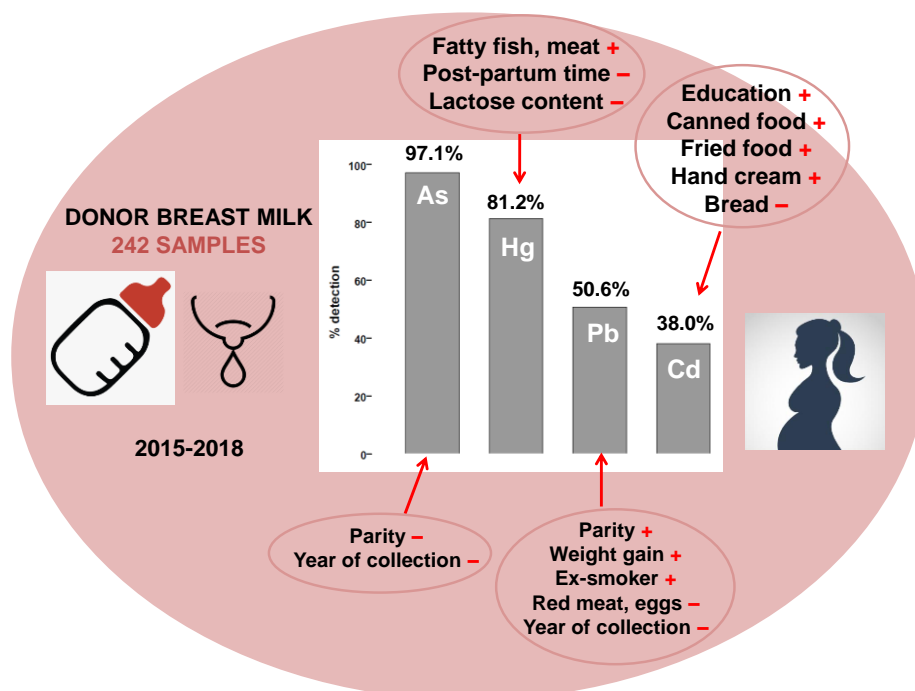
Carmen Freire, Luz Maria Iribarne-Durán, Fernando Gil, Pablo Olmedo,
Laura Serrano-López, Manuela Peña-Caballero, José-Antonio Hurtado, Nelva E. Alvarado-González, Mariana F. Fernández, Francisco M. Peinado, Francisco Artacho-Cordón, Nicolás Olea

International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2022; 240,113914

Factor de impacto: 7,401 Cuartil Q1

DOI: [10.1016/j.ijheh.2021.113914](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113914)

ABSTRACT GRÁFICO



RESUMEN

Objetivo: Medir las concentraciones de plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd) y arsénico (As) en muestras de leche materna de donantes recogidas longitudinalmente, y determinar los factores asociados.

Métodos: Se midieron las concentraciones de Pb, Hg, Cd y As en 242 muestras *pool* de leche materna de 83 donantes de un Banco de Leche Humana en España, en 2015-2018, determinando su asociación con el perfil sociodemográfico de las donantes, los hábitos dietéticos y de estilo de vida, y el tiempo de posparto, entre otros factores, y con las características nutricionales de las muestras. Se utilizó regresión lineal con efectos mixtos para identificar predictores de las concentraciones de Hg y As en la leche materna y regresión logística con efectos mixtos para identificar predictores de la presencia de Pb y Cd.

Resultados: El As fue el elemento más frecuentemente detectado en las muestras de leche (97,1%), seguido del Hg (81,2%), el Pb (50,6%) y el Cd (38,0%). Sus concentraciones medias en la leche materna fueron de 1,49 µg/L, 0,26 µg/L, 0,14 µg/L y <0,04 µg/L, respectivamente. Las concentraciones de As fueron más altas en la leche materna de las donantes primíparas, mientras que el Hg fue más alto en las donantes con una mayor ingesta de pescado graso y carne y más bajo en las muestras recogidas después de un tiempo postparto más largo y con mayor contenido de lactosa. La detección de Pb fue mayor entre las donantes multíparas, las que ganaron peso desde antes del embarazo y las exfumadoras, y fue menor en las muestras recogidas más recientemente y en las donantes con mayor ingesta de carnes rojas y huevos. La detección de Cd fue mayor en los donantes con estudios universitarios y en los que tenían una mayor ingesta de fritos y conservas y un uso más frecuente de crema de manos, y fue menor en los donantes con una mayor ingesta de pan.

Conclusiones: Estos resultados revelan concentraciones relativamente altas de As, moderadas de Hg y bajas de Pb y Cd en la leche materna de las donantes. Varios factores, como el tiempo de posparto, la paridad, el hábito de fumar y la ingesta de ciertos alimentos, se asociaron con el contenido de metales de las muestras de leche.

ABSTRACT

Aim: To measure concentrations of lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd), and arsenic (As) in longitudinally collected donor breast milk samples and to determine associated factors.

Methods: Pb, Hg, Cd, and As concentrations were measured in 242 pooled breast milk samples from 83 donors to a Human Milk Bank in Spain, in 2015-2018, determining their association with the donors' sociodemographic profile, dietary and lifestyle habits, and post-partum time, among other factors, and with the nutritional characteristics of samples. Mixed-effect linear regression was used to identify predictors of Hg and As concentrations in breast milk and mixed-effect logistic regression to identify predictors of the presence of Pb and Cd.

Results: As was the element most frequently detected in milk samples (97.1%), followed by Hg (81.2%), Pb (50.6%), and Cd (38.0%). Their median breast milk concentrations were 1.49 µg/L, 0.26 µg/L, 0.14 µg/L, and <0.04 µg/L, respectively. Concentrations of As were higher in breast milk from primiparous donors, while Hg was higher in donors with a greater intake of fatty fish and meat and lower in samples collected after a longer post-partum time and with higher lactose content. Detection of Pb was higher among multiparous donors, those gaining weight since before pregnancy, and ex-smokers and was lower in samples collected more recently and from donors with greater intake of red meat and eggs. Cd detection was higher for donors with university education and those with greater intake of fried and canned food and more frequent use of hand cream and was lower for donors with greater bread intake.

Conclusions: These findings reveal relatively high As concentrations, moderate Hg concentrations, and low Pb and Cd concentrations in pooled donor breast milk. Several factors including post-partum time, parity, smoking habit, and the intake of certain food items were associated with the metal content of milk samples.

Keywords: toxic metals; arsenic; mercury; lead; cadmium; breast milk

Funding

This research was funded in part by grants from the European Union Commission (The European Human Biomonitoring Initiative H2020-EJP-HBM4EU), Biomedical Research Networking Center-CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), and the Carlos

III Institute of Health (ISCIII) (PI16/01820, PI16/01812, PI16/01858, PI17/01743, and PI17/01526). Metals were analyzed using equipment financed by the State Research Agency and the European Regional Development Fund (FEDER) within the framework of the reference Research Project UNGR15-CE-3380 (MR-F. Gil).

1. Introduction

The benefits for infants and mothers of breastfeeding are well documented (Labbok, 2001; Lawrence, 2000). Breast milk is the best source of nutrition for both full-term and preterm infants. It contains fats, carbohydrates, proteins, and other important dietary components, contributing to the growth, immunity, and development of the infant (Ballard and Morrow, 2013). Nevertheless, breast milk is also known to be a pathway for the maternal excretion of environmental chemicals, and there have been numerous reports worldwide on the presence of different types and concentrations of persistent organic pollutants (POPs) and toxic metals/metalloids due to past or current maternal exposure (Gil and Hernández, 2015; LaKind et al., 2018; Rebelo and Caldas, 2016).

Lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd), and arsenic (As) are widespread environmental metals that top the list of priority hazardous substances published by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2015). Pb, Hg, As, and to a lesser degree Cd can readily pass through the placental barrier from the maternal bloodstream into the fetal circulation (Esteban-Vasallo et al., 2012)

and can be excreted *via* breast milk after birth, with the amount transferred to the milk depending on their chemical form and distribution in maternal blood fractions (Gundacker and Zödl, 2005). Pb, Hg, Cd, and As are considered as persistent contaminants; however, unlike POPs, they do not bind to fat and therefore do not usually accumulate at higher concentrations in breast milk than in blood; hence, infants are likely exposed to higher levels of these metals before birth than during breastfeeding (Solomon and Weiss, 2002). Nonetheless, the metal content of breast milk is an important additional pathway of postnatal exposure and is likely to reflect intrauterine exposure (Solomon and Weiss, 2002) or even the lifetime exposure of the mother (LaKind et al., 2018). For instance, lactation can be accompanied by enhanced bone resorption due to the demand for calcium of nursing infants, which can mobilize Pb stored in maternal bone and contribute to the Pb content of breast milk (Ettinger et al., 2006). Pb and Hg are toxic for the reproductive system and the developing nervous system, Cd and As are known to be human carcinogens (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; IARC, 2016), and all four metals are suspected

endocrine disruptors (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Mendiola et al., 2011).

Pb and Hg have been the most investigated toxic metals in breast milk worldwide, with less research on the presence of As (Cherkani-Hassani et al., 2019; Rebelo and Caldas, 2016; Vollset et al., 2019). Breast milk concentrations of Cd are among the lowest reported (Cherkani-Hassani et al., 2017; Rebelo and Caldas, 2016) most likely because Cd-binding milk proteins have a greater affinity for calcium, which is abundant in breast milk (Vahter et al., 2002). Mothers who smoke or have a higher intake of certain food items (e.g., fish) may be exposed to higher levels of Cd, Pb, and Hg (Bassil et al., 2018; Rebelo and Caldas, 2016; Vollset et al., 2019). With regard to As, higher breast milk concentrations were found in mothers from areas with elevated levels of As in drinking water (Samanta et al., 2007). Some studies have described a trend towards lower breast milk concentrations of toxic metals at later stages of lactation, but this has yet to be definitively established (Chao et al., 2014; García-Esquinas et al., 2011; Leotsinidis et al., 2005).

It is accepted that the benefits of breastfeeding generally outweigh the risks posed by the presence of environmental chemicals in the milk (Mead, 2008). However, it is important to improve knowledge on the exposure of infants to environmental chemicals and on changes in the exposure of mothers during lactation, particularly in the setting of the neonatal intensive care unit (NICU). However, only one recent study has been published on concentrations of toxic metals in donated breast milk given to hospitalized preterm newborns (Oliveira et al., 2020). Recent reports on toxic metals in breast milk from Spanish women are based on the analysis of Pb, Hg, and Cd in 100 samples collected at week 3 postpartum in Madrid (García-Esquinas et al., 2011) and of Pb, Hg, Cd, and As, among other trace elements, in 170 samples gathered in the city of Santiago de Compostela in Northern Spain (Mandiá et al., 2021). Our group recently reported the concentration profiles of various perfluoroalkyl substances (PFAS) and environmental phenols in donor breast milk from a Human Milk Bank in Granada, Southern Spain (Iribarne-Duran et al., unpublished results; Serrano et al.,

2021). In the present study, we examined concentrations of Pb, Hg, Cd, and As and associated factors in longitudinally gathered breast milk samples from the same donors.

2. Materials and methods

2.1. Study population

During 2015-2018, 275 mature breast milk samples were obtained from 83 donors to the Regional Milk Bank of the Virgen de las Nieves University Hospital, Granada (Southern Spain) at different times post-partum (never before 2-3 weeks post-partum). All potential participants were invited to participate in this study. Exclusion criteria for the donors were previously described in detail (Serrano et al., 2021) and included: positive serology for HIV, syphilis, or hepatitis B or C; risk factor for sexual transmitted disease; transplantation in previous 6 months; current smoking or drug habit; and high consumption of alcohol (>20 g/day) or caffeine-containing drinks (>30 g/day). After providing their written informed consent, participating donors completed a questionnaire on socio-demographic characteristics and reproductive and lifestyle factors and donated milk samples for the analysis of

environmental chemicals. The research protocol was approved by the Biomedical Research Ethics Committee of Granada. This study included 242 out of 275 milk samples from 83 donors with enough volume for the analysis of trace elements. Information on dietary habits and the use of personal care products (PCPs) was gathered for a sub-sample of 78 participants who provided a total of 228 samples.

2.2. Breast milk sample collection

Participating donors were asked by the milk bank to collect milk over a period of 1-4 consecutive weeks by manual expression and/or breast pump and to keep the samples frozen at -20 °C in their refrigerator until delivery to the bank. On arrival at the milk bank, samples were stored at -30 °C without ever breaking the cold chain. Immediately before pasteurization by the Holder method (within 2 weeks after arrival at the bank), samples collected from each donor were thawed and then pooled, obtaining an aliquot of 5-30 mL that was stored at -20 °C until analysis. The day of pasteurization was recorded as the donation date, and the interval between the first sample expressed by the mother and the donation date never

exceeded 6 weeks. The median number of donations per woman was two, ranging from one to thirteen (four from 25% of participants and seven from 10%).

2.3. Sample preparation

First, 0.5 mL of milk sample was microwave digested in quartz vessels with 0.5 mL of HNO₃ (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) using the Ethos UP system (Milestone, Shelton, CT, USA) programmed with 1800 W as maximum power and 210 °C as temperature limit (ramp time 20 min; hold time 15 min; cooling time 60 min). The digested solution was then transferred to a decontaminated tube for later analysis. Before their utilization, the quartz vessels were vigorously cleaned, soaked for 24 h in 10% HNO₃, thoroughly rinsed with Milli-Q® water, and dried at 80 °C for about 2 h. A certified reference material was used as quality control (ERM-BD151 Skimmed milk powder). Approximately 0.5 g of certified reference material was reconstituted with 4.5 mL of Milli-Q® water. The resulting liquid milk was then digested, as were all study samples. All samples were diluted 1:5 with 1% HCl (Suprapur, Merck).

2.4. Metal analysis

Quantification of Pb, Hg, Cd, and As concentrations in breast milk was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) on an Agilent 8900 triple quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at the laboratory of the Department of Legal Medicine, Toxicology, and Physical Anthropology of the University of Granada (Spain). A calibration curve was prepared for each element in ultrapure water (Milli-Q) with 2% HNO₃ (Suprapur, Merck) and 1% HCl (Suprapur, Merck) using reference metal standard solutions (Agilent Technologies) and analyzing blanks to correct the results. The instrument was tuned and performance parameters were checked before each analysis session. The quality of results was ensured by adding online multielement 400 µg/L internal standard solution with Sc, Ge, Ir and Rh to the samples. In addition, corresponding certified reference materials [National Institute of Standards and Technology NIST (USA) Trace Elements in Natural Water Standard Reference Material SRM 1640a and ERM-BD151 Skimmed milk powder] were reanalyzed together with

a blank and an intermediate calibration standard every 12 samples. One in every twelve samples was also reanalyzed at the end of each session. Milk concentrations were expressed as µg/L. Limits of detection (LODs) were 0.10 µg/L for Pb, 0.05 µg/L for Hg, 0.04 µg/L for Cd, and 0.40 µg/L for As.

2.5. Explanatory variables

Information on potential explanatory variables was obtained from the questionnaires completed by donors on registration at the bank (donor selection questionnaire) and after inclusion in this study (research questionnaire). The research questionnaire was interviewer administered at the time of the first donation. The following data were gathered: age (continuous, years), university education (yes/no), occupation (unemployed/manual worker/non-manual worker), area of residence (urban/sub-urban/rural), living near agricultural land (yes/no), greenhouse (yes/no) or any industrial activity (yes/no), ex-smoker (yes/no), body mass index (BMI; underweight or normal/overweight or obese); parity (primiparous/multiparous), gestational length (continuous, weeks), birth weight (continuous, g), lifetime duration of

breastfeeding (≤6/>6-12/>12-24/>24 months), weight gain during pregnancy (continuous, kg), weight change from before the most recent pregnancy (gain/loss/no change), presence of amalgam dental filling (yes/no), main source of drinking water (tap/bottled water), intake of coffee (1 cup per day/<1 cup per day) and alcoholic drinks (≥1 drink per month/<1 drink per month), average consumption frequency (servings [sv] per day or week) of seafood, fatty and lean fish, dairy products (yoghurt, milk, butter, cheese), red and cold meats, pulses, eggs, bread, chocolate, cereals, rice, pasta, fruit, raw and cooked vegetables, deep-fried food, and canned food (Table S1), and frequency of use of several PCP products (Table S2). PCPs were explored as potential determinants of breast milk metal concentrations because their utilization has been described as a potential source of exposure to toxic metals, including Pb and Cd (Mesko et al., 2020; Vahidinia et al., 2019). Data on dietary intake and the utilization of PCPs referred to the 12 months before the interview. None of the participating donors were pregnant during the period of donation. The post-partum time of the donation was calculated as the

period between the date of the donation and the date of the most recent birth, categorized as ≤ 3 , $>3-6$, $>6-9$, or >9 months. Cumulative lifetime breastfeeding was calculated by adding the aforementioned period to the lifetime breastfeeding time reported in the research questionnaire. The maternal age was updated at the time of each donation. Given that the transfer of metals into breast milk is produced by binding to proteins, the total protein content of the unpasteurized milk samples was examined as a potential explanatory variable, in addition to the total lipid, lactose, and caloric contents of samples.

2.6. Statistical analysis

In a descriptive analysis, concentrations of metals in individual samples ($n=242$) and mean concentrations per donor ($n=83$) were reported as medians, and 5, 25, 75, and 95 percentiles. Hg and As were detected in a large proportion of samples, and their values below the LOD were imputed as the LOD divided by the square root of two. Distributions of Hg and As were left-skewed and were therefore natural log (ln)-transformed to normalize data for analyses.

Spearman correlation test was used to analyze associations between metal concentrations. Mixed-effect linear regression was used to examine predictors of Hg and As concentrations in breast milk. Given the high percentage of undetected values for Pb and Cd (49.5% and 62.0%, respectively), the odds of breast milk Pb and Cd concentrations above the LOD were assessed by using mixed-effect logistic regression. In mixed-effect models, the donor ID was treated as a random variable (cluster variable) to account for correlation between repeated measurements within subjects. A forward stepwise procedure was used to enter predictors (fixed variables) in the models. All variables listed in tables 1, 2, S1, and S2 were tested as potential explanatory variables. Sensitivity analysis was performed by excluding outlier concentrations of As ($n=7$) and Hg ($n=1$) identified with studentized residuals >3 . $P < 0.05$ was set to retain variables in the final model. Associations were expressed as exponentiated regression coefficients ($\exp[\beta]$) or odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CI). The “nlme” package in the statistical program R v.4.1.0 was used for statistical analyses (The R Project for

Statistical Computing, <https://www.r-project.org>).

3. Results

Participating donors had a mean age of 33 years (range: 19-47 years), 61% had university education, 29% were manual workers, 42% resided in urban areas, 47% were ex-smokers, 31% were overweight or obese, and 10% had an amalgam dental filling (Table 1). At the time of the interview, 46% of donors were multiparous, the mean gestation time and newborn weight in their most recent pregnancy were 38 weeks and 2967 g, respectively, the mean weight gain during the pregnancy was 12 kg, with 53% donors gaining weight since before the pregnancy and 20% losing weight (Table 1). A full description of the dietary habits and PCP utilization of the participants is available in Serrano et al. (2021) and Supplementary material (Tables S1 and S2).

Milk samples were collected at a mean of 238 (range: 20-1513) days after the birth, and most (87%) of them were collected in 2015-2017; 25% of samples were collected after a lifetime breastfeeding time of >24 months and 28% after a time of ≤6 months. The mean protein content of samples was

2.05 g/100 mL, their mean fat content was 3.83 g/100 mL, mean lactose content was 7.44 g/100 mL, and mean energy content was 68 kcal/100 mL (Table 2).

As was the element most frequently detected in milk samples (97.1%), followed by Hg (81.2%), Pb (50.6%), and Cd (38.0%). The median concentrations (5th-95th percentiles) in breast milk were 1.49 µg/L (0.56-3.50 µg/L) for As, 0.26 µg/L (<0.05-1.17 µg/L) for Hg, 0.14 µg/L (<0.10-6.31 µg/L) for Pb, and <0.04 µg/L (<0.04-0.44 µg/L) for Cd (Table 3). Weak to moderate positive correlations were observed between Pb and Cd (Spearman coefficient, $r=0.52$, $p<0.001$), between Hg and As ($r=0.27$; $p<0.001$), between Hg and Cd ($r=0.20$, $p=0.001$), and between Hg and Pb ($r=0.15$, $p=0.02$).

Linear regression models showed that concentrations of As in breast milk decreased by 32% ($(\exp^{\beta}-1)*100$) (95%CI=8-49%) in samples collected in 2017 *versus* 2015 and by 22% (95%CI=1-40%) in samples from multiparous *versus* primiparous donors (Table 4). For Hg, it was found that samples collected at >3-6 *versus* ≤3 months post-partum had 41% (95%CI=17-58%) lower concentrations; in addition, Hg

decreased by 38% (95%CI=5-59%) per each unit increase in lactose content. In contrast, donors consuming 1 sv/week of fatty fish had 68% (95%CI=6-166%) higher Hg concentrations compared to <1 sv/week; and those consuming 2 and >2 sv/week of meat compared to ≤1 sv/week showed a more than 2-fold (95%CI=34-477%) and 3-fold (95%CI=87-523%) increase in Hg, respectively (Table 4).

In logistic models, the odds of a Pb concentration above the LOD were lower for samples collected in 2017 (OR=0.38, 95%CI=0.16; 0.90) and 2018 (OR=0.15, 95%CI=0.04; 0.48) compared with 2015, and for samples from donors with an intake of ≥1 sv/week of red meat *versus* rarely/never (OR=0.23, 95%CI=0.10-0.50) and from those with an intake of 2 sv/week of eggs *versus* 1 sv/week (OR=0.38, 95%CI=0.17-0.84). The odds of Pb detection were higher for multiparous donors (OR=4.56, 95%CI=2.09-10.8), those showing an increase in weight since before the pregnancy (OR=3.15, 95%CI=1.10-9.54), and ex-smokers (OR=1.95, 95%CI=1.05-3.64). The odds of Cd>LOD were higher for donors with university education (OR=3.27, 95%CI=1.69-6.56), those with a higher intake of fried food (1 sv/week:

OR=2.94, 95%CI=1.33-6.76; >1 sv/week: OR=4.25, 95%CI=1.85-10.3 *versus* <1 sv/week), those regularly consuming canned food (OR=3.78, 95%CI=1.65-9.33), and those using hand cream once a day *versus* less frequently (OR=2.99, 95%CI=1.28-7.20); and were lower for those with a greater bread intake (1 sv/day: OR=0.18, 95%CI=0.07-0.42; >1 sv/day: OR=0.21, 95%CI=0.08-0.51 *versus* <1 sv/day).

Exclusion of As outliers led to an inverse association with lifetime breastfeeding, so that breastfeeding for >6-12 and >12-24 months *versus* ≤6 months was associated with a significant decrease in As concentration of 21% (95%CI=6-32%) and 22% (95%CI=6-36%), respectively, while As concentrations were not influenced by the parity of donors after excluding outliers (Table S3). With respect to Hg, exclusion of one outlier in breast milk concentrations did not change the results (data not shown).

4. Discussion

This study is one of the first to provide information on toxic metal concentrations in breast milk from donors in Spain. As was present in almost all pools of milk, Hg in four out of five, Pb in one out of two, and Cd in one out of three. Results suggest a trend towards a decline in Hg concentrations over the lactation period and a decline in Pb concentrations between 2015 and 2018. In addition, smoking habit, the intake of certain food items, weight change since before the pregnancy, and schooling level, among other factors, emerged as significant predictors of breast milk metal concentrations, which were not associated with the total protein content of samples.

4.1. Arsenic

Concentrations of total As in breast milk from these Spanish donors were higher than concentrations in mature milk obtained from women in Germany (Sternowsky et al., 2002), Italy, Croatia, Slovenia (Miklavčič et al., 2013), Cyprus (Kunter et al., 2017), Sweden (Björklund et al., 2012), Japan, the USA (Carignan et al., 2015), Thailand (Chao et al., 2014), the United Arab Emirates

(Abdulrazzaq et al., 2008). Total As concentrations were also higher than those found in 49 pre-concentrated and concentrated breast milk samples from a Brazilian milk bank (Oliveira et al., 2020). They were in the range of concentrations found in the milk of women from India (Samanta et al., 2007) and Bangladesh (Fängström et al., 2008; Islam et al., 2014) exposed to high levels of inorganic As in drinking water (Rebelo and Caldas, 2016), but they were lower than concentrations in primiparas from Lebanon (Bassil et al., 2018). Notably, the maximum As value in Spanish donors (56 µg/L) was higher than the maximum concentration found in milk from the highly exposed women in India (49 µg/L) (Samanta et al., 2007) and Bangladesh (8.9 and 19 µg/L) (Fängström et al., 2008; Islam et al., 2014). In addition, As concentrations in our study population were in the range of those found in the only Spanish study providing data on As in breast milk, which included 70 full-term and 100 preterm mothers recruited in Santiago de Compostela in 2018-2019 (mean=1.37 µg/L) (Mandiá et al., 2021).

The main sources of As exposure are drinking water contaminated with inorganic As and the intake of seafood and rice, which can contain elevated concentrations of organic and inorganic As, respectively (Hughes et al., 2011). As in breast milk has previously been associated with the intake of fish/seafood (Bassil et al., 2018; Miklavčič et al., 2013) and rice/cereals (Bassil et al., 2018), but these associations were not found in the present study. Organic forms of As such as monomethyl As (MMA) and dimethyl As (DMA) are much less toxic than inorganic forms such as trivalent (AsIII) and pentavalent As (AsV), which have been classified as type 1 carcinogens (IARC, 2016). AsIII is the only form of As transported by the aquaglyceroporins present in mammary glands during lactation (Liu et al., 2004; Matsuzaki et al., 2005). It has been shown that the efficient maternal methylation of inorganic As into MMA and DMA leads to a lower excretion of As *via* breast milk, because MMA and DMA in blood plasma do not easily pass through the mammary glands. For these reasons, breast milk largely contains inorganic As, mainly as AsIII (Rebelo and Caldas, 2016). Rice and seafood consumption

has been described as the major source of As exposure in Spain (Signes-Pastor et al., 2017). The specific source of exposure to As in the present donors remains unknown; however, previous studies showed that the topsoil in Southeastern Spain (including Granada province) contains relatively high concentrations of As (Núñez et al., 2016), likely attributable to past usage of phosphate fertilizers. The high occurrence of As (mainly inorganic As) in the breast milk of donors is of particular concern, given that even low concentrations of As have been shown to impair cognitive function and increase the risk of cancer in infants and young children (Rodríguez-Barranco et al., 2016; Tyler and Allan, 2014). Nonetheless, it has been suggested that exclusively breastfed infants are exposed to lower concentrations of As than are non-breastfed infants (Carignan et al., 2015; Fängström et al., 2008), indicating that exclusive breastfeeding may protect the infant from As exposure. Therefore, it is imperative to implement preventive measures to eliminate or reduce the presence of As in breast milk and to closely monitor its concentration in nursing mothers.

The decrease in As concentrations observed in multiparous donors and those with longer lifetime breastfeeding may suggest the clearance of As during lactation, but As was not associated with the post-partum time. This is consistent with a study in Bangladesh that found no difference in As concentrations in milk samples collected at 1, 6, or 9 months post-partum (Islam et al., 2014). In Portuguese and Taiwanese women, As milk concentrations were significantly higher in colostrum than in mature milk (Almeida et al., 2008; Chao et al., 2014), but these results are not comparable to the present findings because colostrum, which may have a higher concentration of metal-binding proteins, was not collected. Overall, the transport mechanism of As *via* breast milk has not been fully elucidated, and the few available data on postnatal exposure to As from breast milk are not conclusive.

4.2. Mercury

Breast milk concentrations of total Hg reported in the literature vary widely among different regions, with the highest concentrations (up to 59 µg/L) found in the Brazilian Amazon (Rebelo and Caldas, 2016). In general, Hg

concentrations in Spanish donors are comparable to those found in women from Austria (Gundacker et al., 2010), Croatia, Greece, Italy, Slovenia (Miklavčič et al., 2013; Valent et al., 2013), Sweden (Björnberg et al., 2005), Brazil (Oliveira et al., 2020), Japan (Iwai-Shimada et al., 2015; Sakamoto et al., 2012) and Iran (Behrooz et al., 2012; Okati et al., 2013), with mean/median concentrations ranging from 0.1 to 0.8 µg/L. The present concentrations are in the range of those observed in mature milk samples collected in 2003-2004 from Spanish women in Madrid (mean=0.53 µg/L) (García-Esquinas et al., 2011) and more recently in Santiago de Compostela (mean=0.31 µg/L) (Mandiá et al., 2021). They are lower than concentrations found in breast milk samples from the Faroe Islands (Needham et al., 2011), different Asian regions (China, India, Indonesia, Korea, Taiwan) (Bose-O'Reilly et al., 2008; Chien et al., 2006; Li et al., 2014; Orün et al., 2012; Vahidinia et al., 2019), the Middle East (Saudi Arabia, Iran, Turkey) (Al-Saleh et al., 2013; Orün et al., 2012; Vahidinia et al., 2019), Africa (Tanzania, Zimbabwe) (Bose-O'Reilly et al., 2008), and Latin America (Brazil, Mexico) (Cunha et al., 2013; Gaxiola-Robles et

al., 2014; Santos-Silva et al., 2018; Vieira et al., 2013); however, they are higher than concentrations observed in samples from Cyprus (Kunter et al., 2017) and the United Arab Emirates (Abdulrazzaq et al., 2008).

A significant association was observed between the intake of 1 sv/week of fatty fish and a higher Hg concentration in breast milk, consistent with the findings of a large study of samples from Croatia, Greece, Italy, and Slovenia, which found an association between fish consumption and breast milk Hg concentrations (Miklavčič et al., 2013). Other studies of women with a high or relatively high consumption of fish also reported an association of fish/seafood intake with Hg concentrations in breast milk (García-Esquinas et al., 2011; Gaxiola-Robles et al., 2013; Grandjean et al., 1995; Iwai-Shimada et al., 2015; Vollset et al., 2019). In general, the intake of fish, particularly fatty fish, is the main source of exposure to methyl-Hg (MeHg), the most neurotoxic form of Hg (Gil and Gil, 2015). It has also been shown that when fish intake is high, around one-half of breast milk Hg is in the form of MeHg (Islam et al., 2014; Miklavčič et al., 2013; Valent et al., 2013) and the other half is

in the form of inorganic Hg (Oskarsson et al., 1996). We were unable to distinguish between organic and inorganic Hg, but a significant amount of MeHg can be expected in the present milk samples because of the relatively frequent consumption of fish by the donors. This is a cause for concern, given that MeHg is almost completely absorbed by the gastrointestinal tract of infants and can readily cross the blood-brain barrier and affect neurological functions (Caserta et al., 2013; Grandjean and Landrigan, 2006), even at low doses (Karagas et al., 2012). The association of meat intake with Hg concentrations is less certain because of the limited information on Hg levels in land animals. Although Hg can also bioaccumulate in this type of animal, the meat is likely to contain low concentrations of Hg (Björnberg et al., 2005; Nawrocka et al., 2020; Vollset et al., 2019). The presence of amalgam fillings, a major source of elemental Hg exposure, was not associated with Hg excretion in these Spanish donors. Studies examining the association of amalgam fillings with Hg in breast milk have yielded conflicting results, with some showing a positive association (Björnberg et al., 2005; Vollset et al.,

2019) and others finding no relationship between them (García-Esquinas et al., 2011; Gundacker et al., 2002).

The inverse association observed between post-partum time and Hg concentration suggests a depuration of this metal during lactation, especially in the first few months. However, Hg concentrations in breast milk from Iranian (N=100) and Swedish (N=20) women remained unchanged throughout lactation (Björnberg et al., 2005; Vahidinia et al., 2019), while García-Esquinas et al. (2011) reported non-significant decreases in Hg concentrations in milk from older and multiparous women in Spain and in those with a previous history of lactation, suggesting a possible clearance of Hg over their lifetime. A decrease in Hg concentrations over the lactation period can be explained by a reduction in the milk's content of proteins such as albumin and casein, which enable the transport of both inorganic and organic Hg (Sundberg et al., 1999). Indeed, the protein content of the present donor milk samples slightly decreased with longer post-partum time (data not shown). Moreover, MeHg is a lipophilic compound, so that accumulated body stores of MeHg

would decline with longer breastfeeding time (Jain, 2013; LaKind et al., 2004). However, the depuration of lipophilic chemicals during lactation may also be influenced by the current exposure of the mother, the volume of milk consumed by the infant, and supplementation with formula or solid food, among other factors (LaKind et al., 2018). In addition, the reason for the inverse association between the lactose and Hg content of samples remains unclear.

4.3. Lead

Breast milk Pb concentrations in these Spanish donors are several times lower than concentrations described in studies published over the past two decades in Asia (Chao et al., 2014; Isaac et al., 2012; Li et al., 2000; Sharma and Pervez, 2005), the Middle East (Al-Saleh et al., 2003; Bassil et al., 2018; Vahidinia et al., 2019), South America (Counter et al., 2004; Marques et al., 2013; Oliveira et al., 2020), North America (Hanning et al., 2003; Sowers et al., 2002), and Africa (Adesiyani et al., 2011; Moussa, 2011), and they are similar to or in the lower range of those found in women from Japan (Sakamoto et al., 2012), Australia (Gulson et al., 2003), Mexico (Ettinger et

al., 2004; Ettinger et al., 2006), and various European countries (Aballe et al., 2008; Almeida et al., 2008; Gundacker et al., 2002; Kunter et al., 2017; Leotsinidis et al., 2005). In comparison to other Spanish studies, Pb concentrations in our donors are much lower than concentrations in samples collected in 2003-2004 in Madrid (mean=15.6 µg/L) (García-Esquinas et al., 2011) but comparable to those in samples recently collected in Galicia (mean=0.30 µg/L) (Mandiá et al., 2021), indicating a decline in Pb exposure in Spain after the suppression of leaded gasoline in 2001 (RealDecreto403, 2000). In this line, a decreasing trend in breast milk Pb concentrations was observed in the present donors over the period under study (2015-2018).

