



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE CIENCIA, INNOVACIÓN  
Y UNIVERSIDADES



Instituto de Salud Carlos III

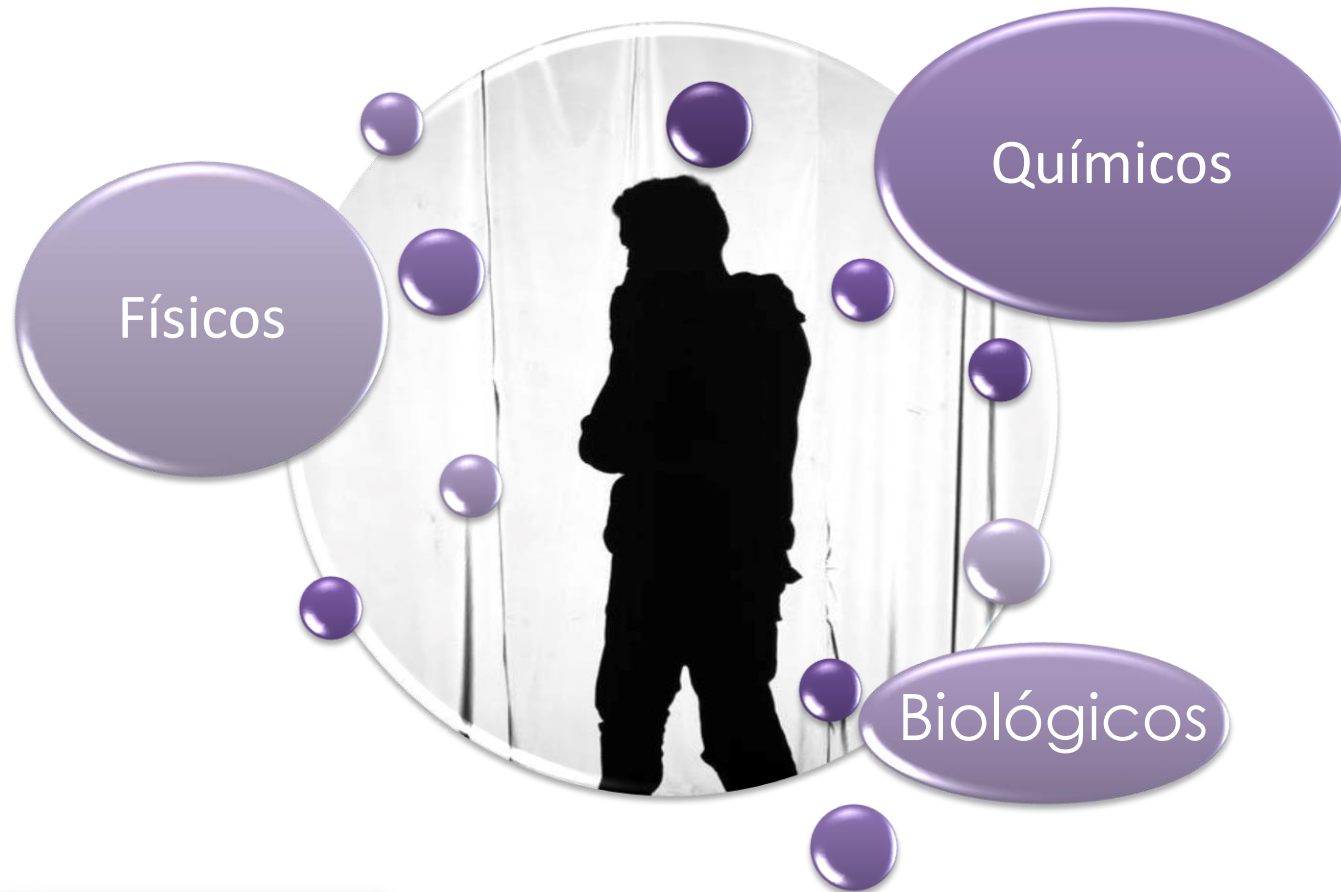
# TENDENCIAS Y RETOS DE LA METROLOGÍA EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN HUMANA A SUSTANCIAS QUÍMICAS

