

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina



Trabajo Fin de Máster

**“CUANTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES CON
ACTIVIDAD DISRUPTORA ENDOCRINA EN LECHE
MATERNA: PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA
ANALÍTICA Y RESULTADOS PREELIMINARES”**

Luz María Iribarne Durán

Granada, 23 de Septiembre de 2015

SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN E INFORME PRECEPTIVO DE ADMISIÓN DE LOS TUTORES PARA LA PRESENTACIÓN Y DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER. CURSO ACADÉMICO 2014-2015.

Máster Oficial en Avances en Radiología Diagnóstica y Terapéutica y Medicina Física, Universidad de Granada.

Doña Luz María Iribarne Durán, con DNI 54104328-W, estudiante de Máster, solicita la presentación del Trabajo de Fin de Máster “CUANTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES CON ACTIVIDAD DISRUPTORA ENDOCRINA EN LECHE MATERNA: PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA Y RESULTADOS PRELIMINARES”, cuyo tutores en la convocatoria de Septiembre son:

Don Juan Pedro Arrebola Moreno con DNI 74673464-P y **Doña Inmaculada Jiménez Díaz** con DNI 75103543-X, profesores colaboradores externos del Máster Oficial en Avances en Radiología Diagnóstica y Terapéutica y Medicina Física, Universidad de Granada

Don Juan Pedro Arrebola Moreno y Doña Inmaculada Jiménez Díaz, tutores del Trabajo Fin de Máster de Doña Luz María Iribarne Durán, consideran que dicho Trabajo es **FAVORABLE** para ser presentado en la convocatoria de Septiembre del curso académico 2014-2015. Con respecto a la candidata, destacar que se ha dedicado de forma completa a su labor, adaptándose satisfactoriamente al entorno de trabajo e interaccionando adecuadamente con el resto de compañeros, colaborando y participando en cualquier tipo de tarea donde pudiera ser requerida. Así mismo, Doña Luz María ha demostrado un elevado rendimiento académico durante sus estudios y unas excelentes aptitudes científicas durante el desarrollo del trabajo.

En Granada, a 17 de Septiembre de 2015



Fdo. Don Juan Pedro Arrebola Moreno



Fdo. Doña Inmaculada Jiménez Díaz

POR TI VIEJO...

PARA VOSOTROS... ANTONIO, ELVIRA Y KARAM

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

RESUMEN /ABSTRACT.....1

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....3

1.1. FUNCIONAMIENTO GENERAL DEL SISTEMA ENDOCRINO

1.2. DISRUPCIÓN ENDOCRINA

1.3. DISRUPTORES ENDOCRINOS QUÍMICOS DEL PROYECTO.

1.3.1. Compuestos orgánicos persistentes.

1.3.2. Compuestos orgánicos no persistentes

1.3.2.1. Bisfenoles (Bisfenol A y derivados).

1.3.2.2. Parabenos.

1.3.2.3. Benzofenonas.

1.4. LECHE MATERNA.

1.4.1. Composición de la leche materna.

1.4.1.1. Aminoácidos y proteínas.

1.4.1.2. Lípidos

1.4.1.3. Oligosacáridos

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....19

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS.....21

3.1. DESCRIPCIÓN BLCHUG

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.2.1. Criterios de inclusión y exclusión.

3.3. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

3.4. ANÁLISIS QUÍMICO

3.4.1. Disolventes y reactivos

3.4.2. Patrones químicos

3.4.3. Material de laboratorio	
3.4.4. Instrumentos y aparatos	
3.4.5. Programas informáticos	
3.4.6. Tratamiento de muestra	
3.5. PLAN DE TRABAJO	
3.5.1. Etapas del desarrollo y distribución de las tareas del equipo investigador.	
3.5.1.1. Equipo de investigación.	
3.5.1.2. Relación de investigadores del estudio.	
3.5.2. Etapas del desarrollo del proyecto. Cronograma.	
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	41
4.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA EXTRACCIÓN DLLME	
4.1.1. Naturaleza de los disolventes extractante y dispersante	
4.1.2. Volumen de los disolventes extractante y dispersante	
4.1.3. Tiempo de extracción, pH de la muestra y adición de sales	
4.2. OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	
4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	
4.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	51
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	64

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

2-OHBP	2-hidroxibenzofenona
3-OHBP	3-hidroxibenzofenona
4-OHBP	4-hidroxibenzofenona
ACN	Acetonitrilo
BLCHUG	Banco de Leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada
BPA	Bisfenol A
BPS	Bisfenol S
BPF	Bisfenol F
BP	Butilparabeno
BPs	Benzofenonas
BP-1	Benzofenona 1
BP-2	Benzofenona 2
BP-3	Benzofenona 3
BP-6	Benzofenona 4
BP-8	Benzofenona 5
BP-12	Benzofenona 12
BP-d ₁₀	Benzofenona deuterada
BPA-d ₁₆	Bisfenol A deuterado
CHUG	Complejo Hospitalario Universitario de Granada
CIBERESP	Ciber de Epidemiología y Salud Pública
CIBz	Clorobenceno
COPs	Compuestos Organoclorados Persistentes
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DER	Desviación Estándar Relativa
DLLME	Dispersiveliquid-liquid microextracción. Microextracción dispersiva líquido-líquido
DHT	Dihidrotetosterona
EDs	Disruptores Endocrinos
EP	Etilparabeno
EPA	Agencia de Protección Medioambiental Americana
EP- ¹³ C ₆	Etilparabeno marcado con ¹³ C ₆
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentos
H ₂ O	Agua
HCB	Hexaclorobenceno
HCH	Hexaclorociclohexano
HPLC	High-Performance liquidchromatography. Cromatografía líquida de alta resolución
IARC	Agencia internacional para la Investigación del Cáncer
Ibs Granada	Instituto de Investigación biosanitario de Granada
IsBP	Isobutilparabenos
IsPP	Isopropilparabenos
LC-MS	LiquidChromatography- massspectrometry. Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MeOH	Metanol
MP	Metilparabeno
NaCl	Cloruro sódico
PBs	Parabenos

PCBs	Bisfenilos policlorados
PCPs	Productos de cuidado personal
PP	Propilparabeno
RDL	Rango Dinámico Lineal
TCC	Tetracloruro de Carbono
TCM	Triclorometano
UGR	Universidad de Granada
UV	Radiación Ultravioleta
WHO	WorldHealthOrganitation. Organización Mundial de la Salud

RESUMEN/ ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

Los Disruptores Endocrinos (DEs) son sustancias exógenas que alteran una o más funciones del sistema endocrino y consecuentemente causan efectos adversos en la salud de un organismo intacto o en su progenie. .

El presente trabajo se incluye en el proyecto titulado: “Disruptores endocrinos en leche materna del Banco de Leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (BLCHUG)”, que abarca el estudio de compuestos orgánicos persistentes y no persistentes en muestras de leche materna, siendo los compuestos no persistentes los seleccionados para este estudio.

Los contaminantes orgánicos no persistentes o “pseudopersistentes” acceden al organismo a diario y de manera cotidiana, son rápidamente excretados y contribuyen de igual manera a la dosis interna que los compuestos orgánicos persistentes. Entre los más relevantes para la salud pública se encuentran: bisfenoles (bisfenol A, F y S); parabenos (MP, EP, PP y BP); y benzofenonas (BP-1 a BP-12 y 4-OH-BP).

La leche materna es el principal alimento en los bebés lactantes y, por tanto, la principal vía de exposición a DEs por vía alimentaria. En este contexto, es de crítica importancia el desarrollo de metodologías analíticas adecuadas que permitan evaluar la exposición de los bebés a diferentes DEs a través de la leche materna.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio ha sido la puesta a punto y validación de una nueva metodología analítica que permita la cuantificación simultánea de bisfenoles, parabenos y benzofenonas en muestras de leche humana, que sea adecuada para su aplicación en estudios epidemiológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La población reclutada son mujeres donantes del BLCHUG, a las que se les aplicó un cuestionario epidemiológico diseñado expresamente para este estudio.

La técnica de extracción seleccionada para llevar a cabo el tratamiento de muestra fue la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME). La cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS).

RESULTADOS

El tratamiento de muestra desarrollado consta de las siguientes etapas: tratamiento enzimático (para determinar el contenido total de compuestos), precipitación de proteínas (para eliminar potenciales interferentes) y extracción DLLME. Con objeto de obtener un método lo más sensible posible, se llevó a cabo la optimización de las principales variables involucradas en la extracción (naturaleza y volumen del disolvente extractante y dispersante, tiempo de agitación, pH de la muestra, y porcentaje de sales). A continuación se obtuvo la recta de calibración del método desarrollado, obteniendo

una buena linealidad para todos los compuestos estudiados. Entonces se procedió a validar el método desarrollado. Los parámetros analíticos obtenidos (límites de cuantificación y detección, rango dinámico lineal, linealidad, selectividad y exactitud) indicaron que el método desarrollado era perfectamente adecuado para su aplicación a muestras de leche materna. Finalmente, el método se aplicó a las primeras 15 muestras de leche recolectadas para el proyecto. Todas las muestras dieron positivo para al menos uno de los compuestos analizados. El MP fue el compuesto más detectado en las muestras de leche analizadas (11/15), seguido de la BP-3 (9/15), PP (6/15), EP (5/15), BPA (4/15) y BP y BP-1 (1/15). No se detectaron BPS, BPF, BP-2, BP-6, BP-8 ni 4-OHBP en ninguna de las muestras analizadas.

CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto y validado un nuevo método analítico, rápido, de bajo coste y versátil mediante DLLME, para la determinación de diferentes disruptores endocrinos químicos no persistentes (bisfenoles, parabenos y benzofenonas) en muestras de leche materna humana. En base a los datos de biomonitorización obtenidos puede afirmarse que la exposición humana a disruptores endocrinos es más que significativa, destacando el contenido de MP, EP, PP, BP, así como de BPA, BP-1 y BP-3 en leche materna. Dado estos resultados, serían necesarias acciones legislativas y de concienciación social que minimicen o eliminen esta exposición.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. FUNCIONAMIENTO GENERAL DEL SISTEMA ENDOCRINO

El sistema endocrino es un conjunto de órganos y tejidos del organismo humano que regula numerosas funciones biológicas, entre ellas el desarrollo madurativo del individuo, desde la etapa de gestación y crecimiento hasta la maduración cognitiva y las funciones reproductivas. Está formado por glándulas y las hormonas segregadas por las mismas.

Las hormonas son mensajeros químicos, que interactúan con uno o varios receptores celulares específicos, a través del torrente sanguíneo, desencadenando procesos bioquímicos, los cuales regulan todo lo relacionado con las funciones biológicas del organismo.

Las hormonas pueden clasificarse en cuatro grupos químicos: derivados de aminoácidos, proteínas, esteroides y eicosanoides [1]. Además, también pueden clasificarse dependiendo de su funcionamiento en: organizativas y activacionales. Mientras que el primer tipo interviene fundamentalmente durante periodos críticos del desarrollo del individuo, induciendo efectos permanentes, el segundo tipo causa sólo cambios transitorios o respuestas rápidas, necesarias para el metabolismo en un instante concreto.

1.2. DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Existe una evidencia creciente de que ciertas sustancias químicas, a las que los seres humanos estamos expuestos de forma habitual, pueden actuar como disruptores endocrinos, es decir, son capaces de alterar la homeostasis normal del sistema endocrino, causando un desequilibrio de estrógenos, andrógenos, progestinas, o las hormonas tiroideas a través de diversos mecanismos de acción [2;3].

Existen muchas definiciones del concepto “Disruptor Endocrino”. La Organización Mundial de la Salud lo define como “Sustancia exógena o mezcla que altera una o más funciones del sistema endocrino y consecuentemente causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto o en su progenie” (Organización Mundial de la Salud, WHO)[4].

De forma análoga, puede decirse que un DE potencial es aquella sustancia cuyas características lo hacen sospechoso de provocar una respuesta disruptora en un organismo intacto [5].

Se han descrito diferentes mecanismos de acción en disrupción endocrina [6], que incluyen: mimetizar la acción de las hormonas naturales, bloquearla e impedir la unión hormona-receptor, alterar el patrón natural de síntesis y metabolismo hormonal e incluso modificar la intensidad de la respuesta bioquímica desencadenada cuando hormona y receptor se unen. Sin embargo, indiferentemente de su actuación, sus efectos pueden ser muy perjudiciales en un individuo, principalmente si éste se encuentra en una fase crítica de crecimiento y/o desarrollo. De hecho, las primeras etapas del desarrollo (embrión, feto, lactancia) son especialmente vulnerables a la acción de los DEs, incluso a bajas dosis de exposición [7]. Además, el estudio de la disrupción endocrina se hace todavía más complejo si tenemos en cuenta que la exposición a DEs puede estar relacionada con patologías con largos períodos de latencia, por lo que sus

efectos definitivos pueden no ser visibles hasta pasados muchos años o incluso manifestarse en las siguientes generaciones [8].

Actualmente existen infinidad de compuestos cuyo carácter disruptor está demostrado o, al menos, es sospechado. La Tabla 1 recoge algunas de las categorías de sustancias más estudiadas en los últimos años en lo referente a disrupción endocrina [9].

Tabla 1. Listado de DEs características.

CATEGORÍA	DISRUPTORES ENDOCRINOS QUÍMICOS	
Alquilfenoles	Octilfenoles Nonilfenoles	Octilfenolesetoxilados Nonilfenolesetoxilados
Bisfenoles	Bisfenol A Bisfenol B	Bisfenol F Bisfenol S
Conservantes, antifúngicos y antimicrobiano	Metilparaben Etilparaben n-Propilparaben Isopropilparaben	n-Butilparaben Isobutilparaben Triclosan Triclocarban
Filtros ultravioleta	Benzofenona-1 Benzofenona-3 4-hidroxi-benzofenona Benzofenona-4	Etilhexilcinamato 4- metilbenzilidencanfor Benzylsalicilato Homosalato
Ftalatos	Dietilftalato Dietilhexilftalato Dipropylftalato	Di-n-butilftalato Dihexilftalato Butilbenzilftalato
Hidrocarburos aromáticos	Antraceno Benzopireno	Fenantreno Pireno
Medicamentos	Etinil estradiol Mestranol	Dietilestilbestrol Tamoxifeno
Metales Pesados	Arsénico Cadmio	Mercurio Plomo
Organohalogenados	Dioxinas Furanos	Policlorobifenilos Polibromobifenilos
Pesticidas	Atrazina Benomyl Carbaryl Clordano Dicofol Endosulfano Hexaclorobenceno Iprodiona	Kepona Lindano Metomil Paration Pentaclorofenol Toxafeno Trifluralin Vinclozolina

Entre las sustancias con potencial actividad disruptora endocrina encontramos una gran cantidad de “compuestos químicos emergentes”, cuya presencia en el medio ambiente o sus posibles implicaciones para la salud humana, se han puesto muy recientemente de manifiesto. Son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o

nada acerca de su presencia en los distintos compartimentos ambientales y en el ser humano y que, por tanto, precisan investigación [10,11]. Dentro de estos contaminantes se incluyen pesticidas, productos químicos industriales, productos farmacéuticos, y productos de cuidado personal (PCP), la mayoría usados con mucha frecuencia en la actualidad. Según esto, el ser humano se encuentra expuesto a los DEs de continuada, incluso desde la época fetal [12-15]. La problemática de la exposición se agrava cuando ésta se produce durante los inicios de la vida de un individuo, ya que existen ciertas evidencias de que podría relacionarse con anomalías en la diferenciación sexual, problemas en el desarrollo neurológico y reproductivo, con el riesgo de desarrollo de problemas reproductivos y cáncer en el futuro [16]. En la Tabla 2, se presentan los posibles efectos que producen los DEs en humanos, según diferentes estudios analíticos y epidemiológicos.

Tabla 2. Posibles efectos de los DEs en humanos.