Diet is considered the major source of Pb exposure for the general population, particularly the intake of vegetables and cereals (Martí-Cid et al., 2008), and breast milk Pb concentrations have been associated with the intake of potatoes in Spanish (García-Esquinas et al., 2011) and Lebanese mothers (Bassil et al., 2018). No food item was found to predict Pb excretion in the present milk samples, probably due to the low Pb

concentrations, while the intake of red meat and eggs was associated with lower breast milk Pb. However, these results should be interpreted with caution, given that much of the Pb in breast milk comes from Pb stored in the bones and not from the exposure of mothers during lactation. Pb is also found in cigarette smoke (Bernhard et al., 2005) which may explain the higher odds of detectable Pb in breast milk from former smokers *versus* never smokers. Similar results were reported by the Lebanese and Spanish studies (Bassil et al., 2018; García-Esquinas et al., 2011; Mandiá et al., 2021).

Pb excreted into breast milk is mainly found in the casein fraction (Chao et al., 2014; Ettinger et al., 2006; Leotsinidis et al., 2005; Oskarsson et al., 1996) and, when bone Pb levels are not high, breast milk concentrations generally decline over the course of lactation due to the decrease in casein content (Chao et al., 2014; Ettinger et al., 2006; Leotsinidis et al., 2005). The lack of an association between Pb and post-partum time in the present study may be explained by the low Pb concentrations. The reason for the higher Pb concentrations found in multiparous donors is not clear; while a

possible explanation for the higher concentrations in mothers gaining weight since before the pregnancy is that this weight gain would increase the release of Pb from bone deposits, because a low calcium intake has been previously related to obesity and weight gain (Lappe et al., 2017).

4.4. Cadmium

Most of the donors in our study had Cd below the LOD, and concentrations were far below the range of those reported for mothers worldwide (Cherkani-Hassani et al., 2017; Rebelo and Caldas, 2016, Oliveira et al., 2020), only being comparable to those described in a few European studies (Björklund et al., 2012; Kantol and Vartiainen, 2001; Vollset et al., 2019) and Iran (Vahidinia et al., 2019). In fact, the concentrations in our donors were several times lower than in previous Spanish studies, which reported mean concentrations of 1.31 µg/L (García-Esquinas et al., 2011) and 0.15 µg/L (Mandiá et al., 2021).

Maternal smoking has been associated with Cd concentrations in breast milk in previous studies (Bassil et al., 2018; García-Esquinas et al., 2011; Gundacker et al., 2007), but no

significant association was observed between detectable Cd in breast milk and smoking habit, most likely due to the lack of current smokers and the low Cd concentrations among the donor mothers. Non-smokers are mainly exposed to Cd through their intake of foods such as cereals, tubers, green leafy vegetables, fruit, nuts, pulses, fish, and shellfish (Gundacker et al., 2007; Leotsinidis et al., 2005; Martí-Cid et al., 2008). In the present study, Cd concentrations were not associated with the intake of any of these food items but were higher in mothers with a university education which may be due to a higher intake of foods containing Cd. In line to the present findings, Vahidinia et al. (2019) found no association between low Cd concentrations in breast milk and the intake of vegetable and fruit. The positive associations with the intake of fried and canned food and the inverse association with bread intake should be interpreted with caution, because these novel findings may be affected by imprecision due to the low Cd concentrations. Finally, hand cream use was associated with Cd, and several studies have demonstrated the presence of toxic elements, including

Cd, Pb, Hg, and As, in cosmetics products such as lipstick and eye cosmetics (Mesko et al., 2020). Toxic metals may be retained as impurities in the raw materials used in the cosmetics or released from the metallic devices used during their production (Bocca et al., 2014). However, further research is needed to elucidate the potential exposure to toxic metals from cosmetics and other PCPs.

4.5. Limitations and strengths

This study has a number of limitations. First, the milk donors are more homogeneous in terms of socioeconomic profile than are lactating women in general (*e.g.*, most donors had a university education and were non-manual workers); therefore, the study findings cannot be generalized to breastfeeding women in the general population. Second, only total Hg and As were determined, limiting the capacity to identify more specific sources of exposure. Third, bias may have resulted from a misreporting of dietary intake and other factors. It is also possible that their diet might have changed with respect to the 12 months before their first donation, the reference period for the dietary questionnaire. Nevertheless,

misclassification is unlikely to be related to breast milk metal concentrations. Another limitation is that the large number of explanatory factors assessed may have generated some spurious statistically significant associations. Finally, the possibility of metal contamination cannot be excluded, as no special provisions during the pooling or processing of the milk were taken to avoid metal contamination.

Current knowledge on the presence of toxic metals in breast milk is generally based on a small number of samples; however, a large number were obtained longitudinally from donors in the present investigation, allowing exploration of the variation in concentrations over the lactation period. A further study strength is the assessment of pooled milk samples (over 1-4 weeks), given that the composition of breast milk and, therefore, its toxic metal concentrations, can change during a feeding session, at different times of day, and from day to day due to variations in the mother's dietary intake, among other factors. Hence, the evaluation of pooled samples may reduce the risk of exposure misclassification in comparison to the

measurement of metal concentrations in spot breast milk samples.

It is important to note that the mere presence of the studied metals in breast milk does not necessarily imply a health risk for the breastfeeding infant. Nevertheless, breast milk donated to milk banks is supplied to highly vulnerable preterm infants, and preventive measures are required to avoid their exposure to metals from this source. Recommendations should be especially targeted at ensuring healthy habits in milk donors, including the maintenance of optimal calcium and iron intakes and the limited consumption of fatty fish during pregnancy and breastfeeding.

5. Conclusion

Toxic metals/metalloids such as Pb, Hg, Cd, and As continue to pose a public health threat worldwide. In this study, 97 and 81% of pooled donor breast milk samples had detectable concentrations of As and Hg, respectively, while 51 and 38% had detectable concentrations of Pb and Cd. Given the extreme vulnerability of preterm infants, it is essential to closely monitor concentrations of toxic metals in donor breast milk and to develop

appropriate measures to reduce their exposure to these chemicals and avoid unnecessary risks.

Acknowledgements

This research would not have been achieved without the selfless collaboration of the donors who took part in the study. The authors gratefully acknowledge editorial assistance from Richard Davies and technical assistance in metal analysis from J. Santiago-Rodríguez. The authors are also grateful to the ISCIII and the FEDER (SCIII/FEDER) for the Miguel Servet Type I Program granted to C. Freire (grant no. MS16/00085), the predoctoral research contract granted to L.M. Iribarne-Durán (FI17/00316), and the José María Segovia de Arana contract granted to N. Olea (INT18/00060). This paper is part of the PhD thesis developed by Laura Serrano in the context of the “Clinical Medicine and Public Health Program” of the University of Granada. The funders had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no actual or potential competing financial interests.

Highlights

1. Arsenic was detected in almost all breast milk samples at relatively high levels
2. Mercury was detected in 81% of samples at moderate levels
3. Low lead and cadmium levels were detected in 50% and 38% of samples, respectively.
4. There was a trend towards a decline in Hg levels over the lactation period
5. Smoking and certain food items were associated with metal levels

References

- Abballe A, Ballard TJ, Dellatte E, di Domenico A, Ferri F, Fulgenzi AR, et al. Persistent environmental contaminants in human milk: concentrations and time trends in Italy. *Chemosphere* 2008; 73: S220-7.
- Abdulrazzaq YM, Osman N, Nagelkerke N, Kosanovic M, Adem A. Trace element composition of plasma and breast milk of well-nourished women. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2008; 43: 329-34.
- Adesiyan A, Akiibinu M, Olisekodiaka M, Onuegbu A, Adeyeye A. Concentrations of some biochemical parameters in breast milk of a population of Nigerian nursing mothers using hormonal contraceptives. *Pak J Nutr* 2011; 10: 249-253.
- Al-Saleh I, Abduljabbar M, Al-Rouqi R, Elkhatib R, Alshabbaheen A, Shinwari N. Mercury (Hg) exposure in breast-fed infants and their mothers and the evidence of oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 2013; 153: 145-54.
- Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A. Heavy metal concentrations in the breast milk of Saudi women. *Biol Trace Elem Res* 2003; 96: 21-37.
- Almeida AA, Lopes CM, Silva AM, Barrado E. Trace elements in human milk: correlation with blood levels, inter-element correlations and changes in concentration during the first month of lactation. *J Trace Elem Med Biol* 2008; 22: 196-205.
- Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013; 60: 49-74.
- Bassil M, Daou F, Hassan H, Yamani O, Kharm JA, Attieh Z, et al. Lead, cadmium and arsenic in human milk and their socio-demographic and lifestyle determinants in Lebanon. *Chemosphere* 2018; 191: 911-921.
- Behrooz RD, Esmaili-Sari A, Peer FE, Amini M. Mercury concentration in the breast milk of Iranian women. *Biol Trace Elem Res* 2012; 147: 36-43.

- Bernhard D, Rossmann A, Wick G. Metals in cigarette smoke. *IUBMB Life* 2005; 57: 805-9.
- Björklund KL, Vahter M, Palm B, Grandér M, Lignell S, Berglund M. Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers: a biological monitoring study. *Environ Health* 2012; 11: 92.
- Björnberg KA, Vahter M, Berglund B, Niklasson B, Blennow M, Sandborgh-Englund G. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1381-5.
- Bocca B, Pino A, Alimonti A, Forte G. Toxic metals contained in cosmetics: a status report. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014; 68: 447-67.
- Bose-O'Reilly S, Lettmeier B, Roider G, Siebert U, Drasch G. Mercury in breast milk - a health hazard for infants in gold mining areas? *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211: 615-23.
- Carignan CC, Cottingham KL, Jackson BP, Farzan SF, Gandolfi AJ, Punshon T, et al. Estimated exposure to arsenic in breastfed and formula-fed infants in a United States cohort. *Environ Health Perspect* 2015; 123: 500-6.
- Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M. Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 2198-206.
- Counter SA, Buchanan LH, Ortega F. Current pediatric and maternal lead levels in blood and breast milk in Andean inhabitants of a lead-glazing enclave. *J Occup Environ Med* 2004; 46: 967-73.
- Cunha LR, Costa TH, Caldas ED. Mercury concentration in breast milk and infant exposure assessment during the first 90 days of lactation in a midwestern region of Brazil. *Biol Trace Elem Res* 2013; 151: 30-7.
- Chao HH, Guo CH, Huang CB, Chen PC, Li HC, Hsiung DY, et al. Arsenic, cadmium, lead, and aluminium concentrations in human milk at early stages of lactation. *Pediatr Neonatol* 2014; 55: 127-34.
- Cherkani-Hassani A, Ghanname I, Mouane N. Assessment of cadmium levels in human breast

- milk and the affecting factors: A systematic review, 1971-2014. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 2377-2391.
- Cherkani-Hassani A, Ghanname I, Mouane N. Total, organic, and inorganic mercury in human breast milk: levels and maternal factors of exposure, systematic literature review, 1976-2017. *Crit Rev Toxicol* 2019; 49: 110-121.
- Chien LC, Yeh CY, Lee HC, Jasmine Chao H, Shieh MJ, Han BC. Effect of the mother's consumption of traditional Chinese herbs on estimated infant daily intake of lead from breast milk. *Sci Total Environ* 2006; 354: 120-6.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2009; 30: 293-342.
- Esteban-Vasallo MD, Aragonés N, Pollan M, López-Abente G, Perez-Gomez B. Mercury, cadmium, and lead levels in human placenta: a systematic review. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 1369-77.
- Ettinger AS, Téllez-Rojo MM, Amarasiriwardena C, González-Cossío T, Peterson KE, Aro A, et al. Levels of lead in breast milk and their relation to maternal blood and bone lead levels at one month postpartum. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 926-31.
- Ettinger AS, Téllez-Rojo MM, Amarasiriwardena C, Peterson KE, Schwartz J, Aro A, et al. Influence of maternal bone lead burden and calcium intake on levels of lead in breast milk over the course of lactation. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 48-56.
- Fängström B, Moore S, Nermell B, Kuenstl L, Goessler W, Grandér M, et al. Breast-feeding protects against arsenic exposure in Bangladeshi infants. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 963-9.
- García-Esquinas E, Pérez-Gómez B, Fernández MA, Pérez-Meixeira AM, Gil E, de Paz C, et al. Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and

- sociodemographic variables in Madrid (Spain). *Chemosphere* 2011; 85: 268-76.
- Gaxiola-Robles R, Labrada-Martagón V, Celis de la Rosa Ade J, Acosta-Vargas B, Méndez-Rodríguez LC, Zenteno-Savín T. Interaction between mercury (Hg), arsenic (As) and selenium (Se) affects the activity of glutathione S-transferase in breast milk; possible relationship with fish and sellfish intake. *Nutr Hosp* 2014; 30: 436-46.
- Gaxiola-Robles R, Zenteno-Savín T, Labrada-Martagón V, Celis de la Rosa Ade J, Acosta Vargas B, Méndez-Rodríguez LC. [Mercury concentration in breast milk of women from northwest Mexico; possible association with diet, tobacco and other maternal factors]. *Nutr Hosp* 2013; 28: 934-42.
- Gil A, Gil F. Fish, a Mediterranean source of n-3 PUFA: benefits do not justify limiting consumption. *Br J Nutr* 2015; 113 Suppl 2: S58-67.
- Gil F, Hernández AF. Toxicological importance of human biomonitoring of metallic and metalloid elements in different biological samples. *Food Chem Toxicol* 2015; 80: 287-297.
- Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006; 368: 2167-78.
- Grandjean P, Weihe P, Needham LL, Burse VW, Patterson DG, Jr., Sampson EJ, et al. Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environ Res* 1995; 71: 29-38.
- Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation--a summary of long-term research. *Sci Total Environ* 2003; 303: 79-104.
- Gundacker C, Fröhlich S, Graf-Rohrmeister K, Eibenberger B, Jessenig V, Gicic D, et al. Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Sci Total Environ* 2010; 408: 5744-9.
- Gundacker C, Pietschnig B, Wittmann KJ, Lischka A, Salzer H, Hohenauer L, et al. Lead and mercury in breast

- milk. *Pediatrics* 2002; 110: 873-8.
- Gundacker C, Pietschnig B, Wittmann KJ, Salzer H, Stöger H, Reimann-Dorninger G, et al. Smoking, cereal consumption, and supplementation affect cadmium content in breast milk. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007; 17: 39-46.
- Gundacker C, Zödl B. Heavy Metals in Breast Milk: Implications for Toxicity, 2005, pp. 1-28.
- Hanning RM, Sandhu R, MacMillan A, Moss L, Tsuji LJ, Nieboer E. Impact on blood Pb levels of maternal and early infant feeding practices of First Nation Cree in the Mushkegowuk Territory of northern Ontario, Canada. *J Environ Monit* 2003; 5: 241-5.
- Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* 2011; 123: 305-32.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Classified by the IARC Monographs. 2016.
- Isaac CP, Sivakumar A, Kumar CR. Lead levels in breast milk, blood plasma and intelligence quotient: a health hazard for women and infants. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 88: 145-9.
- Islam MR, Attia J, Alauddin M, McEvoy M, McElduff P, Slater C, et al. Availability of arsenic in human milk in women and its correlation with arsenic in urine of breastfed children living in arsenic contaminated areas in Bangladesh. *Environ Health* 2014; 13: 101.
- Iwai-Shimada M, Satoh H, Nakai K, Tatsuta N, Murata K, Akagi H. Methylmercury in the breast milk of Japanese mothers and lactational exposure of their infants. *Chemosphere* 2015; 126: 67-72.
- Jain RB. Effect of pregnancy on the levels of blood cadmium, lead, and mercury for females aged 17-39 years old: data from National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010. *J Toxicol Environ Health A* 2013; 76: 58-69.
- Kantol M, Vartiainen T. Changes in selenium, zinc, copper and cadmium contents in human milk during the time when

- selenium has been supplemented to fertilizers in Finland. *J Trace Elem Med Biol* 2001; 15: 11-7.
- Karagas MR, Choi AL, Oken E, Horvat M, Schoeny R, Kamai E, et al. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 799-806.
- Kunter İ, Hürer N, Gülcan HO, Öztürk B, Doğan İ, Şahin G. Assessment of Aflatoxin M1 and Heavy Metal Levels in Mothers Breast Milk in Famagusta, Cyprus. *Biol Trace Elem Res* 2017; 175: 42-49.
- Labbok MH. Effects of breastfeeding on the mother. *Pediatr Clin North Am* 2001; 48: 143-58.
- LaKind JS, Amina Wilkins A, Berlin CM, Jr. Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 184-208.
- LaKind JS, Lehmann GM, Davis MH, Hines EP, Marchitti SA, Alcalá C, et al. Infant Dietary Exposures to Environmental Chemicals and Infant/Child Health: A Critical Assessment of the Literature. *Environ Health Perspect* 2018; 126: 96002.
- Lappe JM, McMahon DJ, Laughlin A, Hanson C, Desmangles JC, Begley M, et al. The effect of increasing dairy calcium intake of adolescent girls on changes in body fat and weight. *Am J Clin Nutr* 2017; 105: 1046-1053.
- Lawrence RA. Breastfeeding: benefits, risks and alternatives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12: 519-24.
- Leotsinidis M, Alexopoulos A, Kostopoulou-Farri E. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: association with dietary habits and other factors. *Chemosphere* 2005; 61: 238-47.
- Li MM, Wu MQ, Xu J, Du J, Yan CH. Body burden of Hg in different bio-samples of mothers in Shenyang city, China. *PLoS One* 2014; 9: e98121.
- Li PJ, Sheng YZ, Wang QY, Gu LY, Wang YL. Transfer of lead via placenta and breast milk in human. *Biomed Environ Sci* 2000; 13: 85-9.

- Liu Z, Carbrey JM, Agre P, Rosen BP. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1178-85.
- Mandiá N, Bermejo-Barrera P, Herbello P, López-Suárez O, Fraga JM, Fernández-Pérez C, et al. Human Milk Concentrations of Minerals, Essential and Toxic Trace Elements and Association with Selective Medical, Social, Demographic and Environmental Factors. *Nutrients* 2021; 13.
- Marques RC, Moreira Mde F, Bernardi JV, Dórea JG. Breast milk lead concentrations of mothers living near tin smelters. *Bull Environ Contam Toxicol* 2013; 91: 549-54.
- Martí-Cid R, Llobet JM, Castell V, Domingo JL. Dietary intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by the population of Catalonia, Spain. *Biol Trace Elem Res* 2008; 125: 120-32.
- Matsuzaki T, Machida N, Tajika Y, Ablimit A, Suzuki T, Aoki T, et al. Expression and immunolocalization of water-channel aquaporins in the rat and mouse mammary gland. *Histochem Cell Biol* 2005; 123: 501-12.
- Mead MN. Contaminants in human milk: weighing the risks against the benefits of breastfeeding. *Environ Health Perspect* 2008; 116: A427-34.
- Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Juárez N, Martínez-García MJ, García-Sánchez A, et al. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ Health* 2011; 10: 6.
- Mesko MF, Novo DR, Costa VC, Henn AS, Flores EMM. Toxic and potentially toxic elements determination in cosmetics used for make-up: A critical review. *Anal Chim Acta* 2020; 1098: 1-26.
- Miklavčič A, Casetta A, Snoj Tratnik J, Mazej D, Krsnik M, Mariuz M, et al. Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ Res* 2013; 120: 7-17.

- Moussa W. Determination of lead and cadmium in human milk and measure some of its composition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2011; 5: 236.
- Nawrocka A, Durkalec M, Szkoda J, Filipek A, Kmiecik M, Żmudzki J, et al. Total mercury levels in the muscle and liver of livestock and game animals in Poland, 2009-2018. *Chemosphere* 2020; 258: 127311.
- Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, Jørgensen PJ, Nielsen F, Patterson DG, Jr., et al. Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 1121-6.
- Núñez O, Fernández-Navarro P, Martín-Méndez I, Bel-Lan A, Locutura JF, López-Abente G. Arsenic and chromium topsoil levels and cancer mortality in Spain. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; 23: 17664-75.
- Okati N, Sari A, Ghasempouri S. Evaluation of mercury pollution in breast milk and Iranian infants' hair. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 2013; 4: 2857-2864.
- Oliveira MM, Trevilato TMB, Segura-Muñoz SI, Aragon DC, Alves LG, Nadal M, Marquès M, Domingo JL, Sierra J, Camelo JS Jr. Essential and toxic elements in human milk concentrate with human milk lyophilizate: A preclinical study. *Environ Res* 2020; 188: 109733.
- Orün E, Yalçın SS, Aykut O, Orhan G, Koç-Morgil G, Yurdakök K, et al. Mercury exposure via breast-milk in infants from a suburban area of Ankara, Turkey. *Turk J Pediatr* 2012; 54: 136-43.
- Oskarsson A, Schültz A, Skerfving S, Hallén IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch Environ Health* 1996; 51: 234-41.
- RealDecreto403. de 24 de marzo, por el que se prohíbe la comercialización de gasolinas con plomo. 2000.
- Rebelo FM, Caldas ED. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks

- for breastfed infants. *Environ Res* 2016; 151: 671-688.
- Rodríguez-Barranco M, Gil F, Hernández AF, Alguacil J, Lorca A, Mendoza R, et al. Postnatal arsenic exposure and attention impairment in school children. *Cortex* 2016; 74: 370-82.
- Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kubota M, Murata K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 84: 179-84.
- Samanta G, Das D, Mandal BK, Chowdhury TR, Chakraborti D, Pal A, et al. Arsenic in the breast milk of lactating women in arsenic-affected areas of West Bengal, India and its effect on infants. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2007; 42: 1815-25.
- Santos-Silva AP, de Moura EG, Pinheiro CR, Oliveira E, Lisboa PC. Short-Term and Long-Term Effects of Bisphenol A (BPA) Exposure During Breastfeeding on the Biochemical and Endocrine Profiles in Rats. *Horm Metab Res* 2018; 50: 491-503.
- Serrano L, Iribarne-Durán LM, Suárez B, Artacho-Cordón F, Vela-Soria F, Peña-Caballero M, et al. Concentrations of perfluoroalkyl substances in donor breast milk in Southern Spain and their potential determinants. *Int J Hyg Environ Health* 2021; 236: 113796.
- Sharma R, Pervez S. Toxic metals status in human blood and breast milk samples in an integrated steel plant environment in Central India. *Environ Geochem Health* 2005; 27: 39-45.
- Signes-Pastor AJ, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Carey M, García de la Hera M, Sunyer J, et al. Concentrations of urinary arsenic species in relation to rice and seafood consumption among children living in Spain. *Environ Res* 2017; 159: 69-75.
- Solomon GM, Weiss PM. Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability. *Environ Health Perspect* 2002; 110: A339-47.
- Sowers MR, Scholl TO, Hall G, Jannausch ML, Kemp FW, Li X, et al. Lead in

- breast milk and maternal bone turnover. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 770-6.
- Sternowsky HJ, Moser B, Szadkowsky D. Arsenic in breast milk during the first 3 months of lactation. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205: 405-9.
- Sundberg J, Ersson B, Lönnerdal B, Oskarsson A. Protein binding of mercury in milk and plasma from mice and man--a comparison between methylmercury and inorganic mercury. *Toxicology* 1999; 137: 169-84.
- Tyler CR, Allan AM. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Curr Environ Health Rep* 2014; 1: 132-147.
- Vahidinia A, Samiee F, Faradmali J, Rahmani A, Taravati Javad M, Leili M. Mercury, Lead, Cadmium, and Barium Levels in Human Breast Milk and Factors Affecting Their Concentrations in Hamadan, Iran. *Biol Trace Elem Res* 2019; 187: 32-40.
- Vahter M, Berglund M, Akesson A, Lidén C. Metals and women's health. *Environ Res* 2002; 88: 145-55.
- Valent F, Mariuz M, Bin M, Little D, Mazej D, Tognin V, et al. Associations of prenatal mercury exposure from maternal fish consumption and polyunsaturated fatty acids with child neurodevelopment: a prospective cohort study in Italy. *J Epidemiol* 2013; 23: 360-70.
- Vieira SM, de Almeida R, Holanda IB, Mussy MH, Galvão RC, Crispim PT, et al. Total and methylmercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and in villages along the Rio Madeira, Amazon, Brazil. *Int J Hyg Environ Health* 2013; 216: 682-9.
- Vollset M, Iszatt N, Enger Ø, Gjengedal ELF, Eggesbø M. Concentration of mercury, cadmium, and lead in breast milk from Norwegian mothers: Association with dietary habits, amalgam and other factors. *Sci Total Environ* 2019; 677: 466-473

Table 1. Maternal characteristics and reproductive factors, n=83 milk donors

Variables	n (%)	Mean (range)
Maternal characteristics		
Age (years)		33 (19-47)
University education	51 (61.4)	
Occupation		
Unemployed	5 (6.2)	
Manual worker	24 (28.9)	
Non-manual worker	54 (65.1)	
Area of residence		
Rural	24 (28.9)	
Sub-urban	24 (28.9)	
Urban	35 (42.2)	
Living near agricultural land	40 (51.3)	
Living near greenhouse	14 (17.9)	
Living near industrial activity	61 (78.2)	
Ex-smoker	39 (47.0)	
Current BMI (kg/m ²)		23.67 (17.30-36.09)
Overweight/obese	26 (31.3)	
Amalgam dental filling	8 (9.6)	
Reproductive factors[†]		
Multiparous	38 (45.8)	
Length of gestation (weeks)		38 (26-41)
Birth weight (g)		2932 (840-4500)
Weight gain during pregnancy (kg)		12 (1-36)
Weight change from before pregnancy		
Weight loss	17 (20.5)	
Weight gain	44 (53.0)	
No weight change	22 (26.5)	

BMI: Body mass index.

[†]Reproductive data relative to the most recent pregnancy and before the first donation. None of the donors were or became pregnant during subsequent donations.

Table 2. Characteristics of pooled milk samples (n=242)

Variables	n (%)	Mean (range)
Year of sample collection		
2015	70 (28.9)	
2016	79 (32.6)	
2017	61 (25.2)	
2018	31 (13.8)	
Post-partum time (days)		238 (20-1513)
Post-partum time (months)		
≤3	60 (24.8)	
>3-6	54 (22.3)	
>6-9	57 (23.6)	
>9	71 (29.3)	
Lifetime duration of breastfeeding (months)		
≤6	67 (27.7)	17.2 (0.7-77.3)
>6-12	68 (28.1)	
>12-24	46 (19.0)	
>24	61 (25.2)	
Nutritional parameters		
Total proteins (g/100 mL)		2.05 (0.20-96.0)
Total lipids (g/100 mL)		3.83 (1.05-33.0)
Lactose (g/100 mL)		7.44 (6.10-8.10)
Calories (kcal/100 mL)		68 (44-117)

Table 3. Concentrations of metal(oid)s in breast milk ($\mu\text{g/L}$)

	LOD	% >LOD	Percentiles					Max.
			5	25	50	75	95	
Individual* sample concentrations (n=242 samples)								
As	0.4	97.1	0.563	1.073	1.494	1.989	3.501	56.52
Hg	0.05	81.2	<0.05 [†]	0.080	0.261	0.538	1.174	2.428
Pb	0.10	50.6	<0.10 [†]	<0.10 [†]	0.138	1.250	6.315	49.32
Cd	0.04	38.0	<0.04 [†]	<0.04 [†]	<0.04 [†]	0.070	0.442	4.936
Mean concentrations per donor (n=83 donors)								
As	0.4	-	0.596	1.160	1.660	1.981	7.582	52.17
Hg	0.05	-	<0.05 [†]	0.151	0.277	0.529	1.134	1.515
Pb	0.10	-	<0.10 [†]	<0.10 [†]	0.220	1.138	6.013	24.70
Cd	0.04	-	<0.04 [†]	<0.04 [†]	<0.04 [†]	0.093	0.480	1.860
LOD: Limit of detection								
*Pools of milk samples								

Table 4. Mixed-effects linear regression models for predictors of concentrations of As and Hg in pooled breast milk.

As (n=242 samples from 83 donors)		Hg (n=228 samples from 78 donors)			
Explanatory variables	Exp(β)	95%CI	Explanatory variables	Exp(β)	95%CI
Year of collection (ref: 2015)			Post-partum time (ref: ≤ 3 months)		
2016	0.78	0.59; 1.02*	>3-6 months	0.59	0.42; 0.83**
2017	0.68	0.51; 0.92**	>6-9 months	0.80	0.55; 1.15
2018	0.96	0.65; 1.42	>9 months	0.86	0.60; 1.23
Multiparous vs. primiparous	0.78	0.60; 0.99**	Lactose content (g/100 mL)	0.62	0.41; 0.95**
			Fatty fish intake (ref: < 1 sv/week)		
			1 sv/week	1.68	1.06; 2.66**
			>1 sv/week	1.40	0.77; 2.53
			Meat intake (ref: ≤ 1 sv/week)		
			2 sv/week	2.79	1.34; 5.77**
			>2 sv/week	3.42	1.87; 6.23***

***p<0.001; ** p<0.05; *p<0.10

Table 5. Mixed-effects logistic regression models for predictors of Pb and Cd in pooled breast milk (n=228 from 78 donors).

Explanatory variables	Detected Pb 113 out of 228 samples (49.6%) >LOD			Detected Cd 88 out of 228 samples (38.6%) >LOD		
	OR	95%CI		OR	95%CI	
Year of collection (ref: 2015)						
2016	0.56	0.23; 1.34	University vs. lower schooling level	3.27	1.69; 6.56***	
2017	0.38	0.16; 0.90**	Bread intake (ref: <1 sv/day)			
2018	0.15	0.04; 0.48**	1 sv/day	0.18	0.07; 0.42***	
Multiparous vs. primiparous	4.56	2.09; 10.8***	>1 sv/day	0.21	0.08; 0.51***	
Weight change (ref: no change)			Fried food intake (ref: <1 sv/week)			
Weight gain	3.15	1.10; 9.54**	1 sv/week	2.94	1.33; 6.76**	
Weight loss	1.39	0.57; 3.40	>1 sv/week	4.25	1.85; 10.3***	
Ex-smoker vs. never smoker	1.95	1.05; 3.64**	Canned food intake (ever vs. never)	3.78	1.65; 9.33**	
Red meat intake (ref: never)			Hand cream (ref: <once a day)			
<1 sv/week	1.56	0.69; 3.53	once a day	2.99	1.28; 7.20**	
≥1 sv/week	0.23	0.10; 0.50***	>once a day	1.37	0.53; 3.47	
Eggs intake (ref: 1 sv/week)						
2 sv/week	0.38	0.17; 0.84**				
>2 sv/week	1.32	0.56; 3.14				

LOD: Limit of detection.

***p<0.001; **p<0.05; *p<0.01

5.4. Resultado objetivo 4. Determinar las concentraciones de aluminio, antimonio y litio en muestras repetidas de leche materna donada al BLH, identificando posibles determinantes de la exposición

CONCENTRATIONS AND PREDICTORS OF ALUMINUM, ANTIMONY, AND LITHIUM IN BREAST MILK: A REPEATED-MEASURES STUDY OF DONORS

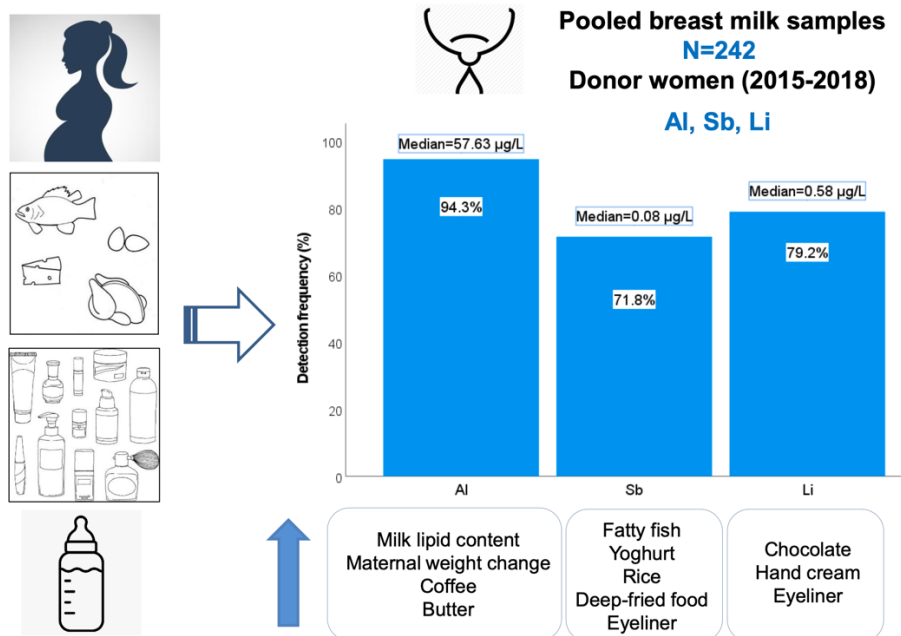
Carmen Freire, Luz Maria Iribarne-Durán, Fernando Gil, Pablo Olmedo, **Laura Serrano-Lopez**, Manuela Peña-Caballero, José-Antonio Hurtado-Suazo, Nelva E. Alvarado-González, Mariana F. Fernández, Francisco M. Peinado, Francisco Artacho-Cordón, Nicolás Olea

Environmental Pollution

En revision. Fecha de envío: 24 Junio 2022

Factor de Impacto 9,988 Cuartil Q1

ABSTRACT GRÁFICO



RESUMEN

El aluminio (Al), el antimonio (Sb) y el litio (Li) son metales tóxicos relativamente comunes que pueden transferirse a la leche materna y, potencialmente, al lactante. Este estudio evaluó las concentraciones de Al, Sb y Li en muestras de leche materna recogidas de madres donantes y exploró los factores predictivos de estas concentraciones. Se recogieron 242 muestras de leche materna en diferentes momentos del posparto de 83 donantes en España (2015-2018) y se analizaron las concentraciones de Al, Sb y Li. Se utilizó regresión lineal con efectos mixtos para investigar la asociación entre las concentraciones de estos elementos en la leche materna y el perfil sociodemográfico de las mujeres, sus hábitos dietéticos y la utilización de productos de cuidado personal (PCP), el intervalo posparto y las características nutricionales de las muestras de leche, entre otros factores. Se detectó Al en el 94% de las muestras, con una concentración media de 57,63 µg/L. El Sb y el Li se detectaron en el 72% y el 79% de las muestras con concentraciones medias de 0,08 µg/L y 0,58 µg/L, respectivamente. Las concentraciones de Al, Sb y Li no se asociaron con el tiempo posparto. El Al se asoció positivamente con el contenido total de lípidos de las muestras, el cambio de peso desde antes del embarazo y la ingesta de café y mantequilla, e inversamente con la ingesta de carne. Li se asoció positivamente con la ingesta de chocolate y el uso de crema facial y lápiz de ojos, e inversamente con el año de recogida de la muestra, la ingesta de huevos, pan y pasta, y el uso de crema de manos. Sb se asoció positivamente con la ingesta de pescado graso, yogur, arroz y alimentos fritos y el uso de lápiz de ojos, e inversamente con la ingesta de huevo y cereales y el uso de sombra de ojos. Este estudio muestra que el Sb y el Li, y especialmente el Al, están ampliamente presentes en las muestras de leche materna de las donantes. Sus concentraciones en las muestras de leche se asociaron con hábitos dietéticos, pero también con el contenido en lípidos de las muestras y al uso de ciertos PCP.