Juan José Ramos, Cristina Grande, Susana Pedraza-Díaz, Marta Esteban, Argelia Castaño, Ana Isabel Cañas

Toxicología Ambiental, Centro Nacional de Sanidad Ambiental, ISCIII



## SANIDAD AMBIENTAL



- ❖ Cada año mueren 12,6 millones de personas a causa de la contaminación ambiental, 1,7 millones de defunciones infantiles, según la OMS

## LOS CONTAMINANTES QUÍMICOS

- ❖ Cada año 1,6 millones de muertes evitables mediante la gestión racional de productos químicos y desechos (*Convenio de Rotterdam*)
- ❖ Asociados a enfermedades de gran impacto en la sociedad...



**Obesidad**

**Cáncer**

**Infertilidad**

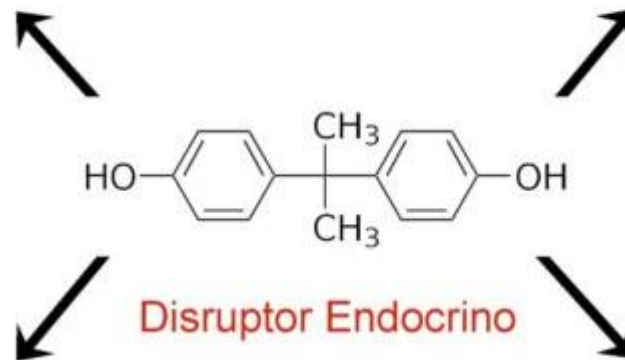
**Diabetes**

**Neurodegenerativas**



Actúan como hormonas

Alteran la producción y secreción de hormonas



Interfieren en la función de las hormonas

Interfieren en la eliminación de las hormonas

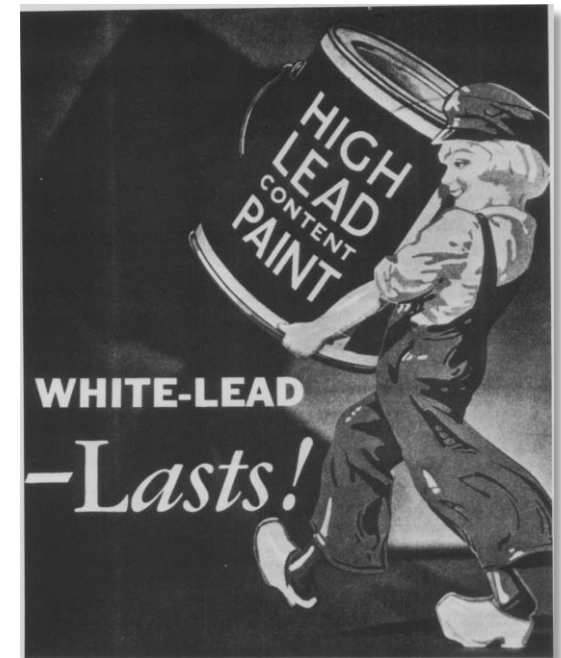
## EL INICIO...

Primer análisis de muestras humanas, plomo en sangre trabajadores (1933)

*Kehoe, R.A., y col. 1933. J. Ind. Hyg. 15, 306–319.*



Industria metalúrgica Estado Unidos (1934)



Oil, Paint and Drug Reporter magazine, December 6, 1937.