MUJERES	NIÑAS	NIÑOS	HOMBRES
Cáncer de mama	Pubertad precoz	Criptorquidia o no descenso testicular	Cáncer de testículos
Endometriosis	Cáncer vaginal	Hipospadias	Cáncer de próstata
Muerte embrionaria y fetal	Mayor incidencia de cánceres	Reducción del recuento espermático	Reducción del recuento espermático
Malformaciones en la descendencia	Deformaciones en órganos reproductores	Disminución del nivel de testosterona	Reducción de la calidad del esperma
	Problemas en el desarrollo del sistema nervioso central	Problemas en el desarrollo del sistema nervioso central	Disminución del nivel de testosterona
	Bajo peso de nacimiento	Bajo peso de nacimiento	Modificaciones de concentraciones de hormonas tiroideas
	Hiperactividad	Hiperactividad	
	Problemas de aprendizaje	Problemas de aprendizaje	
	Disminución del coeficiente de inteligencia y de la comprensión lectora	Disminución del coeficiente de inteligencia y de la comprensión lectora	

1.3. DISRUPTORES ENDOCRINOS QUÍMICOS OBJETO DE ESTUDIO

El presente trabajo fin de master es parte de un proyecto de investigación más amplio que lleva por título: “Disruptores endocrinos en leche materna del Banco de Leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (BLCHUG)”. El proyecto abarca el estudio de compuestos orgánicos persistentes y no persistentes, siendo el grupo de no persistentes el seleccionado para este trabajo.

1.3.1. Compuestos orgánicos persistentes

Los Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) se definen como compuestos orgánicos de origen natural o antropogénico que resisten a la degradación fotolítica, química y biológica [17]. Los COPs se caracterizan por una baja solubilidad en agua y alta liposolubilidad, por lo que tienen a acumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos.

Existen muchos tipos de COPs, pero en el *Convenio de Estocolmo* de 2001 se decidió incluir doce de estos compuestos en una lista, conocida como la docena sucia, como los más importantes debido a su gran toxicidad y uso. Estos son: aldrín, clordano, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno (HCB), mirex, toxafeno, policlorobifenilos (PCBs), diclorodifeniltricloroetano (DDT), dioxinas y furanos. Dentro de los efectos de estos compuestos en el ser humano se encuentra: disminución inmunitaria, disfunciones neurológicas, disfunciones reproductivas, alteraciones hormonales, alteraciones del desarrollo, trastorno neuroconductuales y cáncer [18-25].

1.3.2. Contaminantes orgánicos no persistentes

Algunos DEs pueden acumularse en el organismo por ser lipófilos y resistentes a la degradación, persistiendo generalmente en los tejidos grasos, mientras que otros acceden al organismo a diario y de manera cotidiana, son rápidamente excretados (pseudopersistentes) y contribuyen igualmente a la dosis interna. De entre los más relevantes para la salud pública se encuentran: bisfenoles (bisfenol A, bisfenol F y bisfenol S); parabenos y benzofenonas.

1.3.2.1. Bisfenoles (Bisfenol A, Bisfenol F y Bisfenol S)

Los bifenoles son compuestos aromáticos constituidos por dos anillos fenólicos que se unen a través de un grupo puente. Entre ellos se encuentran el bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) y bisfenol S (BPS).

El BPA es uno de los compuestos con carácter disruptor más utilizado en nuestros días, puesto que es el monómero principal de gran parte de los plásticos que nos rodean [5]. En 1923 comenzó a producirse a escala industrial [26] pero no fue hasta 1957 cuando comenzó su producción masiva [27]. Desde aquel entonces, cada año la demanda de BPA es más elevada a nivel mundial [28].

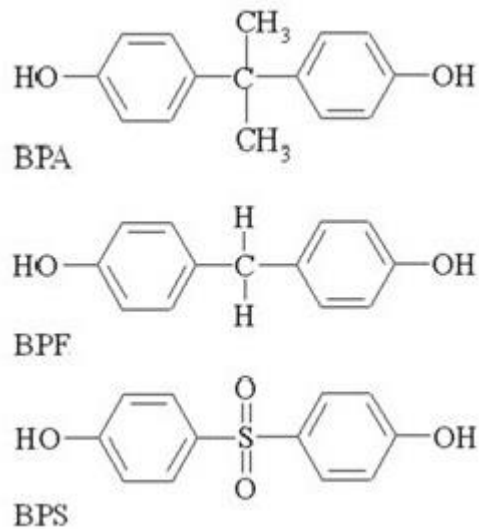


Figura 1. Estructura del BPA, BPF y BPS

El BPA presenta múltiples aplicaciones y su uso principal es la fabricación de las resinas epoxi, así como para la obtención de plásticos policarbonato, que poseen gran estabilidad mecánica y térmica, además de muy buena transparencia [29]. Otra de sus aplicaciones industriales es su uso como retardante de llama.



Figura 2. Principales aplicaciones del BPA.

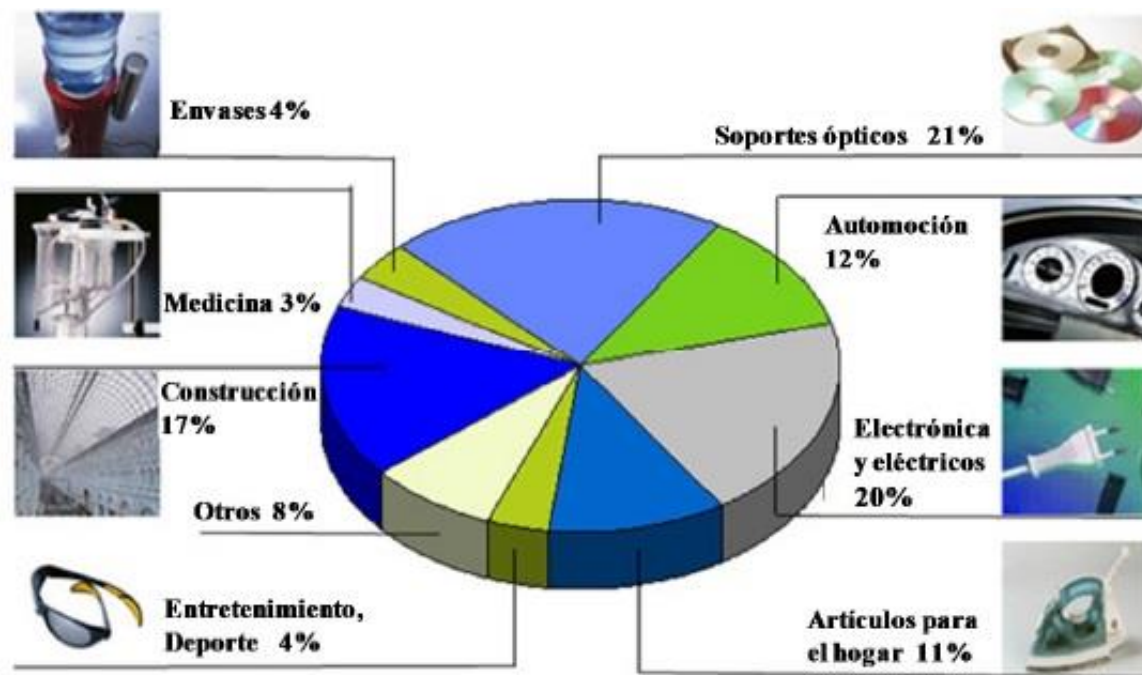


Figura 3. Distribución de los usos del bisfenol A en Europa por sectores. (Demanda global de policarbonato de 3.4 millones de toneladas en 2010)

Se han observado una serie de dianas y posibles mecanismos de acción del BPA en el organismo humano, entre los que se incluyen los siguientes:

- Capacidad para unirse a los receptores hormonales estrogénicos y competir con los estrógenos naturales. [30-32].
- Interacción con sistemas enzimáticos reguladores del balance hormonal [33].
- Actividad antiandrogénica. El BPA puede inhibir las respuestas asociadas a hormonas androgénicas como la dihidrotetosterona (DHT) asociándose con los receptores androgénicos y evitando así la unión DHT-receptor [34].

Se ha relacionado a este compuesto con diferentes anomalías y problemas de salud, como son: daños sobre la capacidad y el desarrollo reproductivos de las especies [35, 36], numerosas anomalías neuroendocrinas [37]; alteraciones fisiológicas y estructurales del cerebro [38]. Además se le relaciona con la inhibición de los fenotipos masculinos y de la espermatogénesis [39] y el incremento en la masa del tejido uterino y endometrio.

La principal vía de exposición al BPA es la alimentaria [40]. Se ha demostrado que uno de los principales medios de exposición a este compuesto es a través de las envases de policarbonato [41]. Así, ha quedado demostrado que la concentración de BPA en orina puede incrementar en un 66% después de la toma de sustancias almacenadas en este tipo de envases [42].

La temperatura, el pH, el tiempo de contacto entre el alimento y el envase, la cantidad de revestimiento del mismo, así como las condiciones de fabricación y procesamiento del recipiente van a favorecer la absorción de BPA por los alimentos [43, 44].

Debemos de tener en cuenta que existen otras fuentes de exposición a BPA, de las cuales la población no es consciente. Una de estas fuentes es el polvo. El registro más elevado se encuentra en entornos de trabajo como laboratorios [45] y oficinas [46], debido al tipo de materiales usados en estos lugares. Otra fuente de exposición a BPA es el contacto dérmico con papel térmico (cajeros de centros comerciales y similares), debido a la presencia de BPA en los componentes del mismo [47].

El BPA se usa en la polimerización de los empastes dentales de composite, así como en algunos útiles médicos, como sondas nasogástricas y respiradores automáticos. Se han realizado estudios como el de Calafat y colaboradores, en los que queda demostrado el riesgo de exposición a BPA tras un tratamiento médico en el que se usaban los citados materiales [48].

La creciente preocupación sobre la capacidad disruptora endocrina del BPA y sus posibles efectos en la salud humana ha resultado en la búsqueda de sustitutos para este compuesto. Dentro de estos sustitutos se encuentran análogos estructurales como el BPS y BPF, bisfenoles como el BPA, y que por tanto podrían tener efectos fisiológicos parecidos al BPA en el organismo.

El BPS se usa en una gran variedad de aplicaciones industriales. Se utiliza como monómero en polímeros sintéticos como la polietersulfona (PES) y polisulfona (PSU). El PES ha reemplazado a los policarbonatos basados en BPA en los biberones de plástico. Además el BPS se usa también en papeles térmicos, cartón reciclado para alimentos y en pegamentos de secado rápido. Por su parte, el BPF se usa en una gran variedad de productos de consumo como barnices, lacas, adhesivos, y empaquetados de comida. A pesar de que el BPS y BPF fueron creados para sustituir al BPA y así evitar los efectos dañinos del mismo, numerosos estudios afirman que BPS y BPF son tan activos hormonalmente como el BPA y por tanto son capaces de actuar como disruptores endocrinos [49]

1.3.2.2. Parabenos

Los parabenos (PBs) conforman el grupo de homólogos de ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico. Estos compuestos son sólidos inodoros, blanquecinos, relativamente solubles en agua e hidrolíticamente estables [50].

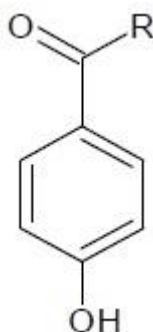


Figura 4. Estructura Parabenos.

La utilidad principal de los PBs es la de conservantes en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica [51]. Aunque la capacidad antimicrobiana de los parabenos es

mayor cuanto mayor es su cadena alquílica, su solubilidad en agua decrece de forma notable.



Figura 5. Principales usos y aplicaciones de los parabenos

Por ser los más empleados a nivel industrial, los parabenos seleccionados para su estudio en este trabajo son: metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) y butilparabeno (BP). En la Figura 6, se muestran las estructuras de estos compuestos.

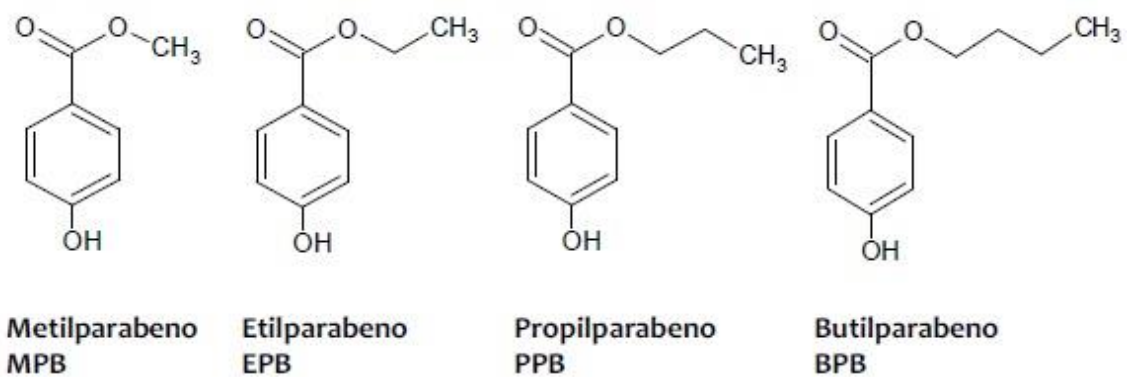


Figura 6. Estructura química de los parabenos objeto de estudio

A finales de los años 90 comenzó la investigación sobre el carácter disruptor de estos compuestos [52]. Hoy en día numerosos estudios han obtenido importantes conclusiones que avalan la inclusión de los PBs dentro del grupo de DEs. En concreto, estudios *in vitro* han evidenciado una serie de efectos sobre la salud derivados de la exposición a estos contaminantes:

- Competencia con los estrógenos naturales. La longitud de la cadena alquílica juega un papel importante en este comportamiento, siendo el BP el que mayor estrogenicidad posee [53, 54].

- Proliferación tumoral. Hay estudios que han demostrado que estos compuestos provocan la proliferación de las células MCF-7 [55].

- Interacciones con los sistemas enzimáticos de regulación del balance hormonal. La aplicación cutánea de PBs provoca una disfunción de las enzimas sulfotransferasas de la piel, por lo cual el estradiol, una vez que se une a los receptores y desencadena la repuesta endocrina, no puede transportarse y salir de estos tejidos [56].

- Actividad antiandrogénica. El MPB, PPB y BPB son capaces de disminuir la producción bioquímica de testosterona [52].

1.3.2.3. Benzofenonas

Las benzofenonas (BPs) son una familia de compuestos empleados en la industria como filtros de la radiación ultravioleta. Las más utilizados son las denominados desde benzofenona 1 (BP-1) a benzofenona 12 (BP-12), aunque existen otras menos habituales como la 2-hidroxibenzofenona (2-OHBP), la 3-hidroxibenzofenona (3-OHBP) y la 4-hidroxibenzofenona (4-OHBP), con una menor aplicación industrial.

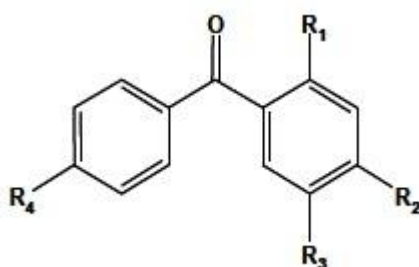


Figura 7. Estructura de las benzofenonas.

Desde un punto de vista físico-químico, se trata de cetonas aromáticas con olor a rosa. Su naturaleza química las hace especialmente eficaces en la absorción de luz ultravioleta (λ : 280 - 400 nm), ya que son capaces de absorberla y disiparla en forma de calor. De esta propiedad deriva su aplicación industrial como filtros solares.



Figura 8. Principales aplicaciones de las benzofenonas

En la Figura 9 se muestran la estructura de las benzofenonas estudiadas en el presente trabajo.

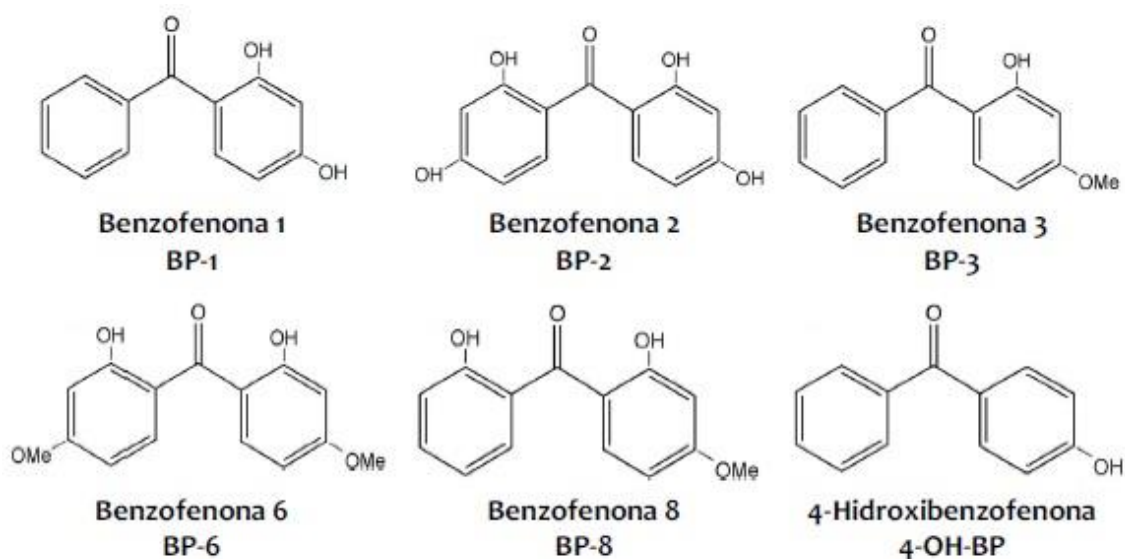


Figura 9. Estructura de las benzofenonas objeto de estudio

Estos compuestos, aunque raramente producen reacciones alérgicas o irritaciones y aparentemente son carentes de toxicidad, son capaces de bioacumularse en los organismos vivos [57-60]. Desde mediados de los años 90 diferentes estudios han demostrado el carácter disruptor de estos compuestos, evidenciando los siguientes efectos derivados de la exposición a los mismos:

-Competencia con los estrógenos naturales. El trabajo desarrollado por Molina-Molina y colaboradores[61], demuestra que las BPs son capaces de unirse a receptores estrogénicos y desencadenar la respuesta asociada a dicha unión. En este mismo estudio se demostró que estos compuestos eran capaces de desplazar el estradiol unido a su receptor.