ABSTRACT

Aluminum (Al), antimony (Sb), and lithium (Li) are relatively common toxic metal(oid)s that can be transferred into breast milk and potentially to the nursing infant. This study assessed concentrations of Al, Sb, and Li in breast milk samples collected from donor mothers and explored the predictors of these concentrations. Two hundred forty-two pooled breast milk samples were collected at different times post-partum from 83 donors in Spain (2015-2018) and analyzed for Al, Sb, and Li concentrations. Mixed-effect linear regression was used to investigate the association of breast milk concentrations of these elements with the sociodemographic profile of the women, their dietary habits and utilization of personal care products (PCPs), the post-partum interval, and the nutritional characteristics of milk samples, among other factors. Al was detected in 94% of samples, with a median concentration of 57.63 µg/L. Sb and Li were detected in 72% and 79% of samples at median concentrations of 0.08 µg/L and 0.58 µg/L, respectively. Concentrations of Al, Sb, and Li were not associated with post-partum time. Al was positively associated with total lipid content of samples, weight change since before pregnancy, and coffee and butter intakes and inversely with meat intake. Li was positively associated with intake of chocolate and use of face cream and eyeliner and inversely with year of sample collection, egg, bread, and pasta intakes, and use of hand cream. Sb was positively associated with fatty fish, yoghurt, rice, and deep-fried food intakes and use of eyeliner and inversely with egg and cereal intakes and use of eyeshadow. This study shows that Al, Sb, and Li, especially Al, are widely present in donor breast milk samples. Their concentrations in the milk samples were most frequently associated with dietary habits but also with the lipid content of samples and the use of certain PCPs.

Keywords: aluminum; antimony; lithium; metals; breast milk; human milk bank

1. Introduction

Breast milk is the optimal source of nutrition for infant growth and is also rich in antibodies that are the first source of immunity in the intestinal tract of the newborn (Lessen and Kavanagh, 2015). When preterm or low birth weight infants cannot receive milk from their own mothers, pasteurized human milk from a milk bank is considered the next best option (AAP, 2012). Nevertheless, breast milk is a potential route of exposure to toxic metals and other environmental chemicals for nursing infants due to past or current maternal exposure (Gil and Hernández, 2015; Rebelo and Caldas, 2016). The presence of mercury (Hg), lead (Pb), arsenic (As), and cadmium (Cd) in breast milk samples is well documented worldwide (Rebelo and Caldas, 2016). However, only limited data are available on breast milk concentrations of other relatively common toxic metal(oid)s, including aluminum (Al), antimony (Sb), and lithium (Li).

Al is the most abundant metal in the earth's crust and is therefore a natural component of drinking water

and foodstuffs. It is also present in numerous manufactured goods, including electrical equipment, materials in contact with food (*e.g.*, pots, pans, and drink containers), pharmaceuticals, personal care products (PCPs) (*e.g.*, antiperspirants), and infant vaccines (Dórea and Marques, 2010; Krewski et al., 2007; Sanajou et al., 2021). Food intake and PCP utilization are considered the most important sources of human exposure to Al (Sanajou et al., 2021; Sander et al., 2018; Wong et al., 2010), which is known to be a neurotoxic metal with estrogenic and genotoxic potential (Darbre, 2006; Exley, 2014). Human exposure to Al has been associated with Parkinson disease and other neurodegenerative disorders (Ullah et al., 2021) as well as breast cancer (Darbre et al., 2013). The few studies on Al concentrations in breast milk (Chao et al., 2014; Mannello et al., 2009; Taravati Javad et al., 2018) have included two investigations in Spain (Fernandez-Lorenzo et al., 1999; Motas et al., 2021). In one study, Al concentrations were found to be several-fold higher in breast milk than in maternal blood (Mannello

et al., 2009), suggesting that breast milk is a major pathway of Al excretion.

The metalloid Sb is mainly present in the environment in two states of oxidation as Sb(III) and Sb(V). Sources of environmental Sb include natural events and human activities, notably emissions from mining, smelting, incinerators, power plants, and traffic (Bukowiecki et al., 2009; Sundar and Chakravarty, 2010). Sb compounds are also present as fire retardants in textiles, carpet backings, plastics, and synthetic fibers, and they are widely used in the manufacture of metal alloys, sheet and pipe metal, enamels, batteries, ceramics, paints, glass, rubber, pharmaceutical products, tobacco, and paper products (NHANES, 2009; Zumbado et al., 2019). The general population is mainly exposed to Sb from food and, to a lesser extent, air and drinking water (Cooper and Harrison, 2009). Sb is on the list of priority hazardous substances published by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2017), and it has been widely detected in biological samples from adults and children in the general population. In a biomonitoring

study of trace elements in adults living in Andalusia, Southern Spain, Sb was detected in plasma samples from all participants (n=419) (Henríquez-Hernández et al., 2020). Sb was found to be widely present in cord blood samples from newborns in La Palma, Canary Islands (Cabrera-Rodríguez et al., 2018), in urine from pregnant women in Catalonia, Northern Spain (Forns et al., 2014), and in urine from infants, children, and adults in other countries (Cullen et al., 1998; Dezateux et al., 1997; Hinwood et al., 2015; Saravanabhavan et al., 2017; Schulz et al., 2009). Data on breast milk concentrations of Sb are only available from a few small-sized studies (Björklund et al., 2012; Iyengar et al., 1982; Parr et al., 1991; Wappelhorst et al., 2002).

Environmental exposure to Li may be increasing due to the greater utilization and disposal of Li-ion batteries (Robinson et al., 2018). Li is also found in greases and ceramics, as well as being frequently used to treat bipolar disorder or other psychotic conditions in women of childbearing age (Grandjean and Aubry, 2009). In the

general population, drinking water is likely the primary source of Li exposure, although only scant data have been published on its concentrations (Harari et al., 2015). Li has been classified as teratogenic by the U.S. Food and Drug Administration, and fetal exposure to high levels through drinking water or maternal consumption of Li-containing drugs has been associated with increased risk of cardiovascular defects, preterm birth, reduced fetal size, miscarriage, hypothyroidism, and neurodevelopmental impairment (Broberg et al., 2011; Grandjean and Aubry, 2009; Harari et al., 2015; McKnight et al., 2012; Oyebode et al., 2012; Poels et al., 2018a). Clinical studies have shown that Li is excreted into the breast milk of mothers under Li treatment (Poels et al., 2018b), but there are very limited data on breast milk Li concentrations in the general population (Björklund et al., 2012).

Our group previously reported on the concentrations of perfluoroalkyl substances (Serrano et al., 2021), environmental phenols (Iribarne-Durán et al., 2022), and As, Hg, Cd, and Pb (Freire et al., 2022) in pooled breast milk

samples collected at different times post-partum from donors to a Human Milk Bank in Spain. The aim of the present study was to determine the concentrations of Al, Sb, and Li in the same milk samples, identifying sociodemographic, lifestyle, and nutritional factors associated with the concentrations found. The study focused on Al, Sb, and Li because i) they are common but less studied environmental metal(oid)s, particularly Al and Sb; ii) they may share sources of exposure, such as drinking water and food contact materials; iii) Sb exposure has increased over the past few years, leading to widespread exposure in the general population; and iv) data on maternal exposure to environmentally relevant concentrations of Li are lacking.

2. Materials and methods

2.1. Study population

A convenience sample of 83 breast milk donors was recruited at the Regional Milk Bank of the Virgen de las Nieves University Hospital, Granada (Southern Spain), between 2015 and 2018. During this period, 275 mature breast milk samples were obtained from

participating women at different weeks/months post-partum. Criteria established by the bank for the selection of breast milk donors were previously reported (Freire et al., 2022; Serrano et al., 2021). Women who agreed to participate in the study signed written informed consent and completed a questionnaire on socio-demographic characteristics, reproductive factors, dietary habits, and the use of PCPs. The present study included 242 of the 275 milk samples with sufficient volume for the analysis of trace elements. The research protocol was approved by the Biomedical Research Ethics Committee of Granada (protocol number 1552-N-16, date of approval March 29 2017).

5.2. Breast milk sample collection

The breast milk collection procedure is described in detail elsewhere (Freire et al., 2022; Serrano et al., 2021). Briefly, donors collected breast milk at home over a period of 1-4 consecutive weeks, at any time of the day and either before or after feeding sessions, using an electric breast milk pump (most mothers used a Medela Swing® Breast Pump, United States,

while a very small number used their own breast pump). Milk collected by the mothers was stored in 130-mL baby feeding polypropylene bottles (Beldico Belgium, model HPG37528) provided by the bank at -20 °C until delivery to the bank, where samples were kept at -30 °C. Within two weeks after arrival at the bank and immediately before pasteurization, samples were thawed and then pooled, obtaining an aliquot of 5-30 mL that was stored in polypropylene tubes (Deltalab 409003.2 sterile cryovials) at -20 °C until analysis of trace elements. Bottles and tubes were pre-tested to ensure that they did not contain or leach any of the target elements. The day of pasteurization was recorded as the donation date, and the interval between the first sample expressed by the mother and the donation date never exceeded six weeks (Freire et al., 2022). The median number of donations per woman was two, ranging from one to thirteen (40% of women made at least 3 donations and 22% made 5 donations).

5.3. Metal analysis

Quantification of Al, Sb, and Li in breast milk was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) following the method previously described in Freire et al. (2022). Regarding sample pretreatment, 0.5 mL of milk sample was microwave digested in quartz vessels with 0.5 mL of HNO₃ (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) using the Ethos UP system (Milestone, Shelton, CT, USA) programmed with 1800 W as maximum power and 210 °C as temperature limit (ramp time 20 min; hold time 15 min; cooling time 60 min). The digested solution was then transferred to a decontaminated tube for later analysis. Before their utilization, the quartz vessels were vigorously cleaned, soaked for 24 h in 10% HNO₃, thoroughly rinsed with Milli-Q® water, and dried at 80 °C for about 2 h. A certified reference material was used as quality control (ERM-BD151 skimmed milk powder). Approximately 0.5 g of certified reference material was reconstituted with 4.5 mL of Milli-Q® water. The resulting liquid milk was then digested, as were all study samples. All

samples were diluted 1:5 with 1% HCl (Suprapur, Merck). The Trace Elements in Natural Water Standard Reference Material SRM 1640a from National Institute of Standards and Technology NIST (USA) was also used as reference material for other elements (including Al, Li, and Sb), although in this case digestion was not required. A calibration curve was prepared for each element in ultrapure water (Milli-Q) with 2% HNO₃ (Suprapur, Merck) and 1% HCl (Suprapur, Merck) using reference metal standard solutions (Agilent Technologies) and analyzing blanks to correct the results. The instrument was tuned and performance parameters were checked before each analysis session. The quality of results was ensured by adding online multielement 400 µg/L internal standard solution with Sc, Ge, Ir, and Rh to the samples. Limits of detection were calculated by dividing the standard deviation of the response of the ICP-MS by the slope of the calibration curve. The limit of quantification is three times the limit of detection. In our cases, the limits of detection and quantification, respectively, were 2 and 6 µg/L for Al,

0.02 and 0.1 µg/L for Sb, and 0.2 and 0.7 µg/L for Li.

5.4. Potential predictors of Al, Sb, and Li in breast milk

Potential explanatory variables are listed in Tables 1 and 2 and Supplementary material (Tables S1 and S2) and were previously described in detail (Freire et al., 2022; Serrano et al., 2022). In summary, variables examined as potential predictors of breast milk concentrations of Al, Sb, and Li included: age (updated at the time of each donation); schooling (university education); occupation; area of residence; living near agricultural land, greenhouse, or any industrial activity; main source of drinking water; smoking habit (ex-smoker); body mass index (normal weight or overweight/obese); regular medication intake (none, supplements, ibuprofen, hypertension drugs, heparin, and/or oral contraceptives); parity; length of gestation; birth weight; weight gain during pregnancy; and weight change (gain or loss) from before the most recent pregnancy (**Table 1**). Participants completed a food frequency

questionnaire and a questionnaire on the frequency of their utilization of PCPs with reference to the previous 12 months, which included detailed information on the consumption of several food items (Table S1) and the use of cosmetics and other PCPs (Table S2). Information on dietary intake and the utilization of PCPs was obtained for 78 out of 83 participants (n=228 milk samples). The post-partum time of the donation was categorized as ≤3, >3-6, >6-9, or >9 months. Total lifetime breastfeeding, which was calculated by adding the aforementioned period to the lifetime breastfeeding time reported in the interview, was categorized as ≤6, >6-12, >12-24, or >24 months (**Table 2**). The year of collection and the nutritional characteristics of the unpasteurized milk samples, including the total protein, total lipid, lactose, and caloric contents, were also tested as potential predictors of Al, Sb, and Li concentrations (Table 2).

2.5. Statistical analysis

Calculations were performed of the detection frequencies and selected percentiles of metal concentrations in

breast milk samples. Analytical results below the LOD were imputed as the LOD/√2 (Hornung and Reed, 1990). The Spearman test was used to examine correlations between Al, Sb, and Li concentrations, applying the Kolmogorov-Smirnov test to examine their normality. The intraclass correlation coefficient (ICC), defined as the ratio of between-subject variance to total variance, was calculated for the first three and five repeated measures (N=33 and 18 women, respectively) of each element, as few women made more than 5 donations.

The association of breast milk concentrations of Al, Sb, and Li with the sociodemographic profile of women, reproductive factors, their dietary and lifestyle habits, and the nutritional characteristics of samples, among other factors, was assessed by repeated-measure analysis using mixed-effect linear regression. The concentrations of the three metals showed left-skewed distributions, and they were therefore normalized by log transformation before regression analysis. The subject ID was treated as a random variable to account for within-subject correlations

between repeated measurements. Predictors (fixed variables) were entered in models using a forward stepwise procedure, establishing a significance level of 0.05 to retain variables in the model. Associations were expressed as the percent change in metal concentrations ($(\exp^{\beta}-1)*100$) with their respective 95% confidence intervals (CIs). In a sensitivity analysis, regression models were fitted after exclusion of samples with Sb or Li concentrations below the LOD, given that the replacement of values below the LOD by LOD/√2 may have introduced bias in the results (Bernhardt et al., 2015). The statistical program R v.4.1.0 was used for statistical analyses (package “nlme”) (The R Project for Statistical Computing, <https://www.r-project.org>).

6. Results

Table 1 exhibits the socio-demographic and reproductive characteristics of participating women. The mean age was 33 years (range=19-47 years), 61% had university education, 29% were manual workers and 29% resided in a rural area; 47% of the

women were ex-smokers; and 31% had overweight or obesity. At the time of recruitment, 46% of women were multiparous, 53% had gained weight since before the most recent pregnancy, and 20% had lost weight. Nearly 38% of the women reported regular intake of supplements, while very few used medication other than supplements. A full description of the dietary habits and PCP utilization of the participants is available in Supplementary material (Tables S1 and S2).

Almost half (47.1%) of the samples were collected within 6 months post-partum (mean=238 days, range=20-1513 days), and 56% of samples were collected after a lifetime breastfeeding duration of at least 12 months (mean=17.2 months, range=0.7-77.3 months). The mean protein, fat, and lactose contents of samples were 2.05, 3.83, and 7.44 g/100 mL, respectively, and the mean energy content was 68 kcal/100 mL (Table 2).

Al was detected in almost all breast milk samples (94%), with a median (25th-75th percentile [P25-P75]) concentration of 57.63 µg/L (28.83-150.3 µg/L). Sb and Li were detected in

79% and 72% of samples at median concentrations of 0.08 µg/L (P25-P75=<0.02-1.19 µg/L) and 0.58 µg/L (P25-P75=0.25-1.48 µg/L), respectively (**Table 3**). Al and Sb were moderately positively correlated (Spearman coefficient, $r=0.55$, $p<0.001$), and weak positive correlations were found between Li and Al ($r=0.31$; $p<0.001$) and between Li and Sb ($r=0.23$, $p<0.001$). Correlations were similar after exclusion of Sb and Li concentrations below the LOD. The ICCs (95%CI) for the first three and five measurements, respectively, were: Al=0.28 (0.06; 0.52) and 0.11 (-0.04; 0.37); Sb=0.24 (-0.01; 0.45) and 0.03 (-0.01; 0.10); and Li=0.03 (-0.17; 0.24) and 0.008 (-0.02; 0.21).

Predictors of breast milk concentrations of Al, Sb, and Li are exhibited in **Table 4**. Al concentrations were significantly and positively associated with the total fat content of samples, weight change from before pregnancy, and intake of coffee and butter, while they were inversely associated with meat intake. Specifically, Al concentrations increased by 78% (95% CI=6-197%) for each log-unit increment in total lipid content, and

they were more than two-fold higher in samples from lactating women who either lost or gained weight, and 87% and 89% higher in those consuming 1 cup/day of coffee and 1 sv/week of butter, respectively, *versus* no consumption. By contrast, samples from women consuming 2 *versus* 1 sv/week of meat had a 66% lower concentration of Al.

Sb concentrations in milk were positively associated with the intake of fatty fish, yoghurt, rice, and deep-fried food and with eyeliner use, and they were inversely associated with the intake of eggs and cereals and with eye shadow use. In this way, a higher intake of fatty fish, yoghurt, rice, and deep-fried food was associated with a more than two-fold increase in Sb concentrations, whereas a greater intake of eggs and cereals was associated with a decrease in Sb concentrations of 47% and 66%, respectively. Finally, Sb concentrations were two-fold higher in samples from women with a higher frequency of eyeliner use but 58% lower in those from women with a higher frequency of eye shadow application. Regression

models excluding Sb concentrations below the LOD showed similar results, except that rice and deep-fried food intakes that did not remain significant (Table S3).

Li concentrations were more than five-fold higher in samples from women with greater chocolate intake, three-fold higher in those from women who used eyeliner, and more than two-fold higher in those from women with more frequent hand cream use. Li concentrations were between 49 and 65% lower in samples from mothers with a greater intake of eggs, bread, and pasta and more frequent face cream use and in those collected in 2017 and 2018 compared to 2015. Exclusion of Li concentrations below the LOD led to substantially unchanged results, although pasta intake did not remain associated with detected Li concentrations (Table S4).

7. Discussion

This study evidences the wide presence of Al, Sb, and Li in pooled breast milk samples from lactating women collected at different times post-partum, suggesting the generalized

exposure of lactating mothers and breastfed infants to these elements, especially Al. Concentrations of Sb and Li were two to three orders of magnitude lower than those of Al; nevertheless, the health effects of low concentrations of these elements in breast milk remain poorly understood. Breast milk concentrations of these elements were mostly associated with dietary habits, although other factors were also identified as potential predictors of their concentrations. These included maternal weight change and lipid content of samples in the case of Al, and the use of certain PCPs in the cases of Sb and Li. The post-partum time was not associated with the concentrations of any element under study; however, the ICCs indicated the poor reliability of subsequent measurements, particularly for Li, suggesting variations in patterns of exposure throughout the donation period.

4.1. Aluminum

Concentrations of Al in the present samples are markedly higher than observed in mature breast milk

samples collected in the 1990s in Galicia in Northern Spain (mean=21.5 µg/L at >10 days post-partum) (Fernandez-Lorenzo et al., 1999) and in samples collected more recently in Murcia in Southeastern Spain (mean=34.3 µg/L, detection frequency=18% at 1-32 months post-partum) (Motas et al., 2021). They are within the range of concentrations found in mature and transitional milk samples from Austria (mean=67 µg/L) (Krachler et al., 2000); however, they are lower than in samples from Sweden (median=185 µg/L) (Björklund et al., 2012) and Iran (mean=149 µg/L) (Taravati Javad et al., 2018), and several-fold higher than in samples from mothers in France (range: <8 µg/L) (Biego et al., 1998) and Taiwan (mean=13.44 µg/L) (Chao et al., 2014) (**Table 5**).

A significant decrease in Al concentrations from colostrum to mature milk was observed in two of the studies (Chao et al., 2014; Taravati Javad et al., 2018). This is attributable to the total protein content of breast milk, which is highest in colostrum and then decreases at subsequent lactation stages, given that metals transfer into

breast milk by binding to proteins (Gundacker, 2005). However, Al concentrations were not associated with post-partum time or protein content of the present milk samples, probably because only mature milk was collected, and the total lipid content of samples emerged as a significant predictor of Al concentrations. Likewise, Fernandez-Lorenzo et al. (1999) found higher Al concentrations in Spanish breast milk samples with greater fat content. These findings are supported by previous observations of a positive association between concentrations of Al in human breast tissue and in breast tissue fat (Exley et al., 2007) and between Al exposure and increased triglyceride levels and obesity risk in non-occupationally exposed individuals (Tinkov et al., 2019). These findings suggest that Al alters lipid metabolism and promotes adipogenesis (Mailloux et al., 2007).

Al concentrations in breast milk were not associated with the socio-demographic profile of the mothers, in agreement with previous studies of Taiwanese and Spanish mothers (Chao et al., 2014; Motas et al., 2021). Many

unprocessed foods (e.g., fruit, vegetables, cereal products, and cocoa) naturally contain Al, and there is a further contribution from food additives and from the paper, plastic, ceramics, and/or metal used for food packaging, processing, and storage (Astolfi et al., 2021; Tietz et al., 2019). A recent German study estimated that instant tea beverages, mixed vegetable salads, tea beverages, bitter chocolate, and multigrain bread were the main contributors to dietary Al intake in adults, finding that children aged 3–6 years had the highest dietary Al intake (Tietz et al., 2019). In the present study, Al concentrations were higher with a greater intake of coffee and butter. In the case of coffee, this may be attributable to the increasingly widespread utilization of Al coffee capsules. In Spain, drinking water, fruit juices, wine, and soft drinks have also been shown to contribute to Al intake (López et al., 2002). In this line, Motas et al. (2021) found higher Al concentrations in the breast milk of Spanish mothers with a greater intake of water, while breast milk Al concentrations were higher in Irani

mothers with a higher intake of vegetables and lower intake of fish (Taravati Javad et al., 2018). In this regard, breast milk Al concentrations in the present study were lower in lactating women with a greater intake of meat, although the reasons for this association remain unclear.

The most important non-dietary source of Al exposure is dermal exposure from PCPs, especially antiperspirants (Sanajou et al., 2021; Tietz et al., 2019), and epidemiological evidence has linked breast cancer to Al-based underarm antiperspirants (Allam, 2016; Exley et al., 2007). The frequent use of Al-based pharmaceuticals such as antacids and anti-diarrheal drugs can also increase Al exposure (Reinke et al., 2003), but none of the study participants reported the intake of Al-containing drugs. In the present series, no association was found between breast milk Al concentrations and the utilization of antiperspirants or other PCPs potentially containing Al, such as lipstick, toothpaste, or sunscreen (Tietz et al., 2019). However, no information was gathered on medication or other potential sources of Al exposure, such as

cookware, utensils, and packaging (e.g., Al cans, foil, and films, etc.) used for food preparation and storage (Tietz et al., 2019; WHO, 2007).

7.2. Antimony

Most (72%) of the present breast milk samples had detectable concentrations of Sb. However, they were below the range of Sb concentrations reported for breast milk samples collected during the 1970-80s in several countries (Clemente et al., 1982; Iyengar et al., 1982; Parr et al., 1991). Concentrations were comparable to those in more recently collected mature milk samples in Sweden (median=0.042 µg/L, range=0.018-0.15 µg/L) (Björklund et al., 2012) and in the Czech Republic, Germany, and Poland (median=0.12 µg/L, range=0.06-0.57 µg/L) (Wappelhorst et al., 2002) (Table 5).

The present findings are consistent with previous reports on the widespread presence of Sb in human biological samples from the general population, including blood, urine, and hair from adults (Henríquez-Hernández et al., 2020), pregnant women (Cabrera-

Rodríguez et al., 2018; Forns et al., 2014; Hinwood et al., 2015), infants (Cullen et al., 1998; Dezateux et al., 1997), and children (CDC, 2009; Pérez et al., 2018; Schulz et al., 2009), reflecting the increased utilization of Sb and its compounds over the past few decades. Notably, detectable concentrations of Sb were found in all cord blood samples from 471 mother-newborns in the Canary Islands (mean=13.82 µg/L) and were associated with reduced birth weight (Cabrera-Rodríguez et al., 2018). However, the health risks posed by postnatal exposure to low doses of Sb *via* breastfeeding remain poorly understood.

Human biomonitoring studies have described higher Sb exposure levels in males, older people, and children (CDC, 2009; Gebel et al., 1998; Henríquez-Hernández et al., 2020; Paschal et al., 1998; Schulz et al., 2009). It has been proposed that age may influence the bioaccumulation of Sb (Liu et al., 2011), but the half-life of breast milk Sb elimination is unknown. A cumulative effect of age on Sb exposure was not observed in the present study, which is likely explained by the age

range of the participating women (19-47 years).

Sb is present in various foods, including fish, fruit, vegetables, and grains grown in Sb-contaminated soils or soils with naturally occurring Sb (Fu et al., 2010; Hammel et al., 2000). Accordingly, a Spanish study assessing the influence of diet on urinary concentrations of metals in 6- to 11-year-old children from Valencia found that vegetables, fruit, fish, and cereals were major determinants of urinary Sb (Pérez et al., 2018). In partial agreement with these results, the present study provides evidence that the intake of fatty fish and rice may increase Sb concentrations in breast milk; by contrast, however, cereal intake was associated with lower rather than higher Sb concentrations. Sb is known to leach from bottles made of polyethylene terephthalate (PET) resin, given that Sb trioxide (Sb₂O₃) is the most frequently used catalyst in its production (Filella, 2020). In the European Union (EU), the maximum admissible concentration for Sb in drinking water is 10 µg/L and 40 µg/L for food (including water) in plastic

containers (Directive (EU) 2020/2184; Reimann et al., 2012). However, the consumption of bottled water was not associated with milk Sb concentrations in the present study, although a greater use of oil in PET bottles may in part explain the association found between deep-fried food intake and higher Sb concentrations. Further research is needed to identify relevant dietary sources of Sb in the general population.

Detectable amounts of Sb have been described in different cosmetic products, such as lipstick (Pinto et al., 2018), mascara (Al-Dayel et al., 2011; Sneyers et al., 2009), and eye shadow (Sneyers et al., 2009), and Sb concentrations were higher in breast milk samples from women who more frequently used eyeliner. The EU prohibits Sb in cosmetics at any concentration (Regulation-EC1223/2009), but only limited information is available on the presence of Sb and other less regulated toxic elements in cosmetics (Mesko et al., 2020), and further investigation is warranted.

7.3. Lithium

The median Li concentration in the present breast milk samples is half that found in samples collected in Sweden (median=1.4 µg/L) (Björklund et al., 2012), although the upper concentrations are higher (95th percentile=15.77 µg/L vs. maximum=2.8 µg/L in the Swedish study) (Table 5). Notably, one pooled breast milk sample in the present study had a concentration of Li of 1333 µg/L, comparable to concentrations in the breast milk of mothers using Li-containing drugs (Poels et al., 2018b; Viguera et al., 2007) (Table 5). However, the woman presenting this high Li content in her milk reported no medication use. High Li concentrations in breast milk may have toxic effects on infants (Poels et al., 2018b), but there is inadequate evidence on the adverse health effects of low-dose environmental exposure to Li *via* breastfeeding.

A key source of Li intake is drinking water, and Li exposure is higher in inhabitants of areas with elevated concentrations (~1000 µg/L) in their water, such as northern Chile (Figueroa et al., 2013), parts of Austria (Kapusta et

al., 2011), and the northern Argentinean Andes, where one series of pregnant women had urinary concentrations of around 1600 µg/L (Concha et al., 2010; Harari et al., 2015). High Li concentrations (up to 10 mg/L) have also been reported in some bottled waters (Reimann and Birke, 2010). There is an evident need to screen drinking water from all sources for the presence of Li. Besides drinking water, the consumption of certain food items may increase Li exposure (Naeem et al., 2021). Li content has been shown to be low in cereals and cereal products but appears to be higher in chocolate, especially bitter chocolate (Anke M, 2003). In fact, chocolate intake was the sole dietary factor associated with increased Li concentrations in the present breast milk samples, whereas the intake of bread and pasta was associated with reduced concentrations. Finally, the positive association with eyeliner, also observed for Sb, is supported by evidence of the presence of Li in certain cosmetic products (Al-Dayel et al., 2011; Pinto et al., 2018).

7.4. Risk assessment

Calculation of the daily oral intake of Al, Sb, and Li *via* donated breast milk was based on their median and 95th percentile concentrations (worst-case scenario) in samples and on the assumption that a preterm baby with birth weight of 1500 g consumes 200 mL of milk per day. The following daily oral intakes were estimated: average of 7.68 µg/kg/day for Al, rising to 70.03 µg/kg/day in the worst-case scenario; 0.01 µg/kg/day for Sb, rising to 0.09 µg/kg/day; and 0.08 µg/kg/day for Li, rising to 2.10 µg/kg/day. Estimated oral intakes (EDIs) did not exceed the tolerable daily intake (TDI) of Al established by the European Food Safety Authority (1 mg/kg/week or 143 µg/kg/day) (Tietz et al., 2019) or the TDIs of Sb (6 µg/kg/day) (WHO, 2003) or Li (20 µg/kg/day) (Naeem et al., 2021). Because these metals may have common sources of exposure, such as drinking water, cosmetics, and food containers, co-exposure is highly likely. For instance, a recent study reported the release of Al, Sb, and Li from metallic and non-metallic reusable water bottles (Astolfi et al., 2021). Indeed, significant

correlations were observed between metals, particularly between Al and Sb. Therefore, a chronic hazard index (cHI) was calculated by summing the hazard quotient ($HQ\% = EDI/TDI \times 100$) of each element (HQ: Al=5.37%, Sb=0.16%, Li=0.40%), resulting in a cHI of 5.94%, which is considerably below the 100% cutoff point indicating an acceptable health risk. However, these safety reference values are set for adults, and infants may experience adverse health effects at much lower concentrations, especially when born preterm, given the higher vulnerability of newborns compared to adults and children due to significant differences in physiology that affect the absorption, distribution, metabolism, and elimination of toxic chemicals (Pla et al., 2019).

4.5. Strengths and limitations

This study is among the first to assess the concentrations of Al, Sb, and Li, common but less regulated toxic elements, in breast milk samples from environmentally exposed women. A relatively large number of samples (n=242) was studied, and the collection of pooled milk samples rather than spot

samples can also be considered a study strength because it can reduce the risk of exposure misclassification. This is because the composition of breast milk and its concentrations of trace elements can change during a feeding session, at different times of day, and from day to day, due to variations in the mother's dietary intake and other factors. Moreover, hospitalized preterm infants are given pooled milk from the bank; therefore, its content of environmental chemicals reflects the oral intake by these infants *via* donor breast milk.

This study has potential limitations. The study findings cannot be extrapolated to the wider population of lactating women because of the specific profile of milk donors, who tend to have more schooling and belong to higher social classes in comparison to breastfeeding women in general. A further limitation is that the possibility of metal contamination during the collection and processing of the milk cannot be ruled out. This study is one of a series investigating the presence of contaminants in donor breast milk prescribed to hospitalized infants. It should be noted that contaminants in

the milk may be related to maternal factors, explored in depth in the present paper, or to factors related to sample extraction and analysis, which have been controlled as rigorously as possible. Thus, storage conditions were the same for all samples, and processing of the milk at the Bank and the laboratory was also identical for all samples. In addition, metal concentrations were not higher in “older” samples (collected in 2015). The ability to identify more specific sources of exposure to Al, Sb, and Li was also limited by the lack of data on amount of water intake and food contact materials.

Finally, it is necessary to underscore that the advantages of breastfeeding generally outweigh any risk from the presence of environmental chemicals in the milk (Mead, 2008). Moreover, it has been shown that infant formula, either milk-based or soy-based, can contain much higher amounts of toxic metals such as Al (Dabeka et al., 2011; Fernandez-Lorenzo et al., 1999; Tietz et al., 2019). Hence, breast milk may be safer than infant formulas and especially preferable for preterm infants

in the NICU. Nevertheless, it is important to understand how breastfeeding contributes to infant exposure.

8. Conclusion

This study found relatively high concentrations of Al in donor breast milk samples and a wide presence of Sb and Li. Although Sb and Li concentrations were low, comparable to those reported for other lactating women from the general population, their potential to cause adverse health effects in term and preterm infants is uncertain. Dietary habits may strongly influence maternal exposure to these elements; however, there is a need to further investigate the influence on their concentrations of factors such as PCP utilization. Importantly, breastfeeding is still to be encouraged under most circumstances, especially in the case of hospitalized preterm infants, but monitoring of toxic elements in breast milk is recommended.