## DESPUÉS DE LA SEGUNDA GUERRA MUNDIAL...

### EEUU



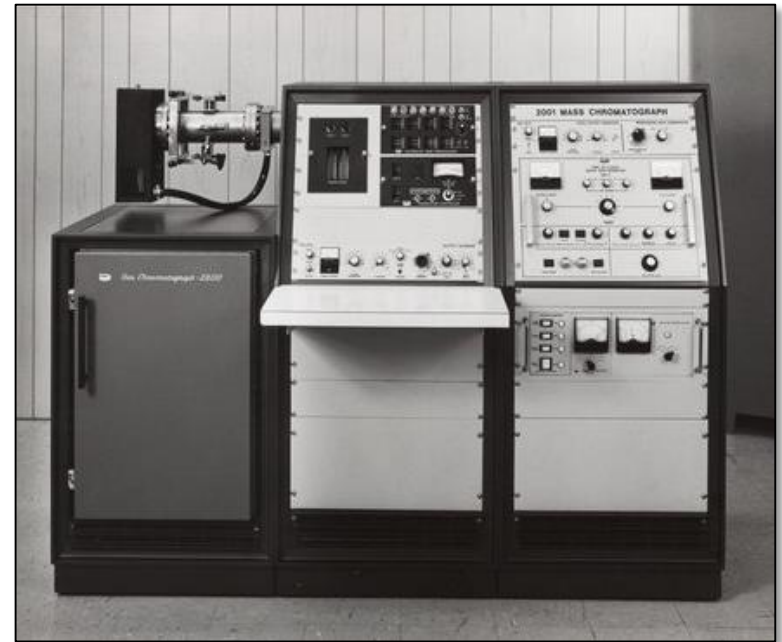
### ESPAÑA



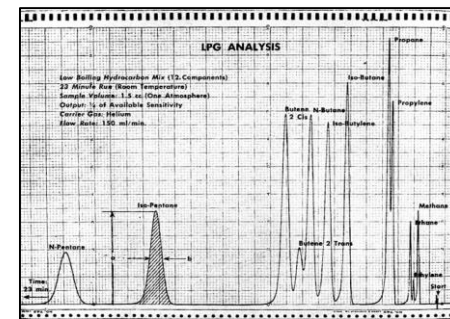
## CROMATOGRAFÍA DE GASES



GC 1958

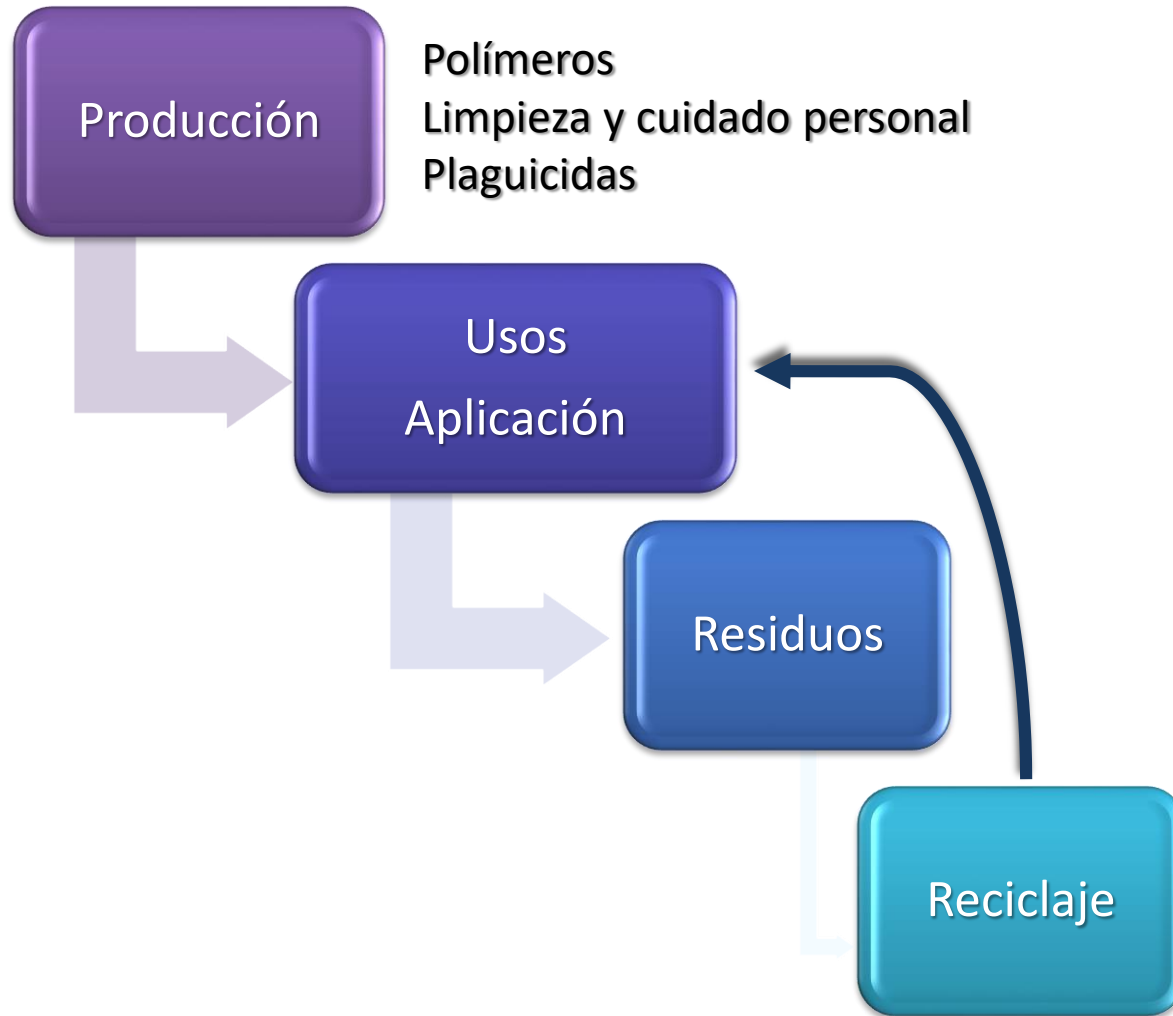


GC/MS 1970





## FUENTES DE EXPOSICIÓN



## VIAS DE EXPOSICIÓN

### CONTACTO

Cosméticos, jabones  
productos de  
consumo... bisfenoles,  
ftalatos

### TRANSFERENCIA

Placenta/leche materna  
PCBs PBDEs, plaguicidas...



### INHALACIÓN

Contaminación/p  
olvo doméstico  
metales pesados,  
hidrocarburos,  
retardantes de  
llama.....