-Actividad antiandrogénica. Existen diversos trabajos de investigación que ponen de manifiesto la capacidad de las BPs para inhibir la actividad propia de la dihidrotestosterona[62].

-Proliferación de células tumorales. Ha quedado demostrado que las BPs favorecen el desarrollo de colonias celulares cancerosas como las MCF-7 [62].

1.4. LECHE MATERNA

La leche materna constituye el principal alimento en los bebés lactantes y, por tanto, la principal vía de exposición a sustancias químicas por vía alimentaria [50, 63-66]. De hecho, se estima que es un buen biomarcador de la exposición del lactante y ha sido ampliamente usada en estudios de biomonitorización ya que el muestreo es no invasivo y los volúmenes disponibles de muestra son relativamente grandes [67].

Como se ha mencionado a lo largo de la Introducción, la exposición a DEs, aunque sea en bajas dosis, es crítica en las fases de crecimiento y desarrollo del individuo. Por ello, es de extrema importancia el estudio de estos compuestos en los grupos de mayor vulnerabilidad como son fetos, bebés lactantes y niños menores de 5 años [68], pudiendo a estos provocarles efectos irreversibles, debido a la susceptibilidad del cerebro y otros órganos a los estrógenos durante este período [69].



Figura 10. Grupos más vulnerables a los DEs

Para poder valorar de forma adecuada la transmisión de DEs a través de la leche materna, así como sus implicaciones sobre la salud, es importante considerar tanto la intensidad de la contaminación como la duración de la lactancia [70-72]. La leche de la mujer es un medio de excreción de compuestos [73;74].

1.4.1. Composición de la leche materna

Se ha demostrado que la dieta de la madre lactante es fundamental, pues su alimentación y estado nutricional influye sobre la calidad y cantidad de leche segregada. De modo que el estado nutricional previo al embarazo, durante el mismo y el de la lactancia, constituye toda una secuencia nutricional [75]. Es bien conocido que el

consumo frecuente de alcohol, cafeína, nicotina, marihuana y los hábitos tabáquicos afectan negativamente a la producción, volumen, composición y eyección de la leche humana [76-79].

De entre los componentes de la leche, podemos subrayar la importancia de las proteínas, lípidos y oligosacáridos.

- Proteínas

El contenido proteico de la leche varía dependiendo del estado de lactancia de la madre. Durante la lactancia temprana oscila entre 1.4 y 1.6g/100mL, entre 0.8 y 1.0g/100mL durante los 3-4 primeros meses de lactancia y entre 0.7 y 0.8g/100mL después de 6 meses de lactancia [80;81].

La composición proteica de la leche materna se suele determinar a través de la composición en aminoácidos [82]. La taurina, el ácido glutámico y la glutamina son los aminoácidos libres más abundantes en la leche materna, comprendiendo casi el 50% del total de los aminoácidos libres [83-86]. Existe una distribución anormal para estos aminoácidos, por lo que podría considerarse como huella dactilar de cada leche materna.

De entre las funciones de los aminoácidos destacan 2: participan en la digestión, aumentando la absorción de nutrientes, e incrementar la función del sistema inmune del bebé contra bacterias patógenas, virus y levaduras [87].

- Lípidos

Los lípidos son el segundo componente más abundante en la leche materna. Los triglicéridos representan aproximadamente el 98% del contenido total de lípidos en la leche materna, por lo tanto se puede hablar del contenido total de triglicéridos como el contenido total de grasas [88, 89]. Curiosamente, la etapa del calostro es la que tiene menor contenido (2.0 g L^{-1}), aumentando durante los 30 primeros días de lactancia hasta los 4.0 g L^{-1} . Sin embargo, según avanza el periodo de lactancia el contenido en triglicéridos varía considerablemente entre 2.5 y 4.5 g L^{-1} .

La principal función de los lípidos es proporcionar energía para el crecimiento y desarrollo del bebé [90]. Estos ácidos grasos proceden de tres fuentes principales [81,89, 92, 119, 121, 122]:

- Directamente de la dieta de la madre.
- Previamente almacenados o sintetizados en los tejidos maternos.
- Sintetizados en la glándula mamaria.

Estas tres fuentes deben ser equilibradas para así poder mantener constante el suministro de ácidos grasos y aportar la energía al bebé de manera adecuada.

- Oligosacáridos

Los oligosacáridos son el tercer componente más abundante de la leche materna. La composición y cantidad de oligosacáridos en la leche materna varía entre mujeres y a lo largo del periodo de lactancia [93;94]. El calostro contiene 20-25 g/L de

oligosacáridos y a medida que avanza el periodo de lactancia, se produce una disminución del contenido en oligosacáridos a 5-20 g/L. Los oligosacáridos encontrados en la leche materna derivan generalmente de cinco monosacáridos, concretamente glucosa, galactosa, fucosa, ácido siálico y N-acetilglucosamina.

La presencia de oligosacáridos en la leche materna sirve para prevenir el acceso de patógenos a las superficies mucosas del bebé y disminuir el riesgo de infecciones virales, bacterianas y parásitas. Además, pueden modular las respuestas celulares epiteliales e inmunes, reducir la activación y la infiltración de leucocitos, disminuir el riesgo de enterocolitis necrosante y aportar ácido siálico, que es un nutriente esencial para el desarrollo cognitivo y del cerebro del niño.

La Tabla 3, refleja la composición media de una leche materna madura, que es el tipo de leche usada en el presente trabajo.

Tabla 3. Composición media de una leche madura.

Componente	Concentración (gL⁻¹)
Proteína	8
Grasa	41
Lactosa	70
Oligosacáridos	5-15
Número oligosacáridos identificados	+100

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como ya hemos especificado anteriormente, el presente trabajo fin de máster se incluye en un proyecto de investigación más amplio, cuya hipótesis principal es que la leche materna puede ser un vehículo para la excreción de contaminantes con moderada o alta lipofilicidad, a los que las personas estamos expuestas de forma diaria. Por tanto, este medio podría ser una vía de exposición importante para el recién nacido en período de lactancia.

Para este trabajo fin de máster se han planteado los siguientes objetivos:

Objetivo general: puesta a punto de una metodología analítica que permita la cuantificación simultánea de tres familias de DEs no persistentes (bisfenoles, parabenos y benzofenonas) en muestras de leche humana, que sea adecuada para su aplicación en estudios epidemiológicos.

Objetivos específicos:

- Poner a punto y validar una metodología analítica para la cuantificación simultánea de tres bisfenoles (BPA, BPS y BPF), cuatro parabenos (MP, EP, PP y BP) y seis benzofenonas (BP1, BP2, BP3, BP6, BP8 y 4-OHBP); en leche materna de madres donantes del Banco de Leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (BLCHUG).
- Realizar un pilotaje que consistirá en la aplicación de la metodología analítica desarrollada a las primeras 15 muestras de leche reclutadas en el proyecto.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Descripción del banco de leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (BLCHUG).

El Banco de Leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (BLCHUG) comenzó a funcionar durante el mes de Mayo de 2010. La labor de este banco de leche consiste en recoger leche de madres donantes, procesarla, almacenarla y dispensarla, con todas las garantías sanitarias, a los pacientes que la necesiten.

Además, el BLCHUG se encuentra en colaboración con otros hospitales de la comunidad de Andalucía como son: Hospital Materno Infantil de Málaga, Hospital Comarcal Santa Ana de Motril, Hospital Materno Infantil de Jaén y Hospital de Torrecárdenas de Almería.

Los principales objetivos del BLCHUG son los siguientes:

- Ofrecer leche materna a todos los neonatos ingresados en la Unidad Neonatal de este Centro que lo necesiten y cuyas madres no puedan proporcionarla ellas mismas por algún motivo.

- Proporcionar leche donada a otros centros Hospitalarios próximos que atiendan a neonatos que puedan necesitarla.

- Realizar tareas de promoción y apoyo a la lactancia materna entre personal sanitario, madres con neonatos ingresados en la Unidad Neonatal del Hospital Materno Infantil de Granada, madres con neonatos sanos en el área de hospitalización de púerperas de este centro, y grupos sociales de apoyo a la lactancia materna.

3.2. Población de estudio

La población de estudio está compuesta por mujeres inscritas en el BLCHUG.

Una vez que las nuevas donantes han realizado su inscripción al BLCHUG, reciben información tanto oral como escrita (trípticos, Anexo I) sobre el objetivo del estudio, así como las características del mismo, y se les invita a participar. En el caso de que consientan formar parte del estudio, es en este momento, en que se les ofrece el consentimiento informado (Anexo II). Una vez firmado el mismo, se les da todo el material necesario para el proceso de extracción de leche, en el que entre otros, se incluye un tríptico y un manual con todo el procedimiento (trípticos, Anexo III).

Tras la primera donación de leche de la madre y superadas las diferentes pruebas de calidad, nos ponemos en contacto con ellas telefónicamente. Tras una breve presentación, intentamos concertar una entrevista personal. Tanto la fecha como la hora las eligen ellas, adaptándose el grupo al momento que ellas dispongan. En el caso de que a las madres les sea imposible ir hasta el hospital, les ofrecemos la posibilidad de hacer la entrevista de manera telefónica.

3.2.1. Criterios de inclusión y exclusión.

Tras lo descrito, además hemos fijado unos criterios de inclusión y exclusión para el estudio.

Los criterios de inclusión de la población de estudio son los siguientes:

- Tener hábitos de vida saludables.
- Formalizar la inscripción antes de los tres meses de lactancia, idealmente en el primer mes.
- Comprometerse a realizar donaciones de muestra periódicas durante al menos 6 meses.

Criterios de exclusión:

- Mujeres con serología positivas para VIH 1 y 2, Hepatitis B y C o sífilis.
- Mujeres que tienen, ella o su pareja, prácticas de riesgo para adquirir infecciones de transmisión sexual (no pareja estable, no utilización de preservativos, posibilidad de infección a través de tatuajes o piercing en los últimos 6 meses, acupuntura o pinchazo accidental en los últimos 6 meses, transfusiones sanguíneas...)
- Mujeres que hayan sido trasplantadas en los últimos 6 meses.
- Mujeres que consumen tabaco o drogas.
- Mujeres con consumo excesivo de alcohol (más de dos unidades al día, no más de 20 gramos/día) y/o de bebidas con cafeína (más de tres unidades al día, 30 gramos/día).

Además de los criterios de inclusión y exclusión del BLCHUG, el presente estudio tiene sus propios criterios de inclusión y exclusión, que son:

Criterios de inclusión del estudio:

- Prestar consentimiento informado firmado.

Criterios de exclusión del estudio:

- No cumplir alguno de los criterios anteriores

3.3. Cuestionario epidemiológico

Con el objetivo de recolectar información acerca de las características sociodemográficas, clínicas y de estilo de vida de las participantes, se les aplicó un cuestionario epidemiológico diseñado expresamente para este estudio.

El cuestionario tarda en completarse aproximadamente entre 20-25 minutos. Cuando las entrevistas son personales se realizan en la sala del Hospital Materno Infantil de Granada. Si son respondidas de forma telefónica, intentamos que se acorte un poco

El cuestionario consta de dos partes (Anexo IV):

- La primera parte corresponde a las características socio-demográficas, características antropométricas, condiciones de salud, estilos de vida, aspectos relacionados con la dieta y suplementos nutricionales y otros hábitos dietéticos. Consta de 65 preguntas.

- La segunda parte corresponde a un pequeño cuestionario de higiene personal y cosmética, referido a la madre en el último mes antes de la donación. Consta de 29 preguntas.

3.4. Análisis químico

3.4.1. Disolventes y reactivos

- Acetato de amonio, grado analítico
- Acetona, grado HPLC
- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC
- Acetonitrilo, grado LC-MS
- Agua Mili-Q, obtenida con un equipo de purificación Milli-Q Plus Advantage A10 (Millipore). Su resistividad, contralada automáticamente, nunca fue inferior a 18 MΩ cm.
- Agua, grado LC-MS
- Amoníaco (25%), grado LC-MS
- Clorobenceno(CIBz)
- Cloruro de sodio, grado analítico
- Enzima β -glucuronidasa/sulfatasa, *HelixPomatia*, $3 \cdot 10^6$ U g⁻¹
- Etanol, grado HPLC
- Metanol (MeOH), grado HPLC
- Metanol, grado LC-MS
- Tetracloruro de carbono (TCC)
- Triclorometano (TCM)

3.4.2. Patrones químicos

- Bisfenol A (BPA), CAS: 80-07-5; 4,4'-(propano-2,2-diil)difenol
- Bisfenol A deuterado(BPA-d₁₆), CAS: 96210-87-6
- Bisfenol S (BPS), 4,4'-sulfonil difenol; CAS: 80-09-1
- 4-Hidroxibenzofenona (4-OH-BP), CAS: 1137-42-4
- Benzofenona-1 (BP-1), CAS: 131-56-6; 2,4-dihidroxibenzofenona
- Benzofenona-2 (BP-2), CAS: 131-55-5; 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona
- Benzofenona-3 (BP-3), CAS: 131-57-7; 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona
- Benzofenona-6 (BP-6), CAS: 131-54-4; 2,2'-dihidroxi-4,4'- dimetoxibenzofenona
- Benzofenona-8 (BP-8), CAS: 131-53-3; 2,2'-dihidroxi-4- metoxibenzofenona
- Benzofenonadeuterada (BP-d10), CAS: 22583-75-1
- Metilparabeno (MP), CAS: 99-76-3; 4-hidroxibenzoato de metilo
- Etilparabeno (EP), CAS: 120-47-8; 4-hidroxibenzoato de etilo
- Propilparabeno (PP), CAS: 94-13-3; 4-hidroxibenzoato de propilo
- Butilparabeno (BP), CAS: 94-26-8; 4-hidroxibenzoato de butilo
- Etilparabeno marcado con ¹³C, (EP-¹³C₆), EC Number: 200- 662-2

A partir de estos patrones químicos, todos ellos de pureza superior al 99%, se prepararon disoluciones de 100 ng mL⁻¹ en MeOH y se conservaron en oscuridad a 4°C. Éstas fueron estables al menos durante cuatro meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon justo antes de su uso mediante dilución con MeOH.

3.4.3. Material de laboratorio

- Agujas de 0,8 x 40 mm.
- Jeringas de 2 mL.
- Matraces aforados de diferentes capacidades.
- Micropipetas de 100, 250 y 1000 µL.
- Pesasustancias.
- Pipetas graduadas y aforadas de diferentes capacidades.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de centrifuga de fondo cónico de 15 mL con tapón de caucho.
- Tubos de microcentrifuga de plástico (Eppendorf) de 1,5 y 2,0 mL.
- Vasos de precipitado de diferentes capacidades.
- Viales para cromatógrafo de líquidos de 2 mL de capacidad, provistos de insertos de 300 µL.

3.4.4. Instrumentos y aparatos

- Cromatógrafo de líquidos *Agilent*, modelo 1290, provisto de:
 - Bomba cuaternaria de disolventes.
 - Inyector automático.
- Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo *API 4000*, provisto de interfase de ionización ESI de tipo ortogonal.
- Balanza analítica *AND GX-400*.
- Centrifuga *Eppendorf*, modelo *Centrifuge 5810R*
- pH-metro digital *CRISON*, modelo pH/mV-meter digit 501, provisto de electrodo combinado de vidrio y Ag/AgCl.
- *Vortex Yellowline*, modelo TTS2.
- Incubador para tratamiento enzimático, modelo *SANYO MCO-20AIC1*.