Acknowledgements

This research would not have been achieved without the selfless

collaboration of the women who took part in the study. The authors gratefully acknowledge editorial assistance from Richard Davies and technical assistance in metal analysis from J. Santiago-Rodríguez. The authors are also grateful to the ISCIII and the “Fondo Europeo de Desarrollo Regional” (ISCIII/FEDER) for the predoctoral research contract granted to L.M. Iribarne-Durán (FI17/00316) and the Miguel Servet Type II Program granted to C. Freire (grant no. CPII21/00014), and to the Servicio Andaluz de Salud (SAS) for the “Refuerzo de la Actividad Investigadora” research grant granted to N. Olea (Exp. A1-0047-2021). The funders had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Highlights

1. Al, Sb, and Li were widely detected in donor milk samples longitudinally collected
2. Concentrations of Al were 2-3 orders of magnitude higher than those of Sb and Li
3. Breast milk concentrations of Al, Sb, and Li were associated with dietary habits
4. Lipid content of milk samples was also associated with higher Al concentrations
5. Use of certain personal care products was associated with higher Sb and Li

References

- AAP. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012; 129: e827-e841.
- Al-Dayel O, Hefne J, Al-Ajyan T. Human exposure to heavy metals from cosmetics. *Oriental Journal of Chemistry* 2011; 27: 1.
- Allam MF. Breast Cancer and Deodorants/Antiperspirants: a Systematic Review. *Cent Eur J Public Health* 2016; 24: 245-247.
- Anke M USU, Arnhold W. Lithium-an overview. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. 2003.
- Astolfi ML, Castellani F, Avino P, Antonucci A, Canepari S, Protano C, Vitali M. Reusable water bottles: release of inorganic elements, phthalates, and bisphenol A in a “real use” simulation experiment. *Separations* 2021; 8: 126.
- ATSDR. ATSDR's substance priority list. Retrieved 12/02/2019, from. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/#2017spl>. 2017.
- Bernhardt PW, Wang HJ, Zhang D. Statistical methods for generalized linear models with covariates subject to detection limits. *Stat Biosci* 2015; 7: 68-89.
- Biegho GH, Joyeux M, Hartemann P, Debry G. Determination of mineral contents in different kinds of milk and estimation of dietary intake in infants. *Food Addit Contam* 1998; 15: 775-81.
- Björklund KL, Vahter M, Palm B, Grandér M, Lignell S, Berglund M. Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers: a biological monitoring study. *Environ Health* 2012; 11: 92.
- Broberg K, Concha G, Engström K, Lindvall M, Grandér M, Vahter M. Lithium in drinking water and thyroid function. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 827-30.
- Bukowiecki N, Lienemann P, Hill M, Figi R, Richard A, Furger M, et al. Real-world emission factors for antimony and other brake wear related trace elements: size-segregated values for light and heavy duty vehicles. *Environ Sci Technol* 2009; 43: 8072-8.
- Cabrera-Rodríguez R, Luzardo OP, González-Antuña A, Boda LD, Almeida-González M, Camacho M, et

- al. Occurrence of 44 elements in human cord blood and their association with growth indicators in newborns. *Environ Int* 2018; 116: 43-51.
- CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals (No. 4). CDC - Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. 2009.
- Clemente GF, Ingrao G, Santaroni GP. The concentration of some trace elements in human milk from Italy. *Sci Total Environ* 1982; 24: 255-65.
- Concha G, Broberg K, Grandér M, Cardozo A, Palm B, Vahter M. High-level exposure to lithium, boron, cesium, and arsenic via drinking water in the Andes of northern Argentina. *Environ Sci Technol* 2010; 44: 6875-80.
- Cooper RG, Harrison AP. The exposure to and health effects of antimony. *Indian J Occup Environ Med* 2009; 13: 3-10.
- Cullen A, Kiberd B, Matthews T, Mayne P, Delves HT, O'Regan M. Antimony in blood and urine of infants. *J Clin Pathol* 1998; 51: 238-40.
- Chao HH, Guo CH, Huang CB, Chen PC, Li HC, Hsiung DY, et al. Arsenic, cadmium, lead, and aluminium concentrations in human milk at early stages of lactation. *Pediatr Neonatol* 2014; 55: 127-34.
- Dabeka R, Fouquet A, Belisle S, Turcotte S. Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2011; 28: 744-53.
- Darbre PD. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 121-43.
- Darbre PD, Mannello F, Exley C. Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology. *J Inorg Biochem* 2013; 128: 257-61.
- Dezateux C, Delves HT, Stocks J, Wade A, Pilgrim L, Costeloe K. Urinary antimony in infancy. *Arch Dis Child* 1997; 76: 432-6.
- Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of on the Quality of Water Intended for Human Consumption. 2020. Available online: <https://eur->

- lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32020L2184 (accessed on 28 September 2022)
- Dórea JG, Marques RC. Infants' exposure to aluminum from vaccines and breast milk during the first 6 months. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010; 20: 598-601.
- Exley C. What is the risk of aluminium as a neurotoxin? *Expert Rev Neurother* 2014; 14: 589-91.
- Exley C, Charles LM, Barr L, Martin C, Polwart A, Darbre PD. Aluminium in human breast tissue. *J Inorg Biochem* 2007; 101: 1344-6.
- Fernandez-Lorenzo JR, Cocho JA, Rey-Goldar ML, Couce M, Fraga JM. Aluminum contents of human milk, cow's milk, and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 270-5.
- Figueroa LT, Razmillic B, Zumeata O, Aranda GN, Barton SA, Schull WJ, et al. Environmental lithium exposure in the north of Chile--II. Natural food sources. *Biol Trace Elem Res* 2013; 151: 122-31.
- Filella M. Antimony and PET bottles: Checking facts. *Chemosphere* 2020; 261: 127732.
- Forns J, Fort M, Casas M, Cáceres A, Guxens M, Gascon M, et al. Exposure to metals during pregnancy and neuropsychological development at the age of 4 years. *Neurotoxicology* 2014; 40: 16-22.
- Freire C, Iribarne-Durán LM, Gil F, Olmedo P, Serrano-Lopez L, Peña-Caballero M, et al. Concentrations and determinants of lead, mercury, cadmium, and arsenic in pooled donor breast milk in Spain. *Int J Hyg Environ Health* 2022; 240: 113914.
- Fu Z, Wu F, Amarasiriwardena D, Mo C, Liu B, Zhu J, et al. Antimony, arsenic and mercury in the aquatic environment and fish in a large antimony mining area in Hunan, China. *Sci Total Environ* 2010; 408: 3403-10.
- Gebel TW, Suchenwirth RH, Bolten C, Dunkelberg HH. Human biomonitoring of arsenic and antimony in case of an elevated geogenic exposure. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 33-9.
- Gil F, Hernández AF. Toxicological importance of human biomonitoring of metallic and metalloid elements in different

- biological samples. *Food Chem Toxicol* 2015; 80: 287-297.
- Grandjean EM, Aubry JM. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: part III: clinical safety. *CNS Drugs* 2009; 23: 397-418.
- Gundacker C. Heavy metals in breast milk: implications for toxicity. *Reviews in Food and Nutrition Toxicity* 2005; 4: 1-28.
- Hammel W, Debus R, Steubing L. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere* 2000; 41: 1791-8.
- Harari F, Langeén M, Casimiro E, Bottai M, Palm B, Nordqvist H, et al. Environmental exposure to lithium during pregnancy and fetal size: a longitudinal study in the Argentinean Andes. *Environ Int* 2015; 77: 48-54.
- Henríquez-Hernández LA, Romero D, González-Antuña A, Gonzalez-Alzaga B, Zumbado M, Boada LD, et al. Biomonitoring of 45 inorganic elements measured in plasma from Spanish subjects: A cross-sectional study in Andalusian population. *Sci Total Environ* 2020; 706: 135750.
- Hinwood AL, Stasinska A, Callan AC, Heyworth J, Ramalingam M, Boyce M, et al. Maternal exposure to alkali, alkali earth, transition and other metals: Concentrations and predictors of exposure. *Environ Pollut* 2015; 204: 256-63.
- Hornung RW, Reed LD. Estimation of average concentration in the presence of nondetectable values. *App Occup Environ Hyg* 1990; 5: 46-51.
- Iribarne-Durán LM, Serrano L, Peinado FM, Peña-Caballero M, Hurtado JA, Velasoria F, et al. Biomonitoring bisphenols, parabens, and benzophenones in breast milk from a human milk bank in Southern Spain. *Sci Total Environ* 2022; 830: 154737.
- Iyengar GV, Kasperek K, Feinendegen LE, Wang YX, Weese H. Determination of Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Sb, Se and Zn in milk samples. *Sci Total Environ* 1982; 24: 267-74.
- Kapusta ND, Mossaheb N, Etzersdorfer E, Hlavin G, Thau K, Willeit M, et al. Lithium in drinking water and suicide mortality. *Br J Psychiatry* 2011; 198: 346-50.
- Krachler M, Prohaska T, Koellensperger G, Rossipal E, Stingeder G. Concentrations of selected trace elements in human milk and in infant formulas determined by magnetic sector field inductively

- coupled plasma-mass spectrometry. *Biol Trace Elem Res* 2000; 76: 97-112.
- Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2007; 10 Suppl 1: 1-269.
- LaKind JS, Lehmann GM, Davis MH, Hines EP, Marchitti SA, Alcalá C, et al. Infant Dietary Exposures to Environmental Chemicals and Infant/Child Health: A Critical Assessment of the Literature. *Environ Health Perspect* 2018; 126: 96002.
- Lessen R, Kavanagh K. Position of the academy of nutrition and dietetics: promoting and supporting breastfeeding. *J Acad Nutr Diet* 2015; 115: 444-449.
- Liu B, Wu F, Li X, Fu Z, Deng Q, Mo C, et al. Arsenic, antimony and bismuth in human hair from potentially exposed individuals in the vicinity of antimony mines in Southwest China. *Microchemical Journal* 2011; 97: 20-24.
- López FF, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Aluminium content of drinking waters, fruit juices and soft drinks: contribution to dietary intake. *Sci Total Environ* 2002; 292: 205-13.
- Mailloux R, Lemire J, Appanna V. Aluminium-induced mitochondrial dysfunction leads to lipid accumulation in human hepatocytes: a link to obesity. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 627-38.
- Mannello F, Tonti GA, Darbre PD. Concentration of aluminium in breast cyst fluids collected from women affected by gross cystic breast disease. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 1-6.
- McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR. Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2012; 379: 721-8.
- Mead MN. Contaminants in human milk: weighing the risks against the benefits of breastfeeding. *Environ Health Perspect* 2008; 116: A427-34.
- Mesko MF, Novo DR, Costa VC, Henn AS, Flores EMM. Toxic and potentially toxic elements determination in cosmetics used for make-up: A critical review. *Anal Chim Acta* 2020; 1098: 1-26.
- Motas M, Jiménez S, Oliva J, Cámara M, Pérez-Cárceles MD. Heavy Metals and Trace Elements in Human Breast Milk from Industrial/Mining and Agricultural Zones of Southeastern Spain. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18.

- Naeem A, Aslam M, Saifullah, Mühling KH. Lithium: Perspectives of nutritional beneficence, dietary intake, biogeochemistry, and biofortification of vegetables and mushrooms. *Sci Total Environ* 2021; 798: 149249.
- NHANES I. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia 2009.
- Oyebode F, Rastogi A, Berrisford G, Coccia F. Psychotropics in pregnancy: safety and other considerations. *Pharmacol Ther* 2012; 135: 71-7.
- Parr RM, DeMaeyer EM, Iyengar VG, Byrne AR, Kirkbright GF, Schöch G, et al. Minor and trace elements in human milk from Guatemala, Hungary, Nigeria, Philippines, Sweden, and Zaire. Results from a WHO/IAEA joint project. *Biol Trace Elem Res* 1991; 29: 51-75.
- Paschal DC, Ting BG, Morrow JC, Pirkle JL, Jackson RJ, Sampson EJ, et al. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. *Environ Res* 1998; 76: 53-9.
- Pérez R, Doménech E, Conchado A, Sanchez A, Coscollà C, Yusà V. Influence of diet in urinary levels of metals in a biomonitoring study of a child population of the Valencian region (Spain). *Sci Total Environ* 2018; 618: 1647-1657.
- Pinto E, Paiva K, Carvalhido A, Almeida A. Elemental impurities in lipsticks: Results from a survey of the Portuguese and Brazilian markets. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018; 95: 307-313.
- Pla A, Hernández AF, Gil F. Manual de Toxicología. Editorial Técnica Avicam; 2nd edition (August 21, 2019). ISBN: 978-84-17628-56-7.
- Poels EMP, Bijma HH, Galbally M, Bergink V. Lithium during pregnancy and after delivery: a review. *Int J Bipolar Disord* 2018a; 6: 26.
- Poels EMP, Schrijver L, Kamperman AM, Hillegers MHJ, Hoogendijk WJG, Kushner SA, et al. Long-term neurodevelopmental consequences of intrauterine exposure to lithium and antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2018b; 27: 1209-1230.
- Rebelo FM, Caldas ED. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. *Environ Res* 2016; 151: 671-688.

- Regulation-EC1223/2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the council. Official Journal of the European Union L; 342: 59.
- Reimann C, Birke M. Geochemistry of European bottled water. 2010.
- Reimann C, Birke M, Filzmoser P. Temperature-dependent leaching of chemical elements from mineral water bottle materials. *Applied Geochemistry* 2012; 27: 1492-1498.
- Reinke CM, Breitzkreutz J, Leuenberger H. Aluminium in over-the-counter drugs: risks outweigh benefits? *Drug Saf* 2003; 26: 1011-25.
- Robinson BH, Yalamanchali R, Reiser R, Dickinson NM. Lithium as an emerging environmental contaminant: Mobility in the soil-plant system. *Chemosphere* 2018; 197: 1-6.
- Sanajou S, Şahin G, Baydar T. Aluminium in cosmetics and personal care products. *J Appl Toxicol* 2021; 41: 1704-1718.
- Sander S, Kappenstein O, Ebner I, Fritsch KA, Schmidt R, Pfaff K, et al. Release of aluminium and thallium ions from uncoated food contact materials made of aluminium alloys into food and food simulat. *PLoS One* 2018; 13: e0200778.
- Saravanabhavan G, Werry K, Walker M, Haines D, Malowany M, Khoury C. Human biomonitoring reference values for metals and trace elements in blood and urine derived from the Canadian Health Measures Survey 2007-2013. *Int J Hyg Environ Health* 2017; 220: 189-200.
- Schulz C, Angerer J, Ewers U, Heudorf U, Wilhelm M. 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). *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 637-47.
- Serrano L, Iribarne-Durán LM, Suárez B, Artacho-Cordón F, Vela-Soria F, Peña-Caballero M, et al. Concentrations of perfluoroalkyl substances in donor breast milk in Southern Spain and their potential determinants. *Int J Hyg Environ Health* 2021; 236: 113796.
- Sneyers L, Verheyen L, Vermaercke P, Bruggeman M. Trace element determination in beauty products by k₀-instrumental neutron activation analysis. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* 2009; 281: 259-263.

- Sundar S, Chakravarty J. Antimony toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7: 4267-77.
- Taravati Javad M, Vahidinia A, Samiee F, Elaridi J, Leili M, Faradmal J, et al. Analysis of aluminum, minerals and trace elements in the milk samples from lactating mothers in Hamadan, Iran. *J Trace Elem Med Biol* 2018; 50: 8-15.
- Tietz T, Lenzner A, Kolbaum AE, Zellmer S, Riebeling C, Gürtler R, et al. Aggregated aluminium exposure: risk assessment for the general population. *Arch Toxicol* 2019; 93: 3503-3521.
- Tinkov AA, Skalnaya MG, Aaseth J, Ajsuvakova OP, Aschner M, Skalny AV. Aluminium levels in hair and urine are associated with overweight and obesity in a non-occupationally exposed population. *J Trace Elem Med Biol* 2019; 56: 139-145.
- Ullah I, Zhao L, Hai Y, Fahim M, Alwayli D, Wang X, et al. "Metal elements and pesticides as risk factors for Parkinson's disease - A review". *Toxicol Rep* 2021; 8: 607-616.
- Viguera AC, Newport DJ, Ritchie J, Stowe Z, Whitfield T, Mogielnicki J, et al. Lithium in breast milk and nursing infants: clinical implications. *Am J Psychiatry* 2007; 164: 342-5.
- Wappelhorst O, Kühn I, Heidenreich H, Markert B. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* 2002; 18: 316-22.
- WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants/prepared by the fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Safety evaluation of certain food additives and contaminants/prepared by the fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2007.
- WHO. Antimony in drinking-water, background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Switzerland, Geneva 2003.
- Wong WW, Chung SW, Kwong KP, Yin Ho Y, Xiao Y. Dietary exposure to aluminium of the Hong Kong population. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2010; 27: 457-63.
- Zumbado M, Luzardo OP, Rodríguez-Hernández Á, Boada LD, Henríquez-Hernández LA. Differential exposure to 33 toxic elements through cigarette smoking, based on the type of tobacco and rolling paper used. *Environ Res* 2019; 169: 368-376.

Table 1. Maternal characteristics and reproductive factors (N=83).

VARIABLES	n (%) or mean \pm SD
Maternal characteristics	
Age (years)	33.5 \pm 5.4
University education	51 (61.4)
Occupation	
Unemployed	5 (6.2)
Manual worker	24 (28.9)
Non-manual worker	54 (65.1)
Area of residence	
Rural	24 (28.9)
Sub-urban	24 (28.9)
Urban	35 (42.2)
Living near agricultural land	40 (51.3)
Living near greenhouse	14 (17.9)
Living near industrial activity	61 (78.2)
Ex-smoker	39 (47.0)
Overweight/obese	26 (31.3)
Medication intake	
None	43 (51.8)
Supplements (vitamins, iron, iodine)	31 (37.5)
Ibuprofen	3 (3.6)
Hypertension drug	3 (3.6)
Heparin	3 (3.6)
Oral contraceptive	2 (2.4)
Reproductive factors[†]	
Multiparous	38 (45.8)
Length of gestation (weeks)	37.7 \pm 3.7
Birth weight (g)	2967 \pm 860
Weight gain during pregnancy (kg)	11.8 \pm 4.7
Weight change from before pregnancy	
Weight loss	17 (20.5)
Weight gain	44 (53.0)
No weight change	22 (26.5)

BMI: Body mass index.

[†]Reproductive data relative to the most recent pregnancy and before the first donation (none of the donors were or became pregnant during subsequent donations).

Table 2. Characteristics of milk samples (N=242).

Variables	n (%)	Mean (range)
Year of sample collection		
2015	70 (28.9)	
2016	79 (32.6)	
2017	61 (25.2)	
2018	31 (13.8)	
Post-partum time (days)		238 (20-1513)
Post-partum time (months)		
≤3	60 (24.8)	
>3-6	54 (22.3)	
>6-9	57 (23.6)	
>9	71 (29.3)	
Lifetime duration of breastfeeding (months)		17.2 (0.7-77.3)
≤6	67 (27.7)	
>6-12	68 (28.1)	
>12-24	46 (19.0)	
>24	61 (25.2)	
Nutritional parameters		
Total proteins (g/100 mL)		2.05 (0.20-96.0)
Total lipids (g/100 mL)		3.83 (1.05-33.0)
Lactose (g/100 mL)		7.44 (6.10-8.10)
Calories (kcal/100 mL)		68 (44-117)

Table 3. Concentrations of Al, Sb, and Li in breast milk (µg/L) (N=242 samples from 83 donors)

	LOD	% >LOD	GM	Percentiles					Max.
				5	25	50	75	95	
Al	2.0	94.3	56.99	<LOD	28.83	57.63	150.3	525.2	1135
Sb	0.02	71.8	0.07	<LOD	<LOD	0.08	0.19	0.65	2.95
Li	0.2	79.2	0.79	<LOD	0.25	0.58	1.48	15.77	1333

LOD: Limit of detection; GM: Geometric mean.

Table 4. Association between characteristics of lactating women and breast milk samples and concentrations of Al, Sb, and Li in breast milk (N=228 samples from 78 women)

Explanatory variables	Al			Sb			Li		
	Exp(β)	95% CI	Explanatory variables	Exp(β)	95% CI	Explanatory variables	Exp(β)	95% CI	Explanatory variables
Total lipids milk content (log)	1.78	1.06; 2.97*	Fatty fish intake (ref: <1 sv/week)	1.21	0.71; 2.07	Year of collection (ref: 2015)	0.94	0.54; 1.61	
Weight change from before pregnancy			1 sv/week			2016			
Lost weight	2.36	1.13; 4.90*	>1 sv/week	2.23	1.14; 4.35*	2017	0.35	0.20; 0.62**	
Gained weight	2.13	1.15; 3.93*	Yoghurt intake: ≥ vs. <1 sv/day	2.15	1.27; 9.03*	2018	0.46	0.23; 0.92*	
Coffee intake: 1 cup/day vs. never	1.87	1.00; 3.52*	Eggs intake (ref: ≤1 sv/week)			Eggs intake (ref: ≤1 sv/week)			
Butter intake (ref: never)			2 sv/week	0.36	0.20; 0.66*	2 sv/week	0.38	0.19; 0.76*	
1 sv/week	1.89	1.03; 3.45*	>2 sv/week	0.34	0.18; 0.67*	>2 sv/week	0.69	0.36; 1.32	
>1 sv/week	1.76	0.86; 3.60	Rice intake: > vs. ≤1 sv/week	2.25	1.06; 4.76*	Bread intake (ref: <1 sv/day)			
Meat intake (ref: 1 sv/week)			Cereals intake (ref: never)			1 sv/day	0.62	0.32; 1.20	
2 sv/week	0.34	0.14; 0.83*	<1 sv/day	0.52	0.31; 0.89*	>1 sv/day	0.51	0.26; 1.00*	
>2 sv/week	0.66	0.32; 1.38	≥1 sv/day	0.53	0.29; 0.98*	Chocolate intake (ref: never)			
			Deep-fried food intake (ref: <1 sv/week)			<1 sv/day	5.10	2.46; 10.6**	
			1 sv/week	2.77	1.55; 4.95**	≥1 sv/day	5.68	2.51; 12.8**	
			>1 sv/week	1.43	0.81; 2.53	Pasta intake: > vs. ≤1 sv/day	0.48	0.23; 0.99*	
			Eye shadow use (ref: rarely/never)			Face cream (ref: <once a day)			
			<once a day	0.60	0.33; 1.07	once a day	0.38	0.21; 0.69*	
			≥once a day	0.42	0.19; 0.91*	>once a day	0.39	0.20; 0.77*	
			Eyeliner use (ref: rarely/never)			Hand cream (ref: <once a day)			
			<once a day	2.01	1.13; 3.56*	once a day	2.68	1.48; 4.85*	
			≥once a day	2.12	1.10; 4.09*	>once a day	2.87	1.42; 5.81*	
			Eyeliner use (ref: rarely/never)			Eyeliner use (ref: rarely/never)			
			<once a day			<once a day	3.09	1.75; 5.42**	
			≥once a day			≥once a day	1.04	0.51; 2.12	

sv: serving.

*p<0.05, **p<0.001

Table 5. Summary of published studies reporting concentrations of Al, Sb, and Li in breast milk.

STUDY	Country	Collection period	Type of milk	Sample size	Element	%>LOD	Mean	Range
THIS STUDY	Spain (Granada)	2015-2018	Mature (≥ 20 days post-partum)	242 samples, 83 women	Al	94.3	56.99 $\mu\text{g/L}^{\dagger}$	<LOD-1135 $\mu\text{g/L}$
					Sb	71.8	0.07 $\mu\text{g/L}^{\dagger}$	<LOD-2.95 $\mu\text{g/L}$
					Li	79.2	0.79 $\mu\text{g/L}^{\dagger}$	<LOD-1333 $\mu\text{g/L}$
FERNANDEZ-LORENZO ET AL., 1999	Spain (Galicia)	N.R.	Colostrum, intermediate, and mature	45 samples (14 colostrum, 22 intermediate, 9 mature)	Al	N.R.	Overall: 23.9 $\mu\text{g/L}$ Colostrum: 25.7 $\mu\text{g/L}$ Intermediate: 23.3 $\mu\text{g/L}$ Mature milk: 21.5 $\mu\text{g/L}$	7-42 $\mu\text{g/L}$
MOTAS ET AL., 2021	Spain (Murcia)	N.R.	Mature (1-32 months post-partum)	50 samples, 50 women	Al	18.0	34.3 $\mu\text{g/L}$	0-882.4 $\mu\text{g/L}$
BIEGO ET AL., 1998 KRACHLER ET AL., 2000	France	N.A.	Mature	N.A.	Al	N.R.	<8 $\mu\text{g/L}$	N.A.
	Austria	N.R.	Mature and transitional	27 samples, 27 women	Al	N.R.	67 $\mu\text{g/L}^{\ddagger}$	<10-380 $\mu\text{g/L}$
WAPPELHORST ET AL., 2002	Czech Republic, Germany, and Poland	N.R.	Mature (2-8 weeks post-partum)	536 samples, 19 women	Sb	N.R.	0.12 $\mu\text{g/L}^{\ddagger}$	0.06-0.57 $\mu\text{g/L}$
	Sweden	2000-2002 and 2009	Mature (2-3 weeks post-partum)	2000-2002: 30 samples 2009: 30 samples	Al	100	185 $\mu\text{g/L}^{\ddagger}$	21-4393 $\mu\text{g/L}$
BJÖRKLUND ET AL., 2012					Sb	100	0.042 $\mu\text{g/L}^{\ddagger}$	0.018-0.15 $\mu\text{g/L}$
					Li	100	1.4 $\mu\text{g/L}^{\ddagger}$	0.79-2.8 $\mu\text{g/L}$

				Li	100	1.4 µg/L [†]	0.79-2.8 µg/L
TARAVATI JAVAD ET AL., 2018	Iran	N.R.	Mature (1-12 months post-partum)	Al	N.R.	Overall: 149 µg/L 1-2 months: 180 µg/L 6-7 months: 260 µg/L 12 months: 120 µg/L	0.5-3120 µg/L
CHAO ET AL., 2014	Taiwan	2008	Colostrum, transitional, early mature, and mature	Al	N.R.	Overall: 13.44 µg/L Colostrum: 56.45 µg/L Transitional: 36.57 µg/L Early mature: 18.11 µg/L Mature: 13.44 µg/L	N.R.
CLEMENTE ET AL., 1982	Italy	N.R.	Mature (>15 days post-partum)	Sb	49	3.0 ng/g	<0.05-12.9 ng/g
IYENGAR ET AL., 1982	Several countries	N.R.	Pooled milk	Sb	N.R.	13 ng/g	N.R.
PARR ET AL., 1991	Guatemala, Hungary, Nigeria, Philippines, Sweden, and Zaire	N.R.	Mature milk (3 months post-partum)	Sb	N.R.	4.05 µg/L [†] Higher levels in Philippines (11 µg/L) and Nigeria (4.1 µg/L)	N.R.
VIGUERA ET AL., 2007	US	2002-2004	Mature (8-27 weeks post-partum)	Li	100	2429 µg/L	1319-3331 µg/L

LOD: Limit of detection. N.R.: Not reported; N.A.: Not available.

[†]Geometric mean.

[#]Median.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Se admite por parte de la comunidad médica que la exposición a DEs y otros contaminantes ambientales es causa de disfunciones severas y de enfermedades de muy diferente índole en los niños. La evidencia científica proviene tanto de estudios de laboratorio y con animales de experimentación, como de la investigación clínico-epidemiológica cuyos resultados son biológicamente plausibles y cumplen con los criterios de causalidad. Es también reconocido por la comunidad médica que la prevención de la exposición a DEs requiere tanto de intervenciones a nivel individual como actuaciones generales de carácter legislativo. A este respecto, nuestro grupo de trabajo lleva años reclamando en Europa un marco regulador para los DEs basado en la realización de pruebas específicas de disrupción hormonal, previas a la comercialización de cualquier nuevo producto, así como la constitución de un organismo independiente formado por científicos que revise las pruebas presentadas por la industria para la toma de decisiones de forma objetiva y científica.

Es interesante recordar de nuevo que, aunque las definiciones de las diferentes organizaciones varían ligeramente entre grupos de expertos, los DEs tienen dos características fundamentales: Alteran la función hormonal y por ende contribuyen a la aparición de disfunciones y enfermedad en los individuos expuestos. Nada que objetar sobre el mecanismo hormonal. No obstante, a medida que ha ido creciendo nuestro conocimiento en el campo de la epigenética y otros mecanismos moleculares de toxicidad, la definición de DEs ya no se limita a las sustancias químicas sintéticas, contaminantes ambientales que imitan a las hormonas naturales y actúan directamente sobre los receptores específicos, sino que se amplía con los fundamentos de la reprogramación endocrina. Hoy día sabemos que la actividad del sistema endocrino subyace a casi todas las funciones biológicas humanas por lo que la nueva hipótesis sobre el origen durante el desarrollo de la salud y la enfermedad (*Developmental Origins of Health and Disease*, DOHaD) acepta y reconoce la larga latencia de los efectos de los DEs al re-programar las funciones metabólicas y endocrinas en cualquier individuo en desarrollo.

También es conveniente tener en cuenta que hace años, cuando el pesticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y el fármaco dietilbestrol (DES) fueron reconocidos como DEs, la comunidad científica pensó que la toxicidad endocrina era poco frecuente

y se limitaba a exposiciones a altas dosis de algún compuesto en particular. Algunos de estos conceptos han cambiado radicalmente, sobre todo aquellos que se refieren a dosis de exposición y al efecto combinado entre varios DEs. En la actualidad, más de 1.000 sustancias químicas sintéticas son reconocidas como DEs, aunque esta cifra estaría claramente subestimada ya que las normativas existentes para la caracterización toxicológica de los compuestos químicos no exigen la realización rutinaria de pruebas para detectar los efectos hormonales; los pocos requisitos obligatorios en este campo se limitan a las disruptores de las hormonas sexuales y tiroideas.

Por otra parte, también consideramos que la demostración de la especial vulnerabilidad de los niños a las exposiciones a niveles bajos de DEs va en contra del paradigma paracelsiano, según el cual la dosis hace el veneno. En nuestra propia experiencia, aunque no se disponga de ensayos clínicos aleatorios, pensamos que existen pruebas suficientes para actuar diligentemente para disminuir cualquier exposición que creamos inapropiada para los niños, aunque las dosis de exposición sean bajas. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral, que se fijó en la exposición infantil a contaminantes presentes en la leche materna, orienta hacia una toma de decisión, que debe ser firme y diligente, encaminada a la disminución efectiva de la presencia de DEs y otros contaminantes ambientales en la leche materna y por ende a asegurar la mínima exposición del niño.

Creemos que la exposición a DEs durante el periodo prenatal, la infancia y la niñez puede causar efectos adversos graves en la salud y el bienestar del niño. En primer lugar, se ha demostrado que algunos DEs pueden atravesar la barrera placentaria y llegar a los órganos internos del embrión/feto en desarrollo. Se había postulado hasta muy recientemente que sólo las sustancias químicas polares podían atravesar esta barrera, pero estudios recientes sugieren que incluso moléculas de mayor tamaño, como los microplásticos, pueden alcanzar la placenta. De hecho, el término *plasticenta* se ha acuñado para definir la presencia de estos polímeros complejos en el tejido placentario. Más recientemente estos microplásticos también se han encontrado en la leche materna (Ragusa, et al., 2022) donde han llegado gracias a un proceso activo de las células glandulares del epitelio mamario. Esta observación refuerza nuestros propios hallazgos sobre la presencia de PFAS y metales tóxicos en la leche de las madres donantes, al señalar a la leche como una vía de excreción y limpieza de contaminantes.

Nuestro grupo de trabajo ha explorado durante años la exposición humana a DEs y particularmente la exposición materno-infantil. Hemos descrito concentraciones detectables de una amplia variedad de DEs, entre los que se incluyen bisfenoles, benzofenonas y parabenos, presentes en distintos compartimentos materno-fetales que sugieren exposiciones químicas a lo largo de las fases más críticas del desarrollo. Hemos explorado, de forma particular, la exposición neonatal que se produce a través de la lactancia materna y que acompaña a otras vías externas de mayor o menor relevancia, como inhalación, dérmica e ingestión. Nuestro interés se centró hace años en la presencia de DEs persistentes por su difícil metabolismo y lipofiliidad, como los COPs; más recientemente abordamos la exposición vía lactancia a compuestos no persistentes, de vidas medias cortas y de fácil eliminación como los mencionados bisfenoles, benzofenonas y parabenos (Iribarne-Durán et al., 2022). Ahora abordamos la exposición infantil a través de la leche materna centrándonos en compuestos persistentes, pero con peculiaridades que los hacen muy distintos a los COPs explorados hasta el momento por nuestro grupo. De una parte, los PFAS que, sin ser lipofílicos, persisten en el organismo debido a su difícil metabolismo y unión a proteínas. De otra, una serie de siete metales y metaloides no esenciales, algunos de los cuales se acumulan en el organismo cuando adoptan formas moleculares orgánicas.

De esta manera, este trabajo de Tesis Doctoral contribuye a ampliar el catálogo de tóxicos en la leche humana a sabiendas de que para los lactantes las primeras etapas de la vida, desde la concepción hasta los dos años (los famosos mil días), son ventanas críticas del crecimiento y desarrollo, caracterizadas por la maduración y la programación epigenética de las vías neuronales, metabólicas e inmunitarias, así como de los sistemas endocrino, reproductivo y renal. Sabemos que estas etapas de la vida son especialmente sensibles a los tóxicos debido a la inmadurez de las enzimas metabólicas y a la menor capacidad para eliminar los contaminantes, lo que sugiere que el metabolismo y la desintoxicación no son tan eficientes en los bebés y los niños pequeños como en los adultos. Factores como el mayor consumo de agua y alimentos, mayor tasa de inhalación por unidad de masa corporal en comparación con los adultos, la mayor absorción intestinal y el hábito de llevarse los objetos y las manos a la boca también contribuyen a elevar las exposiciones en los niños. Los niños tienen una piel fisiológicamente más fina que la de los adultos y también una mayor superficie cutánea

por unidad de peso corporal, lo que puede dar lugar a una mayor permeabilidad dérmica y exposición a los tóxicos.

La leche materna por sus incuestionables beneficios es el alimento de elección para los recién nacidos. Cuando ésta no está disponible, la leche materna donada a un BLH es el alimento recomendado para este grupo poblacional. La leche donada está sometida a estrictos controles microbiológicos y organolépticos dada la susceptibilidad de los receptores a los que va destinada, sin embargo, el control y legislación en cuanto a contaminantes químicos ambientales como los DEs presentes en la misma es mucho más laxo. Los DEs y los metales no esenciales pueden acumularse en la fase grasa de la leche materna, o bien unirse a proteínas y desplazar componentes de la misma. En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la exposición a PFAS, tenidos como DEs persistentes, y Hg, As, Pb, Cd, Al, Sb y Li en recién nacidos prematuros extremos en una UCIN a través de la principal fuente de exposición de los mismos, la leche materna, mediante el estudio de leche humana donada a un banco de leche hospitalario.