### Alimentos/agua

COPs, plaguicidas, ftalatos,  
metales pesados etc.

EN ESTE CONTEXTO...

RELACIÓN CONCENTRACIÓN-EFECTOS

EXPOSICIÓN A UNA MEZCLA COMPLEJA DE  
CONTAMINANTES AMBIENTALES, MUCHOS DE ELLOS  
EMERGENTES

NECESIDAD DE CONOCER IDENTIFICAR Y CONOCER DE  
FORMA PRECISA LAS SUS CONCENTRACIONES



RETOS Y TENDENCIAS EN METROLOGÍA

## Reto 1. Procedimientos analíticos para la identificación y/o cuantificación de contaminantes ambientales emergentes

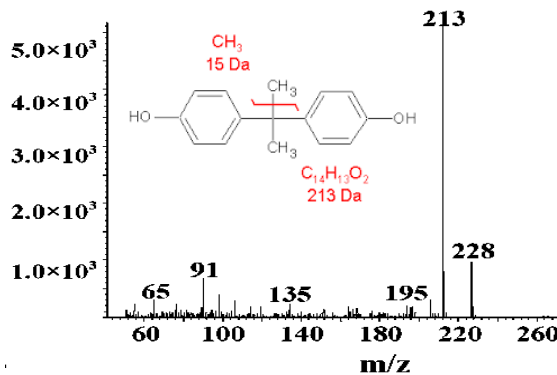
### Tendencias

- a) Si el compuesto es conocido (sabemos estructura, patrones, metabolismo...)