Las condiciones usadas en el LC-MS/MS se recogen en el Anexo V.

3.4.5. Programas informáticos

-Software *Analyst 1.5.1*. Tratamiento y toma de datos a partir del cromatógrafo de líquidos acoplado con un espectrómetro de masas.

-Paquete de *Microsoft® Office*: Word® 2007, Excel® 2007 y Powerpoint® 2007. Parte de Microsoft Office Enterprise 2007. Microsoft Corporation (2006).

-Software *Statgraphics plus* versión 5.1 de tratamiento estadístico. Edición profesional. Copyright© 1994-2000. StatisticalGraphics Corp. Abril, 2002.

3.4.6. Tratamiento de muestra

En el tratamiento de muestra podemos diferenciar varias etapas que comentaremos a continuación, y que son: tratamiento enzimático, precipitación de proteínas y extracción mediante la técnica de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME).

- Tratamiento enzimático. Consta de los siguientes pasos:

- Preparación de la disolución de la enzima. Se pesan 10 mg de enzima y se añaden 1,5 mL de acetato amónico 1M a pH=5.

- Tratamiento enzimático de la muestra. Se toma 1 mL de leche, se coloca en un vial de cromatografía y se añaden 50 μL de la disolución de la enzima. La mezcla se agita y se incuba durante 24 horas a 37°C.

- Precipitación de proteínas

Este paso va a permitir eliminar interferentes, facilitando la etapa de extracción. Para ello:

- Se toma 250 μL de muestra tratada enzimáticamente y se añade 10 μL de la disolución de surrogates (BPA-d₁₆, BP-d₁₀ y EP-¹³C₆ a 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno, 50 ng mL⁻¹ en muestra).

- Se añade 250 μL de acetona y se agita 30 segundos en vortex.

- Se centrifuga durante 15 minutos a 13000 r.p.m.

- Finalmente, se recoge el sobrenadante y se sitúa en un tubo de vidrio de 15 mL de fondo cónico, para llevar a cabo la etapa de extracción.

- Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)

El proceso a seguir es el siguiente:

- Se añade al sobrenadante de la etapa anterior 10 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 5% y pH=2.



Figura10. Conjunto de muestras a tratar. Inicio del procedimiento DLLME.

- Se inyecta 1.5 mL de la mezcla de agente extractante y dispersante (TCM-acetona, 1:1 v/v). Este paso debe realizarse rápida y enérgicamente para permitir que aparezcan microburbujasy se forme una dispersión.

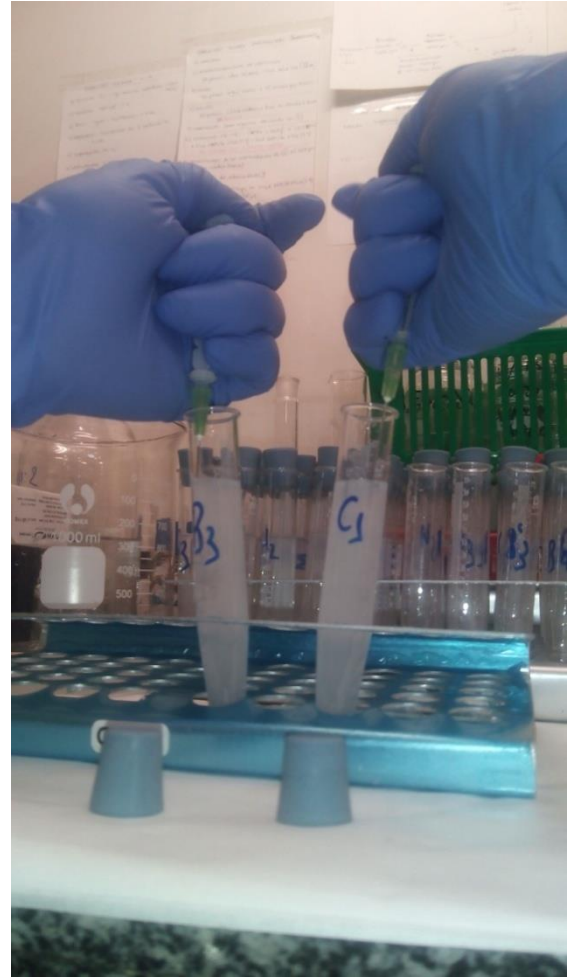
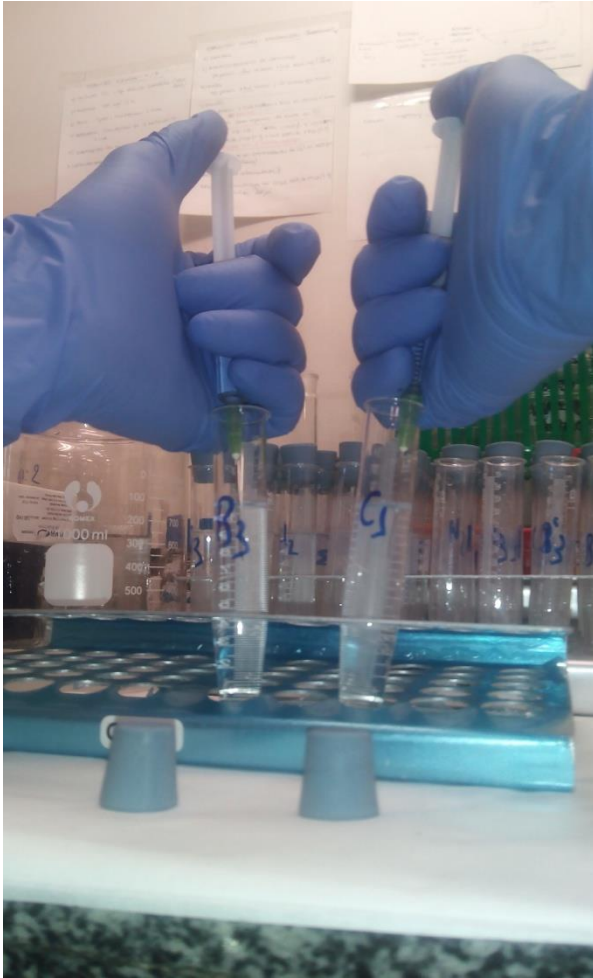


Figura11 y 12. Imagen de la izquierda, momento previo a la inyección de la mezcla con TCM-acetona. Imagen de la derecha, momento exacto de la inyección y formación de las microburbujas.

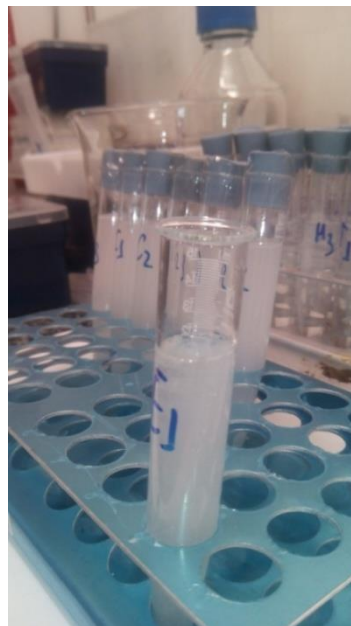


Figura 13.: Microburbujas y formación de la dispersión

- Se agita manualmente durante 20 segundos y se centrifuga a 3200 rpm durante 5 minutos.

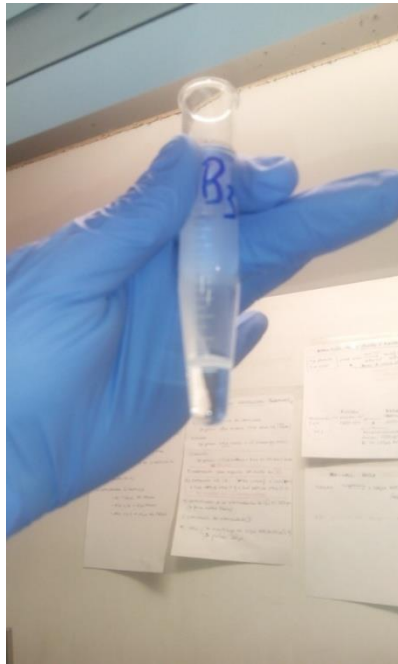


Figura 14. Separación de las diferentes fases tras la centrifugación.

- Se lleva a sequedad bajo corriente de N_2 y se reconstituye con 80 μ L de fase móvil ($H_2O:ACN$, 70:30 v/v).
- Finalmente, se trasvasa a un vial cromatográfico con inserto y 10 μ L son inyectados en el cromatógrafo de líquidos.

3.5. PLAN DE TRABAJO

3.5.1. Etapas del desarrollo y distribución de las tareas del equipo investigador.

3.5.1.1. Equipo de investigación.

La captación de donantes y los cuestionarios epidemiológicos se llevarán a cabo en la Unidad Neonatal del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (CHUG). La puesta a punto de la metodología analítica y los análisis de laboratorio se realizarán en los laboratorios de la Unidad Científico tecnológica del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (ibs Granada).

- Captación de donantes. Luz María Iribarne Durán (LMID), Manuela Peña (MP) y Laura Serrano (LS).
- Recogida de muestras. Luz María Iribarne Durán (LMID), Francisco Artacho Cordón (FAC).
- Cuestionarios. Luz María Iribarne Durán (LMID).

- Puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de compuestos orgánicos persistentes (PCBs y pesticidas organoclorados). Inmaculada Jiménez Díaz (IJD) y Luz María Iribarne Durán (LMID)
- Puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de compuestos orgánicos no persistentes (BPA, parabenos y benzofenonas). Fernando Vela Soria (FVS) y Luz María Iribarne Durán (LMID).
- Procesamiento y análisis de las muestras de leche. Luz María Iribarne Durán (LMID), Francisco Artacho Cordón (FAC), Inmaculada Jiménez Díaz (IJD).
- Análisis estadístico y tratamiento de datos. Juan Pedro Arrebola Moreno (JPAM), Nicolás Olea Serrano (NOS), Francisco Artacho Cordón (FAC) y Luz María Iribarne Durán (LMID).
- Redacción de manuscritos e informe final. Juan Pedro Arrebola Moreno (JPAM), Nicolás Olea Serrano (NOS), Inmaculada Jiménez Díaz (IJD), Francisco Artacho Cordón (FAC) y Luz María Iribarne Durán (LMID).
- Diseño, redacción, coordinación y gestión. Juan Pedro Arrebola Moreno (JPAM), Nicolás Olea Serrano (NOS), Manuela Peña (MP) Francisco Artacho Cordón (FAC) y Luz María Iribarne Durán (LMID).

3.5.1.2. Relación de investigadores del estudio:

A. Departamento de Radiología y Medicina Física y Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada(UGR): Luz María Iribarne Durán (LMID), Francisco Artacho Cordón (FAC), Nicolás Olea Serrano (NOS)*

B. Unidad Científico tecnológica del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (ibs Granada): Inmaculada Jiménez Díaz (IJD), Fernando Vela Soria (FVS), Luz María Iribarne Durán (LMID), Francisco Artacho Cordón (FAC)

C. Banco de Leche del Complejo Hospitalario Universitario de Granada: Manuela Peña (MP) y Laura Serrano (LS).

D. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada: Juan Pedro Arrebola Moreno (JPAM), Inmaculada Jiménez Díaz (IJD), Fernando Vela Soria (FVS), Luz María Iribarne Durán (LMID), Francisco Artacho Cordón (FAC) y Nicolás Olea Serrano (NOS)*

* Son además miembros del CIBER de Epidemiología y Salud Pública CIBERESP

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Optimización de las condiciones de la extracción DLLME

Con el objeto de obtener un método lo más sensible posible, se llevó a cabo la optimización de los principales parámetros involucrados en la etapa de extracción.

4.1.1. Naturaleza de los disolventes extractante y dispersante

Uno de los factores más influyentes en la DLLME es la naturaleza de los disolventes extractante y dispersante. Se ensayaron distintas mezclas de volumen final 2.0 mL, compuestas por 1.0 mL de diferentes disolventes dispersantes (ACN, MeOH, etanol, y acetona) y 1.0 mL de diferentes disolventes extractantes (TCC, TCM y ClBz). La mayor respuesta para todos los compuestos correspondió a la mezcla acetona-TCM, que fue por tanto la seleccionada para el resto de experimentos.

4.1.2. Volumen de los disolventes extractante y dispersante

Una vez seleccionada la mezcla binaria de disolventes extractante-dispersante, se optimizó el volumen de ambos. Para ello se testaron volúmenes de acetona comprendidos entre 0.5 y 3.5 mL (0.5, 1.0, 2.0 y 3.5) y volúmenes de TCM entre 0.15 y 0.75 mL (0.15, 0.25, 0.50 y 0.75). Los valores encontrados como óptimos fueron 0.5 mL de acetona y 0.75 mL de TCM.

4.1.3. Tiempo de extracción, pH de la muestra y adición de sales

En primer lugar se evaluó el efecto del tiempo de extracción, definido como el periodo durante el cual la muestra es agitada tras la adición de la mezcla binaria dispersante-extractante, antes de llevar a cabo la centrifugación. Se ensayaron tiempos de extracción entre 10 y 120 segundos (10, 20, 30, 50, 75, 100 y 120), obteniendo la mayor respuesta para todos los compuestos con el valor de 20 segundos.

A continuación se estudió el efecto que el pH de la muestra ejercía en la extracción. Para ello, se testaron valores de pH comprendidos entre 2 y 6 (2, 3, 4, 5 y 6), siendo el valor de pH 2 el encontrado como óptimo.

Finalmente se evaluó el efecto de la adición de sal, concretamente NaCl. Se estudiaron valores de NaCl comprendidos entre el 0 y 10 % (0, 2.5, 5 y 10), siendo 10 % la concentración con la cual se obtuvo la mayor respuesta para todos los compuestos.

En la Tabla 5, se resumen los parámetros óptimos de la extracción DLLME.

Tabla 5. Parámetros óptimos de la extracción DLLME.

Condiciones óptimas				
Agente Extractante (mL)	Agente Dispersante (mL)	Tiempo de extracción (Seg)	pH de la muestra	Adición de sales (%)
TCM (0.5)	Acetona (0.75)	20	2	10

4.2 Obtención de la curva de calibración

Para la obtención de las curvas de calibración de los DEs estudiados, se empleó el modelo de regresión lineal univariante por mínimos cuadrados, que implica que existe una relación lineal entre la señal analítica medida (S) y la concentración del compuesto (C). Esta relación es del tipo $S = a + bC$, donde a es la ordenada en el origen y b es la pendiente.

Las curvas de calibración se construyeron empleando como señal analítica el cociente de las áreas de pico correspondientes al analito y el patrón interno (surrogate), y representando dicha señal frente a la concentración del analito. Para el establecimiento de la función de calibrado, se preparó una curva de 10 niveles de concentración (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 y 100.0 ng/mL), con 3 réplicas por cada nivel. En la Tabla 6, se recogen los parámetros de calibración obtenidos.

Tabla 6. Parámetros analíticos y estadísticos del calibrado

Compuesto	a	S _a	b (ng/mL) ⁻¹	S _b	R ² (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	RDL (ng/mL)
BPA	0.0043	0.0151	0.0318	3.22 E-04	99.5	0.2	0.7	0.7-100
BPS	0.0337	0.0524	0.0870	1.11 E-03	99.2	0.1	0.4	0.4-100
BPF	0.0012	0.0043	0.0091	9.23 E-05	99.6	0.1	0.5	0.5-100
MP	0.0168	0.0176	0.0392	3.75 E-04	99.6	0.1	0.5	0.5-100
EP	0.0072	0.0082	0.0184	1.76 E-04	99.4	0.1	0.5	0.5-100
PP	0.0197	0.0117	0.0250	2.5 E-04	99.6	0.1	0.5	0.5-100
BP	0.0084	0.0064	0.0154	1.37 E-04	99.6	0.1	0.5	0.5-100
BP-1	0.0648	0.0655	0.1269	1.39 E-04	99.4	0.1	0.4	0.4-100
BP-2	0.0283	0.0160	0.0314	3.41 E-04	99.4	0.2	0.7	0.7-100
BP-3	0.0131	0.0075	0.0147	1.60 E-04	99.4	0.2	0.6	0.6-100
BP-6	0.0022	0.0105	0.0266	2.25 E-04	99.6	0.1	0.5	0.5-100
BP-8	0.0009	0.0055	0.0137	1.18 E-04	99.6	0.2	0.6	0.6-100
4-OH-BP	0.0246	0.1163	0.2921	2.47 E-03	99.7	0.1	0.3	0.3-100

a, ordenada en el origen; S_a, desviación estándar de la ordenada en el origen; b, pendiente; S_b, desviación estándar de la pendiente; R², coeficiente de determinación; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; RDL, rango dinámico lineal.