El primer objetivo de la misma fue el desarrollo y validación de un procedimiento analítico para la determinación de PFAS en muestras de leche materna, mediante la combinación de técnicas de extracción líquido-líquido con micro-extracción dispersiva y cromatografía de masas en tándem. Para ello, se recogieron veinte muestras de leche materna donada y se aplicaron estrategias que optimizaran los parámetros experimentales previos en la determinación de PFAS en leche. El método fue desarrollado de forma satisfactoria, encontrándose con mayor frecuencia el ácido perfluorooctanoico (PFOA), el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorohexanoico (PFHxA). El segundo objetivo específico fue determinar las concentraciones de PFAS en muestras de leche de 83 madres donantes del BLH del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), Granada, evaluando diferentes determinantes de las concentraciones, incluyendo tiempo transcurrido desde el parto, características nutricionales de las muestras de leche y perfil socio-demográfico, factores reproductivos, dieta y uso de PCPs de las madres donantes. Tras el análisis de once PFAS, se evidenció la presencia de PFAS en 24-100% de las muestras de leche materna analizadas. Se detectó PFHpA en el 100% de las muestras, seguido de PFOA (84%), PFNA (71%), PFHxA (66%) y PFTrDA (62%). Los PFOS estaban en el 34% de las muestras de leche. Las concentraciones medianas oscilaron entre <0,66 ng/L (PFHxS) y

19,39 ng/L (PFHpA). La mediana de la suma de las concentraciones de todos los PFAS analizados fue 87,67 ng/L y fue mayor para las PFAS de cadena corta que para los de cadena larga. Los factores asociados con mayores concentraciones de PFAS incluyeron la ingesta de alimentos de origen animal y el uso de PCPs, como productos para el cuidado de la piel y maquillaje. A pesar del pequeño tamaño de la muestra, los datos muestran una presencia generalizada de PFAS en leche de madres donantes, posiblemente influenciada por ciertos factores relacionados con el estilo de vida.

Estudios recientes muestran que la ingesta media diaria estimada de PFOS y PFOA en los lactantes de EEUU es hasta cinco veces mayor que la calculada para los adultos (Wu y Kannan, 2019). De hecho, las dosis de exposición calculadas para el PFOS y el PFOA en niños estaban por encima de la ingesta semanal tolerable establecida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) de 4,4 ng/kg de peso corporal/semana. Además, se vió que varios DEs de interés actual, incluidos los ftalatos y los bisfenoles, presentan dosis de exposición más altas en los niños que en los adultos (Liao y Kannan, 2013; Tran y Kannan, 2015). Todos estos datos sobre las dosis de exposición estimadas mediante el análisis de la leche materna, los preparados para lactantes u otras fuentes ambientales están respaldados por la información proporcionada por los estudios de biomonitorización humana en los que nuestro grupo de trabajo ha actuado muy intensamente (Ghassabian et al., 2022).

El tercer y cuarto objetivo de la Tesis Doctoral fue determinar las concentraciones de varios metales tóxicos, no esenciales, en 242 muestras de leche materna obtenidas en donaciones sucesivas realizadas por las 83 donantes del BLH, identificando factores asociados con la exposición. El metal más frecuentemente detectado fue As (97%), seguido de Al (94%), Hg (81%), Li (79%), Sb (72%), Pb (51%) y Cd (38%). La mediana de las concentraciones fue 57,63 µg/L para Al, 1,49 µg/L para As, 0,58 µg/L para Li, 0,26 µg/L para Hg, 0,14 µg/L para Pb, 0,08 µg/L para Sb y <0,04 µg/L para Cd. Las concentraciones de As fueron mayores en las muestras de leche de madres primíparas, mientras que las de Hg fueron mayores en aquellas con mayor consumo de pescado graso y carne, y menor en muestras recogidas más tardíamente en el postparto y con mayor contenido de lactosa. La detección de Pb fue mayor en madres multíparas, exfumadoras y con ganancia de peso desde antes del embarazo. La detección de Cd fue mayor para donantes con educación universitaria, mayor ingesta de alimentos fritos y

enlatados y uso más frecuente de PCPs como crema de manos. Las concentraciones de Al se asociaron positivamente con el contenido de lípidos de las muestras de leche, el cambio de peso desde antes del embarazo y el consumo de café y mantequilla. Las concentraciones de Sb se asociaron positivamente con la ingesta de pescado graso, yogur, arroz y alimentos fritos y con el uso de sombra de ojos, y las de Li con la ingesta de chocolate y el uso de crema para manos y delineador de ojos.

La elevada exposición de los niños a muchas sustancias químicas se debe a que estos compuestos se utilizan en diversos productos de consumo y a que el ambiente interior del hogar, en particular el polvo de los interiores, es un sumidero de estas sustancias químicas. El papel del polvo de interiores en la contribución a la elevada exposición a tóxicos ambientales en los niños ha sido un tema de interés durante más de una década que nosotros hemos abordado muy recientemente en un estudio que caracteriza la composición del polvo y una serie de PFAS y compuestos fenólicos considerados (datos no publicados). Este trabajo de Tesis Doctoral ha hecho un esfuerzo importante en identificar fuentes de exposición, que si bien no han sido estudiadas de forma directa, es decir midiendo la concentración de PFAS y metales tóxicos en alimentos, cosméticos y productos de consumo, sí que ha intentado buscar la asociación entre las concentraciones de los contaminantes en la leche y los hábitos de consumo de las madres lactantes.

Hemos de advertir que muchos de los productos de uso general y de puericultura no son sometidos a pruebas para detectar la presencia de sustancias tóxicas. A pesar de ello, diferentes estudios han demostrado la lixiviación de ftalatos, bisfenoles y otros DEs comercializados en mordedores para bebés de EEUU (Asimakopoulos et al., 2016). También se ha reportado de la presencia de bisfenoles, ftalatos, parabenos y otros DEs emergentes en biberones, ropa para bebés, toallitas higiénicas y cremas para pañales, productos utilizados con frecuencia por bebés y niños. Nuestro propio grupo de investigación ha reportado la exposición proveniente del material plástico empleado en el ambiente sanitario (Iribarne-Duran et al., 2019) y de la lixiviación y exposición dérmica de DEs proveniente de textiles en niños de corta edad (Freire et al., 2019).

La hipótesis DOHaD sobre los orígenes del desarrollo de las enfermedades se ha ido comprendiendo mejor en las últimas décadas, con un número cada vez mayor de estudios que demuestran que las alteraciones experimentadas durante el desarrollo

temprano contribuyen a las enfermedades que se manifiestan más tarde en la vida (Heindel y Vandenberg, 2015). La endocrinología infantil ha señalado acciones muy distintas de las hormonas en función del momento de la exposición. En general, se piensa que en el adulto las hormonas inducen efectos de activación, por ejemplo, respuestas que se producen sólo cuando se administra la hormona y que cesan una vez que se deja de tomar el tratamiento. Por ejemplo, los anticonceptivos hormonales son consistentes con un papel activador de las hormonas, bloqueando la ovulación y la implantación durante la ingesta del fármaco, pero con la vuelta a la fertilidad poco después de que la ingesta cese. Sin embargo, durante las ventanas críticas del desarrollo las hormonas tienen efectos organizativos; por ejemplo, las exposiciones durante este periodo inducen alteraciones permanentes en la diferenciación de células y tejidos. Es esperable que los DEs tengan efectos activadores y organizativos similares en los individuos y en tejidos y órganos específicos; cada tejido tendrá períodos únicos de vulnerabilidad, dependiendo del momento y el papel de las hormonas endógenas en el desarrollo de estos órganos. De esta manera, la experimentación animal ha puesto de manifiesto que incluso cambios modestos de apropiadamente un 30% en los niveles circulantes de hormonas tiroideas durante un período de tres días de gestación en la rata son suficientes para inducir anomalías estructurales en el cerebro de las crías; las alteraciones de los niveles de hormonas tiroideas durante períodos posteriores no inducen estos efectos, lo que refleja el período crítico para este efecto específico (Miller et al., 2009).

Uno de los desafíos para los estudios epidemiológicos, especialmente cuando se evalúan sustancias químicas no persistentes, es si el momento de la evaluación de la exposición es apropiado para evaluar los períodos críticos del desarrollo. En el caso de las sustancias químicas con una vida media larga, como son los PFAS y los metales tóxicos, en las que las concentraciones en fluidos y tejidos evaluadas en un día son altamente predictivas de las concentraciones medidas en semanas, meses o años, un único punto de tiempo es a menudo suficiente para caracterizar las exposiciones al tiempo que se minimiza la caracterización errónea de la exposición. Sin embargo, muchas otras sustancias químicas tienen vidas medias de unas pocas horas, y las dosis de exposición pueden variar mucho de un día a otro. En el caso de estas sustancias químicas no persistentes, probablemente sea más apropiado utilizar múltiples muestras

de biomonitorización y una estrategia de muestreo que dé cuenta de las diferencias en la exposición a lo largo del período crítico de interés. En esta Tesis Doctoral se han estudiado contaminantes persistentes, determinando además su presencia en *pools* de muestras de leche recogidas a lo largo de 1-4 semanas consecutivas, disminuyendo así el error de caracterización de la exposición de las madres lactantes y sus hijos.

Tal vez uno de los mitos más generalizados que se han perpetuado en relación con los DEs es que la exposición de los seres humanos a estas sustancias químicas es tan baja que no hay motivo de preocupación. Creemos que es importante que se sepa que decenas de estudios de epidemiología ambiental van en contra de este mito, de tal manera que incluso cuando las exposiciones se limitan a los llamados niveles bajos, se asocian con efectos adversos en la salud (Vandenberg et al., 2012). Pero es que, además, la etiqueta de dosis baja es un término equívoco. Mientras que las hormonas son capaces de ejercer efectos organizativos a niveles circulantes en el rango de entre partes por trillón y partes por billón, las concentraciones de muchos DEs en los tejidos y fluidos humanos están en el rango de partes por billón e incluso partes por millón. De la misma forma, para metales tóxicos para el sistema nervioso en desarrollo, como Hg y Pb, a día de hoy sabemos que no es posible establecer dosis seguras para la madre embarazada y los niños de corta edad, pues la evidencia epidemiológica ha mostrado daños al neurodesarrollo a dosis de exposición bajas o muy bajas (Grandjean y Landrigan, 2006).

Está claro que los métodos que se han utilizado para identificar las dosis supuestamente seguras para los seres humanos son insuficientes para estos fines. Una de las razones puede ser que los signos de toxicidad evaluados en los estudios con animales son inadecuados para predecir los efectos de los DEs en las enfermedades mediadas por hormonas. Otra razón puede ser que la premisa de un umbral es errónea y que las dosis altas no pueden utilizarse para predecir los efectos de las dosis más bajas debido a la presencia de respuestas no monotónicas a las dosis. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la amplia presencia de contaminantes ambientales como los PFAS y metales tóxicos no esenciales en muestras de leche materna donada, representando una fuente de exposición para los recién nacidos más vulnerables, con la necesidad urgente de adoptar medidas preventivas mediante una rigurosa regulación de estas sustancias en una matriz tan valiosa.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral junto con la revisión de la literatura científica consultada y la experiencia clínica en la atención a los lactantes en la UCIN y en la gestión del Banco Hospitalario de Leche Materna, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. De acuerdo con las tareas de biomonitorización en curso, hemos ampliado el catálogo de compuestos químicos de toxicidad reconocida, analizando 242 muestras de leche, correspondiente a 83 madres donantes, con la precaución de que cada muestra analizada corresponde a varias tomas, lo cual evita el problema atribuido al muestreo simple (*spot sampling*). Las muestras de leche proceden de un banco de leches hospitalario que cumple con los más estrictos controles de seguridad existentes y son empleadas en la prescripción alimentaria de niños de muy bajo peso hospitalizados en la UCIN.
2. Respondiendo al primer objetivo, hemos abordado el estudio de los PFAS, permitiendo el desarrollo y validación de un procedimiento analítico para la determinación de estos compuestos en las muestras de leche materna, mediante la combinación de técnicas de extracción líquido-líquido con micro-extracción dispersiva y cromatografía de masas en tándem.
3. La aplicación del método a las muestras de leche muestra que al menos cinco de los once PFAS investigados están presentes en más de la mitad de las muestras: PFHpA en el 100%, PFOA en 84%, PFNA en 71%, PFHxA en 66% y PFTrDA en 62% de las muestras. La mediana de la suma de las concentraciones de todos los PFAS analizados fue de 87,67 ng/L, siendo la concentración de los PFAS de cadena corta mayor que la de los PFAS de cadena larga. Estos resultados corroboran anteriores estudios que sugieren que la lactancia es la fuente principal de exposición a PFAS en el niño de corta edad. Aunque las concentraciones de PFAS encontradas en la leche materna

donada son bajas en comparación con las descritas para otras poblaciones, se debe tener en cuenta que: 1) la evidencia epidemiológica sobre los efectos de la exposición postnatal a PFAS es muy limitada; 2) la leche donada es administrada a recién nacidos extremadamente vulnerables a la acción de cualquier sustancia tóxica; 3) el rango de concentraciones más altas descritas en esta Tesis Doctoral son comparables a las concentraciones en leche materna consideradas críticas por la EFSA para los PFAS más comunes (PFOA, PFOS, PFNA y PFHxA).

Los factores asociados con mayores concentraciones de PFAS incluyen tanto la ingesta de alimentos de origen animal como el uso de PCPs. Esta es una observación sorprendente, confirmada recientemente por otras publicaciones científicas, que pone de manifiesto las deficiencias de la declaración de ingredientes (INCI) que por ley deben cumplir cosméticos y PCPs.

4. Respondiendo al tercer objetivo hemos investigado la presencia de siete metales tóxicos, no esenciales, y los factores asociados con la exposición. La paridad, el empleo de PCPs y ciertos hábitos alimentarios se asociaron con la presencia de unos u otros metales. Preocupante es la presencia de As en la casi totalidad de las muestras (97%). Las concentraciones de As (mediana de 0,58 µg/L) fueron mayores en las muestras de leche de madres primíparas, hecho que parece concordar con la limpieza que supone la lactancia y el consecuente resultado de la exposición del lactante. Observación muy seria cuando se trata de un agente carcinógeno (Grupo I).

Como era esperable, las concentraciones de Hg (detectado en 81% de las muestras, mediana de 0,14 µg/L) fueron mayores en donantes que declararon con mayor consumo de pescado graso y carne. Esta es una observación habitual que ha motivado las recomendaciones que la administración europea y española dan sobre el consumo de pescado durante el embarazo, la lactancia y la infancia.

La detección de Pb ocurrió en algo más de la mitad de las muestras (51%) mayor en madres multíparas, exfumadoras y con ganancia de peso desde

antes del embarazo. Por su parte, Cd (38%), Li (79%) y Sb (72%) se asociaron con el uso de ciertos PCP, como había ocurrido con los PFAS, pero poco sabemos de la presencia de metales tóxicos en la formulación de este tipo de productos.

5. El Al, que se encontró en la casi totalidad de las muestras de leche (94%), alcanzó las concentraciones más elevadas (57,63 µg/L) de todos los metales medidos, superiores en un factor mayor de 100 al resto de metales. Las concentraciones del metal se asociaron con el contenido de lípidos de las muestras de leche y con el cambio de peso desde antes del embarazo. Pero curiosamente, el consumo de café que se ha popularizado por el empleo de envases unidos de este metal también es un predictor de las concentraciones.

Por último, las concentraciones de Sb se asociaron, entre otros factores alimentarios (pescado graso, yogur, arroz), con los alimentos fritos, hecho que nos hace pensar en el envase de plástico PET tan frecuentemente empleado en el envasado de aceite, a sabiendas de que Sb es el catalizador de la polimerización de este plástico.

Las estimaciones de las ingestas medias diarias de estos elementos metálicos vía leche materna donada por parte de los recién nacidos de muy bajo peso arrojan valores que están muy por debajo de los niveles seguros establecidos por autoridades como la EFSA. No obstante, hay que tener en que dichas dosis seguras suelen calcularse para el individuo adulto, además de no considerar la exposición a combinaciones de diferentes sustancias tóxicas.

6. Esta Tesis Doctoral fijó un objetivo general cumplido: La caracterización de la exposición infantil a contaminantes ambientales presentes en la leche materna bajo la premisa de que para los lactantes las primeras etapas de la vida, desde la concepción hasta los dos años son ventanas críticas de crecimiento y desarrollo, caracterizadas por la maduración y la programación epigenética de las vías neuronales, metabólicas e inmunitarias, así como de

los sistemas endocrino, reproductivo y renal. La exposición a contaminantes DEs debería ser evitada.

Queda ahora reflexionar y proceder a la toma de decisiones, firmes y diligentes, encaminada a la disminución efectiva de la presencia de los contaminantes ambientales en la leche materna a través de las recomendaciones que deben ser dadas a las madres donantes y los criterios de calidad y seguridad que los bancos deben de incorporar.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham K, Mielke H, Fromme H, Völkel W, Menzel J, Peiser M, et al. Internal exposure to perfluoroalkyl substances (PFASs) and biological markers in 101 healthy 1-year-old children: associations between levels of perfluorooctanoic acid (PFOA) and vaccine response. *Arch. Toxicol* 2020; 94 (6), 2131–2147.
- Almeida A.A, Lopes C.M, Silva M.A, Barrado E, Trace elements in human milk: correlation with blood levels, inter-element correlations and changes in concentration during the first month of lactation. *J. Trace Elem. Med. Biol* 2208; 22, 196–205.
- American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition, Section on Breastfeeding and Committee on fetus and newborn. Donor Human Milk for the High Risk Infant: Preparation, Safety, and Usage Options in the United States. *Pediatrics* 2017; 139:1.
- American Academy of Pediatrics. Section on breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012; 129:e827–41.
- Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 2015; 91(11):629-35.
- Antunes Dos Santos A, Appel Hort M, Culbreth M, López-Granero C, Farina M, Rocha JB, Aschner M. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 38:99-107.
- APNP AdPdNP. España tiene una de las tasas más altas de Europa de nacimientos prematuros. 2018.
- Asimakopoulos AG, Elangovan M, Kannan K. Migration of parabens, bisphenols, benzophenone-type UV filters, triclosan, and triclocarban from teething rings and its implications for infant exposure. *Environ. Sci. Technol* 2016; 50:13539–47.
- Ask K, Akesson A, Berglund M, Vahter M. Inorganic mercury and methylmercury in placentas of Swedish women. *Environ. Health Perspect* 2002; 110 (5), 523–526.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007a. Toxicological profile for lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR, 2007b. Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2012. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR, 2015. The priority list of hazardous substances that will be the candidates for toxicological profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

ATSDR, 2017. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (pfas) in the u.s. population.

ATSDR, 2018. Toxicological Profile for Perfluoroalkyls.

ATSDR. ATSDR's substance priority list. Retrieved 12/02/2019, from. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/#2017spl.2017>.

ATSDR. 2019. Agency for toxic substances and disease registry: Pfas exposure assessments.

Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006; 147: S43-9.

Apel P, Rousselle C, Lange R, Sissoko F, Kolossa-Gehring M, Ougier E. Human biomonitoring initiative (HBM4EU) - Strategy to derive human biomonitoring guidance values (HBM-GVs) for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health* 2020; 230:113622.

Arrebola JP, Fernández MF, Olea N, Ramos R, Martin-Olmedo P. Human exposure to p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) in urban and semi-rural areas in southeast Spain: a gender perspective. *Sci Total Environ* 2013; 458-460: 209- 16

Bach C.C, Vested A, Jørgensen K.T, Bonde J, Henriksen T, Toft G. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and measures of human fertility: A systematic review. *Critical Reviews in Toxicology* 2016; 46, 735–755.

Bahadar H, Abdollahi M, Maqbool F, Baeeri M, Niaz K. Mechanistic overview of immune modulatory effects of environmental toxicants. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2015; 13(6):382–386

Ballard O, Morrow A.L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* 2013; 60, 49–74

- Banks and Associations. Maintaining human milk bank services throughout the COVID-19 pandemic: A global response. *Maternal & Child Nutrition* 2021; 17, e13131.
- Barbarossa A, Masetti R, Gazzotti T, Zama D, Astolfi A, Veyrand B, et al. Perfluoroalkyl substances in human milk: a first survey in Italy. *Environ Int* 2013; 51:27–30
- Barker D.J. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatrica* 2004; 93, 26–33.
- Bartolomé M, Gallego-Picó A, Cutanda F, Huetos O, Esteban M, Pérez-Gómez B; Bioambient.es, Castaño A. Perfluorinated alkyl substances in Spanish adults: Geographical distribution and determinants of exposure. *Sci Total Environ* 2017; 15,603-604:352-360.
- Beasley SS, Saris, PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:5051-5053
- Bernhard D, Rossmann A, Wick G. Metals in cigarette smoke. *IUBMB Life* 2005; 57, 805–809.
- Beser M, Pardo O, Beltrán J, Yusà V. Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2019; 1049, 123–132.
- Bjerregaard-Olesen C, Bach C, Long M, Ghisari M, Bech B, Nohr E, et al. Determinants of serum levels of perfluorinated alkyl acids in Danish pregnant women. *Int. J. Hyg Environ. Health* 2016; 219 (8), 867–875.
- Björklund KL, Vahter M, Palm B, Grandér M, Lignell S, Berglund M. Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers: a biological monitoring study. *Environ Health* 2012; 11: 92.
- Black RF. Transmission of HIV-1 in the breast-feeding process. *J Am Diet Assoc* 1996; 96:267–274
- Blake BE, Fenton SE. Early life exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and latent health outcomes: A review including the placenta as a target tissue and possible driver of peri-and postnatal effects. *Toxicology* 2020; 443:152565.

- Bossi R, Strand J, Sortkjaer O, Larsen MM. Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environ Int* 2008; 34(4):443-50.
- Braun J. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat. Rev. Endocrinol* 2017; 13 (3):161–173.
- Brenna JT, Varamini B, Jensen RG, Diersen-Schade DA, Boettcher JA, Arterburn LM. Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk world- wide. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1457–64.
- Bressler J, Olivi L, Cheong J, Kim Y, Maerten A, Bannon D. Metal transports in intestine and brain: the involvement in metal-associated neuro- toxicity. *Hum. Exp. Toxicol* 2007;26, 221–229.
- Broberg K, Concha G, Engström K, Lindvall M, Grandér M, Vahter M. Lithium in drinking water and thyroid function. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 827-30.
- Brown RC, Barone Jr. S, Kimmel CA. Children’s health risk assessment: incorporating a lifestage approach into the risk assess- ment process. *Birth Defects Res (Part B)* 2008; 83:511–521.
- Bukowiecki N, Lienemann P, Hill M, Figi R, Richard A, Furger M, et al. Real-world emission factors for antimony and other brake wear related trace elements: size-segregated values for light and heavy duty vehicles. *Environ Sci Technol* 2009; 43: 8072-8.
- Bustaffa E, Stocco A, Bianchi F, Migliore L. Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. *Arch. Toxicol* 2014; 88 (5): 1043–1067.
- Cabrera-Rodríguez R, Luzardo OP, González-Antuña A, Boada LD, Almeida-González M, Camacho M, et al. Occurrence of 44 elements in human cord blood and their association with growth indicators in newborns. *Environ Int* 2018; 116: 43-51.
- Calafat AM, Needham LL, Kuklennyik Z, Reidy JA, Tully JS, Aguilar- Villalobos M, et al. Perfluorinated chemicals in selected resi- dents of the American continent. *Chemosphere* 2006; 63:490–496
- Calafat A, Kuklennyik Z, Reidy J.A, Caudill S, Tully J, Needham L. Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the u. S. Population: Data from the national

health and nutrition examination survey (nhanes) 1999-2000. *Environmental Science & Technology* 2007; 41: 2237–2242.

Calvo J, García Lara NR, Gormaz M, Peña M, Martínez Lorenzo MJ, Ortiz Murillo P, et al. Recomendaciones para la creación y el funcionamiento de los bancos de leche materna en España [Recommendations for the creation and operation of maternal milk banks in Spain]. *An Pediatr (Engl Ed)* 2018; 89(1):65

Cardoso O, Júlio F, Alves R, Baena A, Dez I, Suzuki M, et al. Concentration profiles in breast milk, drinking water and soil: relationship between matrices. *Biol. Trace Elem. Res* 2014; 160: 116–122.

Carignan CC, Cottingham KL, Jackson BP, Farzan SF, Gandolfi AJ, Punshon T, et al. Estimated exposure to arsenic in breastfed and formula-fed infants in a United States cohort. *Environ Health Perspect* 2015; 123(5):500–506

Cariou R, Veyrand B, Yamada A, Berrebi A, Zalko D, Durand S, et al. Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. *Environ. Int* 2015; 84: 71–81.

Carlin D.J, Naujokas M.F, Bradham K.D, Cowden J, Heacock M, Henry H.F. et al. Arsenic and environmental health: state of the science and future research opportunities. *Environ. Health Perspect* 2016; 124 (7): 890–899.

Castaño A, Cutanda F, Esteban M, Part P, Navarro C, Gomez S, et al. Fish consumption patterns and hair mercury levels in children and their mothers in 17 EU countries. *Environ. Res* 2015; 141: 58–68.

Casteleyn L, Aerts D. Guest Editorial. Harmonized human biomonitoring on a European scale: experiences in seventeen countries. *Environ Res* 2015; 141:1-2.

Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano F.J, Castell M, Moretones M.G, et al. A Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J. Nutr* 2011; 141:1181–1187.

Čechová E, Scheringer M, Seifertová M, Mikeš O, Kroupová K, Kuta J, et al. Developmental neurotoxicants in human milk: comparison of levels and intakes in three European countries. *Sci Total Environ* 2017; 579:637–645

- Costa S.L, Malm O, Dorea J.G. Breast-milk Mercury concentrations and amalgam surfasse in mothers from Brasilia, Brasil. *Biol. Trace Elem. Res* 2005; 106:145–151.
- Costa G, Sartori S, Consonni D. Thirty years of medical surveillance in perfluooctanoic acid production workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2009; 51: 364–372.
- Cubadda F, Jackson BP, Cottingham KL, Van Horne YO, Kurzius- Spencer M. Human exposure to dietary inorganic arsenic and other arsenic species: State of knowledge, gaps and uncer- tainties. *Sci. Total Environ* 2017; 579:1228–1239
- C8 Science Panel, 2020. C8 Science Panel. URL: <http://www.c8sciencepanel.org/>.
- Daniels L, Gibson R.S, Diana A, Haszard J.J, Rahmannia S, Luftimas D.E, et al. Micronutrient intakes of lactating mothers and their association with breast milk concentrations and micronutrient adequacy of exclusively breastfed Indonesian infants. *Am. J. Clin. Nutr* 2019; 110: 391–400.
- Darbre PD, Mannello F, Exley C. Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology. *J Inorg Biochem* 2013; 128: 257-61.
- Davidson P, Myers G, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, et al. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *J. Am. Med. Assoc* 1998;. 280 (8): 701–707.
- DeMarchis A, Israel-Ballard K, Mansen KA, Engmann C. Establishing an integrated human milk banking approach to strengthen newborn care. *J Perinatol* 2017; 37(5):469-474.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2009; 30(4):293-342.
- Domingo J.L, Nadal M. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in food and human dietary intake: a review of the recent scientific literature. *J. Agric. Food Chem* 2017; 65 (3):533–543.

Domingo J.L, Nadal M. Human exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (pfas) through drinking water: A review of the recent scientific literature. *Environmental Research* 2019; 177: 108648.

Dórea JG. Aluminium concentrations in human milk: additional comments on exposure issues in the neonate. *Pediatr Neonatol* 2014; 55(2):81-2.

Dórea JG, Marques RC. Infants' exposure to aluminum from vaccines and breast milk during the first 6 months. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010; 20: 598-601.

Dreyer A, Kirchgeorg T, Weinberg I, Matthias V, Particle-size distribution of airborne poly- and perfluorinated alkyl substances, *Chemosphere* 2015; 129:142e149

Duijts L, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics* 2010; 126:18–25

Duty SM, Mendonca K, Hauser R, Calafat AM, Ye X, Meeker JD, et al. Potential sources of bisphenol A in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2013; 131: 483-9.

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare's. "EDQM Highlights – 2019 annual report".

European Food Safety Authority (EFSA)2009a. Scientific opinion on arsenic in food – panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J* 2009a; 7(10):1351.

EFSA. Cadmium in food: scientific opinion of the Panel on Contaminants in Food Chain. European Food Safety Authority. *EFSA J* 2009b; 980: 1–139.

EFSA. Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J* 2020; 18 (9): 6223.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, Del Mazo J, et al. Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA J* 2020;18(9):e06223.

Eidelman A.I, Schanler R.J. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012; 129 (3): e827–e841.

EPA. US. A framework for assessing health risks of environmental exposures to children. 2006; <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid 5 158363>

- Esteban-Vasallo MD, Aragonés N, Pollan M, López-Abente G, Perez-Gomez B. Mercury, cadmium, and lead levels in human placenta: a systematic review. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 1369-77.
- ESPGHAN Committee on Nutrition, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, Campoy C, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57:535–42.
- Ettinger A.S, Roy A, Amarairiwardena C.J, Smith D.R, Lupoli N, Mercado-Garcia A, et al. Maternal blood, plasma and breast milk lead: lactational transfer and contribution to infant exposure. *Environ. Health Perspect* 2014; 122 (1): 87–92.
- Ettinger A.S, Tellez-Rojo M.M, Amarairiwardena C.J, Gonzalez-Cossio T, Peterson K.E, Aro, A. Levels of lead in breast milk and their relation to maternal blood and bone lead levels at one month postpartum. *Environ. Health Perspect* 2004; 112: 926–931.
- European Milk Bank Association (EMBA). Map of European human milk banks. 2021; <https://europeanmilkbanking.com/map/>
- European Commission. Evaluation of the Union legislation on blood, tissues and cells. European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation (CD-P-TO). Other substances of human milk origin for clinical application. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application 2019; 29: 327-32
- European Commission. Blood, tissues and cells for medical treatments & therapies– revised EU rules. 2021; <https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/12734-Blood-tissues-and-cells-for-medical-treatments-therapies-revised-EU-rules>
- EUROSTAT. Chemicals production and consumption statistics. *Statistics Explained* 2020.
- Fängström B, Moore S, Nermell B, Kuenst L, Goessler W, Vahter M, et al. Breast-feeding protects against arsenic exposure in Bangladeshi infants. *Environ. Health Perspect* 2008; 116 (7): 963–969.
- Farina M, Aschner M, Rocha J.B.T. Special issue: environmental chemicals and neurotoxicity oxidative stress in MeHg induced toxicology. *Toxicol. Appl Pharm* 2011; 256 (3):405–417.

- Fenton S.E, Ducatman A, Boobis A, DeWitt J.C, Lau C, Ng C, et al. Per- and polyfluoroalkyl substance toxicity and human health review: current state of knowledge and strategies for informing future research. *Environ. Toxicol. Chem* 2020; 40 (3):606-630.
- Ferguson A, Penney R, Solo-Gabriele H. A Review of the Field on Children's Exposure to Environmental Contaminants: A Risk Assessment Approach. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14(3):265.
- Fernandez-Lorenzo JR, Cocho JA, Rey-Goldar ML, Couce M, Fraga JM. Aluminum contents of human milk, cow's milk, and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 270-5.
- Fernandez MF, Kiviranta H, Molina-Molina JM, Laine O, Lopez-Espinosa MJ, Vartiainen T, et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere* 2008; 71: 1196-205.
- Forns J, Fort M, Casas M, Cáceres A, Guxens M, Gascon M, et al. Exposure to metals during pregnancy and neuropsychological development at the age of 4 years. *Neurotoxicology* 2014; 40: 16-22.
- Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 899-911.
- Freire C, Amaya E, Gil F, Fernández MF, Murcia M, Olea N. et al. INMA Project. Prenatal co-exposure to neurotoxic metals and neurodevelopment in preschool children: The Environment and Childhood (INMA) Project. *Sci Total Environ* 2018; 621:340-351.
- Freire C, Amaya E, Gil F, Murcia M, Olea N, Fernández MF, et al., INMA Project. Placental metal concentrations and birth outcomes: The Environment and Childhood (INMA) project. *Int J Hyg Environ Health* 2019;222(3):468-478.
- Frisbee SJ, Brooks AP Jr, Maher A, Flensburg P, Arnold S, Fletcher T, et al. The C8 health project: design, methods, and participants. *Environ Health Perspect* 2009; 117(12):1873-82.

- Fromme H, Mosch C, Morovitz M, Alba-Alejandre I, Boehmer S, Kiranoglu M, et al. Pre- and postnatal exposure to perfluorinated compounds (PFCs). *Environ. Sci. Technol* 2010; 44:7123–7129
- Fujii Y, Yan J, Harada KH, Hitomi T, Yang H, Wang P, Koizumi A. Levels and profiles of long-chain perfluorinated carboxylic acids in human breast milk and infant formulas in East Asia. *Chemosphere* 2012; 86(3):315–321
- García-Lara NR, Peña Caballero M. Risks associated with the uncontrolled use of donated breast milk. *An Pediatr* 2017; 86(5):237-239
- Gaxiola-Robles R, Zenteno-Savin T, Labrada-Martagón V, Rosa A.J.C, Vargas B.A, Méndez-Rodríguez L.C. Concentraciones de mercurio em leche de mujeres del noroeste de Mexico: posible asociación a la dieta, tabaco y otros factores maternos. *Nutr. Hosp* 2013; 28(3):934–942.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3725-40.
- Geiger, A. and Cooper, J. Overview of Airborne Metals Regulations, Exposure Limits, Health Effects, and Contemporary Research. Environmental Protection Agency 2010; 1:56.
- Ghassabian A, Vandenberg L, Kannan K, Trasande L. Endocrine-Disrupting Chemicals and Child Health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2022; 62:573-594.
- Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr* 2014; 14:216.
- Gil F, Hernández AF. Toxicological importance of human biomonitoring of metallic and metalloid elements in different biological samples. *Food Chem Toxicol* 2015; 80: 287-297.
- Gimeno P, Spinau C, Lassu N, Maggio AF, Brenier C, Lempereur L. Identification and quantification of bisphenol A and bisphenol B in polyvinylchloride and polycarbonate medical devices by gas chromatography with mass spectrometry. *J Sep Sci* 2015; 38(21):3727-34.