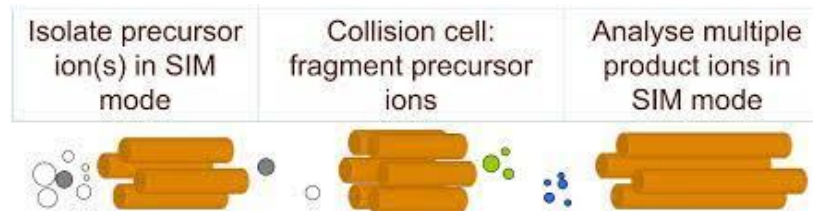


Target  
análisis

Espectro de masas



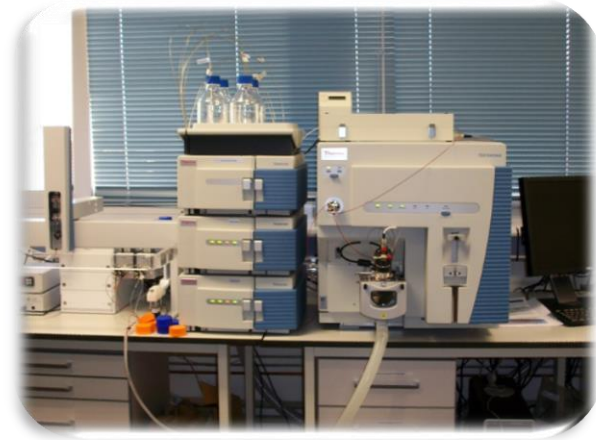
Cromatografía acoplada a espectrometría de masas en modo tándem (ms/ms).



Muy alta selectividad

Baja interferencia matriz/compuestos  $\longrightarrow$  Bajos límites de detección

LC-MS/MS



- ✓ Desarrollo de nuevos métodos analíticos (diferentes características).

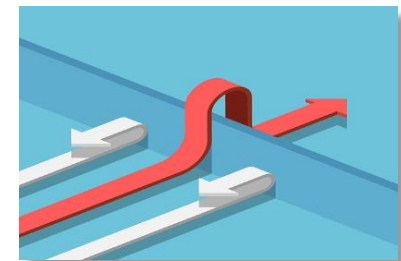
Ej. Desarrollo y validación de un ensayo basado en la LC-MS/MS para la determinación de plastificantes alternativos en orina y suero humanos (doi:10.1016/j.talanta.2019.02.024.)

- ✓ Adaptación de métodos existentes (emergentes pertenecen a una familia ya estudiada, similares estructuralmente, BPs, PFAS...)

Ej. Un método rápido para la determinación de bisfenol A y seis análogos (S, F, Z, P, AF, AP) en muestras de orina mediante LC-MS/MS (doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.098)

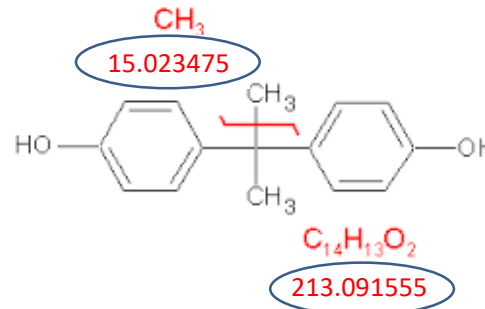
## Limitaciones:

- Una familia de contaminantes o de familias con similares características químicas
- Necesidad de patrones de los compuestos



b) Si el compuesto emergente es desconocido

Espectrometría de masas de alta resolución ("masas exactas") el espectro completo (SCAN)



Non-target screening

Cromatografía acoplada a Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (qTOF)