4.3 Validación del método analítico

La validación del método analítico se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la “*Guía de validación para métodos bioanalíticos*” propuesta por la Agencia de Medicamentos y Alimentos (FDA) [125]. Los parámetros de validación evaluados fueron: sensibilidad, los límites de cuantificación y detección, el rango dinámico lineal, la linealidad, la selectividad y la exactitud.

-Sensibilidad. Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad del método es un aspecto muy importante a la hora de validar un método. Dos parámetros fundamentales que deben examinarse son el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para así determinar si un analito está presente en la muestra o no. Se define LOD como la cantidad mínima de analito detectable en la muestra, mientras que LOQ es la cantidad mínima de analito que

podríamos cuantificar con un nivel de confianza determinado. En las Tabla 6, se recogen los valores obtenidos de LOD y LOQ para cada compuesto.

-Rango dinámico lineal y linealidad

El rango dinámico lineal (RDL) se define como el intervalo de concentraciones comprendido entre el límite de cuantificación de dicho método y el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado el método. En la Tabla 6, se muestran los valores para cada compuesto estudiado.

La linealidad de las curvas de calibración en el rango de trabajo seleccionado, se estimó a partir de los coeficientes de determinación (R^2). Los valores de R^2 comprendidos entre el 99.2 y 99.7% hacen concluir que existe una buena linealidad dentro del rango establecido para el análisis.

-Selectividad

Para la determinación de la especificidad del método se compararon los cromatogramas de una muestra blanca con el correspondiente a una muestra de leche dopada, sin encontrar interferencias de sustancias endógenas a los tiempos de retención de los analitos.

-Exactitud: veracidad y precisión

Para evaluar la veracidad, se llevó a cabo un estudio de recuperación con muestras dopadas, a tres niveles de concentración (1, 40 y 80 ng/mL), empleando para ello muestras de leche que no contuvieran los compuestos objeto de estudio o cuyas concentraciones estuvieran por debajo de los LODs del método. Las muestras fueron analizadas empleando el procedimiento desarrollado y la concentración de cada analito en la muestra se determinó por interpolación a la curva de calibración. Los valores de recuperación se obtuvieron por comparación con las cantidades de analito conocidas que fueron añadidas previamente a las muestras. Las Tablas 7 y 8, muestran los valores de recuperación obtenidos.

Para evaluar la precisión del método, se estudió la reproducibilidad del mismo. Para ello, se realizaron tres réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de recuperación, repitiendo el procedimiento durante 6 días. La Tabla 7 muestra los valores obtenidos para la precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER).

Tabla 7, Valores obtenidos para la precisión (BPA, BPS, BPF, MP, EP, PP y BP)

Compuesto	Concentración Dopada ^a (ng/mL)	Concentración Encontrada (ng/mL)	Recuperado (%)
BPA	1	1.0 (13.0)	100.6
	40	39.6 (5.0)	99.0
	80	78.8 (6.7)	98.5
BPS	1	1.1 (14.8)	110.4
	40	39.6 (10.6)	98.9
	80	82.8 (7.3)	103.6
BPF	1	0.9 (13.4)	94.6
	40	38.2 (9.2)	95.4
	80	77.8 (8.6)	97.2
MP	1	1.0 (19.6)	101.9
	40	44.8 (8.3)	111.9
	80	88.6 (12.6)	110.8
EP	1	0.9 (11.9)	90.2
	40	39.2 (8.9)	97.9
	80	84.0 (6.3)	105.0
PP	1	0.9 (14.4)	93.9
	40	43.4 (7.5)	108.5
	80	87.9 (6.2)	109.8
BP	1	1.1 (12.1)	107.6
	40	39.1 (7.9)	97.8
	80	83.7 (11.4)	104.6

^aMedia de 18 determinaciones

Tabla 8. Valores obtenidos para la precisión (BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8 y 4-OHBP)

Compuesto	Concentración Dopada ^a (ng/mL)	Concentración Encontrada (ng/mL)	Recuperado (%)
BP1	1	1.0 (13.9)	95.8
	40	42.9 (6.3)	107.2
	80	79.7 (12.1)	99.6
BP2	1	1.0 (14.7)	96.5
	40	41.4 (6.9)	103.5
	80	77.8 (7.8)	97.3
BP3	1	1.0 (10.3)	95.4
	40	39.9 (5.3)	99.7
	80	74.5 (10.8)	93.1
BP6	1	1.0 (10.6)	99.4
	40	41.8 (12.3)	104.6
	80	80.7 (5.4)	100.8
BP8	1	1.0 (10.4)	97.8
	40	40.5 (12.3)	101.3
	80	78.2 (5.4)	97.7
4-OHBP	1	0.9 (4.4)	86.2
	40	40.2 (4.3)	100.4
	80	79.7 (5.1)	99.6

^aMedia de 18 determinaciones

4.4 Aplicación del método analítico

El método desarrollado fue aplicado para determinar la cantidad total de BPA, 4 parabenos y 6 benzofenonas en 15 muestras de leche materna. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Para asegurar la calidad de los resultados, las extracciones se hicieron en tandas de 8, incluyendo cada tanda 1 blanco metodológico (agua Milli-Q tratada de igual forma que una muestra) y 1 control de calidad (muestra de leche, analizada previamente, y con niveles de BPA, BPS, BPF, parabenos y benzofenonas por debajo de los LOD del método y dopada con los compuestos objeto de estudio a una concentración final de 10 ng/mL). En la tabla 9, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 9. Resultado de la aplicación del método a 15 muestras de leche materna.

Muestra	Concentración ng/mL ^a						
	BPA	MP	EP	PP	BP	BP-1	BP-3
A	ND	10.4	ND	0.7	ND	ND	1.5
B	ND	ND	5.3	ND	ND	ND	0.7
C	1.9	2.3	ND	ND	ND	ND	1.1
D	ND	2.5	ND	ND	D	ND	ND
E	ND	18.3	6.8	D	ND	ND	1.0
F	ND	7.5	D	D	ND	ND	ND
G	D	5.3	ND	D	ND	ND	ND
H	ND	5.2	ND	D	ND	ND	D
I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J	2.3	ND	ND	ND	ND	0.6	D
K	ND	6.0	D	ND	ND	ND	1.4
L	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
N	ND	1.9	ND	ND	ND	ND	ND
O	D	18.6	ND	3.8	ND	ND	1.0

^a Media de tres determinaciones; ND, no detectado (<LOD); D, detectado (>LOD y <LOQ).

A continuación, pasamos a discutir la tabla 9, donde se muestran los siguientes resultados:

En cuanto a la familia de los bisfenoles, el BPA fue detectado en 4/15(26.7%) de las muestras analizadas y cuantificado en el 13.3% de las mismas, en un rango de concentraciones entre 1.9-2.3 ng/mL. Sin embargo, el BPF y BPS no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas.

Respecto a la familia de los parabenos, podemos apreciar que todos los compuestos que hemos analizado, han sido detectados, 100% (15/15), en mayor o menor proporción. El MP fue detectado en 11/15 (73.3%) de las muestras analizadas y cuantificado en el 66.7% de las mismas, en un rango de concentraciones entre 1.9-18.6 ng/mL. El EP fue detectado en 5/15 (33.3%) de las muestras analizadas y cuantificado en el 13.3 % de las mismas, en un rango de concentraciones entre 5.3-6.8 ng/mL. El PP fue detectado en 6/15 (40.0%) de las muestras analizadas y cuantificado en el 13.3 % de las mismas, en un rango de concentraciones que se disponen entre 0.7-3.8 ng/mL. El BP fue detectado en 1/15 (6.7%) de las muestras analizadas.

Para la familia de las benzofenonas, la BP-1 fue detectada en el 6.7% de las muestras analizadas (1/15) a una concentración de 0.6 ng/mL. La BP-3 fue detectada en el 60.0% de las muestras analizadas (9/15) y cuantificado en el 40.0 % de las mismas, en un rango de concentraciones entre 0.7-1.5 ng/mL. No se encontraron BP-2, BP-6, BP-8 ni 4-OH-BP en ninguna de las muestras analizadas.

4.5. Descripción de la población de estudio

Nuestra población consta de 15 mujeres, de las cuales 14 (93.3%) son españolas y una (6.6%) marroquí. Del total de la población 6 (40%) de las madres viven en Granada y el resto se dividen con un 6.7 % de la población, entre las zonas de Baza, Iznalloz, Padul, Armilla, Atarfe y Huétor Vega, respectivamente.

Las profesiones de estas mujeres son muy variadas y en ninguno de los casos el oficio se repite en la población. En cuanto, a su estado de pareja, 15/15 (100%) tenían en el momento de la entrevista, pareja estable. Dentro de la población estudiada, 12/15 (80%) de las madres no presentaba ningún tipo de patología diagnosticada, excepto las 3 (20%) restantes, que presentaban una psoriasis, una hipertensión y una enfermedad celíaca. La distribución de los Hospitales en los que nacieron los niños de las mujeres donantes de leche, fueron las siguientes: 6 (40%) en el Hospital Materno Infantil, 6 (40%) en el Hospital Clínico San Cecilio, 1 (6.7) en el Hospital Comarcal de Baza, 1 (6.7) en la Clínica Inmaculada y 1 (6.7) en el Hospital Nuestra Señora de la Salud. En la Tabla 10, se muestran las frecuencias de localización, profesiones, estabilidad emocional, patologías diagnosticadas y hospitales donde han nacido los hijos de las madres donantes de la leche materna.

Tabla 10. Tabla de frecuencias sobre la localización, profesiones, pareja, patologías y hospital.

Localización		Profesores		Pareja estable		Patología diagnosticada		Hospital nacimiento bebe	
Granada	6(40%)	Abogada	1(6.7%)	Si	15(100%)	Si	3 (20%)	Materno Infantil	6 (40%)
Baza	1(6.7%)	Admin. Lotería	1(6.7%)	No	0 (0%)	No	12(80%)	Clínico	6 (40%)
Iznalloz	1(6.7%)	Comercial	1(6.7%)					Comarcal Baza	1(6.7%)
Padul	1(6.7%)	Desempleada	1(6.7%)					Clínica Inmaculada	1(6.7%)
Armilla	1(6.7%)	Educadora	1(6.7%)					Hspt. Ntra. Señora de la Salud	1(6.7%)
Atarfe	1(6.7%)	Enfermera	1(6.7%)						
Huétor Vega	1(6.7%)	Informática	1(6.7%)						
		Ing. Industrial	1(6.7%)						
		Limpiadora	1(6.7%)						
		Pediatra	1(6.7%)						
		Peluquera	1(6.7%)						
		Profesora	1(6.7%)						
Total	15		15		15		15		15

Las edades de las mujeres que forman parte de nuestro estudio están comprendidas los 28-42 años, con una mediana de 33 años y las edades de gestación se sitúan en torno a un rango entre 27-41. Un total de las madres, 12 (80%) tuvieron sus hijos durante año 2014 y los 3 (20%) restantes en 2015. El rango de semanas de gestación estaba comprendido entre de 27-41 semanas, con una mediana de 38 semanas

de gestación y una desviación típica de 3.54. El rango del peso de los niños al nacer fue de entre 840- 3950 Kg, con una mediana igual a 3044 Kg de peso y una desviación típica de 727.224. El índice de masa corporal de nuestra población tiene una mediana igual a 38.8 kg/altura. Con un rango entre 29.19-62.43. Un dato de gran importancia, es que 4/ 13 (26.7%) de las madres son multíparas, y solamente una (6.7%) de ellas tiene 2 hijos previos y las 3 (20%) restantes tienen un único hijo previo.

Tabla 11. Frecuencias sobre la edad de la madre, IMC, edad gestacional, peso del bebe al nacer y la presencia de hijos anteriores.

Edad de la madre		IMC		Edad gestacional		Peso del bebe al nacer		Hijos anteriores	
28	2 (13.3%)	29.19	1 (10.0%)	27	1 (6.7%)	840	1 (6.7%)	0	11 (73.3%)
30	1 (6.7%)	31.48	1 (10.0%)	35	1 (6.7%)	2600	2 (13.3%)	1	3 (20.0%)
32	2 (13.3%)	31.88	1 (10.0%)	36	2 (13.3%)	2690	1 (6.7%)	2	1 (6.7%)
33	5 (33.3%)	36.09	1 (10.0%)	37	1 (6.7%)	2950	1 (6.7%)		
35	2 (13.3%)	38.24	1 (10.0%)	38	3 (20.0%)	2970	1 (6.7%)		
36	1 (6.7%)	39.39	1 (10.0%)	39	2 (13.3%)	3100	1 (6.7%)		
38	1 (6.7%)	42.35	1 (10.0%)	40	2 (13.3%)	3260	1 (6.7%)		
42	1 (6.7%)	49.14	1 (10.0%)	41	3 (20.0%)	3280	1 (6.7%)		
		49.38	1 (10.0%)			3300	1 (6.7%)		
		62.43	1 (10.0%)			3380	1 (6.7%)		
						3460	1 (6.7%)		
						3530	1 (6.7%)		
						3750	1 (6.7%)		
						3950	1 (6.7%)		
Total	15	Total	10	Total	15	Total	15	Total	15

De las 15 madres reclutadas hasta el momento, 3 (20%) aún no han respondido al cuestionario. Por lo que, tenemos una pérdida del 20% de los datos. En cuanto al nivel de estudios de las madres, 12 (80%) de las madres presentaban estudios universitarios y sólo 1 de ellas estudios secundarios (6.7%). En cuanto al nivel de estudios de sus parejas, 7 (53.8) tenían estudios universitarios, 5(38.5%) estudios secundarios y 1 (7.7) estudios primarios. Respecto al estilo de vida, 4 de las 15 madres (26.7%) consumían 1 café al día y 3 de las 15 (20.0%) eran fumadoras (1 una vez al mes, 1 una vez al mes y 1 cigarrillo al día). Y solamente 1 (6.7) de ellas, tiene una dieta vegetariana.

Tabla 12. Frecuencias sobre niveles de estudio (madre-pareja), consumo de caféina, hábitos tabáquicos y dieta vegetariana.

Nivel de estudios de la madre		Nivel de estudios de la pareja		Consumo de caféina		Consumo de tabaco		Dieta vegetariana	
Universidad	12 (80%)	Universidad	7 (53.8%)	Si	4 (26.7%)	Si	3 (20.0%)	Si	1 (6.7%)
Secundaria	1 (6.7%)	Secundaria	5 (38.5%)	No	11 (73.3%)	No	12 (80%)	No	14 (93.3%)
Primaria	0 (0%)	Primaria	1 (7.7%)						
Total	13 (100%)	Total	13 (100%)	Total	15 (100%)	Total	15 (100%)	Total	15 (100%)

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se ha puesto de manifiesto la relevancia de la exposición humana a contaminantes no persistentes con actividad disruptora endocrina, a los que la mayor parte de la población suele estar expuesta de forma diaria. Este hecho podría suponer un problema relevante para la Salud Pública, sobre todo en los colectivos más vulnerables, como los lactantes.

En nuestro trabajo hemos desarrollado una metodología rápida, económica, fiable y sensible para la cuantificación simultánea de varias familias de compuestos con potencial actividad disruptora hormonal (bisfenoles, parabenos y benzofenonas). La selección de estos compuestos se realizó en base a su prevalencia reportada en la población general [95], así como sus efectos potenciales sobre la salud, demostrados tanto en estudios experimentales como en diseños epidemiológicos.

Otros grupos de investigación han desarrollado previamente metodologías para el análisis de bisfenoles, parabenos y benzofenonas en leche materna. Los tratamientos de muestra usados abarcan desde técnicas clásicas como la extracción líquido-líquido (LLE) [96] y extracción en fase sólida (SPE) [97], hasta técnicas de microextracción más recientes como extracción con ultrasonidos [98], extracción por sorción en barra agitadora (Stir bar sorptive extraction, SBSE) [99], extracción con adsorbentes dispersivos [100] y extracción con membrana agitada [101]. Las citadas metodologías presentan ciertas limitaciones comparada con la desarrollada en este trabajo, como un mayor tiempo de procesamiento de muestra y un coste más elevado.

En la Tabla 13 se comparan los límites de detección, grado de positividad y rango de concentraciones halladas, de los métodos más sensibles encontrados en bibliografía para el análisis de bisfenoles, parabenos y benzofenonas en leche materna. . En dicha tabla se observa que los límites de detección del método desarrollado son similares a los de estos métodos. Con respecto a las concentraciones de contaminantes encontradas, indistintamente de la técnica empleada, éstas se encuentran en el rango de las pocos ng/mL.