- Ginsberg G, Slikker W Jr, Bruckner J, Sonawane B. Incorporating children's toxicokinetics into a risk framework. *Environ Health Perspect* 2004; 112(2):272-83.
- Goeden H.M, Greene C.W, Jacobus J.A. A transgenerational toxicokinetic model and its use in derivation of Minnesota PFOA water guidance. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 2019; 29:183–195.
- Goeden H.M. Focus on chronic exposure for deriving drinking water guidance underestimates potential risk to infants. *Int J Environ Res Public Health* 2018; 15:512.
- Gonçalves R.M, Gonçalves J.R, Fornés N.S. Cádmio no leite materno: concentração e relação com o estilo de vida da puérpera. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet* 2010; 32(7): 340–345.
- Grandjean P. Delayed discovery, dissemination, and decisions on intervention in environmental health: a case study on immunotoxicity of perfluorinated alkylate substances. *Environ. Health* 2019; 17(1):62.
- Grandjean EM, Aubry JM. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: part III: clinical safety. *CNS Drugs* 2009; 23: 397-418.
- Grandjean P, Landrigan P.J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006; 368:2167–2178.
- Grandjean P, Weihe P, White R.F, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with pre-natal exposure to methyl-mercury. *Neurotoxicol. Teratol* 1997; 19:417–428.
- Gulson B.L, Mizon K.J, Korsch M.J, Palmer J.M. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation – a summary of long term research. *Sci. Total Environ.* 2003; 303:79–104.
- Gundacker C, Pietschnig B, Wittmann K.J, Lischka A, Salzer H, Hohenauer L, Schuster E. Lead and mercury in breast milk. *Pediatrics* 2002; 110(5):873–878.
- Gundacker C, and Zödl B. Heavy metals in breast milk: implications for toxicity, In: Preedy V.R. and Watson R.R., (Eds.), *Reviews in Food and Nutrition Toxicity* 2005; 4:1–28.

- Guney M, Zagury G.J. Heavy metals in toys and low-cost jewelry: critical review of US and Canadian legislations and recommendations for testing. *Environ. Sci. Technol* 2012; 46:4265–4274.
- Gürbay A, Charehsaz M, Eken A, Sayal A, Girgin G, Yurdakak M, et al. Toxic metals in breast milk samples from Ankara Turkey: assessment of lead, cadmium, nickel and arsenic levels. *Biol. Trace Elem. Res* 2012; 149: 117–122.
- Guzmán MM, Clementini C, Pérez-Cárceles MD, Rejón SJ, Cascone A, Martellini T, et al. Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake. *Sci Total Environ* 2016; 544:595–600
- Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, Olea N, et al. INMA Project. Cohort Profile: the INMA--INfancia y Medio Ambiente-- (Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol* 2012; 41(4):930-40.
- Hadders-Algra M, Bouwstra H, van Goor SA, Dijck-Brouwer DA, Muskiet FA. Prenatal and early postnatal fatty acid status and neurodevelopmental outcome. *J Perinat Med* 2007; 35 Suppl 1: S28-34.
- Hanson LA, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin Neonatol* 2002;7(4):275–81.
- Harari F, Langeén M, Casimiro E, Bottai M, Palm B, Nordqvist H, et al. Environmental exposure to lithium during pregnancy and fetal size: a longitudinal study in the Argentinean Andes. *Environ Int* 2015; 77: 48-54.
- Harrison W, Goodman D. Epidemiologic Trends in Neonatal Intensive Care, 2007-2012. *JAMA Pediatrics* 2015; 169:855-862.
- Haug L.S, Huber S, Becher G, Thomsen C. Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds--comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. *Environ. Int* 2011; 37(4):687–693.
- Health Risk Assessment Guidance for Metals (HERAG). Gastrointestinal Uptake and Absorption, and Catalogue of Toxicokinetic Models. Health Risk Assessment Guidance for Metals (HERAG) Fact Sheet 4 2007; Available at: <<https://www.icmm.com/document/264>>

- Heiman H, Schanler RJ. Enteral nutrition for premature infants: the role of human milk. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12(1):26-34.
- Heindel J.J, Balbus J, Birnbaum L, et al. Developmental origins of health and disease: integrating environmental influences. *Endocrinology* 2015; 156(10):3416–3421.
- Heindel JJ, Vandenberg LN. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease etiology and prevention. *Curr. Opin. Pediatr* 2015; 27:248–53
- Henríquez-Hernández LA, Romero D, González-Antuña A, Gonzalez-Alzaga B, Zumbado M, Boada LD, et al. Biomonitoring of 45 inorganic elements measured in plasma from Spanish subjects: A cross-sectional study in Andalusian population. *Sci Total Environ* 2020; 706:135750.
- Hoffman K, Vieira V, Webster T, White R. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children aged 12-15 years. *Epidemiology* 2009; 20(6):S70
- Hooper K, She J. Lessons from the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Precautionary principle, primary prevention, and the value of community-based body-burden monitoring using breast milk. *Environ Health Perspect* 2003;111:109–14.
- Honda R, Tawara K, Nishijo M, Nakagawa H, Tanebe K, Saito S. Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. *Toxicology* 2003; 186(3):255–259.
- Hopkins Z.R, Sun M, DeWitt J.C, Knappe D.R. Recently detected drinking water contaminants: GenX and other per-and polyfluoroalkyl ether acids. *Journal-American Water Works Association* 2018; 110(7):13–28.
- Hu L, Luo D, Wang L, Yu M, Zhao S, Wang Y, et al. Levels and profiles of persistent organic pollutants in breast milk in China and their potential health risks to breastfed infants: a review. *Sci. Total Environ* 2021; 753:142028.
- Hylander MA, Strobino DM, Pezzullo JC, Dhanireddy R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol* 2001; 21:356–62.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Classified by the IARC Monographs 2016.

Ibrahim H, ElGhany A, Mohamed S, Elshafie MT, Hady E. Cognitive Function in breastfed versus Artificially Fed in preschool children. Egypt J.Hosp. Med 2019; 77:5742-5751

Interstate Technology and Regulatory Council (ITRC). Interstate technology and regulatory council: Naming conventions and physical and chemical properties of per- and polyfluoroalkyl substances (pfas) 2020; URL: <https://pfas-1.itrcweb.org/fact-sheets/>.

Iribarne-Durán LM, Artacho-Cordón F, Serrano L, Hurtado JA, Fernández MF, Freire C, Olea N. Presence of Bisphenol A and Parabens in a Neonatal Intensive Care Unit: An Exploratory Study of Potential Sources of Exposure. Environ Health Perspect 2019; 127(11):117004.

Iyengar G.V. Reference values for elemental concentrations in some human samples of clinical interest: a preliminary evaluation. Sci. Total Environ 1984; 38:125–131.

Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 3: toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. Sci Total Environ 2001;280(1-3):221-38.

Iyengar GV, Kasperek K, Feinendegen LE, Wang YX, Weese H. Determination of Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Sb, Se and Zn in milk samples. Sci Total Environ 1982; 24:267-74.

JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series 2004; No. 922.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 2011A; No. 959.

JECFA. Safety Evaluation of Certain Contaminants in Food. Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Technical Report Series 2011B; No. 960.

- Jones PD, Hu W, de Coen W, Newsted JL, Giesy JP . Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ Toxicol Chem* 2003; 22:2639–2649
- Jones K, Galea KS, Scholten B, Loikala M, Porrás SP, Bousoumah R, et al. Eu Diisocyanates Study Team. HBM4EU Diisocyanates Study-Research Protocol for a Collaborative European Human Biological Monitoring Study on Occupational Exposure. *Int J Environ Res Public Health* 2022; 19(14):8811.
- Joas R, Casteleyn L, Biot P, Kolossa-Gehring M, Castano A, Angerer J, et al.. Harmonised human biomonitoring in Europe: activities towards an EU HBM framework. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215(2):172-5.
- Jorissen J. Literature review. Outcomes associated with postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) via breast milk. *Adv Neonatal Care* 2007; 7(5):230-7.
- Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 40(1):241-58.
- Kadar H, Veyrand B, Barbarossa A, Pagliuca G, Legrand A, Boshier C et al. Development of an analytical strategy based on liquid chromatography–high resolution mass spectrometry for measuring perfluorinated compounds in human breast milk: application to the generation of preliminary data regarding perinatal exposure in France. *Chemosphere* 2011; 85:473–480
- Kang H, Choi K, Lee HS, Kim DH, Park NY, Kim S, Kho Y. Elevated levels of short carbon-chain PFASAs in breast milk among Korean women: current status and potential challenges. *Environ Res* 2016; 148:351–359
- Karmaus W, DeKoning EP, Kruse H, Witten J, Osuia N. Early childhood determinants of organochlorine concentrations in school- age children. *Pediatr Res* 2001;50:331–6.
- Kärrman A, Ericson I, van Bavel B, Darnerud PO, Aune M, Glynn A, et al. Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden. *Environ Health Perspect* 2007; 15(2):225–230

- Kärrman A, Lindström G. Trends, analytical methods and precision in the determination of perfluoroalkyl acids in human milk, *Trends Anal. Chem* 2013; 46:118e128
- Kärrman A, Domingo J.L, Llebaria X, Nadal M, Bigas E, van Bavel B, Lindström G. Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: concentrations and trends in human liver and milk samples. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int* 2010; 17:750–758.
- Kashino I, Sasaki S, Okada E, Matsuura H, Goudarzi H, Miyashita C, et al. Prenatal exposure to 11 perfluoroalkyl substances and fetal growth: A large-scale, prospective birth cohort study. *Environ Int* 2020; 136:105355.
- Kelleher S.L, Lonnerdal B. Molecular regulation of milk trace mineral homeostasis. *Mol. Asp. Med* 2005; 6:328–339.
- Kim S, Eom S, Kim H-J, Lee JJ, Choi G, Choi S, et al. Association between maternal exposure to major phthalates, heavy metals, and persistent organic pollutants, and the neurodevelopmental performances of their children at 1 to 2 years of age- CHECK cohort study. *Sci Total Environ* 2018; 624:377–384
- Kim SK, Lee KT, Kang CS, Tao L, Kannan K, Kim K-R, et al. Distribution of perfluorochemicals between sera and milk from the same mothers and implications for prenatal and postnatal exposures. *Environ Pollut* 2011; 159:169–174
- Kippler M, Lönnerdal B, Goessler W, Ekström E.C, Arifeen S.E, Vahter M. Cadmium interacts with the transport of essential micronutrients in the mammary gland – a study in rural Bangladeshi women. *Toxicology* 2009; 257(1–2):64–69.
- Klotz D, Jansen S, Glanzmann R, Haiden N, Fuchs H, Gebauer, C. Donor human milk programs in German, Austrian and Swiss neonatal units—Findings from an international survey. *BMC Pediatrics* 2020; 20(1), 235.
- Klotz D, Wesołowska A, Bertino E, Moro GE, Picaud JC, Gayà A, Weaver G. The legislative framework of donor human milk and human milk banking in Europe. *Matern Child Nutr* 2022; 18(2):e13310.

- Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, et al. The roles of long- chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* 2008; 36: 5- 14.
- Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns?. *Environ Health Perspect* 2007; 115 Suppl 1: 106-14
- Landrigan PJ, Carlson JE, Bearer CF, Cranmer JS, Bullard RD, Etzel RA, et al. Children's health and the environment: a new agenda for prevention research. *Environ Health Perspect* 1998; 106(Suppl 3):787-94.
- Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 2018; 391(10119):462-512.
- Lankova D, Lacina O, Pulkrabova J, Hajslova J. The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula. *Talanta* 2013; 117: 318–325
- Lawrence RA. Breastfeeding: benefits, risks and alternatives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12:519–524.
- Lee S, Kim S, Park J, Kim H.J, Choi G, Choi S, et al. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in breast milk from Korea: time-course trends, influencing factors, and infant exposure. *Sci. Total Environ* 2018; 612:286–292.
- Lehmann GM, LaKind JS, Davis MH, Hines EP, Marchitti SA, Alcalá C, Lorber M. Environmental Chemicals in Breast Milk and Formula: Exposure and Risk Assessment Implications. *Environ Health Perspect* 2018; 126(9):96001.
- Lenters V, Iszatt N, Fornis J, Čechová E, Kočan A, Legler J, et al. Early-life exposure to persistent organic pollutants (OCPs, PBDEs, PCBs, PFASs) and attention-deficit/hyperactivity disorder: A multi-pollutant analysis of a Norwegian birth cohort. *Environ Int* 2019; 125:33-42.
- Leon-Cava N, Lutter C, Ross J, Martin L. Quantifying the Benefits of Breastfeeding: A Summary of the Evidence; Pan American Health Organization: Washington, DC, USA, 2002.

- Leotsinidis M, Alexopoulos A, Kostopoulou-Farri E. Toxic and essential trace elements in human milk from greek lactating women: association with dietary habits and other factors. *Chemosphere* 2005; 61:238–247.
- Li D, Suh S. Health risks of chemicals in consumer products: A review. *Environ Int* 2019; 123:580-587.
- Liao C, Kannan K. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J. Agric. Food. Chem* 2013; 61:4655–62
- Lien G.W, Huang C.C, Wu K.Y, Chen M.H, Lin C.Y, Chen C.Y, et al. Neonatal-maternal factors and perfluoroalkyl substances in cord blood. *Chemosphere* 2013; 92:843–850.
- Liew Z, Luo J, Nohr E.A, Bech B.H, Bossi R, Arah O.A, Olsen J. Maternal plasma perfluoroalkyl substances and miscarriage: a nested case-control study in the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect* 2020; 128 (4):47007.
- Liu Z, Cabrey J.M, Agre P, Rosen B.P. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochem Biophys. Res. Commun* 2004; 316 (4):1178–1185.
- Li P, Sheng Y, Wang Q, Gu L, Wang Y. Transfer of lead via placenta and breast milk in human. *Biomed. Environ. Sci* 2000; 13:85–89.
- Liu J, Li J, Zhao Y, Wang Y, Zhang Y, Lei Z, Wu Y. The occurrence of perfluorinated alkyl compounds in human milk from different regions of China. *Environ Int* 2010; 36:433–438
- Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012; 379:2151-61.
- Liu J, Li J, Liu Y, Chan HM, Zhao Y, Cai Z, Wu Y. Comparison on gestation and lactation exposure of perfluorinated compounds for newborns. *Environ Int* 2011; 37:1206–1212
- Li P, Sheng Y, Wang Q, Gu L, Wang Y. Transfer of lead via placenta and breast milk in human. *Biomed. Environ. Sci* 2000; 13:85–89.

- Llorca M, Farré M, Pico Y, Teijón M.L, Alvarez J.C, Barceló D. Infant exposure of perfluorinated compounds: levels in breast milk and commercial baby food. *Environ. Int* 2010; 36:584–592.
- Lonnerdal B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol* 2004; 554:11–25.
- Lopez-Espinosa M.J, Mondal D, Armstrong B, Bloom M.S, Fletcher T. Thyroid function and perfluoroalkyl acids in children living near a chemical plant. *Environ. Health Perspect* 2012; 120:1036–1041.
- Lorenzo M, Farré M, Blasco C, Onghena M, Pico Y, Barceló D. Perfluoroalkyl substances in breast milk, infant formula and baby food from Valencian community (Spain). *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage* 2016; 6:108–115.
- Louro H, Gomes BC, Saber AT, Iamiceli AL, Göen T, Olea N, et al. The Use of Human Biomonitoring to Assess Occupational Exposure to PAHs in Europe: A Comprehensive Review. *Toxics* 2022; 10(8):480.
- Lynch H.N, Greenberg G.I, Pollock M.C, Lewis A.S. A comprehensive evaluation of inorganic arsenic in food and considerations for dietary intake analyses. *Sci. Total Environ* 2014; 299–313.
- Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol* 2012; 1:533–557.
- Maffei D, Schanler RJ. Human milk is the feeding strategy to prevent necrotizing enterocolitis! *Semin Perinatol* 2017; 41:36–40.
- McClintock T.R, Chen Y, Bundschuh J, Oliver J.T, Navoni J, Olmos V, et al. Arsenic exposure in Latin America: biomarkers, risk assessment and related health effects. *Sci. Total Environ* 2012; 429:76–91.
- Macheka-Tendenguwo L.R, Olowoyo J.O, Mugivhisa L.L, Afafe O.A. Per- and polyfluoroalkyl substances in human breast milk and current analytical methods. *Environ. Sci. Pollut. Res* 2018; 25:36064–36086.
- MacManus-Spencer LA, Tse ML, Herbert PC, Bischel HB, Luthy RG. Binding of perfluorocarboxylates to serum albumin: a comparison of analytical methods. *Anal Chem* 2010; 82(3):974–981

- Makris SL, Thompson CM, Euling SY, Selevan SG, Sonawane B. A lifestage-specific approach to hazard and dose-response characterization for children's health risk assessment. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008; 83(6):530-46.
- Man YB, Chow KL, Xing GH, Chan JKY, Wu SC, Wong MH. A pilot study on health risk assessment based on body loadings of PCBs of lactating mothers at Taizhou, China, the world's major site for recycling transformers. *Environ Pollut* 2017; 227:364–371
- Mannello F, Tonti GA, Darbre PD. Concentration of aluminium in breast cyst fluids collected from women affected by gross cystic breast disease. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 1-6.
- Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al., Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215(1):103.e1-103.e14.
- Marques R.C, Moreira, Mde F, Bernardi J.V, Dórea J.G. Breast milk lead concentrations of mothers living near tin smelters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 2013; 91:549–554.
- Martí-Cid R, Llobet J.M, Castell V, Domingo J.L. Dietary intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by the population of Catalonia, Spain. *Biol. Trace Elem. Res* 2008; 125:120–132.
- Martin JW, Kannan K, Berger U, Pim de Voogt P, Field J, Franklin J, et al. Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research. *Environ Sci Tech* 2004; 38:248A–255A
- Matsuzaki T, Machida N, Tajika Y, Ablimit A, Suzuki T, Aoki T. Expression and immunolocalization of water-channel aquaporins in the rat and mouse mammary gland. *Histochem. Cell Biol* 2005; 123 (4–5):501–512.
- McClintock T.R, Chen Y, Bundschuh J, Oliver J.T, Navoni J, Olmos V, et al. Arsenic exposure in Latin America: biomarkers, risk assessment and related health effects. *Sci. Total Environ* 2012; 429: 76–91.

- McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR. Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2012; 379:721-8.
- McManaman J.L, Neville M.C. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Deliv. Rev* 2003; 55:629–641.
- McManaman J.L. Lipid transport in the lactating mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2014; 19:35–42.
- Miklavcic A, Casetta A, Tratnik J.S, Mazej D, Krsnik M, Mariuz M, et al. Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ. Res* 2013; 120:7–17.
- Miller MD, Crofton KM, Rice DC, Zoeller RT. Thyroid-disrupting chemicals: interpreting up-stream biomarkers of adverse outcomes. *Environ. Health Perspect* 2009; 117:1033–41.
- Ministerio de Sanidad S.Sel. Unidades de Neonatología. Estándares y recomendaciones de calidad. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2014.
- Miracle D.J, Szucs K.A, Torke A.M, Helft P.R. Contemporary ethical issues in human milk-banking in the United States. *Pediatrics* 2011; 128(6):1186–1191.
- Mokarizadeh A, Faryabi MR, Rezvanfar MA, Abdollahi M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol Mech Methods* 2015; 25(4):258–278.
- Mondal D, Hernandez Weldon R, Armstrong B.G, Gibson L.J, Lopez-Espinosa M.J, Shin H.M, Fletcher T. Breast feeding: a potential excretion route for mothers and implications for infant exposure to perfluoroalkyl acids. *Environ. Health Perspect* 2014; 122(2): 187–192.
- Motas Guzmán M, Clementini C, Pérez-Cárceles M.D, Rejón S.J, Cascone A, Martellini T, et al. Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake. *Sci. Total Environ* 2016; 544:595–600.
- Motas M, Jiménez S, Oliva J, Cámara M, Pérez-Cárceles MD. Heavy Metals and Trace Elements in Human Breast Milk from Industrial/Mining and Agricultural Zones of Southeastern Spain. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18.

- Nemsadze K, Sanikidze T, Ratiani L, Gabunia L, Sharashenidze T. Mechanisms of lead-induced poisoning. *Georgian Med. News* 2009; 7–8 (172–173):92–96.
- NHANES I. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia 2009.
- Nicole W. Advocates for Children's Health: Working Together to Reduce Harmful Environmental Exposures. *Environ Health Perspect* 2018; 126(1):012001.
- Nickerson K. Environmental contaminants in breast milk. *J Midwifery Womens Health* 2006; 51(1):26-34.
- Novak FR, Cordeiro DM. The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(1):87-91.
- Oddy WH. Breastfeeding protects against illness and infection in infants and children: a review of the evidence. *Breastfeed Rev* 2001; 9:11–18.
- Ohno K, Yanase T, Matsuo Y, Kimura T, Rahman MH, Magara Y, Matsui Y. Arsenic intake via water and food by a population living in an arsenic-affected area of Bangladesh. *Sci Total Environ* 2007; 381(1-3):68–76
- Olsen GW, Church TR, Miller JP, Burris JM, Hansen KJ, Lundberg JK et al. Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross blood donors. *Environ Health Perspect* 2003; 111:1892–1901
- Ortega-García JA, Aguilar-Ros E, Ares-Segura S, Agüera-Arenas JJ, Pernas-Barahona A, Sáenz de Pipaón M, et al. Exposiciones laborales, dieta y envasado: recomendaciones para reducir los contaminantes medioambientales en la lactancia materna [Occupational exposures, diet and storing: Recommendations to reduce environmental pollutants in breastfeeding]. *An Pediatr (Engl Ed)* 2021; 94(4):261.e1-261.e9.
- Örün E, Yalçın S.S, Aykut O, Orhan G, Koç-Morgil G, Yurdakök K, Uzun R. Mercury exposure via breast-milk in infants from a suburban area of Ankara, Turkey. *Turk. J. Pediatr* 2012; 54:136–143.
- Oskarsson A, Hallén I.P, Sundberg J, Grawé K.P. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. *Analyst* 1998; 123:19–23.

- Oyebode F, Rastogi A, Berrisford G, Coccia F. Psychotropics in pregnancy: safety and other considerations. *Pharmacol Ther* 2012; 135:71-7.
- Pak VM, Nailon RE, McCauley LA. Controversy: neonatal exposure to plasticizers in the NICU. *MCN Am J Matern Child Nurs* 2007; 32(4):244-9.
- Papke O. PCDD/PCDF: Human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ Health Perspect* 1998; 106(Suppl 2):723–31.
- Parr RM, DeMaeyer EM, Iyengar VG, Byrne AR, Kirkbright GF, Schöch G, et al. Minor and trace elements in human milk from Guatemala, Hungary, Nigeria, Philippines, Sweden, and Zaire. Results from a WHO/IAEA joint project. *Biol Trace Elem Res* 1991; 29: 51-75
- Parker M.G, Stellwagen L.M, Noble L, Kim J.H, Poindexter B.B, Puopolo K.M, AAP Section on Breastfeeding, Committee on Nutrition, Committee on Fetus and Newborn. Promoting human milk and breastfeeding for the very low birth weight infant. *Pediatrics* 2021; 148(5):e2021054272.
- Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol* 2011; 31: 363-73.
- Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Cervantes-Amat M, Esteban M, Ruiz-Moraga M, Aragonés N, et al. BIOAMBIENT.ES study protocol: rationale and design of a cross-sectional human biomonitoring survey in Spain. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20(2):1193-202
- Pérez F, Nadal M, Navarro-Ortega A, Fàbrega F, Domingo J.L, Barceló D, et al. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment International* 2013; 59:354–362.
- Picaud JC, Buffin R. Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clin Perinatol* 2017; 44:95–119
- Poels EMP, Schrijver L, Kamperman AM, Hillegers MHJ, Hoogendijk WJG, Kushner SA, et al. Long-term neurodevelopmental consequences of intrauterine exposure to lithium and antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2018b; 27: 1209-1230.

- Pons S.M, Bargalló A.C, Folgoso C.C, Sabater M.L. Triacylglycerol composition in colostrum, transitional and mature human milk. *Eur. J. Clin. Nutr* 2000; 54: 878–882.
- Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fitó N, Llop S, López T. Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience. *Environ Int* 2008; 34(4):546-61.
- Poulin J, Gibb H. Mercury – assessing the environmental burden of disease at national and local levels. *Environmental Burden of Disease Series, No. 16*. In: Prüss-Üstün, Annette (Ed.). WHO, Public Health and the Environment Geneva 2008.
- Powe CE, Knott CD, Conklin Brittain N. Infants ex predicts breast milk energy content. *Am. J. Hum. Biol* 2010; 22:50-54
- Prashanth L, Kumar Kattapagari K, Teja Chittur R, Ramana Reddy Badda V, Krishna Prasad L. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci* 2015; 4:75-85
- Preston E.V, Webster T.F, Claus Henn B, McClean M.D, Gennings C, Oken E, et al. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and maternal and neonatal thyroid function in the Project Viva Cohort: a mixtures approach. *Environ. Int* 2020; 139: 105728.
- Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 22:CD002971.
- Ragusa A, Notarstefano V, Svelato A, Belloni A, Gioacchini G, Blondeel C, et al. Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers (Basel)* 2022; 14(13):2700.
- Rahimi E, Hashemi M, Toriki Baghbadorani Z. Determination of cadmium and lead in human milk. *Int J. Environ. Sci. Technol* 2009; 6:671–676.
- Rebelo FM, Caldas ED. Arsenic, lead, mercury and cadmium: toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. *Environ Res* 2016; 151:671–688
- Reemtsma, T, García-Lopez M, Rodríguez I, Quintana JB, Rodil R. Organo- phosphorus flame retardants and plasticizers in water and air I. Occurrence and fate, *TrAC Trends Anal. Chem* 2008; 27:727e737

- Rite Gracia S, Fernández Lorenzo JR, Echániz Urcelay I, Botet Mussons F, Herranz Carrillo G, Moreno Hernando J, Salguero García E, Sánchez Luna M; Comité de Estándares y la Junta Directiva de la Sociedad Española de Neonatología. Niveles asistenciales y recomendaciones de mínimos para la atención neonatal. *An Pediatr (Barc)* 2013; 79(1):51.e1-51.e11. S
- Robinson BH, Yalamanchali R, Reiser R, Dickinson NM. Lithium as an emerging environmental contaminant: Mobility in the soil-plant system. *Chemosphere* 2018; 197: 1-6.
- Roosens L, D'Hollander W, Bervoets L, Reynders H, van Campenhout K, Cornelis C, et al. Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environ. Pollut* 2010; 158: 2546–2552.
- Rotenberg S.J, Khan F, Manalo M, Jiang J, Cuellar R, Reyes S, et al. Maternal bone lead contribution to blood lead after pregnancy. *Environ. Res* 2000; 82: 81–90.
- Rysavy MA, Li L, Bell EF, Das A, Hintz SR, Stoll BJ, et al. Between-hospital variation in treatment and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 2015; 372: 1801-11.
- Safe S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(4):139-44.
- Sakamoto M, Kubota M, Matsumoto S, Nakano A, Akagi H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. *Environ. Res* 2002; 90(3): 185–189.
- Samanta G, Das D, Mandal B.K, Chowdhury T.R, Pal A, Ahamed S. Arsenic in the breast milk of lactating women in arsenic-affected areas of West Bengal, India and its effects in infants. *J. Environ. Sci. Health Part A: Toxic Hazard. Subst. Environ. Eng* 2007; 42 (8): 1815–1825.
- Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou P.B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Rev. Environ. Health* 2009; 24(1): 15–45.

- Sánchez-Tamayo T, Espinosa Fernández MG, Affumicato L, et al. Reduction in necrotising enterocolitis after implementing an evidence-based enteral nutrition protocol in very low birth weight newborns. *An Pediatr (Barc)* 2016; 85: 291–299.
- Sander S, Kappenstein O, Ebner I, Fritsch KA, Schmidt R, Pfaff K, et al. Release of aluminium and thallium ions from uncoated food contact materials made of aluminium alloys into food and food simulant. *PLoS One* 2018; 13: e0200778.
- Sanajou S, Şahin G, Baydar T. Aluminium in cosmetics and personal care products. *J Appl Toxicol* 2021; 41: 1704-1718.
- SCENIHR. Opinion on the Safety of the Use of Bisphenol A in Medical Devices. Luxembourg: European Commission 2015.
- SCENIHR. Opinion on the Safety of Medical Devices Containing DEHPPlasticized PVC or Other Plasticizers on Neonates and Other Groups Possibly at Risk (2015 Update). Luxembourg: European Commission 2016.
- Scheepers PTJ, Duca RC, Galea KS, Godderis L, Hardy E, Knudsen LE, Hbm Eu E-Waste Study Team et al. HBM4EU Occupational Biomonitoring Study on e-Waste-Study Protocol. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(24):12987.
- Schettgen T, Alt A, Esser A, Kraus T. Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p,p'-DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2015; 218: 380-5.
- Schnaas L, Rothenberg S, Flores M, Martinez S, Hernandez C, Osório E, et al. Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. *Environ. Health Perspect* 2006; 114: 791–799.
- Scholtens PA, Alliet P, Raes M, Alles MS, Kroes H, Boehm G, et al. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *J Nutr* 2008; 138(6):1141-7.
- Scholtens S, Wijga AH, Smit HA, Brunekreef B, de Jongste JC, Gerritsen J, Seidell JC. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk and early weight gain in breast-fed infants. *Br J Nutr* 2009; 101(1):116-21.

- Schulz C, Angerer J, Ewers U, Heudorf U, Wilhelm M. 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). *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 637-47.
- Schultes L, Vestergren R, Volkova K, Westberg E, Jacobson T, Benskin J.P. Per- and polyfluoroalkyl substances and fluorine mass balance in cosmetic products from the Swedish market: implications for environmental emissions and human exposure. *Environ. Sci. Process Impacts* 2018; 20(12): 1680–1690.
- Serrano L, Iribarne-Durán LM, Artacho-Cordón F, Olea N, Fernández MF, Freire C, et al. Concentrations of perfluoroalkyl substances in donor breast milk in Southern Spain and their potential determinants. *Int J Hyg Environ Health* 2021; 236:113796.
- Shenker N, Staff M, Vickers A, Aprigio J, Tiwari S, Nangia S, et al. & Virtual Collaborative Network of Milk Banks and Associations. Maintaining human milk bank services throughout the COVID-19 pandemic: A global response. *Maternal & Child Nutrition* 2021; 17: e13131.
- Shennan D, Peaker M. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol. Rev* 2000; 80: 925–951.
- Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B, et al. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 2014; 122(10):1103–1109
- Sinialu L, Yeung LWY, Wang J, Pan Y, Dai J, Hyötyläinen T. Prenatal exposure to poly-/per-fluoroalkyl substances is associated with alteration of lipid profiles in cord-blood. *Metabolomics* 2021; 17(12):103.
- Skinner MK, Guerrero-Bosagna C. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics* 2009; 1: 111-117
- Slama R, Ballester F, Casas M, Cordier S, Eggesbø M, Iniguez C, et al. Epidemiologic tools to study the influence of environmental factors on fecundity and pregnancy-related outcomes. *Epidemiol Rev* 2014; 36(1):148-64.

- Solomon GM, Weiss PM. Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability. *Environ Health Perspect* 2002; 110: A339-47.
- Stern A.H, Smith A.E. An assessment of the cord blood: maternal blood methyl mercury ratio: implications for risk assessment. *Environ. Health Perspect* 2003; 111 (12): 1465–1470.
- Street M.E, Angelini S, Bernasconi S, Burgio E, Cassio A, Catellani C, et al. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: highlights from a national Italian meeting. *Int. J. Mol. Sci* 2018; 19 (6): 1647.
- Sundar S, Chakravarty J. Antimony toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7:4267-77.
- Sunderland E.M, Hu X.C, Dassuncao C, Tokranov A.K, Wagner C.C, Allen J.G. A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) and present understanding of health effects. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 2019; 29: 131–147.
- Tao L, Kannan K, Wong C.M, Arcaro K.F, Butenhoff J.L. Perfluorinated compounds in human milk from Massachusetts, USA. *Environ. Sci. Technol* 2008a; 42 (8): 3096–3101.
- Tao L, Ma J, Kunisue T, Libelo EL, Tanabe S, Kannan K. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ Sci Tech* 2008b; 42:8597–8602
- Taravati Javad M, Vahidinia A, Samiee F, Elaridi J, Leili M, Faradmal J, et al. Analysis of aluminum, minerals and trace elements in the milk samples from lactating mothers in Hamadan, Iran. *J Trace Elem Med Biol* 2018; 50: 8-15.
- Taylor V, Goodale B, Raab A, Schwerdtle T, Reimer K, Conklin S, et al. Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Sci Total Environ* 2017; 580:266–282
- Tittlemier S.A, Pepper K, Seymour C, Moisey J, Bronson R, Cao X.L, Dabeka R.W. Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *J. Agric. Food Chem* 2007; 55 (8): 3203–3210.

- Thomsen C, Haug LS, Stigum H, Frøshaug M, Broadwell SL, Becher G. Changes in concentrations of perfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast-milk during twelve months of lactation. *Environ Sci Tech* 2010; 44: 9550–9556.
- Tran TM, Kannan K. Occurrence of phthalate diesters in particulate and vapor phases in indoor air and implications for human exposure in Albany, New York, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 2015; 68:489–99.
- UNEP, 2019. Global Chemicals Outlook II: summary for policymakers. UNEP/EA.4/21.
- Ullah I, Zhao L, Hai Y, Fahim M, Alwayli D, Wang X, et al. "Metal elements and pesticides as risk factors for Parkinson's disease - A review". *Toxicol Rep* 2021; 8: 607-616.
- Urbaniak M, Kiedrzyńska E, Kiedrzyński M, Zieliński M, Grochowalski A. The role of hydrology in the polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran distributions in a lowland river. *J Environ Qual* 2015; 44(4):1171–1182
- Vahter M. Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic Clin. Pharm. Toxicol* 2008; 102: 204–211.
- Valent F, Mariuz M, Bin M, Little D, Mazej D, Tognin V, et al. Associations of prenatal mercury exposure from maternal fish consumption and polyunsaturated fatty acids with child neurodevelopment: a prospective cohort study in Italy. *J. Epidemiol* 2013; 23: 360–370.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr., et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev* 2012; 33:378–455
- Vass R.A, Kemeny A, Dergez T, Ertl T, Reglodi D, Jungling A, Tamas A. Distribution of bioactive factors in human milk samples. *Int. Breastfeed. J* 2019; 14: 9.
- Vela-Soria F, Serrano-López L, García-Villanova J, de Haro T, Olea N, Freire C. HPLC-MS/MS method for the determination of perfluoroalkyl substances in breast milk by combining salt-assisted and dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem* 2020; 412 (28): 7913–7923.
- Vieira S.M, Almeida R, Holanda I.B.B, Mussu M.H, Galvão R.C.F, Crispim P.T.B et al. Total and methyl Mercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho

and villages along the Rio Madeira, Amazon, Brasil. *Int J. Hyg. Environ. Health* 2013; 216: 682–689.