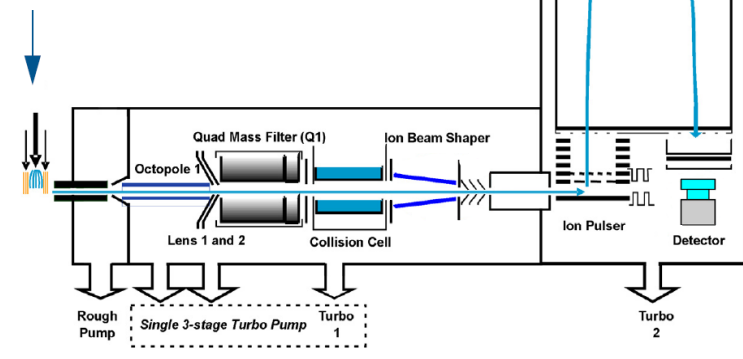


Librería de espectros alta resolución



Identificación

The Agilent 6540 Q-TOF supports the Agilent Jet Stream Technology.



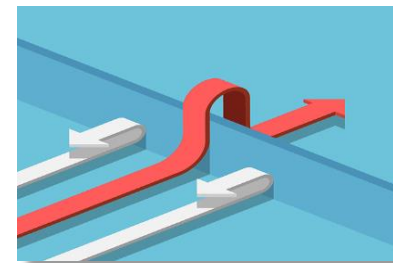
- ✓ Métodos de preparación de muestra genéricos, evitando así cualquier discriminación con etapas de extracción/purificación

Ej: Nuevo método de screening para la caracterización de la exposición química en embarazadas, identificación de 700 compuestos orgánicos, entre los que se encontraban los metabolitos de ftalatos y bisfenoles, mediante LC-QTOF/MS.  
(doi: 10.1289/EHP2920)

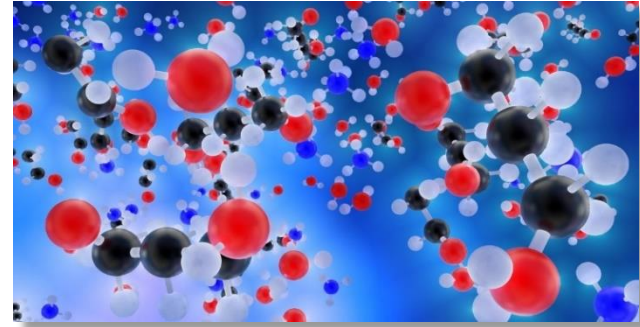
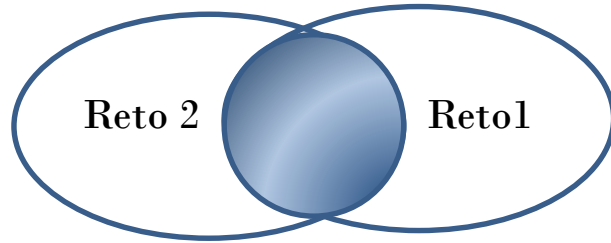
Ej: Metodología basada en el non-target screening para caracterizar la exposición química en humanos. Aplicación a compuestos halogenados en leche materna  
(doi: 10.1016/j.talanta.2020.121979)

## Limitaciones

- Alta complejidad y sofisticación
- Personal altamente cualificado
- Elevado coste
- Evaluación semi-cuantitativa sin patrones pero cuantificación requiere de patrones.