Tabla 13. Comparación de resultados, de los compuestos objetos de estudio en leche materna, con diferentes técnicas (DLLME y SBSE)

Compuesto	DLLME (presente trabajo)			SBSE [98]			Absorbentes dispersivos [99]			Ultrasonidos [100]			Membrana Agitada [101]		
	LD	Positivos	□ ng/ml	LD	Positivos	□ ng/ml	LD	Positivos	□ ng/ml	LD	Positivos	□ ng/ml	LD	Positivos	□ ng/ml
BPA	0.2	4/15 (26.7%)	1.9- 2.3	0.2	8/10 (80%)	3.16- 10.8	0.05	6/10 (60%)	0.6- 13.8	0.2	8/10 (80%)	0.6- 2.10	-	ND	ND
MP	0.1	11/15 (73.3%)	1.9- 18.6	0.1	5/10 (50%)	0.8- 7.8	0.03	9/10 (90%)	0.4- 3.5	0.2	9/10 (90%)	1.26- 16.3	0.2	8/10 (80%)	0.9- 11.3
EP	0.1	5/15 (33.3%)	5.3- 6.8	0.1	8/10 (80%)	0.7- 15.0	0.03	9/10 (90%)	0.2- 3.4	0.1	9/10 (90%)	0.97- 18.1	0.1	6/10 (60%)	0.5- 13.2
PP	0.1	6/15 (40.0%)	0.7- 38	0.1	9/10 (90%)	0.7- 41.2	0.03	9/10 (90%)	0.1- 7.5	0.1	8/10 (80%)	1.02- 12.6	0.1	9/10 (90%)	0.5- 37.0
BP	0.1	ND	ND	0.1	5/10 (50%)	0.7- 13.4	0.03	9/10 (90%)	0.2- 1.3	0.2	9/10 (90%)	1.17- 12.1	0.2	8/10 (80%)	0.6- 11.3
BP-1	0.1	1/15 (6.7%)	D	0.2	6/10 (60%)	0.8- 1.5	0.03	8/10 (80%)	0.2- 1.3	0.1	9/10 (90%)	0.61	-	ND	ND
BP-3	0.2	9/15 (60.0%)	0.7- 1.5	0.1	9/10 (90%)	0.9- 9.6	0.03	9/10 (90%)	0.9- 17.4	0.2	9/10 (90%)	4.7- 15.7	-	-	-
BP-6	0.1	ND	ND	0.2	1/10 (10%)	D	0.03	ND	ND	0.1	4/10 (40%)	D	-	-	-
BP-8	0.2	ND	ND	0.1	2/10 (20%)	D	0.02	ND	ND	0.1	6/10 (60%)	0.31- 3.9	-	-	-
4-OHBP	0.1	ND	ND	0.1	7/10 (70%)	7.7- 10.2	0.03	9/10 (90%)	0.4- 5.8	0.1	4/10 (40%)	0.73	-	-	-

Es de interés comparar los niveles de contaminantes en leche materna con los niveles reportados en otras matrices biológicas. La presencia de BPA ha sido confirmada en otras matrices como placenta, suero u orina (Tabla 14), en unos rangos de detección que suelen oscilar entre el 27 y el 40%. Con respecto a BPF y BPS, al igual que en nuestro trabajo, no se han reportado niveles positivos de estos compuestos en otras matrices humanas. Con respecto a los parabenos, igual que ocurre con la leche materna, el MP es el compuesto detectado con mayor frecuencia. Cabe destacar que, respecto al que el PP, se detectó en un 40% de nuestras muestras, presentó un rango de concentración muy amplio (0.7- 30 ng/ml). Esta variabilidad es de interés debido a que implica una gran desigualdad en los niveles de exposición de la población. Con respecto al grupo de benzofenonas, cabe destacar que aunque en leche materna no se han detectado ni la BP-2 ni la 4-OHBP, estas fueron encontradas en el 100% de las muestras de un estudio llevado a cabo en orina [102]. Esto podría deberse a la mayor tendencia de estos compuestos a ser excretados por la orina en lugar de bioacumularse, debido a su mayor polaridad.

Según lo anteriormente mencionado, podemos concluir que la leche materna muestra un comportamiento similar a otras matrices con contenido graso parecido en relación a la acumulación de tóxicos con moderada lipofilia. Por tanto, esta matriz puede ser considerada como una fuente de excreción de los mismos para la madre y así mismo una fuente de exposición para el bebé lactante.

Tabla 14. Comparación de resultados, de los compuestos objetos de estudio en diferentes matrices (Placenta, leche materna y orina)

Compuesto	Placenta [50]		Leche Materna (presenta trabajo)		Orina [102]	
BPA	20/50 (40%)	1.2-15.4 ng/g	4/15 (26.7%)	1.9-2.3 ng/ml	3/10 (30%)	4.3-12 ng/ml
BPF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BPS	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MP	49/50 (98%)	0.1-8.7 ng/g	11/15 (73.3%)	1.9-18.6 ng/ml	10/10 (100%)	30-353 ng/ml
EP	33/50 (66%)	0.2-1.8 ng/g	5/15 (33.3%)	5.3-6.8 ng/ml	7/10 (70%)	1.1-199 ng/ml
PP	26/50 (68%)	0.2-0.8 ng/g	6/15 (40.0%)	0.7-38 ng/ml	10/10 (100%)	2.3-94 ng/ml
BP	7/50 (16%)	0.2-1.6 ng/g	ND	ND	5/10 (50%)	1.1-24.1 ng/ml
4-OHBP	29/50 (58%)	0.2-0.9 ng/g	ND	ND	10/10 (100%)	1.0-2.9 ng/ml
BP-1	ND	ND	1/15 (6.7%)	D	10/10 (100%)	1.9-22 ng/ml
BP-2	ND	ND	ND	ND	10/10 (100%)	0.8-8.8 ng/ml
BP-3	ND	ND	9/15 (60.0%)	0.7-1.5 ng/ml	10/10 (100%)	0.8-17 ng/ml
BP-6	6/50 (12%)	0.2-1.0 ng/g	ND	ND	ND	ND

-PERSPECTIVAS FUTURAS

Como se ha indicado anteriormente, este trabajo se incluye dentro de un proyecto más amplio, cuya duración estimada es de tres años. Los objetivos que se perseguirán a partir de ahora son:

- Reclutar el mayor número de madres posible
- Aplicar la metodología desarrollada en el presente trabajo a todas las muestras de leche disponibles
- Poner a punto y validar una metodología analítica adecuada para la determinación de compuestos orgánicos persistentes (OCPs y PCBs) en muestras de leche materna y aplicar la metodología a todas las muestras de leche disponibles
- Llevar a cabo los pertinentes análisis estadísticos para establecer los predictores de exposición a los compuestos objeto de estudio

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente Memoria de Trabajo Fin de Máster son las siguientes:

1. Se ha desarrollado un nuevo método analítico para la determinación del contenido total de diferentes disruptores endocrinos químicos no persistentes (bisfenoles, parabenos y benzofenonas) en muestras de leche materna humana. Todos los parámetros involucrados en el proceso de extracción se han optimizado con el objetivo de conseguir un método lo más sensible posible.

2. Se ha validado el método desarrollado. Los parámetros obtenidos (límites de cuantificación y detección, rango dinámico lineal, linealidad, selectividad y exactitud) indican que este método es perfectamente adecuado para su aplicación a muestras de leche materna.

3. Se ha aplicado la metodología desarrollada a 15 muestras de leche materna donadas por voluntarias del BLCHUG.

4. Los datos de biomonitorización obtenidos indican que la exposición humana a disruptores endocrinos es significativa, destacando el contenido de MP, EP, PP, BP, así como de BPA, BP-1 y BP-3 en leche materna. Por tanto, serían necesarias acciones legislativas y de concienciación social que minimicen o eliminen esta exposición.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Lister, A.L., Van Der Kraag, G.J., 2001. Water Quality Research Journal of Canada (36):175-190.
- [2]. Zhou, W.X., Shen, Y., Hu, ET., Zhao, Y., Sheng, M.Y., Zheng, Y.X., Wang, S.Y., Lee, YP., Wang, CZ., Lynch, D.W., Chen, L.Y., 2012. Opt Express. 20(27):28953-62.
- [3] Soto, A.M., Sonnenschein, C., 2010. Nat Rev Endocrinol.6(7):363-70.
- [4] WHO/PCS/EDC/02.2., 2002. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors.
http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
- [5] Vela-Soria, F., 2014. Evaluación de la exposición humana a disruptores endocrinos químicos.
- [6] Sonnenschein, C., Soto, A.M., 1998. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (65):143-150.
- [7] Palanza, P., Morellini, F., Parmigiani, S., vomSaal, F.S., 1999. Neuroscience and Biobehavioral Reviews (23):1011-1027.
- [8] Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P., 1996. Our stolen future. Plume/Penguin Books; New York
- [9] Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McFinlay, R., Orton, F., Rosivatz, E., 2011. Estate of the art assesment of endocrine disrupters, Final Report.
- [10] Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. 2010. Water Research, (44):578–588.
- [11] Vogelsang, C., Grung, M., Jantsch, T.G., Tollefsen, K.E., Liltved, H., 2006. Water Research, (40):3559–3570.
- [12] Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K., 2005. Mutation Research, (574):139–155.
- [13] Rubin, B.S., 2011. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, (127):27–34
- [14] Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R.S., 2002. Environment International, (28):215–226
- [15] Frye, C.A., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H.B., Venerosi, A., Wojtowicz, A.K., Panzica, G.C., 2012. Journal of Neuroendocrinology, (24):144–159.
- [16] Damgaard, I.N., Main, K.M., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2002. Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism, (16):289–309.
- [17] UNEP., 1999. Inventory of Information Sources on Chemicals. Persistent Organic Pollutans.

- [18] Gocmen, A., Peters, H.A., Cripps, D.J., Bryan, G.T, Morris, C.R. 1989. *Biomed Environ Sci*, 2(1):36-43.
- [19] Smith, A.G, Dinsdale, D, Cabral, J.R, Wright, A.L., 1987. *Arch Toxicol*, 60(5):343-9.
- [20] IARC., 1998. Report of an ad-hoc IARC Monographs Advisory Group on Priorities for Future Evaluations. International Agency for Research on Cancer; <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/internrep/98-004.pdf>
- [21] Wolff, Ms., Toniolo, PG., 1995. *Environ Health Perspect Suppl*, (7):141-5.
- [22] Steinmetz, R., Young, P.C., Caperell-Grant, A., Gize, E.A., Madhukar, B.V., Ben-Jonathan, N., et al., 1996. *Cancer Res*, 56(23):5403-9.
- [23] IARC., 2001. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Substances Profiles*. International Agency for Research on Cancer.
- [24] Porta, M., Kogevinas, M., Zumeta, E., Sunyer, J., Ribas-Fito, N., Ruiz, L., et al. 2002. *GacSanit*, 16(3):257-66.
- [25] Botella, B., Crespo, J., Rivas, A., Cerrillo, I., Olea-Serrano, MF., Olea, N., 2004. *Environ Res*, 96(1):34-40.
- [26] The Dow Chemical Company. Bisphenol A., 1969.
- [27] www.bisphenol-a.org.
- [28] The Dow Chemical Company. Product Safety Assesment: Bisphenol A., 2012.
- [29] Rodríguez-Gómez, R., 2014. Desarrollo de métodos de análisis para la cuantificación de disruptores endocrinos químicos en muestras biológicas.
- [30] Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonell, D.P., Gaido, K.W., 1998. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (142):203–214.
- [31] Aloisi, A.M., Della-Seta, D., Ceccarelli, I., Farabollini, F., 2001. *Neuroscience Letters*, (310):49–52.
- [32] Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe H., Ohta S., 2005. *Toxicological Sciences*, (84):249–259.
- [33] Stowell, C.L., Barvan, K.K., Young, P.C.M., Bigseby, R.M., Verdugo, D.E., Bertozzi, C.R., Wdlanski, T., 2006. *Chemistry and Biology*, (13):891–897.
- [34] Satoh, K., Ohyama, K., Aoki, N., Lida, M., Nagai, F., 2004. *Food and Chemical Toxicology*, (42):983-993.

- [35] Patisaul, H.B., Bateman, H.L., 2008. *Hormones and Behavior*, (53):580–588.
- [36] Ramakrishnan, S., Wayne, N.L., 2008. *Reproductive Toxicology*, (25):177–183.
- [37] Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., VomSaal, F.S., 2007. *Reproductive Toxicology*, (24):199–224.
- [38] Tando, S., Itoh, K., Yaoi, T., Ikeda, J., Fujiwara, Y., Fushiki, S., 2007. *Brain Development*, (29):352–356.
- [39] Furuya, M., Adachi, K., Kuwahara, S., Ogawa, K., Tsukamoto, Y., 2006. *LifeSciences*, (78):1767–1776.
- [40] Von-Goetz, N., Wormuth, M., Scheringer, M., Hungerbuhler, K., 2010. *Risk Analysis*, (30):473–487.
- [41] Carwile, J.L., Luu, H.T., Bassett, L.S., Driscoll, D.A., Yuan, C., Chang J.Y., Ye, X.Y., Calafat, A.M., Michels, K.B., 2009. *Environmental Health Perspectives*, (117):1368–1372.
- [42] Geens, T., Goeyens, L., Covaci, A., 2011. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, (214):339–347.
- [43] Carwile, J.L., Luu, H.T., Bassett, L.S., Driscoll, D.A., Yuan, C., Chang, J.Y., Ye, X.Y., Calafat, A.M., Michels, K.B., 2009. *Environmental Health Perspectives*, (117):1368–1372.
- [44] Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., Cooper, I., 2002. *Food Additives and Contaminants*, (21):1015–1026.
- [45] Loganathan, S.N., Kannan, K., 2011. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, (61):68-73.
- [46] Geens, T., Roosens, L., Neels, H., Covaci, A., 2009. *Chemosphere*, (76):755-760
- [47] Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Bernert, J.T., Ye, X., Silva, M.J., Barr, D.B., Sathyanarayana, S., Lanphear, B.P., 2011. *Environmental Health Perspectives*, (119):131-137.
- [48] Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., Hauser, R., 2009. *Environmental Health Perspectives*, (117):639-644.
- [49] Johanna, R., Rochester, Ashley, L., 2015. Bolden. *EnvironmentalHealthPerspectives*, (123):7
- [50] Vela-Soria, F., Jiménez-Díaz, I., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Olea N., Navalón, A., 2011. *Analytical Methods*, (3):2073–2081.
- [51] Daniel, J.W., 1986. *Xenobiotica* (16):1073-1078

- [52] Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., 2005. *Food Chemistry and Toxicology*, (43):985–1015.
- [53] Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (153):12-19.
- [54] Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G.B., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D., 2002. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, (80):49-60.
- [55] Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D., 2002. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (80):49–60.
- [56] Prusakiewicz, J.J., Harville, H.M., Zhang, Y., Ackermann, C., Voorman, R.L., 2007. *Toxicology* (232):248-256.
- [57] Felix, T., Hall, B.J., Brodbelt, J.S., 1998. *Analytica Chimica Acta*, (371):195–203.
- [58] Hagedorn-Leweke, U., Lippold, B.C., 1995. *Pharmacological Research*, (12):1354–1360.
- [59] Hayden, C.G.J., Roberts, M.S., Benson, H.A.E., 1997. *Lancet*, (850):863–864.
- [60] Jiang, R., Roberts, M.S., Collins, D.M., Benson, H.A.E., 1999. *British Journal of Clinical Pharmacology*, (48):635–637.
- [61] Molina-Molina, J.M., Escande, A., Pillon, A., Gómez, E., Pakdel, F., Cavailles, V., Olea, N., Ait-Aissa, S., Balaguer, P., 2008. *Toxicology and Applied Pharmacology* (232):384-395.
- [62] Suzuki, T., Kitamura, S., 2005. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (203):9–17.
- [63] Jiménez-Díaz, I., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalón, A., Olea, N., Vílchez, J.L., 2010. *Journal of Chromatography B*, (878):3363–3369.
- [64] Jiménez-Díaz, I., Vela-Soria, F., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., Ballesteros, O., Navea, N., Olea, N., Vílchez, J.L., 2011. *Talanta*, (84):702–709.
- [65] Vela-Soria, F., Jiménez-Díaz, I., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navalón, A., Vílchez, J.L., Fernández, M.F., Olea, N., 2011. *Talanta*, (85):1848–1855.
- [66] Stefanidou, M., Maravelias, C., 2009. Spiliopoulou. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders – Drug Targets*, (3):269–276.
- [67] Smolders, R., Schramm, K.W., Nickmilder, M., Schoeters, G., 2009. *Environmental Health Perspectives*, (8):8–18.
- [68] Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2013. *Endocrine Reviews*,

In press DOI:<http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0002>.