Vilahur N, Bustamante M, Byun HM, Fernandez MF, Santa Marina L, Basterrechea M, et al. Prenatal exposure to mixtures of xenoestrogens and repetitive element DNA methylation changes in human placenta. *Environ Int* 2014; 71: 81-7

Vogel JP, Chawanpaiboon S, Watananirun K, Lumbiganon P, Petzold M, Moller AB, et al. Global, regional and national levels and trends of preterm birth rates for 1990 to 2014: protocol for development of World Health Organization estimates. *Reprod Health* 2016; 13: 76.

Völkel W, Genzel-Boroviczeny O, Demmelmair H, Gebauer C, Koletzko B, Twardella D. Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2008; 211 (3):440–446.

Vrijheid M, Casas M, Gascon M, Valvi D, Nieuwenhuijsen M. Environmental pollutants and child health-A review of recent concerns. *Int J Hyg Environ Health* 2016; 219(4-5): 331-42.

Vuong A.M, Yolton K, Xie C, Dietrich K.N, Braun J.M, Calafat A. M, et al. Prenatal and childhood exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) and cognitive development in children at age 8 years. *Environ. Res* 2019; 172: 242–248.

Wappelhorst O, Kühn I, Heidenreich H, Markert B. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* 2002; 18: 316-22.

Weaver G, Bertino E, Gebauer C, Grovslien A, Mileusnic-Milenovic R, Arslanoglu S, et al., Recommendations for the Establishment and Operation of Human Milk Banks in Europe: A Consensus Statement From the European Milk Bank Association (EMBA). *Front Pediatr* 2019; 7:53.

Welborn JM. The experience of expressing and donating breast milk following a perinatal loss. *J Hum Lact* 2012; 28:506–10.

Wesolowska A, Sinkiewicz-Darol E, Barbarska O, Bernatowicz-Lojko U, Borszewska-Kornacka MK, van Goudoever JB. Innovative Techniques of Processing Human Milk to Preserve Key Components. *Nutrients* 2019; 11(5):1169.

- Whitworth KW, Haug LS, Baird DD, Becher G, Hoppin JA, Skjaerven R et al. Perfluorinated compounds and subfecundity in pregnant women. *Epidemiology* 2012; 23(2):257–263.
- World Health Organization (WHO), 2001. Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds, Second edition.
- WHO/PCS/EDC/02.2. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. 2002.
- WHO, 2003. Elemental Mercury and Inorganic Mercury Compounds: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document 50.
- WHO, 2010a. Childhood Lead Poisoning. World Health Organization, Geneva.
- WHO/UNICEF. Global Strategy for Infant and Young Child Feeding. Geneva: WHO 2003; Available online at <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562218.pdf>
- World Health Organization 2017. Donor human milk for low-birthweight infants. http://www.who.int/elena/titles/donormilk_infants/en/.
- Wu Q, Kannan K. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in foodstuffs and human dietary exposure. In *Advances in the Determination of Xenobiotics in Foods 2019*; 258–311.
- Xu C, Yin S, Liu Y, Chen F, Zhong Z, Li F, et al. Prenatal exposure to chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonic acids and perfluoroalkyl acids: Potential role of maternal determinants and associations with birth outcomes. *Journal of Hazardous Materials* 2019; 380: 120867.
- Yusà V, Dualde P, Pardo O, Coscolla, C, López A. Evaluación de la de la exposición a contaminantes alimentarios y ambientales mediante biomonitorización humana en la Comunitat Valenciana. 2020.
- Zumbado M, Luzardo OP, Rodríguez-Hernández Á, Boada LD, Henríquez-Hernández LA. Differential exposure to 33 toxic elements through cigarette smoking, based on the type of tobacco and rolling paper used. *Environ Res* 2019; 169: 368-376.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

Anexo I. Aprobación Comité de Ética

Anexo II. Entrevista Inicial donantes inscripción Banco de Leche

Anexo III. Cuestionario epidemiológico ampliado

Anexo IV. Hoja informativa Banco de Leche Humana

Anexo V. Material Suplementario Artículo 1

Anexo VI. Material Suplementario Artículo 2

Anexo VII. Material Suplementario Artículo 3

Anexo VIII. Material Suplementario Artículo 4

ANEXO I. APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª: Juan Morales Arcas como secretario/a del CEI de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Exposición del recién nacido de muy bajo peso a disruptores endocrinos (DEs) en la Unidad de Cuidados Neonatales (UCIN) y evaluación de las consecuencias sobre el desarrollo. ,(P116/01820)

Protocolo, Versión: HIP, Versión: 2
CI, Versión: 2

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en GRANADA a 29/03/2017

D/Dª. Juan Morales Arcas, como Secretario/a del CEI de Granada



Código Seguro De Verificación:	16a862a9f0e36e2d04b71770463a9f6da46bb934	Fecha	29/03/2017	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Juan Morales Arcas			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificafirmaDocumento.iface/code/16a862a9f0e36e2d04b71770463a9f6da46bb934	Página	1/2	

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 28/11/2016 y recogida en acta 3/2017 la propuesta del/de la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Exposición del recién nacido de muy bajo peso a disruptores endocrinos (DEs) en la Unidad de Cuidados Neonatales (UCIN) y evaluación de las consecuencias sobre el desarrollo. , (PI16/01820)

Protocolo, Versión: 2

HIP, Versión: 2

CI, Versión: 2

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/D^a. Fidel Fernández Quesada

Vicepresidente/a

D/D^a. Francisco Manuel Luque Martínez

Secretario/a

D/D^a. Juan Morales Arcas

Vocales

D/D^a. Jesús Martínez Tapias
 D/D^a. José Expósito Hernández
 D/D^a. Juan Ramón Delgado Pérez
 D/D^a. Berta Gorlat Sánchez
 D/D^a. José Dario Sánchez López
 D/D^a. José Cabeza Barrera
 D/D^a. José Uberos Fernández
 D/D^a. Enrique Lopez Cordoba
 D/D^a. MARIA ESPERANZA DEL POZO GAVILAN
 D/D^a. ESTHER OCETE HITA
 D/D^a. MAXIMILIANO OCETE ESPINOLA
 D/D^a. Joaquina Martínez Galán
 D/D^a. Maria José García Sánchez
 D/D^a. AURORA BUENO CAVANILLAS
 D/D^a. MARIA MERCEDES RODRIGUEZ MORALES
 D/D^a. Paloma Muñoz de Rueda
 D/D^a. Manuel Gálvez Ibáñez
 D/D^a. JUAN ROMERO COTELO
 D/D^a. Esther Espinola García
 D/D^a. MARÍA DEL PILAR GONZÁLEZ CARRIÓN
 D/D^a. Juan de Dios Luna del Castillo
 D/D^a. Pilar Guijosa Campos
 D/D^a. José Luis Martín Ruiz
 D/D^a. FRANCISCO LUIS MANZANO MANZANO
 D/D^a. MIGUEL LÓPEZ GUADALUPE

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.



Lo que firmo en GRANADA a 29/03/2017

Código Seguro De Verificación:	16a862a9f0e36e2d04b71770463a9f6da46bb934	Fecha	29/03/2017	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Juan Morales Arcas			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iFace/code/16a862a9f0e36e2d04b71770463a9f6da46bb934	Página	2/2	

ANEXO II. ENTREVISTA INICIAL DONANTES
INSCRIPCIÓN BANCO DE LECHE HUMANA

H.U. Virgen de las Nieves
U.G.C. MEDICO QUIRÚRGICA DE LA INFANCIA Unidad de Neonatología

Formulario para inscripción de la donante Fecha / /

Madre

Nombre.....

D.N.I.....

Dirección: Calle/Plaza/AVDA No C.P.

Poblacion: Ciudad

.....

FN / / Edad años

Teléfonos de contacto: 1)..... 2) móvil

e-mail Profesión

País de origen: de la donante: de su pareja:

¿Por qué quiere ser donante?

¿Cómo se enteró del Banco de Leche?

Hijo actual:

Nombre Fecha de nacimiento / /

Lugar de nacimiento Se le transfundió intraútero: no / si Edad gestacional..... Peso al nacer

Ha estado ingresado: no / si ¿Dónde? Alguna patología

Su bebé está sano y crece adecuadamente: si / no

Planes de la donante para incorporarse a su trabajo

Hijos previos:

No: No: No:

tiempo en meses con LM ... Donante de leche previamente: si / no tiempo en meses con LM

tiempo en meses con LM

Historia médica materna

¿Padece o ha padecido alguna de las siguientes infecciones?:

- hepatitis, ictericia o problemas hepáticos no / si -
tuberculosis o contacto con la mismano / si - otras
.....

¿Padece o ha padecido alguna enfermedad?: (especificar)
F-PO-N-01-01 Pág.1 de 3 “BLH – Unidad Neonatología”

Ed.02 11/03/2015

H.U. Virgen de las Nieves
U.G.C. MEDICO QUIRÚRGICA DE LA INFANCIA Unidad de Neonatología

- crónica: no / si - importante en el último
año: no / si
.....

Medicación (incluidas hierbas y vitaminas):
-habituales: - ocasionales:
.....

Situaciones de riesgo:

- vacunada de rubéola u otra en las últimas 4 semanas
- receptora de hormona de crecimiento previa a 1985
- receptora de trasplante de tejidos u órganos
- cirugía mayor o endoscopia en los últimos 6 meses - ha recibido alguna
transfusión o inmunoglobulina
- tatuajes o piercing en los 6 últimos meses - acupuntura o pinchazo
accidental con aguja en los 6 últimos meses .

no / si no / si no / si

no / si no / si

no / si

no / si

- Ha viajado en los últimos 6 meses a algún país de Africa, America o Asia no/si ¿Cuál?

Estilo de vida materna

Cafeína: no / si Tabaco: no / si Alcohol: no / si

no de bebidas al día
no de cigarrillos al día
no de unidades al día / semana

¿Consume o ha consumido drogas: no / si especificar Dietas
especiales: - vegetariana: no / si ¿toma vitamina B12: si / no Conducta sexual:

- - ¿tiene pareja estable? si / no
- - ¿ha tenido relaciones sexuales con una pareja transfundida en los últimos 6 meses, consumidora de drogas, con hepatitis, con VIH o residente en zona endémica de VIH? no / si

Declaro que he leído y comprendido los motivos que excluyen la donación de leche humana, que estos no me afectan y que he tenido la oportunidad de aclarar las dudas y que me han sido resueltas

Firma de la madre

Profesional responsable de la inscripción:

F-PO-N-01-01 Pág.2 de 3 Ed.02 11/03/2015

Firma del profesional

“BLH – Unidad Neonatología”

H.U. Virgen de las Nieves

U.G.C. MEDICO QUIRÚRGICA DE LA INFANCIA Unidad de Neonatología

Granada de 20

Número de donante

Observaciones

F-PO-N-01-01 Pág.3 de 3 “BLH – Unidad Neonatología” Ed.02 11/03/2015

ANEXO III. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO
AMPLIADO

CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

Nombre de la donante:	
Código proyecto:	
Código Biobanco:	
Entrevistador:	

A. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS	
1. Lugar de residencia _____	
2. ¿Cuánto tiempo lleva viviendo en ese lugar? _____ años	
3. Considere los últimos 10 años. ¿Está su residencia próxima a una zona con actividad agrícola (<5Km)? 1. No 2. Sí Nº Años _____	
4. Considere los últimos 10 años. ¿Está su residencia próxima a un lugar con invernaderos (<5Km)? 1. No 2. Sí Nº Años _____	
5. Considere los últimos 10 años. ¿Está su residencia próxima a una zona con alguna actividad industrial (<5Km)? 1. No 2. Sí Nº Años _____	
6. Considere los últimos 10 años. ¿Qué tipo de actividad industrial (<5Km)? (reparación de coches, maquinarias, gasolineras...) garaje,...) 1. No 2. Sí Nº Años _____	
7. ¿Qué características presenta su calle? 1. Calle 2. Avenida 3. Camino rural 4. Plaza 5. Otras: _____	
8. ¿Qué tipo de vivienda tiene (casa, piso, chalet...)? _____	
9. ¿Qué estudios tiene usted? 1. Hasta primaria 2. Secundaria 3. Estudios Universitarios	10. ¿Qué estudios tiene su cónyuge? 1. Hasta primaria 2. Secundaria 3. Estudios Universitarios

B. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS
11. ¿Cuánto mide usted? _____ Cm
12. ¿Cuánto pesa usted? _____ Kg
13. ¿Cuánto peso ha ganado durante el embarazo? _____ Kg
14. ¿Cuánto peso ha perdido desde el parto? _____ Kg
15. Con respecto a antes de quedarse embarazada (Y NO ANTES DEL PARTO), cree usted que ha: 1. Perdido peso 2. Ganado peso 3. Se ha mantenido igual
16. ¿Se encuentra usted bajo algún programa de pérdida de peso activo? 1. No 2. Sí ¿Cuál? _____
17. Nº Semanas de gestación _____
18. ¿Cuál ha sido la longitud del bebe al nacer? _____ Cm
19. ¿Padeció diabetes gestacional durante el embarazo?

- | |
|----------------|
| 1. No
2. Sí |
|----------------|

C. CONDICIONES DE SALUD		
20. ¿Le han puesto alguna vez un empaste? 1. No 2. Sí		
21. En caso afirmativo, por favor especifique:		
Tipo	<u>Amalgama</u>	<u>Composite</u>
Número de empastes		
22. ¿Cuánto tiempo hace desde que le pusieron un empaste por última vez? _____ meses		

D. ESTILOS DE VIDA		
23. ¿Ha fumado con anterioridad? 1. Nunca 2. Sí		
24. En caso afirmativo, ¿Con qué frecuencia fumaba en el pasado? _____ cigarrillos/día		

E. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA DIETA	
Las preguntas de dieta se refieren a los hábitos de vida de la mujer fuera del embarazo, NO durante el embarazo	
25. ¿Qué tipo de agua bebe usted más frecuentemente?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agua del grifo 2. Agua mineral
26. ¿Cuánta agua bebe? _____ vasos/día. (1 vaso=250mL)	
27. ¿Con qué frecuencia come pescado y marisco?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
28. ¿Con qué frecuencia come pescado blanco?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
29. ¿Con qué frecuencia come pescado azul?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
30. ¿Con qué frecuencia consume productos lácteos? (no queso)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Dos veces por semana o menos 3. Más de dos veces por semana 4. Todos los días <p style="text-align: center;">DESNATADOS / ENTEROS</p>
31. ¿Qué tipo de leche consume?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Entera 2. Semidesnatada 3. Desnatada
32. ¿Cuánta leche toma al día? _____ vasos/día	
33. ¿Con qué frecuencia come queso?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Dos veces por semana o menos 3. Más de dos veces por semana 4. Todos los días
34. ¿Qué tipo de queso consume más frecuentemente?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fresco 2. Semicurado 3. Curado 4. Indistintamente
35. ¿Con qué frecuencia consume embutidos y fiambres?	

<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Dos veces por semana o menos 3. Más de dos veces por semana 4. Todos los días
<p>36. ¿Qué consume con mayor frecuencia?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Embutido 2. Fiambre
<p>37. ¿Con qué frecuencia come carne?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>38. ¿Qué tipo de carne consume más frecuentemente?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pollo 2. Cerdo 3. Vacuno 4. Ovino 5. Indistintamente 6. Otros
<p>39. ¿Con qué frecuencia come carne roja (ternera, cerdo, cordero...)?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>40. ¿Con qué grasa cocina habitualmente?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aceite de oliva 2. Otros aceites vegetales 3. Grasa animal 4. Indistintamente
<p>41. ¿Consume mantequilla y/o margarina?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Mantequilla 3. Margarina 4. Indistintamente
<p>42. ¿Con que frecuencia consume mantequilla y/o margarina?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una vez por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día
<p>43. ¿Con qué frecuencia come legumbres? (lentejas, garbanzos,...)</p>

<ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>44. ¿Con qué frecuencia come verduras cocinadas?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>45. ¿Con qué frecuencia come vegetales crudos?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>46. ¿Con qué frecuencia come fruta?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>47. ¿Con qué frecuencia come huevos? (fritos, en tortilla, cocidos...)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>48. ¿Con qué frecuencia come pan?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una-dos veces por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día
<p>49. ¿Con qué frecuencia consume chocolate?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una-dos veces por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día
<p>50. ¿Con qué frecuencia consume arroz?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una-dos veces por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día

<p>51. ¿Con qué frecuencia consume pastas? (macarrones, espaguetis,...)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una-dos veces por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día
<p>52. ¿Con qué frecuencia consume cereales?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una-dos veces por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día
<p>53. ¿Consume comida enlatada?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No 2. Sí
<p>54. En caso de respuesta afirmativa, ¿Cuántas latas de conserva consumen a la semana? _____ latas/semana</p>
<p>55. ¿Ha variado su dieta considerablemente en los últimos doce meses?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No 2. Sí
<p>56. En caso afirmativo, indicar en qué medida y cuándo se produjo dicha variación:</p>
<p>57. ¿Come comida ecológica?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No 2. Sí
<p>58. En caso afirmativo ¿Qué proporción de su dieta proviene de alimentos ecológicos?</p>
<p>59. ¿Con qué frecuencia come comidas fritas?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. 1 vez por semana 4. 2-4 veces por semana 5. 5-6 veces por semana 6. A diario
<p>60. ¿Cuáles son los alimentos fritos que más consume?</p>
<p><i>SUPLEMENTOS Y OTROS HÁBITOS DIETÉTICOS</i></p>
<p>61. ¿Ha tomado usted suplementos nutricionales?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No (Fin Cuestionario) 2. Sí
<p>62. Preparados de calcio (Una unidad...)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca


<ul style="list-style-type: none"> 2. Menos de una vez por semana 3. 1 vez por semana 4. 2-4 veces por semana 5. 5-6 veces por semana 6. A diario
<p>63. Suplementos ricos en fibra (Una unidad...)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. 1 vez por semana 4. 2-4 veces por semana 5. 5-6 veces por semana 6. A diario
<p>64. Multivitaminas (Una unidad...)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. 1 vez por semana 4. 2-4 veces por semana 5. 5-6 veces por semana 6. A diario
<p>65. Otros suplementos (Ácido fólico, yodo...) (Una unidad...)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. 1 vez por semana 4. 2-4 veces por semana 5. 5-6 veces por semana 6. A diario

CUESTIONARIO SOBRE
USO DE PRODUCTOS DE HIGIENE PERSONAL
Y
COSMÉTICA

A) CREMAS SOLARES

1. Frecuencia de aplicación de cremas solares

En esta pregunta, queremos saber con qué frecuencia has usado **crema solar** en los últimos 30 días. Por favor, indica cuantos días (1.1) y con qué frecuencia (1.2) has usado crema solar en las áreas corporales marcadas de gris:

Área corporal	Últimos 30 días
(A) Aplicación total 	1.1 Un total de _____ días 1.2 una media de <input type="checkbox"/> 1 vez al día <input type="checkbox"/> 2 veces al día <input type="checkbox"/> 3 veces al día <input type="checkbox"/> 4 veces al día o más
(B) Sólo en cabeza y brazos y/o piernas 	1.1 Un total de _____ días 1.2 una media de <input type="checkbox"/> 1 vez al día <input type="checkbox"/> 2 veces al día <input type="checkbox"/> 3 veces al día <input type="checkbox"/> 4 veces al día o más
(C) Sólo cabeza 	1.1 Un total de _____ días 1.2 una media de <input type="checkbox"/> 1 vez al día <input type="checkbox"/> 2 veces al día <input type="checkbox"/> 3 veces al día <input type="checkbox"/> 4 veces al día o más

2. Nombre y Factor de protección de la crema solar utilizada

Por favor, indica, con el mayor detalle posible, en nombre (Nivea, Garnier,...) y tipo de aplicación (Spray, crema,...) y el factor de protección de la crema más usada en los últimos 30 días

Nombre	Tipo de aplicación	Factor de protección

3. Protector labial

En general, está usando algún tipo de protector labial (en barra, crema...)

Nombre	Tipo de aplicación	Factor de protección

B) USO DE COSMÉTICOS

4. En general, ¿con qué frecuencia ha usado los siguientes productos en los últimos 30 días?

	4 o más al día	2-3 veces al día	1 vez al día	5-6 veces a la semana	3-4 veces a la semana	1-2 veces a la semana	Raro/Nunca
4.1 Crema facial							
4.2 Loción corporal							

4.3 Crema de manos							
4.4 Mascarilla							
4.5 Maquillaje							
4.6 Tónico facial							
4.7 Pintalabios							
4.8 Lápiz de ojos							
4.9 Sombra de ojos							
4.10 Leche facial							
4.11 Pintaúñas							

5. En general, con qué frecuencia realiza las siguientes actividades?

	Semanalmente	Varias veces al mes	Mensualmente	Menos de una vez al mes	Nunca
5.1 Tratamiento facial _____					
5.2 Manicura					
5.3 Pedicura					
5.4 Uñas acrílicas					
5.4 Masaje					
5.5 Tinción de pelo					
5.6 Permanente, fortalecimiento pelo,.... _____					

C) USO DE PRODUCTOS DE HIGIENE PERSONAL

5. En general, ¿con qué frecuencia ha usado los siguientes productos en los últimos 30 días?

	4 o más al día	2-3 veces al día	1 vez al día	5-6 veces a la semana	3-4 veces a la semana	1-2 veces a la semana	Raro/Nunca
5.1 Champú _____							
5.2 Gel _____							
5.3 Desodorante							
5.4 Acondicionador							
5.6 Laca/cera/espuma							
5.7 Colonia/perfume							
5.8 Pasta de dientes							
5.9 Enjuague bucal							

ANEXO IV. HOJA INFORMATIVA DONANTES BANCO DE
LECHE HUMANA 1

Recuerde no hay una cantidad mínima de leche para donar, ni un tiempo limitado para ser donante. Su hijo no se quedará sin leche, ya que con las extracciones regulares de leche, su producción aumentará.

Entrega de Leche

La leche congelada en su domicilio debe llegar al Banco de Leche en los 15 días posteriores a su extracción.

El horario de entrega en la Unidad de Neonatología 5ª Planta Hospital Materno Infantil es todos los días de la semana de 8:00-22:00. Consulte otros puntos de recogida de leche en Granada.

El Banco de Leche puede facilitarle una “**Tarjeta de aparcamiento**” que le permitirá estacionar transitoriamente en el recinto del Hospital mientras se realiza la entrega de leche.

INFORMACIÓN UTIL

Atención a donantes Lunes a Viernes: 8:00-15:00

Cita previa: Teléfonos: 958 02 00 03- 670 941 857- 690 959 634

Entrega de Leche: 5ªPlanta Unidad Neonatal Hospital Materno Infantil.

Lunes a Domingo 8:00-22:00. Consultar otros puntos de Entrega

Consultas: 670 941 857- 690 959 634

Mail: bancodeleche.hvn.sspa@juntadeandalucia.es

Durante todo el periodo de donación, personal sanitario adscrito al Banco de Leche estará a su disposición.

En nombre de todos los profesionales que trabajan en este Banco de leche, de los padres de niños enfermos y prematuros y en nombre de los propios neonatos le damos gracias por su generosa aportación.



INFORMACIÓN UTIL PARA LAS DONANTES

Le agradecemos su colaboración e interés por donar su leche. La donación es un acto voluntario y altruista que beneficia a muchos recién nacidos enfermos y prematuros sin ningún riesgo para la madre donante ni para su hijo. La OMS y la UNICEF, ya señalaron hace años “*La leche humana es el alimento de elección para todos los niños, incluidos los prematuros y los niños enfermos...*” “*Cuando no se disponga de leche de la propia madre, la leche pasteurizada de madres donantes seleccionadas es la mejor opción para la alimentación de los niños, sobre todo si se trata de ni os enfermos o de alto riesgo...*” <http://www.who.int/gb/EB-WHA/PDF/WHA55/EA5515.PDF>

La leche donada se selecciona, se analiza, se le realizan controles microbiológicos y se pasteuriza recibiendo todos los tratamientos establecidos que garantizan su seguridad antes de administrarla a los receptores.

La leche donada pasteurizada se administrará bajo prescripción médica niños prematuros y enfermos que puedan mejorar su estado de salud.

Se le solicitará consentimiento para que pequeñas muestras de leche donada podrán ser usadas con fines de investigación siempre con el objetivo de mejorar el proceso de donación de leche humana.

Para ser madre donante se requieren unos requisitos de salud y estilo de vida, que se le explicarán en el momento de realizar su inscripción como donante.

Siga las indicaciones que se le han proporcionado de forma oral y escrita en el momento de su inscripción acerca de la manera de extraer, conservar y transportar su leche hasta el Banco de Leche.

Alimentación

Puede comer cualquier tipo de alimentos que se encuentran incluidos normalmente en la dieta.

Si presenta algún déficit específico de micronutrientes es posible que precise suplementos o productos fortificados, tanto para su propia salud como la de su hijo que su médico le indicará .

Es recomendable realizar una alimentación saludable, equilibrada y variada, reforzar el consumo de lácteos, cereales, frutas y hortalizas

- Realizar 5 comidas al día.
- Preparar los alimentos de forma sencilla, con aceite de oliva virgen extra, disminuyendo la sal y azúcares.
- Limitar el consumo de excitantes como café o té, hierbas como el hinojo y menta poleo. (Menos de 2 bebidas al día, 300 mg)
- Comer despacio y masticar bien.
- Mantener higiene bucal.
- Realizar actividad física diariamente y al aire libre, para evitar el estreñimiento, mejorar la circulación sanguínea, entre otras.
- Mantener una buena hidratación.

No se recomiendan dietas que aporten menos de 1800kcal al día. Si se quiere perder peso se debe combinar la restricción dietética con ejercicio físico, pero que no sean de tipo impacto, como correr o aeróbic, al menos durante los primeros meses, porque se puede resentir el suelo pélvico, que ya viene resentido del embarazo.

Consulte al personal del Banco de Leche, si usted tiene alguna dieta especial o es vegetariana para recibir asesoramiento sobre alimentación durante su período de lactancia.

Hábitos de vida

Recuerde: No se admite ningún consumo de alcohol ni tabaco o productos que contengan nicotina.

Si durante su período como donante desarrolla alguna enfermedad aguda o algún proceso infeccioso agudo leve, comuníquelo al personal del Banco de Leche, que valorará en función del tipo de proceso o infección la conveniencia de suspender temporalmente la donación y el tiempo de dicha suspensión. Igualmente comunique cualquier afectación de la mama (mastitis, o lesiones en área de la areola-pezones), hasta la completa curación de éstas deberá interrumpir la extracción para la donación.

La mayoría de fármacos son compatibles con la lactancia materna, sin embargo la donación de leche va dirigida a pacientes inmaduros, con un mayor riesgo derivado de la posible exposición a fármacos. Sin está tomando o precisa puntualmente tomar algún fármaco, producto de herbolario o parafarmacia comuníquelo al personal del Banco de leche para su valoración. Si se ha vacunado recientemente o va a realizarse pruebas radiológicas con contraste o de medicina nuclear, comuníquelo por favor al personal de atención a donantes.

Donación de leche

Atienda las instrucciones sobre higiene del procedimiento y de los materiales (sacaleches, neveras) para mejorar la calidad y la seguridad del procedimiento de la donación y evitar posibles contaminaciones.

Use siempre los envases facilitados por el Banco de Leche. No se aceptan las bolsas de congelación de leche para la donación de leche.

Recomendamos la extracción diaria para la donación ya que de esta manera aumentará la producción. Elija el momento que le resulte más cómodo para las extracciones destinadas a la donación. Normalmente las extracciones de la mañana suelen ser más eficaces.

ANEXO V. MATERIAL SUPLEMENTARIO ARTÍCULO 1

**“HPLC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF PERFLUOROALKYL
SUBSTANCES IN BREAST MILK BY COMBINING SALT-ASSISTED AND DISPERSIVE
LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION”**

Table S1. Experimental domain and design matrix for salt masses in SALLE optimisation.

Factor	Level	
	Low	High
Mass of NaCl (mg)	300	900
Mass of MgSO ₄ (mg)	200	600
Mass of di-sodium hydrogen citrate	0	400
Mass of tri-sodium citrate	0	400

Design matrix point	Mass of NaCl (mg)	Mass of MgSO ₄ (mg)	Mass of di-sodium citrate (mg)	Mass of tri-sodium citrate (mg)
1	300	200	0	0
2	900	200	0	0
3	300	600	0	0
4	900	600	0	0
5	300	200	400	0
6	900	200	400	0
7	300	600	400	0
8	900	600	400	0
9	300	200	200	400
10	900	200	200	400
11	300	600	200	400
12	900	600	200	400
13	300	200	400	400
14	900	200	400	400
15	300	600	400	400
16	900	600	400	400
17	600	400	200	200
18	600	400	200	200
19	600	400	200	200
20	600	400	200	200
21	600	400	200	200

Table S2. Experimental domain and design matrix for optimisation of DLLME.

Factor	Level	
	Low	High
Volume of TCM (μL)	500	1500
pH of aqueous solution	2	5
% NaCl of aqueous solution	2	10
Extraction time (s)	20	60

Design matrix point	Volume of TCM (μL)	pH of aqueous solution	% NaCl of aqueous solution	Extraction time (s)
1	500	2	2	20
2	1500	2	2	20
3	500	5	2	20
4	1500	5	2	20
5	500	2	10	20
6	1500	2	10	20
7	500	5	10	20
8	1500	5	10	20
9	500	2	2	60
10	1500	2	2	60
11	500	5	2	60
12	1500	5	2	60
13	500	2	10	60
14	1500	2	10	60
15	500	5	10	60
16	1500	5	10	60
17	1000	3,5	6	40
18	1000	3,5	6	40
19	1000	3,5	6	40
20	1000	3,5	6	40
21	1000	3,5	6	40
22	1000	3,5	6	40

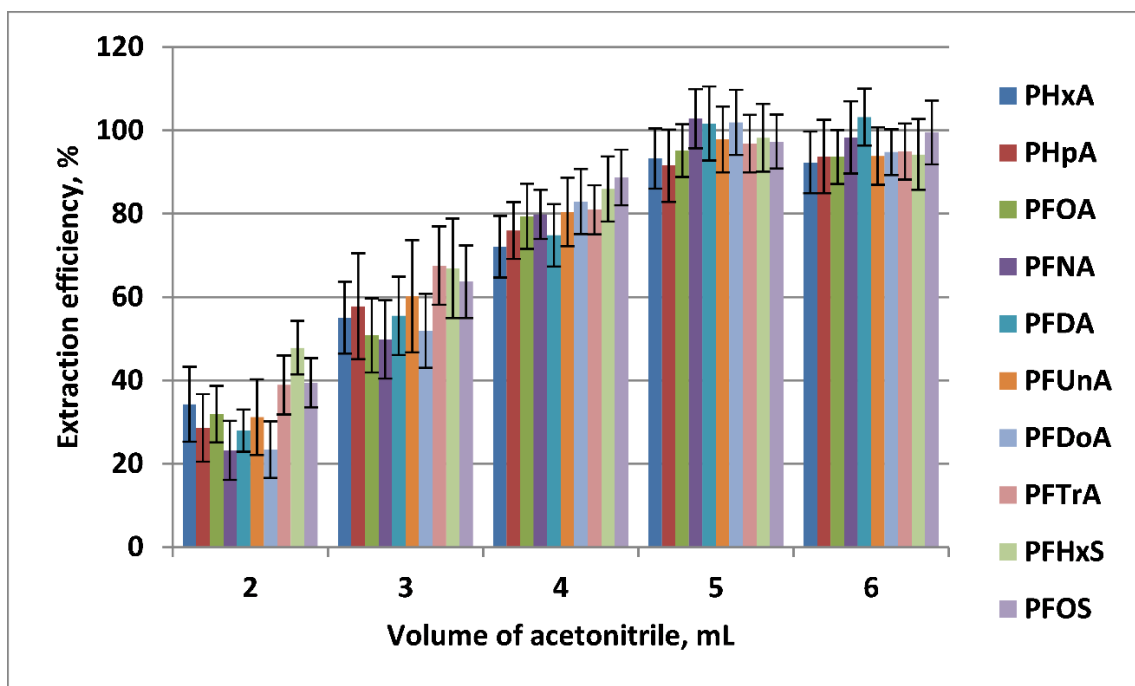


Figura S1

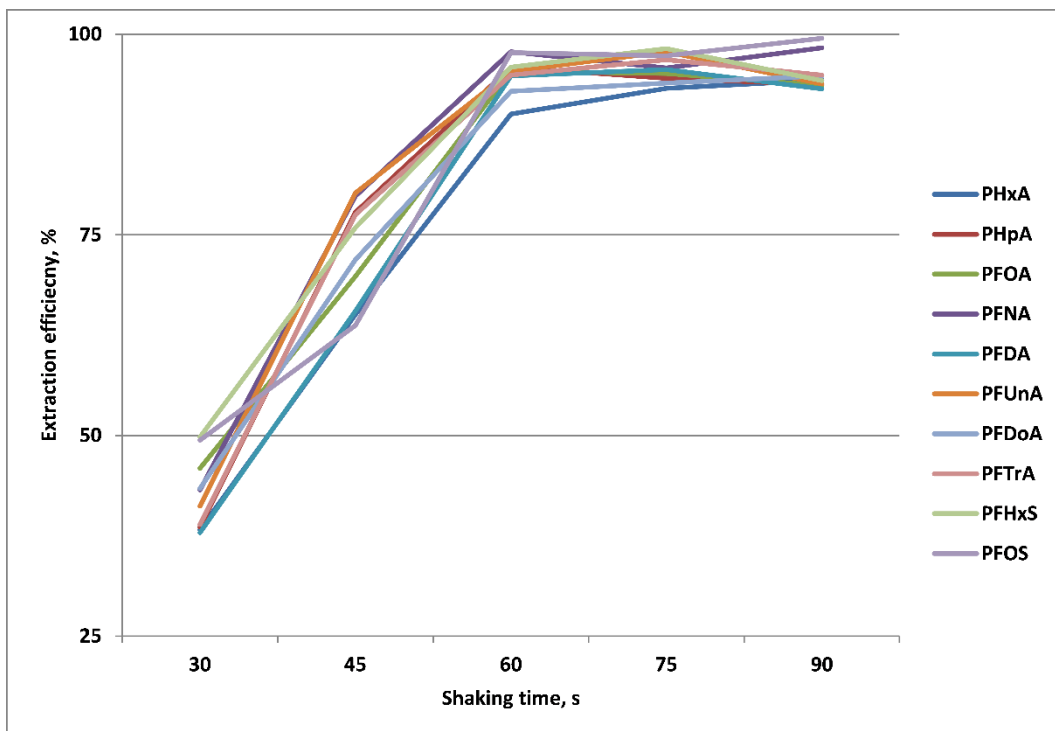


Figura S2

ANEXO VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO ARTÍCULO 2

**“CONCENTRATIONS OF PERFLUOROALKYL SUBSTANCES IN DONOR BREAST MILK IN
SOUTHERN SPAIN AND THEIR POTENTIAL DETERMINANTS”**

Supplementary material

A) Laboratory analysis

Standards, solvents and reagents

All reagents used were analytical grade unless otherwise specified. PFAS were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Mass-labelled internal standards ($^{13}\text{C}_5$ - PFHxA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDoDA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS) were supplied by Wellington Laboratories (Ontario, Canada). Stock standard solutions of compounds (200 mg/L) were prepared in acetonitrile and stored at 4 °C in the dark. Solutions were stable for at least four months. Working standards were prepared immediately before analyses. Trichloromethane and acetone were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and sodium chloride, disodium hydrogen citrate 1.5 hydrate, trisodium citrate 2 hydrate, ammonium acetate, acetonitrile (LC-MS grade), and formic acid from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Water (18.2 MΩ cm) was purified using an in-house Milli-q system (Millipore).