## Reto 2. Exposición a mezcla de contaminantes de forma simultánea



### Tendencias

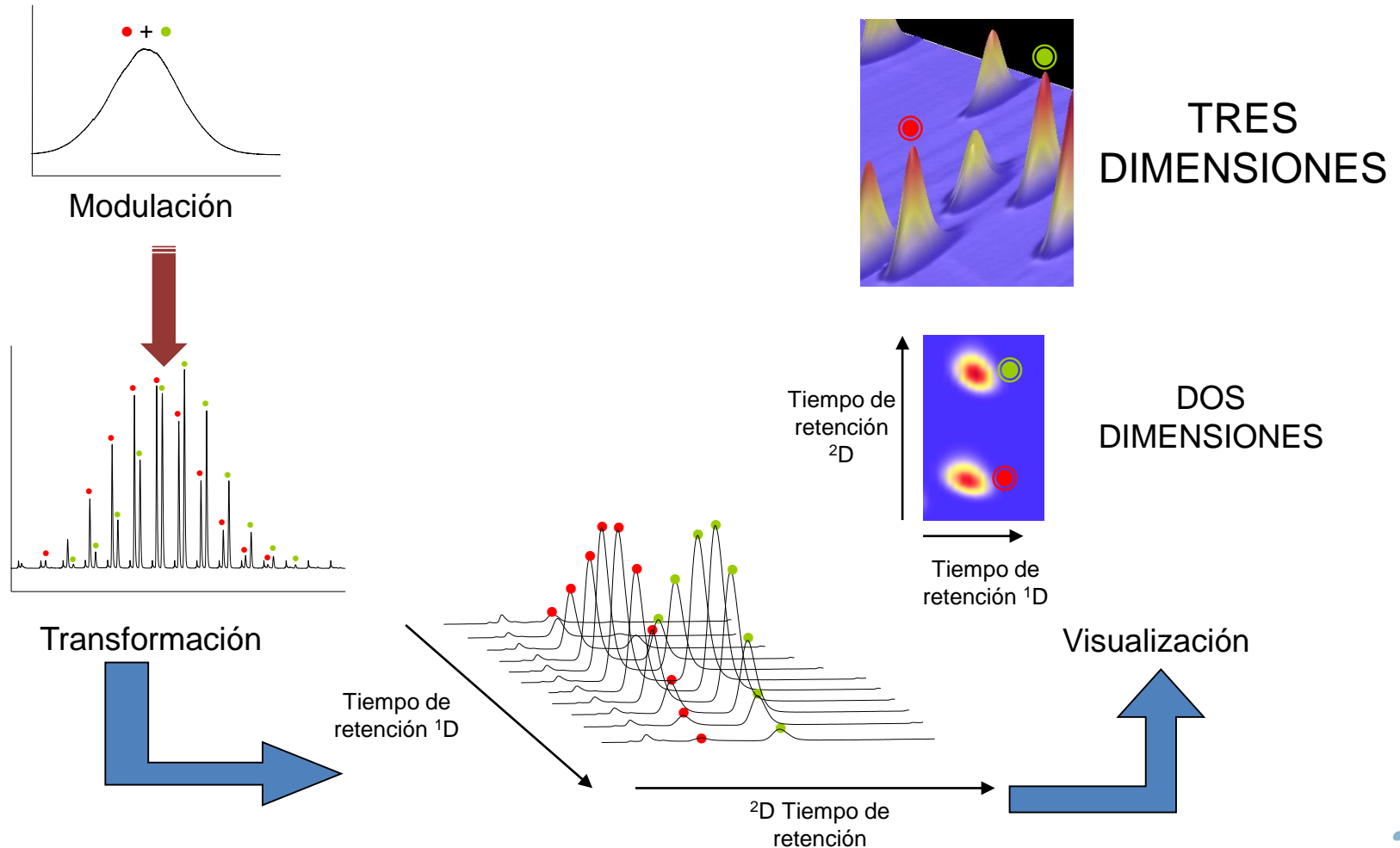
a) Análisis cuantitativo de decenas o centenares de contaminantes en una sola inyección cromatográfica (MS/MS).