- [69] Safe, S., 2005. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, (16):139–144.
- [70] Gladen, B.C., Rogan, W.J., Hardy, P., 1988. *Pediatrics*, (113):991-995
- [71] APP., 1994. Committee on environmental health.PCBs in breast milk. *Pediatrics*, (94):122-123.
- [72] Rogan, W.J., Gladen, B.J., 1992. *Neurotoxicol.* (13):27-36.
- [73] Skaare, J.U, Polder, A. 1990. *Arch Environ Contam Toxicol*, 640-645.
- [74] Hong, CH.S., Bush, B., Xiao, J., 1992. *Chemosphere*, (24):465-473.
- [75] Tagle, M.A., 1980. *Nutrición*. Edit A. Bello. Chile. 120.
- [76] Liston, J., 1998. *Breastfeed Rev*, 6(2):27-30.
- [77] Golding, J., 1997. *Early Hum Dev.* 49 Suppl (29-43).
- [78] Shepherd, C.K., Power, K.G., Carter, H., 1998. *J Public Health Med.* 220(3):275-280.
- [79] Deutch, B., Pedersen, H.S., Jorgensen, E.C., Hanser, J.C., 2003. *Arch Environ Health*, 58(1):30-36.
- [80] Michaelson, K.F. 1994. *American Journal of Clinical Nutrition*, (59):600–611.
- [81] Jensen, R.G., 1995 Academic Press, Inc., San Diego, USA.
- [82] Raiten, D.J., Talbot, J.M., Waters, J.H., 1998. *Journal of Nutrition*, (128):2116S–2118S.
- [83] Agostoni, C., Carratù, B., Boniglia, C., Riva, E., Sanzini, E., 2000. *Journal of the American College Nutrition*, (19):434–438.
- [84] Chuang, C.K., Lin, S.P., Lee, H.C., Wang, T.J., Shih, Y.S., Huang, F.Y., Yeung, C.Y. 2005. *Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition*, (40):496–500.
- [85] Elmastas, M., Keha, E.E., Keles, M.S., Aboul-Enein, H.Y. 2008. *Analytical Letters*, (41):725–736.
- [86] Sarwar, G., 2001. *Journal of the American College Nutrition*, (20):92–93.
- [87] Leonnerdal, B., 2003. *American Journal of Clinical Nutrition*, (77):1537S–1543S.
- [88] Jensen, R.G., Bitman, J., Carlson, S.E., Couch, S.C., Hamosh, M., Newburg, D.S., 1995. Academic Press, San Diego, USA, 495–542.
- [89] Jensen, R.G., 1999. *Lipids*, (34):1243–1271.

- [90] Innis, S. M., 2013. *Current Nutrition Reports*, (2):151–158.
- [91] Innis, S.M. 2004. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (554):27–43.
- [92] Rudolph, M.C., McManaman, J.L., Phang, T., Russell, T., Kominsky, D.J., Stein, T., Anderson, S.M., 2007. Neville M. *Physiological Genomics*, (8):323–336.
- [93] Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S., 2000. *Annual Review of Nutrition*, (20):699–722.
- [94] Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C., Coppa, G.V., 2011. *Pediatrics*, (128):E1520–E1531.
- [95] NHANES. <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>
- [96] Pichon, V., 2000. *Journal of Chromatography A*. (885):195-215.
- [97] Hennion, M.C., 1999. *Journal of Chromatography A* (856):3-54.
- [98] Rodríguez-Gómez, R., Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Camino-Sánchez, F.J., Ballesteros, O., Navalón, A., 2014. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (992):47-55
- [99] Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Camino-Sánchez, F.J., Ballesteros, O., Navalón, A., 2014. *Journal of Chromatography A*, (1349): 69-79.
- [100] Rodríguez-Gómez, R. , Jiménez-Díaz, I. , Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navalón, A., 2014. *Talanta* (130):561-70.
- [101] Camino-Sánchez, F.J., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Santos-Fandila, A., Vílchez, J.L., 2014. *Talanta*, (130):388-399.
- [102] Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, L., Navalón, A., 2014. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (15):3773-85.

ANEXOS

ANEXO I



HOJA INFORMATIVA PARA LA VOLUNTARIA

Título del proyecto: *Cuantificación de compuestos persistentes y no persistentes en leche materna del Banco de Leche Humana de Hospital Virgen de las Nieves de Granada y estimación de factores productores de la exposición*

Objetivo: Identificar compuestos persistentes y no persistentes en Leche Humana,

Metodología:

Se recogerán muestras mensuales de leche de las voluntarias, extraídas con sacaleches eléctrico o de forma manual. La voluntaria extraerá la leche en su domicilio en botes proporcionados al efecto, tras la extracción serán congelados y trasladados al Hospital Materno Infantil en un plazo no superior a 15 días. Se realizará análisis mensual de la leche entregada por la voluntaria. Se realizará encuesta con datos personales y hábitos de vida.

Beneficios esperados: Conocer el perfil de compuestos organoclorados y parabenos de la leche materna y posibles influencias por variables epidemiológicas y hábitos de vida. Conocer potenciales cambios en este contenido a lo largo de la etapa de lactancia.

Incomodidades y riesgos derivados del estudio: al proceder a la extracción de las muestras la voluntaria podrían manifestar síntomas dolor o malestar local etc... en zona mamaria. No se espera ningún otro riesgo o incomodidad.

Posibles acontecimientos adversos: no se esperan.

Carácter voluntario de su participación: la participación es **voluntaria** así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación participante-investigador. Las muestras de leche obtenidas solo se utilizarán para los fines específicos de este estudio.

Personas que tendrán acceso a los datos: los datos serán tratados según establece la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Los investigadores de este estudio garantizan la confidencialidad de los datos. Cada voluntario contará con una clave de identificación y sólo tendrán acceso a sus datos los responsables del mismo: Dra. Luz Iribarne, Dr. Francisco Artacho, Dra. Manuela Peña Caballero, Dr. Hurtado Suazo Dra. Laura Serrano, Dra. Inmaculada Jiménez Díaz, Dra. Estefanía Martín Álvarez, Dr. Nicolás Olea, Dr. JP Arrebola. Todos mantendrán una confidencialidad absoluta.

Modo de compensación: Los resultados del análisis de la leche de estudio, si se consideran relevantes para la salud de la voluntaria o de su hijo se comunicaran y se facilitarían los medios necesarios para su solución. **Cualquier aspecto que establezca dudas y preguntas para el participante, podrá consultarse antes, durante y después del estudio a los organizadores del mismo (teléfonos 958 020083; 670 94 18 57).**

ANEXO II

ANEXO II

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

1.3. Información relacionada con las muestras

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado 2.3.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

1.8. Otras consideraciones

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

v.02

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (este último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: nuhsa:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas de al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso

Asimismo, consiento el tratamiento de los datos clínicos asociados a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

Codificada (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo establecer restricciones respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:

Autorizo recibir información sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Se que puedo revocar, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

5
Ejemplar para el Paciente



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (este último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: NUHSA:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el **Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas de al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido

- Tomadas mediante el procedimiento expreso

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

Codificada (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información).

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

ANEXO III

¿Cómo se realiza la extracción?

La extracción de leche puede realizarse en la Unidad Neonatal o en su domicilio.

Si se realiza en el domicilio, el personal del Banco de Leche le facilitará un sacaleches, y todo el material necesario para la extracción. Además, le asesorará y le proporcionará instrucciones sobre la correcta extracción, conservación y transporte de la leche para asegurar su calidad.

Usted debe tener en su casa de un congelador de -20° C para almacenar la leche hasta traerla al hospital.

El transporte de leche congelada de su domicilio al hospital, será semanalmente o cada 15 días, y para ello se le facilitará una nevera.

Todo el personal de la Unidad de Neonatología queda a su disposición para ayudarla y asesorarla en la extracción de leche.

En este hospital ayudamos a las madres que quieren dar el pecho a sus hijos.

El Banco de Leche Humana recoge la leche donada por otras madres y la procesa, almacena y distribuye entre niños enfermos, cuyas madres no pueden proporcionarla.



En nombre de todos los niños enfermos, de sus padres y en el nuestro propio, gracias por su interés y colaboración.

El Banco de Leche se encuentra en el Servicio de Neonatología del Hospital Materno-Infantil (5ª Planta).

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

BANCO DE LECHE HUMANA



Unidad de Neonatología
Servicio de Farmacia
www.hvn.es/bancodeleche

Tel. de contacto:

670941857

958020083

Dirección de correo electrónico/email:
bancodeleche.hvn.sspa@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Avda. Fuerzas Armadas s/n.
18012 Granada

Horario: De lunes a viernes de 8:00 a 15:00 horas

Banco de leche humana

Es un organismo dedicado a la recepción de leche humana, donada por madres de forma altruista y voluntaria.

Después de su procesamiento, bajo estrictos controles de seguridad, es dispensada entre los niños que se pueden beneficiar de ella.

¿Qué niños se benefician de la leche materna donada?

La mejor leche para un bebé es la de su propia madre (OMS).

Cuando no se disponga de ella, la leche humana donada es la mejor opción, sobre todo si está enfermo o es prematuro.

La leche donada se asimila mejor que la fórmula artificial, protege al bebé de infecciones y mejora sus posibilidades de recuperación, supervivencia y desarrollo (OMS / UNICEF).

¿Quiere ser donante de leche?

Para ser donante debe estar sana y tener un estilo de vida saludable.

No podrá donar leche si:

- Tiene infecciones como VIH (virus del SIDA), hepatitis o sífilis.
- Toma medicamentos o hierbas que pueden perjudicar a otro niño que no sea el suyo.
- Consume drogas, alcohol, tabaco, cafeína u otros tóxicos, en exceso. El consumo frecuente de alcohol (más de 2 unidades al día) o de bebidas con cafeína (más de 3 al día) no permite donar leche. El consumo ocasional de pequeñas cantidades no es peligroso, sobre todo si la extracción de la leche se hace pasada unas horas.

¿Cómo se dona leche?

Una vez instaurada la lactancia en su hijo, se recomienda que se extraiga al menos una vez al día leche para la donación. En ocasiones, las donantes se extraen leche de un pecho mientras están amamantando del otro a su hijo.

Debe saber sobre la donación

- Su hijo no se quedará sin leche aunque la esté donando. Al contrario su producción aumentará. Si le preocupa que su niño pueda quedarse sin leche, puede extraerla después de que él mame.
- Cualquier cantidad de leche extraída será de gran valor para los niños que la necesiten. La extracción regular y rutinaria aumentará su producción de leche.
- Los datos correspondientes a ambos son debidamente salvaguardados, siguiendo la normativa española de protección de datos de carácter personal.

La leche donada es analizada, pasteurizada y congelada para garantizar su calidad y seguridad, siguiendo guías internacionales.

Otros puntos de Atención a Donantes y Recepción de Leche Donada:

Hospital Materno Infantil Málaga.
Telf.: 951292417/671594231
Avda. Arroyo de los Ángeles s/n.
29011 Málaga

Hospital Comarcal Santa Ana Motril.
Telf.: 958038336/600149282
Avda. Enrique Martín Cuevas, s/n.
18600 Motril

Hospital Materno Infantil Jaén.
Telf.: 953008769.
Avda. de Ejército Español, 10.
23007 Jaén

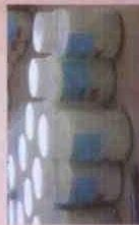
Hospital Torrecárdenas, Almería.
Telf.: 950016426/950016304
Avda. Donantes de Sangre s/n.
04009 Almería

Lave la campana extractora con agua y jabón, tras cada uso, para evitar adherencias. Puede usar lavavajillas o agua y jabón. Enjuague bien después. Una vez al día esterilice todo el material de extracción con el medio que usted use habitualmente.

Sacuda bien el material y deje secar sobre paño limpio. Guarde el material hasta la próxima utilización, en lugar cerrado, limpio y seco.

CONSERVACION

Utilice los envases entregados para tal efecto, si necesita mas no dude en pedirlos.



No llene completamente los envases. Tras la recogida rellene y pegue las etiquetas facilitadas, siguiendo las instrucciones recibidas ponga la fecha y congele lo antes posible.

Lo ideal es guardarlos en el congelador después de una sola extracción aunque no estén llenos

La congelación se hará a -20°C en un cajón de su congelador, separada del resto de alimentos, para evitar contaminaciones.

TRANSPORTE



La leche congelada se transportará al Banco en un plazo máximo de 15 días.

- Se entregará en la U. Neonatal. El personal sanitario de la misma se hará cargo de su leche y le facilitará el material que precise reponer.
 - Transporte la leche en la nevera que le hemos entregado, que debe estar limpia y no haber sido utilizada para transportar otros alimentos.
 - Coloque la leche entre los recipientes de hielo que le hemos facilitado para que llegue al Banco de Leche en adecuadas condiciones.
- Todo el personal adscrito al Banco de Leche del Hospital Virgen de las Nieves queda a su disposición. No dude en solicitar ayuda o información.

CONSEJOS PARA LA EXTRACCION, TRANSPORTE Y CONSERVACION DE LA LECHE



BANCO DE LECHE HUMANA

www.hvn.es/bancodeleche

Telf. de contacto:

670941857

958020083 / 958020344

Dirección de correo electrónico/email:

bancodeleche.hvn.sspa@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Avda. Fuerzas Armadas s/n.
18012 Granada

Horario: De lunes a viernes de 8:00 a 15:00 horas

El material para la extracción, conservación y transporte de la leche que usted va a donar se le facilitará en el Banco de Leche en la U. Neonatal

Rogamos lea detenidamente y ponga en práctica, las siguientes instrucciones, para que la leche llegue al Banco en perfectas condiciones para su uso.

HIGIENE PERSONAL

Es suficiente la higiene personal diaria, no hay que lavarse el pecho especialmente para la extracción ya que se agreda el manto natural protector que recubre la piel.

Lávese muy bien las manos antes de iniciar el proceso de extracción de la leche.

No toque el cabello, ni otros objetos una vez lavadas las manos durante todo el proceso de extracción.

Use mascarilla en caso de infección respiratoria.

EXTRACCION

Para favorecer la extracción de la leche es recomendable estar en un ambiente relajado y tranquilo, dar unos masajes previos que favorecen la salida o eyección de la leche, se debe aplicar tanto en la extracción manual como con extractor de leche.

Masaje suave oprimiendo el pecho hacia la caja torácica, con un movimiento circular de los dedos en el mismo punto sin deslizarlos sobre la piel.

Frotar desde la parte superior hacia el pezón (cosquileo) desde la periferia hacia el pezón.

Inclinarse hacia delante y balancear los pechos

TECNICA DE MAMBIET

Extracción manual
Empujar los dedos hacia atrás (hacia las costillas), sin separarlos.

Rodar los dedos y el pulgar hacia el pezón, sin deslizar para vaciar otras partes del pecho.

Utilizar ambas manos en cada pecho



Extracción con sacaleches eléctrico



1. Conectar las partes del extractor.
2. Para comenzar, poner el control de aspiración en el nivel más bajo.
3. Colocar el embudo del extractor en el pecho, asegúrese que selle bien.
4. Encender el extractor. Primero hará como un masaje
5. Subir progresivamente el nivel de aspiración.
6. Utilizar el extractor en cada pecho por un espacio de 10 ó 15 minutos.

LIMPIEZA DEL MATERIAL

Procure tener el material, utilizado para la extracción de la leche en perfectas condiciones de limpieza y debidamente guardado mientras no se utilice, para evitar contaminaciónes. Siga las siguientes indicaciones:

Hospital Materno Infantil Málaga.
Telf.: 951292417/671594231
Avda. Arroyo de los Ángeles s/n.
29011 Málaga

Otros puntos de Atención a donantes y Recepción de Leche Donada:

Hospital Comarcal Santa Ana Morril.
Telf.: 958038336/ 600 14 92 82
Avda. Enrique Martín Cuevas, s/n.
18600 Morril

**INFORMACIÓN SOBRE: TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN,
CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA LECHE DONADA.**

El material para la extracción, conservación y transporte, de la leche que usted va a donar, se le facilitará en la Unidad Neonatal.