Sample treatment

The sample extraction method was based on Vela-Soria et al (2020) with minor modifications. Internal standard (IS), 1 mL Milli-Q water, 5 mL of acetonitrile and 50 µL of formic acid were added to 1 mL of breast milk. Salting-out assisted liquid-liquid extraction was then performed by adding a salt mixture of 600 mg of NaCl, 200 mg disodium hydrogen citrate, and 200 mg tri-sodium citrate followed by vortexing, and then centrifuging at 4000 rpm for 10 min. The resulting supernatant was transferred to a 7 mL glass vial, concentrated to 1 mL under nitrogen stream, and poured into a 15 mL glass test tube, followed by the addition of 10 mL [10% NaCl aqueous solution (w/v) at pH 2], and 1.5 mL of a mixture of TCM/Acetone 4:1(v/v), and the mixture was gently shaken and centrifuged for 5 min at 4000 rpm. The entire organic phase volume was then transferred to a clean glass vial, evaporated under a nitrogen stream. The residue was dissolved with 100 µL of a mixture of 5 mM ammonium acetate (pH 4.5) and acetonitrile 30:70 (v/v), and 15 µL was injected into the ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPL-MS) system.

2.3.3. Chromatography and mass spectrometry conditions

An Ultimate UHPLC 3000 system (Thermo Fischer) with Q Exactive Focus mass spectrometry (Thermo Fischer) was used for PFAS analyses. A Kinetex 2.6 μm PS C18 100 Å (100 x 3 mm) column (Phenomenex) was employed for the chromatographic separation of compounds. The gradient mobile phase consisted of 5 mM ammonium acetate aqueous solution (pH 4.5) (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow rate and gradient conditions are reported in Table S1. The column temperature was maintained at 30 °C. Mass spectrometry was operated in negative ESI mode with optimized selected ion monitoring (SIM) parameters. SIM transitions, retention times, and analytical parameters of the calibration curves for each compound are also displayed in Table S2.

Table S1. Flow rate and gradient conditions (solvent A: 5 mM ammonium acetate aqueous solution with pH 4.5; solvent B: acetonitrile).

TIME (MIN)	FLOW (ML/MIN)	%A	%B
0	0.3	70	30
1	0.3	40	60
6	0.3	30	70
8	0.3	10	90
8.5	0.3	10	90
9.5	0.3	10	90
10	0.3	70	30
12	0.3	70	30

Table S2. Selected ion monitoring (SIM) transitions, retention times, and analytical parameters of calibration curves.

COMPOUND	Q-SIM	RT (MIN)	A	B	R ²	LD (NG/L)	LQ (NG/L)	MEAN ACCURACY (%)	% RSD
PFHXA	312.972	1.82	12492	337	0.9988	0.73	2.43	99.66	11.6
PFHPA	362.969	2.60	-10438	1804.7	0.9996	0.79	2.64	88.17	3.9
PFOA	412.965	2.90	52526	3318.9	0.9982	0.86	2.85	93.62	8.6
PFNA	462.962	3.02	34605	3230.1	0.9989	0.69	2.29	103.71	4.1
PFDA	512.959	3.15	61465	5214	0.9976	0.72	2.42	101.59	13.7
PFUNDA	562.956	3.25	65565	6218.3	0.9979	0.74	2.46	94.93	13.1
PFDODA	612.953	3.40	133623	6221.7	0.9989	0.77	2.56	101.78	7.5
PFTRDA	662.949	3.60	122057	10847	0.998	0.78	2.60	102.11	14.4
PFBS	298.942	1.88	205094	9464.1	0.9976	0.80	2.67	96.56	11.7

PFHXS	398.936	3.05	467742	33072	0.9973	0.66	2.19	92.63	2.8
PFOS	498.929	3.14	650722	28964	0.9981	0.86	2.87	106.90	6.8

RT: Retention time; LD: Limit of detection; LQ: Limit of quantification.

B) Multiple logistic regression models

Table S3. Significant predictors of PFHxA concentrations.

R²=58.7%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Year of sample collection (ref: 2015)			
2016	19.41	1.98-190.2	0.01
2017	7.08	0.91-55.35	0.06
2018	1.63	0.09-29.41	0.74
Area of residence (ref: rural)			
Sub-urban	0.17	0.02-1.22	0.08
Urban	1.18	0.20-7.11	0.85
Oily fish intake (ref: <1sv/week)			
1 sv/week	1.86	0.35-9.88	0.47
>1 sv/week	20.8	1.10-391.8	0.04
Cheese intake (ref: rarely/never)			
>2 sv/week	0.11	0.01-0.86	0.04
≥1 sv/day	0.99	0.10-9.83	0.99
Milk intake: ≥1 vs. <1 glass/day	12.34	1.51-100.7	0.02
Red meat intake (ref: ≤1 sv/week)			
2 sv/week	0.01	0.00-0.47	0.02
>2 sv/week	0.07	0.01-0.98	0.05
Cold meat intake: 2 vs. <2 sv/week	8.41	1.12-63.3	0.04
Eyeliner use (ref: rarely/never)			
<once a day	14.5	1.41-150.5	0.02
≥once a day	2.04	0.29-14.46	0.48

Table S4. Significant predictors of PFDA concentrations.R²=50.3%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Lifetime breastfeeding (ref: <1 month)			
1-10 months	10.0	1.55-64.9	0.02
>10 months	1.32	0.18-9.40	0.78
Weight change from pre-conception			
Weight loss	26.9	2.58-280	0.006
Weight gain	1.35	0.22-8.13	0.74
Body lotion use (ref: rarely/never)			
<once a day	4.87	0.76-31.3	0.09
≥once a day	0.10	0.01-0.79	0.03
Hand cream use (ref: <once a day)			
once a day	10.0	1.27-79.0	0.03
>once a day	9.32	1.08-80.5	0.04
Eye shadow use (ref: rarely/never)			
<once a day	7.13	1.42-35.7	0.02
≥once a day	4.72	0.54-41.5	0.16

Table S5. Significant predictors of PFUnDA concentrations.R²=42.5%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Body lotion use (ref: rarely/never)			
<once a day	2.65	0.53-13.3	0.23
≥once a day	6.85	1.39-33.8	0.02
Hand cream use (ref: <once a day)			
once a day	0.09	0.01-0.59	0.02
>once a day	0.76	0.15-0.95	0.45
Shampoo use: ≥ vs. <3 times/week	0.27	0.08-0.91	0.04
Deodorant use (ref: <once a day)			
once a day	0.10	0.01-0.86	0.04
>once a day	0.05	0.003-0.64	0.02
Hairspray/mousse/gel: ≥once a day vs. rarely/never	0.14	0.03-0.70	0.02
Lipstick use: ever vs. rarely/never	4.10	1.12-15.0	0.03

Table S6. Significant predictors of PFDoDA concentrations.
R²=60.9%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Year of sample collection (ref: 2015)			
2016	0.27	0.04-1.96	0.20
2017	0.04	0.00-0.32	0.003
2018	1.40	0.11-17.7	0.79
Yoghurt intake: ≥ vs. <1 sv/day	13.6	2.26-82.3	0.004
Cheese intake (ref: rarely/never)			
>2 sv/week	0.14	0.02-0.92	0.04
≥1 sv/day	0.01	0.00-0.18	0.001
Fried food intake (ref: <1 sv/week)			
1 sv/week	0.13	0.02-0.75	0.02
>1 sv/week	0.01	0.00-0.17	0.003
Lipstick use (ref: rarely/never)			
<once a day	19.1	1.74-208	0.02
≥once a day	9.28	1.14-75.7	0.04
Eye shadow (ref: rarely/never)			
<once a day	0.10	0.01-0.99	0.05
≥once a day	0.14	0.01-1.43	0.10
Toothpaste: > vs. ≤once a day	0.17	0.03-1.04	0.06

Table S7. Significant predictors of PFTrDA concentrations.
R²=35.9%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Cheese intake (ref: rarely/never)			
>2 sv/week	5.18	1.45-18.5	0.01
≥1 sv/day	2.00	0.46-8.68	0.35
Red meat intake (ref: ≤1 sv/week)			
2 sv/week	0.04	0.003-0.57	0.02
>2 sv/week	0.19	0.02-1.80	0.15
Pulses intake (ref: 1 sv/week)			
2 sv/week	0.71	0.12-4.41	0.72
>2 sv/week	0.16	0.03-0.94	0.04

Table S8. Significant predictors of PFBS concentrations.
R²=46.5%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Multiparous vs. primiparous	0.08	0.02-0.41	0.002

Cheese intake (ref: rarely/never)			
>2 sv/week	0.42	0.09-1.91	0.26
≥1 sv/day	0.11	0.02-0.74	0.02
Red meat intake (ref: ≤1 sv/week)			
2 sv/week	0.07	0.01-0.77	0.03
>2 sv/week	0.10	0.02-0.65	0.01
Butter intake (ref: never)			
1 sv/week	1.63	0.39-6.84	0.50
>2 sv/week	12.7	1.84-87.3	0.01
Hand cream use (ref: <once a day)			
once a day	0.49	0.09-2.48	0.39
>once a day	4.55	0.85-24.4	0.08
Face cream use (ref: <once a day)			
once a day	0.75	0.19-2.92	0.68
>once a day	0.08	0.01-0.52	0.008

Table S9. Significant predictors of PFHxS concentrations.

R²=40.7%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Cheese intake (ref: rarely/never)			
>2 sv/week	0.22	0.05-1.00	0.05
≥1 sv/day	0.14	0.02-0.89	0.04
Cold meat intake: 2 vs. <2 sv/week	0.15	0.03-0.82	0.03
Hand cream use (ref: <once a day)			
once a day	3.93	0.78-19.9	0.09
>once a day	2.33	0.45-12.0	0.31
Hair mask use: ≥once a week vs. rarely/never	3.50	0.87-14.0	0.08
Eyeliner use (ref: rarely/never)			
<once a day	5.02	0.93-27.2	0.06
≥once a day	1.71	0.29-10.2	0.55

Table S10. Significant predictors of PFOS concentrations.R²=30.2%

Explanatory variables	OR	95%CI	p-value
Weight change from pre-conception			
Weight loss	5.99	0.93-37.2	0.06
Weight gain	4.37	0.95-20.1	0.06
Fried food intake (ref: <1 sv/week)			
1 sv/week	4.43	1.14-17.2	0.03
>1 sv/week	3.90	0.83-18.4	0.09
Hand cream use (ref: <once a day)			
once a day	8.49	1.89-38.1	0.005
>once a day	1.28	0.28-5.88	0.75
Hair dye use (ref: never)			
<once a month	4.15	1.05-16.4	0.04
once a month	1.66	0.38-7.24	0.50

Table S21. Summary of recent studies (2018–2021) assessing the concentrations of PFAS in breast milk samples.

COUNTRY	YEAR OF COLLECTION	ORIGIN OF SAMPLES	TIME POST DELIVERY	NO. SAMPLE	LD (ng/L)	PFHXA	PFHPA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUNDA	PFDDA	PFTRDA	PFBS	PFHXS	PFOS	ΣPFAS	REFERENCE			
SPAIN	2015-2018	Human milk bank	20-273 days	82	LD (ng/L)	0.73	0.79	0.86	0.69	0.72	0.74	0.77	0.78	0.66	0.66	0.86	–	This study			
					LQ (ng/L)	2.43	2.64	2.85	2.87	2.42	2.46	2.56	2.60	2.67	2.19	2.87	–				
					DF (%)	65.9	100	84.1	70.7	24.4	39.0	35.4	62.2	35.4	24.4	34.1	–				
					Median (ng/L)	1.58	19.39	7.17	2.59	<0.72	<0.74	<0.77	1.69	<0.80	<0.66	<0.86	87.67				
					Maximum (ng/L)	322.4	743.9	251.8	136.5	210.3	14.01	131.8	13.34	195.0	45.45	64.75	1899				
2015	Hospital	n.r.	n.r.	20 (14 women)	LD (ng/mL)	0.005	0.007	0.006	0.008	0.024	0.016	0.056	n.a.	n.a.	0.004	0.004	0.004	–	Beser et al., 2019		
					LQ (ng/mL)	0.066	0.066	0.133	0.066	0.333	0.333	0.666	n.a.	n.a.	0.133	0.066	–				
					DF (%)	0	5	85	5	0	0	0	0	n.a.	n.a.	30	55	–			
					Median (ng/mL)	–	<LOQ	0.138	0.070	–	–	–	n.a.	n.a.	<LOQ	0.069	n.r.				
					Maximum (ng/mL)	–	<LOQ	0.180	0.070	–	–	n.a.	n.a.	<LOQ	0.078	n.r.					
ITALY	n.r.	Hospital	≤48 hours	15 mothers of term infants	Median (IQR), ng/L	n.a.	n.a.	87 (77-115)	0 (0-0)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0 (0-0)	47 (41-85)	135 (118-208)	Aceti et al., 2021		
					10 mother of preterm infants	Median (IQR), ng/L	90 (68-108)	6 (0-12)	–	–	–	–	–	–	–	–	0 (0-0)	34 (22-178)		130 (96-296)	
					10 donors	Median (IQR), ng/L	72 (62-92)	20 (0-24)	–	–	–	–	–	–	–	–	0 (0-0)	26 (18-33)		112 (93-135)	
					16 pooled samples (92 women)	LD (ng/mL)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.r.		n.r.	n.r.
		LQ (ng/mL)	–	–	0.02	0.01	–	–	–	–	–	–	0.1	0.04	0.02	–					
		DF (%)	–	–	100	69	–	–	–	–	–	–	0	31	62	–					
		Median (ng/mL)	–	–	0.10	0.014	–	–	–	–	–	–	–	<0.04	0.02	n.r.					
					Maximum (ng/mL)	–	–	0.35	0.10	–	–	–	–	–	0.087	0.12	n.r.				
CZECH REPUBLIC	2006	HBM survey	2-3 weeks	59	LD (ng/mL)	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	–	Cerná et al., 2020		
					LQ (ng/mL)	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01	0.003-0.01		–	
					QF (%)	1.7	20.3	100	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	5.1		100	–
					GM (ng/mL)	–	–	0.078	<LOQ	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	0.05
					Maximum	n.r.	n.r.	0.23	<LOQ	–	–	–	–	n.r.	0.162	n.r.					

		(ng/mL)																
2010/2011	183	QF (%)	0	8.2	96.7	1.6	0.5	0	0.5	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	97.3	n.r.
		GM (ng/mL)	-	-	0.054	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.031	n.r.
		Maximum (ng/mL)	-	n.r.	0.159	<LOQ	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	n.r.	0.158	n.r.
2014	164	QF (%)	0	0.6	99.0	6.7	3	0	0	0	0	0	0	1.2	14.0	99.0	n.r.	
		GM (ng/mL)	-	-	0.034	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.030	n.r.	
		Maximum (ng/mL)	-	n.r.	0.159	<LOQ	n.r.	-	-	-	-	-	-	n.r.	n.r.	0.212	n.r.	
2017	232	QF (%)	0.4	0	100	98.7	0	0	0	0	0	0	0	1.3	0.9	99.6	n.r.	
		GM (ng/mL)	-	-	0.024	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.022	n.r.	
		Maximum (ng/mL)	n.r.	-	0.160	0.029	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	n.r.	0.169	n.r.	
KOREA	2011	Population birth cohort	<7-90 days	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	Lee et al., 2018
		LD (ng/L)	10	10	25	50	50	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		LQ (ng/L)	40	26	88	63	3.1	86	4.1	2.4	1.4	35	100	-	-	-	-	-
	Median (ng/L)	<LOQ	<LOQ	40.1	17.1	<LOQ	23.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	47.8	157	
	Maximum (ng/L)	129	117	657	127	58.1	119	129	52.1	30.8	133	380	1004	-	-	-	-	
	LD (ng/L)	9.5	3.4	1.0	1.0	1.7	1.0	5.6	13.0	10.0	7.7	1.0	-	-	-	-	-	Jin et al., 2020
CHINA	2018-2019	Birth cohort	<7 days	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	-
		LQ (ng/L)	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	-
		DF (%)	49	0	100	55	67	84	0.57	0	0.57	0.57	50	-	-	-	-	-
	Median (ng/L)	<LOQ	<LOQ	31	1.0	1.7	4.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.0	112*	
	Maximum (ng/L)	270	<LOQ	1102	115	138	92	11	<LOQ	31	80	202	1755*	-	-	-	-	
	LD (pg/mL)	n.a.	10	5	3	10	3	3	3	3	3	2	-	-	-	-	-	Awad et al., 2020
2010-2016	30 (3 cities, 10 samples per city)	n.r.	n.r.	33	50	10	34	10	10	10	10	10	10	10	10	7	-	
	DF (%)	0-30†	47.5-100†	42.5-100†	27.5-100†	35-90†	10-80†	35-80†	30-40†	22.5-100†	50-100†	65-119	-	-	-	-	-	
	AM (pg/mL)	<10	94-266	17-32	21-64	16-38	6-7	4-10	4-5	3-13	65-119	-	-	-	-	-	-	
Maximum (pg/mL)	17	151-411	<5-46	42-139	27-99	4-11	11-26	6-11	4-19	177-321	-	-	-	-	-	-	-	

DF: DETECTION FREQUENCY; QF: QUANTIFICATION FREQUENCY; GM: GEOMETRIC MEAN; AM: ARITHMETIC MEAN; HB: HUMAN BIOMONITORING; N.R.: NOT REPORTED; N.A.: NOT ASSESSED; *SUM OF PER- AND POLYFLUOROALKYL SUBSTANCES; †LINEAR

ANEXO VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO ARTÍCULO 3

**“CONCENTRATIONS AND DETERMINANTS OF LEAD, MERCURY, CADMIUM, AND
ARSENIC IN POOLED DONOR BREAST MILK IN SPAIN”**

TABLE S1. Food intake frequency of the milk donors (n=78).

Variables	n (%)	Variables	n (%)
Coffee intake=1 cup/day	17 (20.5)	Pulses	
Alcohol intake≥1 drink/month	4 (4.0)	1 sv/week	13 (16.7)
Origin of drinking water		2 sv/week	30 (38.5)
Tap water	54 (69.2)	>2 sv/week	35 (44.9)
Bottled water	24 (30.8)	Eggs	
Seafood		1 sv/week	16 (20.8)
<1 sv/week	11 (14.1)	2 sv/week	29 (36.4)
1 sv/week	20 (25.6)	>2 sv/week	33 (42.9)
>1 sv/week	47 (60.3)	Bread	
Lean fish		<1 sv/day	15 (19.2)
<1 sv/week	18 (23.1)	1 sv/day	26 (33.3)
1 sv/week	37 (47.4)	>1 sv/day	37 (47.4)
>1 sv/week	23 (29.5)	Chocolate	
Fatty fish		Never	10 (12.8)
<1 sv/week	30 (38.5)	<1 sv/day	44 (56.4)
1 sv/week	34 (43.6)	≥1 sv/day	24 (30.8)
>1 sv/week	14 (17.9)	Cereals	
Yoghurt		Never	28 (35.9)
<1 sv/day	31 (39.7)	<1 sv/day	35 (44.9)
≥1 sv/day	47 (60.3)	≥1 sv/day	15 (19.2)
Milk		Rice	
<1 glass/day	14 (17.9)	1 sv/week	67 (85.9)
≥1 glass/day	64 (82.1)	>1 sv/week	11 (14.1)
Cheese		Pasta	
Never/rarely	22 (28.2)	1 sv/week	67 (85.9)
>2 sv/week	35 (44.9)	>1 sv/week	11 (14.1)
≥1 sv/day	21 (26.9)	Fruit	
Butter		≤2 sv/week	13 (16.7)
Never	23 (29.9)	>2 sv/week	65 (83.3)
1 sv/week	36 (46.8)	Raw vegetables	
>1 sv/week	19 (23.4)	≤2 sv/week	16 (20.5)
Meat		>2 sv/week	62 (79.5)
≤1 sv/week	11 (14.1)	Cooked vegetables	
2 sv/week	13 (16.7)	≤2 sv/week	18 (23.1)
>2 sv/week	54 (69.2)	>2 sv/week	60 (76.9)
Cold meat		Fried food	
<2 sv/week	43 (55.1)	<1 sv/week	37 (47.4)
2 sv/week	35 (44.9)	1 sv/week	25 (32.1)
Red meat		>1 sv/week	16 (20.5)
Never	21 (26.9)	Canned food (ever)	63 (80.8)
<1 sv/week	33 (42.3)		
≥1 sv/week	34 (30.8)		
Sv Serving			

Table S2. Use of personal care products by the milk donors (n=78)

Variables	n (%)	Variables	n (%)
Sunscreen (ever)	37 (48.1)	Eye shadow	
Sunscreen application		rarely/never	49 (63.6)
None	40 (51.9)	<once a day	18 (23.4)
Face	26 (33.8)	≥once a day	10 (13.0)
entire body	11 (14.3)	Nail polish (traditional)	
Sunscreen protection factor		rarely/never	65 (84.4)
None	40 (51.9)	≥once a week	12 (15.6)
<50	12 (15.6)	Acrylic nail polish	
50	25 (32.5)	<once a month	70 (90.9)
Lip protector (ever)	30 (39.0)	once a month	7 (9.1)
Face cream		Manicure	
<once a day	24 (31.2)	<once a month	67 (87.0)
once a day	31 (40.3)	once a month	10 (13.0)
>once a day	22 (28.6)	Pedicure	
Face tonic		<once a month	66 (85.7)
rarely/never	60 (77.9)	once a month	11 (14.3)
≥once a week	17 (22.1)	Hair dye	
Face milk		never	36 (46.8)
rarely/never	70 (90.9)	<once a month	23 (29.9)
≥once a week	7 (9.1)	once a month	18 (23.4)
Face treatment		Shampoo	
Never	59 (76.6)	<3 times/week	25 (32.5)
<once a month	12 (15.6)	≥3 times/week	52 (67.5)
once a month	6 (7.8)	Shower cream	
Body lotion		<once a day	6 (7.8)
rarely/never	28 (36.4)	≥once a day	71 (92.2)
<once a day	15 (19.5)	Hairspray/mousse/gel	
≥once a day	34 (44.2)	rarely/never	58 (75.3)
Hand cream		≥once a day	19 (24.7)
<once a day	43 (55.8)	Deodorant	
once a day	19 (24.7)	<once a day	8 (10.4)
>once a day	15 (19.5)	once a day	52 (67.5)
Hair mask		>once a day	17 (22.1)
rarely/never	38 (49.4)	Perfume	
≥once a week	39 (50.6)	rarely/never	12 (15.6)
Foundation makeup		<once a day	24 (31.2)
rarely/never	41 (53.2)	≥once a day	41 (53.2)
<once a day	19 (24.7)	Toothpaste	
≥once a day	17 (22.1)	≤once a day	17 (22.1)
Lipstick		>once a day	60 (77.9)
rarely/never	39 (50.6)	Mouthwash	
<once a day	24 (31.2)	rarely/never	47 (61.0)
≥once a day	14 (18.2)	<once a day	11 (14.3)
Eyeliner		≥once a day	18 (23.4)
rarely/never	36 (46.8)		

<once a day	21 (27.3)
≥once a day	20 (26.0)

Table S3. Mixed-effects linear regression model for predictors of As in breast milk (n=235, 7 outliers of As concentrations excluded).

Explanatory variables	Exp(β)	95%CI
Lifetime breastfeeding (ref: ≤6 months)		
>6-12 months	0.79	0.68; 0.94*
>12-24 months	0.78	0.64; 0.94*
>24 months	0.87	0.69; 1.09

*p<0.05

ANEXO VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO ARTÍCULO 4

**“CONCENTRATIONS AND PREDICTORS OF ALUMINUM, ANTIMONY, AND LITHIUM IN
BREAST MILK: A REPEATED-MEASURES STUDY OF DONORS”**

Table S1. Food intake frequency of the milk donors (N=78).

Variables	N (%)	Variables	N (%)
Coffee intake=1 cup/day	17 (20.5)	Pulses	
Alcohol intake≥1 drink/month	4 (4.0)	1 sv/week	13 (16.7)
Origin of drinking water		2 sv/week	30 (38.5)
Tap water	54 (69.2)	>2 sv/week	35 (44.9)
Bottled water	24 (30.8)	Eggs	
Seafood		1 sv/week	16 (20.8)
<1 sv/week	11 (14.1)	2 sv/week	29 (36.4)
1 sv/week	20 (25.6)	>2 sv/week	33 (42.9)
>1 sv/week	47 (60.3)	Bread	
Lean fish		<1 sv/day	15 (19.2)
<1 sv/week	18 (23.1)	1 sv/day	26 (33.3)
1 sv/week	37 (47.4)	>1 sv/day	37 (47.4)
>1 sv/week	23 (29.5)	Chocolate	
Fatty fish		Never	10 (12.8)
<1 sv/week	30 (38.5)	<1 sv/day	44 (56.4)
1 sv/week	34 (43.6)	≥1 sv/day	24 (30.8)
>1 sv/week	14 (17.9)	Cereals	
Yoghurt		Never	28 (35.9)
<1 sv/day	31 (39.7)	<1 sv/day	35 (44.9)
≥1 sv/day	47 (60.3)	≥1 sv/day	15 (19.2)
Milk		Rice	
<1 glass/day	14 (17.9)	1 sv/week	67 (85.9)
≥1 glass/day	64 (82.1)	>1 sv/week	11 (14.1)
Cheese		Pasta	
Never/rarely	22 (28.2)	1 sv/week	67 (85.9)
>2 sv/week	35 (44.9)	>1 sv/week	11 (14.1)
≥1 sv/day	21 (26.9)	Fruit	
Butter		≤2 sv/week	13 (16.7)
Never	23 (29.9)	>2 sv/week	65 (83.3)
1 sv/week	36 (46.8)	Raw vegetables	
>1 sv/week	19 (23.4)	≤2 sv/week	16 (20.5)
Meat		>2 sv/week	62 (79.5)
≤1 sv/week	11 (14.1)	Cooked vegetables	
2 sv/week	13 (16.7)	≤2 sv/week	18 (23.1)
>2 sv/week	54 (69.2)	>2 sv/week	60 (76.9)
Cold meat		Deep-fried food	
<2 sv/week	43 (55.1)	<1 sv/week	37 (47.4)
2 sv/week	35 (44.9)	1 sv/week	25 (32.1)
Red meat		>1 sv/week	16 (20.5)
Never	21 (26.9)	Canned food (ever)	63 (80.8)
<1 sv/week	33 (42.3)		

sv: serving

Table S2. Use of personal care products by the milk donors (N=78).

Variables	N (%)	Variables	N (%)
Sunscreen (ever)	37 (48.1)	Eye shadow	
Sunscreen application		rarely/never	49 (63.6)
None	40 (51.9)	<once a day	18 (23.4)
Face	26 (33.8)	≥once a day	10 (13.0)
entire body	11 (14.3)	Nail polish (traditional)	
Sunscreen protection factor		rarely/never	65 (84.4)
None	40 (51.9)	≥once a week	12 (15.6)
<50	12 (15.6)	Acrylic nail polish	
50	25 (32.5)	<once a month	70 (90.9)
Lip protector (ever)	30 (39.0)	once a month	7 (9.1)
Face cream		Manicure	
<once a day	24 (31.2)	<once a month	67 (87.0)
once a day	31 (40.3)	once a month	10 (13.0)
>once a day	22 (28.6)	Pedicure	
Face tonic		<once a month	66 (85.7)
rarely/never	60 (77.9)	once a month	11 (14.3)
≥once a week	17 (22.1)	Hair dye	
Face milk		never	36 (46.8)
rarely/never	70 (90.9)	<once a month	23 (29.9)
≥once a week	7 (9.1)	once a month	18 (23.4)
Face treatment		Shampoo	
Never	59 (76.6)	<3 times/week	25 (32.5)
<once a month	12 (15.6)	≥3 times/week	52 (67.5)
once a month	6 (7.8)	Shower cream	
Body lotion		<once a day	6 (7.8)
rarely/never	28 (36.4)	≥once a day	71 (92.2)
<once a day	15 (19.5)	Hairspray/mousse/gel	
≥once a day	34 (44.2)	rarely/never	58 (75.3)
Hand cream		≥once a day	19 (24.7)
<once a day	43 (55.8)	Antiperspirant	
once a day	19 (24.7)	<once a day	8 (10.4)
>once a day	15 (19.5)	once a day	52 (67.5)
Hair mask		>once a day	17 (22.1)
rarely/never	38 (49.4)	Perfume	
≥once a week	39 (50.6)	rarely/never	12 (15.6)
Foundation makeup		<once a day	24 (31.2)
rarely/never	41 (53.2)	≥once a day	41 (53.2)

<once a day	19 (24.7)	Toothpaste	
≥once a day	17 (22.1)	<once a day	17 (22.1)
Lipstick		>once a day	60 (77.9)
rarely/never	39 (50.6)	Mouthwash	
<once a day	24 (31.2)	rarely/never	47 (61.0)
≥once a day	14 (18.2)	<once a day	11 (14.3)
Eyeliner		≥once a day	18 (23.4)
rarely/never	36 (46.8)		
<once a day	21 (27.3)		
≥once a day	20 (26.0)		

Table S3. Association between characteristics of lactating women and concentrations of Sb in breast milk after exclusion of Sb concentrations below the LOD (N=173 samples).

Explanatory variables	Exp(β)	95%CI
Fatty fish intake (ref: < 1 sv/week)		
1 sv/week	1.18	0.76; 1.84
>1 sv/week	2.20	1.32; 3.63*
Yoghurt intake: ≥ vs.<1 sv/day	1.74	1.21; 2.51*
Eggs intake (ref: ≤1 sv/week)		
2 sv/week	0.50	0.31; 0.81*
>2 sv/week	0.61	0.36; 1.06
Rice intake: > vs.≤1 sv/week	1.36	0.75; 2.46
Cereals intake (ref: never)		
<1 sv/day	0.61	0.40; 0.92*
≥1 sv/day	0.57	0.35; 0.95*
Deep-fried food intake (ref: <1 sv/week)		
1 sv/week	1.38	0.85; 2.22
>1 sv/week	0.99	0.62; 1.57
Eye shadow use (ref: rarely/never)		
<once a day	0.63	0.40; 0.99*
≥once a day	0.85	0.43; 1.68
Eyeliner use (ref: rarely/never)		
<once a day	2.00	1.32; 3.03*
≥once a day	1.47	0.85; 2.53

sv: serving.

*p<0.05

Table S4. Association between characteristics of lactating women and concentrations of Li in breast milk after exclusion of Li concentrations below the LOD (N=191 samples).

Explanatory variables	Exp(β)	95%CI
Year of collection (ref: 2015)		
2016	0.43	0.24; 0.76*
2017	0.23	0.12; 0.39**
2018	0.21	0.11; 0.40**
Eggs intake (ref: ≤ 1 sv/week)		
2 sv/week	0.47	0.26; 0.84*
>2 sv/week	0.61	0.34; 1.09
Bread intake (ref: <1 sv/day)		
1 sv/day	0.63	0.36; 1.10
>1 sv/day	0.56	0.31; 1.03
Chocolate intake (ref: never)		
<1 sv/day	3.80	1.93; 7.48**
≥ 1 sv/day	4.23	2.03; 8.83**
Pasta intake: > vs. ≤ 1 sv/day		
	0.72	0.34; 1.51
Face cream (ref: <once a day)		
once a day	0.45	0.26; 0.79*
>once a day	0.46	0.25; 0.86*
Hand cream (ref: <once a day)		
once a day	1.76	1.03; 3.00*
>once a day	1.79	0.94; 3.89
Eyeliner use (ref: rarely/never)		
<once a day	3.11	1.84; 5.26**
\geq once a day	1.23	0.65; 2.34

sv: serving.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