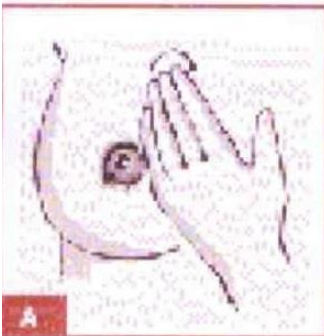
Rogamos lea detenidamente y ponga en práctica, las siguientes instrucciones, para que la leche llegue al Banco en perfectas condiciones para su uso.

EXTRACCIÓN.

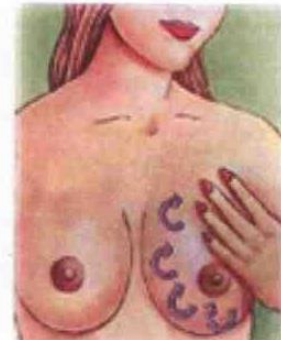
Para favorecer la extracción de la leche se recomienda estar en un ambiente relajado y tranquilo, tener cerca a su bebé o algún objeto que le recuerde a él, utilice música, desconecte el móvil...

Es muy importante preparar el pecho para facilitar la extracción, provocando el reflejo

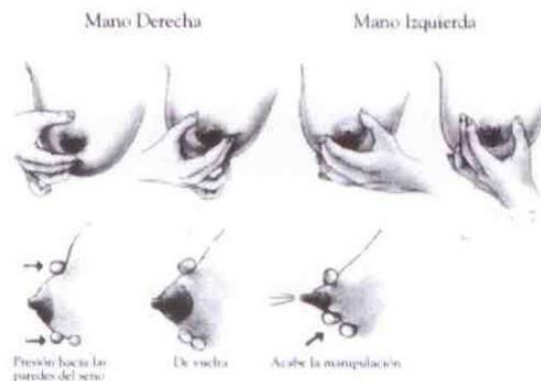
de bajada o eyección láctea. Para ello se pueden seguir tres pasos



Masajear.- Oprimir firmemente el pecho hacia la caja torácica, usando un movimiento circular con los dedos en un mismo punto, sin deslizar, éstos sobre la piel. Seguidamente cambiar hacia otra **zona del pecho.**



Frotar.- el pecho cuidadosamente desde la parte superior hacia el pezón, en forma de cosquilleo.



Sacudir.- ambos pechos suavemente inclinándose hacia delante.

El proceso de extracción ha de ser limpio, para evitar la contaminación de la leche.

Por favor, tenga en cuenta estos consejos:

- Lavado exhaustivo de manos y uñas antes de cada extracción.
- No es necesario el lavado del pecho antes del proceso, con la ducha diaria es suficiente.
- No tocarse el cabello, ni otros objetos una vez lavadas las manos.
- Usar mascarilla en caso de infección respiratoria.

Para poder extraerse la leche le facilitaremos, si no dispone de ello, un sacaleches eléctrico que simula lo que hace el bebé, cuando toma el pecho, succionando el pezón y parte de la areola. Las instrucciones de uso son las siguientes:

1. Conectar las partes del extractor .
2. Para comenzar, poner el control de aspiración en el nivel más bajo.
3. Colocar el embudo del extractor en el pecho, asegurándose que selle bien.
4. Encender el extractor. Primero hará como un masaje. Subir progresivamente el nivel de aspiración.
5. Utilizar el extractor en cada pecho por un espacio de 10 ó15 minutos.
6. Puede extraerse leche en la U. Neonatal o en su domicilio.

Si la extracción se realiza en la U. Neonatal, se entregará la leche recién extraída y debidamente etiquetada al personal del servicio.

Si la extracción se realiza en su domicilio, deberá utilizar los envases que se les administra para ese fin, etiquetarlos y tras poner la fecha, congelarlos (ver apartado de CONSERVACIÓN) y entregarlos en la U. Neonatal en un plazo máximo de 15 días.

LIMPIEZA DEL MATERIAL

Procure tener el material, utilizado para la extracción de la leche (campana extractora, gomas...), en perfectas condiciones de limpieza y debidamente guardado mientras no se utilice, para evitar contaminaciones. Para ello siga las siguientes indicaciones:

- Lavar la campana extractora y gomas inmediatamente después de su uso, se evitará adherencias. Para ello se puede usar el lavavajillas o agua y jabón. Enjuagar bien después.
- Secado minucioso del material. Sacudir bien y dejar secar sobre paño limpio.
- Guardar el material hasta la próxima utilización, en sitio limpio y seco.

CONSERVACIÓN.

Para la conservación de la leche se utilizarán los envases, entregados para tal efecto, si necesita más no dude en pedirlos.

Los envases con leche, deben estar debidamente etiquetados y puesta la fecha tras llenarlos.

A) Si la leche se extrae en la U. Neonatal, una vez extraída, etiquetarla, poner la fecha y entregarla inmediatamente al personal del servicio.

B) Si la extracción se ha realizado en el domicilio:

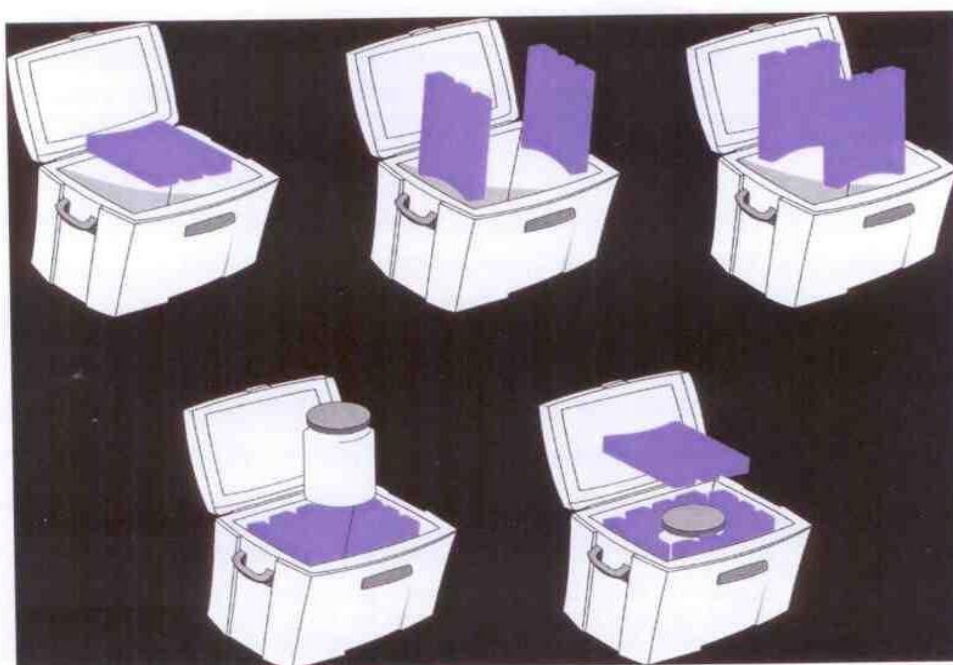
Se recogerá la leche en los recipientes administrados, debidamente etiquetados. La cantidad por cada envase deberá ser de 120 CC. Tras la recogida poner la fecha y congelar lo antes posible (de no ser posible la congelación inmediata de la leche, ésta se podrá guardar en el frigorífico, por un periodo no superior a 24 horas). Si no se extrae la cantidad, necesaria para llenar el envase, de una vez, puede guardar la leche en frío, debidamente tapada y terminar de completar con las siguientes extracciones. El tiempo para llenar el envase, no debe superar las 24 horas, seguidamente tras poner la fecha, se congelará.

La congelación se realizará a -20° C. En un cajón destinado para tal fin. Separado del resto de alimentos, para evitar contaminaciones.

TRANSPORTE

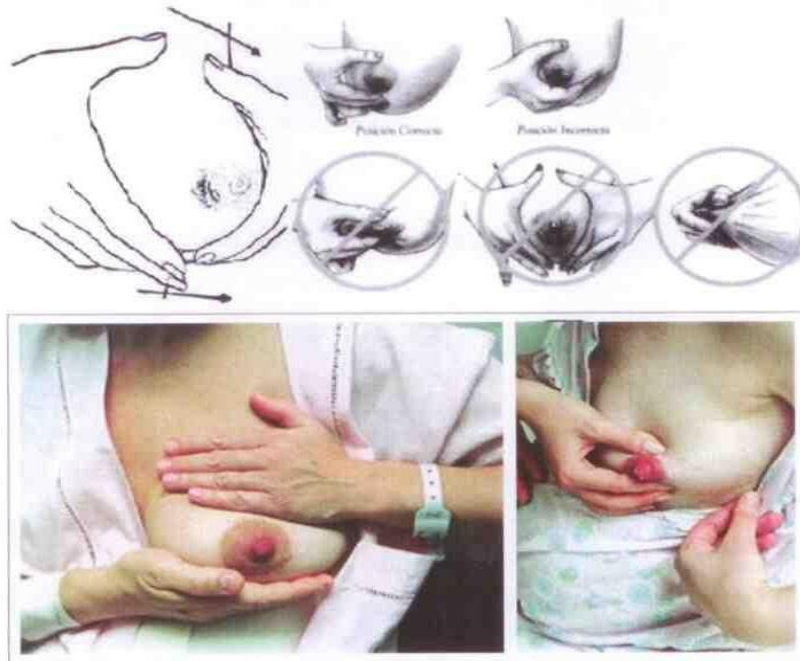
- La leche correctamente congelada se transportará al hospital en un plazo máximo de 15 días.

- Se entregará en la U. Neonatal. A ser posible en turno de mañana.. A su llegada dirijase al personal sanitario que se hará cargo de su leche. Solicítele el material que precise.
- Se transportará la leche en la nevera que le hemos entregado. Que debe estar limpia y no haber sido utilizada para transportar otra cosa.
- Utilizar el dibujo adjunto, para colocar correctamente la leche entre los recipientes de hielo y que llegue al Banco de Leche en adecuadas condiciones. Evitando que se rompa la cadena de frío y que la leche no sea apta.



En nombre de los padres de todos los niños que se beneficiarán de su donación y de todo el personal sanitario, le agradecemos su colaboración y generosidad.

Todo el personal adscrito al Banco de Leche del Hospital Virgen de las Nieves queda a su disposición. No dude en solicitar ayuda o información.



ANEXO IV. CUESTIONARIOS

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. N° 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?

1. Agua del grifo
2. Agua mineral

26. ¿Cuánta agua bebe? _____ vasos/día. (1 vaso=250mL)

27. ¿Con qué frecuencia come pescado y marisco?

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?

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?

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)

1. Nunca
2. Dos veces por semana o menos
3. Más de dos veces por semana
4. Todos los días

DESNATADOS / ENTEROS

31. ¿Qué tipo de leche consume?

1. Entera
2. Semidesnatada
3. Desnatada

32. ¿Cuánta leche toma al día? _____ vasos/día

33. ¿Con qué frecuencia come queso?

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?

1. Fresco
2. Semicurado
3. Curado
4. Indistintamente

<p>35. ¿Con qué frecuencia consume embutidos y fiambres?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Dos veces por semana o menos3. Más de dos veces por semana4. Todos los días
<p>36. ¿Qué consume con mayor frecuencia?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Embutido2. Fiambre
<p>37. ¿Con qué frecuencia come carne?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Menos de una vez por semana3. Una vez por semana4. Dos veces por semana5. Más de dos veces por semana
<p>38. ¿Qué tipo de carne consume más frecuentemente?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Pollo2. Cerdo3. Vacuno4. Ovino5. Indistintamente6. Otros
<p>39. ¿Con qué frecuencia come carne roja (ternera, cerdo, cordero...)?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Menos de una vez por semana3. Una vez por semana4. Dos veces por semana5. Más de dos veces por semana
<p>40. ¿Con qué grasa cocina habitualmente?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Aceite de oliva2. Otros aceites vegetales3. Grasa animal4. Indistintamente
<p>41. ¿Consume mantequilla y/o margarina?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Mantequilla3. Margarina4. Indistintamente
<p>42. ¿Con qué frecuencia consume mantequilla y/o margarina?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Una vez por semana3. Tres-cuatro veces por semana4. Una vez al día5. 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
51. ¿Con qué frecuencia consume pastas? (macarrones, espaguetis,...) 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
52. ¿Con qué frecuencia consume cereales? 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
53. ¿Consume comida enlatada? 1. No 2. Sí
54. En caso de respuesta afirmativa, ¿Cuántas latas de conserva consumen a la semana? _____ latas/semana
55. ¿Ha variado su dieta considerablemente en los últimos doce meses? 1. No 2. Sí
56. En caso afirmativo, indicar en qué medida y cuándo se produjo dicha variación:
57. ¿Come comida ecológica? 1. No 2. Sí
58. En caso afirmativo ¿Qué proporción de su dieta proviene de alimentos ecológicos?
59. ¿Con qué frecuencia come comidas fritas? 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
60. ¿Cuáles son los alimentos fritos que más consume?
<i>SUPLEMENTOS Y OTROS HÁBITOS DIETÉTICOS</i>
61. ¿Ha tomado usted suplementos nutricionales? 1. No (Fin Cuestionario) 2. Sí

<p>62. Preparados de calcio (Una unidad...)</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Menos de una vez por semana3. 1 vez por semana4. 2-4 veces por semana5. 5-6 veces por semana6. A diario
<p>63. Suplementos ricos en fibra (Una unidad...)</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Menos de una vez por semana3. 1 vez por semana4. 2-4 veces por semana5. 5-6 veces por semana6. A diario
<p>64. Multivitaminas (Una unidad...)</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Menos de una vez por semana3. 1 vez por semana4. 2-4 veces por semana5. 5-6 veces por semana6. A diario
<p>65. Otros suplementos (Ácido fólico, yodo...) (Una unidad...)</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nunca2. Menos de una vez por semana3. 1 vez por semana4. 2-4 veces por semana5. 5-6 veces por semana6. A diario

CUESTIONARIO SOBRE

USO DE PRODUCTOS DE HIGIENE PERSONAL


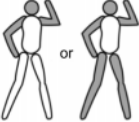

Y

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 Pintañas							

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 V.

Compuesto	Ionización	Transiciones MRM	DP	EP	CE	CXP
BP-1	+	215.2 → 137.2	+50	+10	+26	+10
		215.2 → 105.1	+50	+10	+26	+8
BP-2	+	247.1 → 137.4	+52	+7	+25	+6
		247.1 → 109.3	+52	+7	+45	+5
BP-3	+	229.3 → 151.1	+50	+10	+26	+5
		229.3 → 105.0	+50	+10	+27	+10
BP-6	+	275.3 → 151.0	+55	+10	+24	+6
		275.3 → 95.0	+55	+10	+35	+10
BP-8	+	245.0 → 121.0	+55	+10	+23	+10
		245.0 → 151.1	+55	+10	+25	+7
4-OH-BP	+	199.1 → 105.1	+46	+5	+25	+7
		199.1 → 121.1	+46	+5	+25	+10
BP-D₁₀	+	193.3 → 110.2	+46	+10	+24	+6
		193.3 → 152.1	+46	+10	+12	+10

Compuesto	Ionización	Transiciones MRM	DP	EP	CE	CXP
BPA	-	227.1 → 212.0	-80	- 10	-26	-5
		227 → 133.0	-80	- 10	-36	-10
BPS	-	249.0 → 108.0	-85	- 10	-36	-6
		249.0 → 156.0	-85	- 10	-30	-10
BPF	-	199.0 → 92.9	-80	- 10	-30	-5
		199.0 → 105.1	-80	- 10	-30	-5
BPA-D₁₆	-	241.1 → 223.1	-80	- 10	-28	-5
		241.1 → 142.1	-80	- 10	-36	-10
MP	-	150.9 → 136.0	-64	- 10	-20	-5
		150.9 → 107.9	-64	- 10	-30	-5
EP	-	164.9 → 136.0	-62	- 10	-20	-6
		164.9 → 107.9	-62	- 10	-30	-5
PP	-	179.1 → 136.1	-68	- 10	-20	-5
		179.1 → 107.9	-68	- 10	-30	-5
BP	-	193.1 → 136.1	-75	- 10	-20	-5
		193.1 → 107.9	-75	- 10	-30	-5
EP-¹³C₆	-	171.1 → 142.0	-65	- 10	-21	-5
		171.1 → 114.0	-65	- 10	-35	-5

t min	FLUJO μl/min	A	B
0	425	70	30
1	425	70	30
10	425	32	68
11	425	32	68
11,1	425	70	30
12,5	425	70	30

A - 90 AGUA: 10 ACN
0.1% ÁCIDO FÓRMICO

B - 10 AGUA : 90 ACN
0.1 % ÁCIDO FÓRMICO