- ✓ Métodos de preparación de muestra multiresiduales (baja especificidad), pero extractos lo suficientemente limpios para su análisis mediante MS/MS (*QuEChERS*)

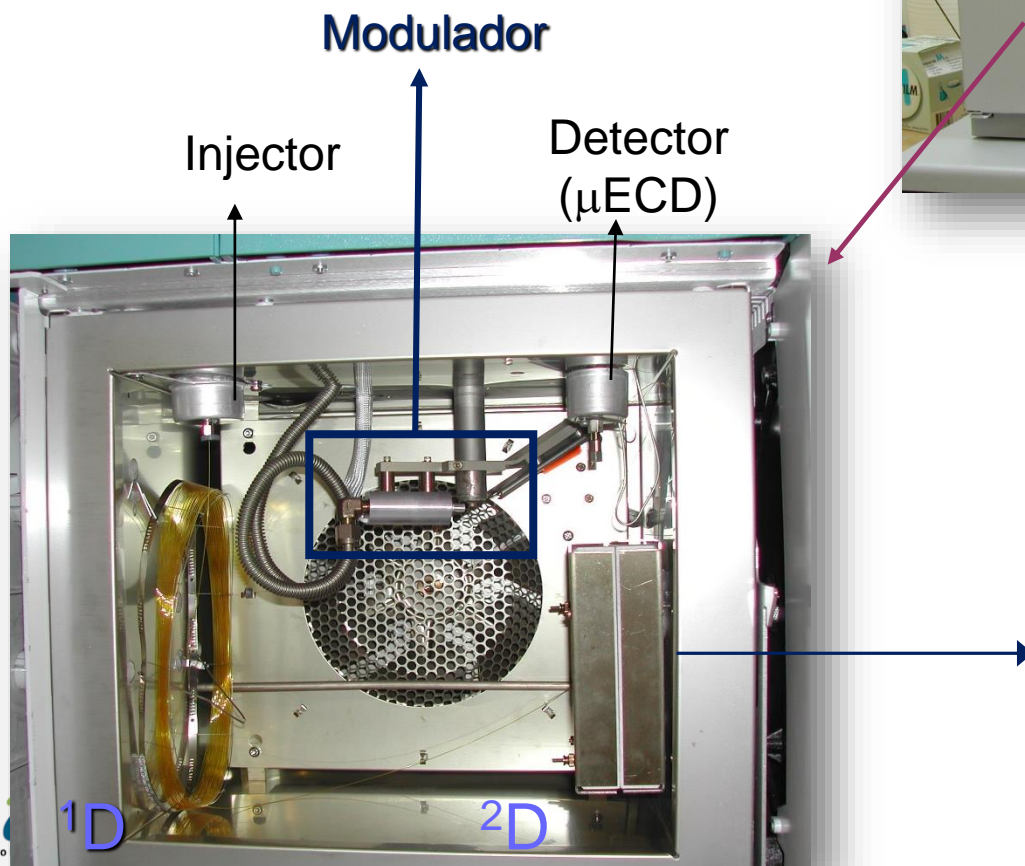
Ej. Cuantificación de 260 plaguicidas en muestras de orina mediante LC-MS/MS  
(doi:10.3390/molecules24071330)

Ej. Cuantificación de 85 contaminantes orgánicos persistentes en suero humano mediante GC-MS/MS (doi:10.1016/j.chroma.2020.461170)

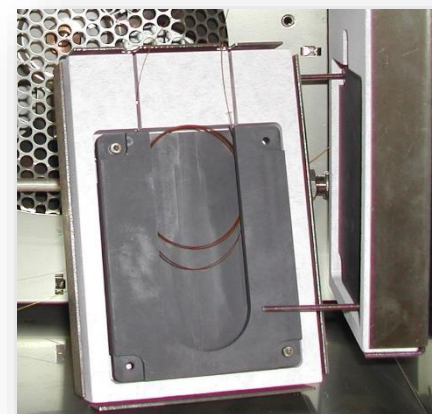
b) Aumentar la capacidad de separación cromatográfica. La cromatografía de gases completa en dos dimensiones (GCXGC) .



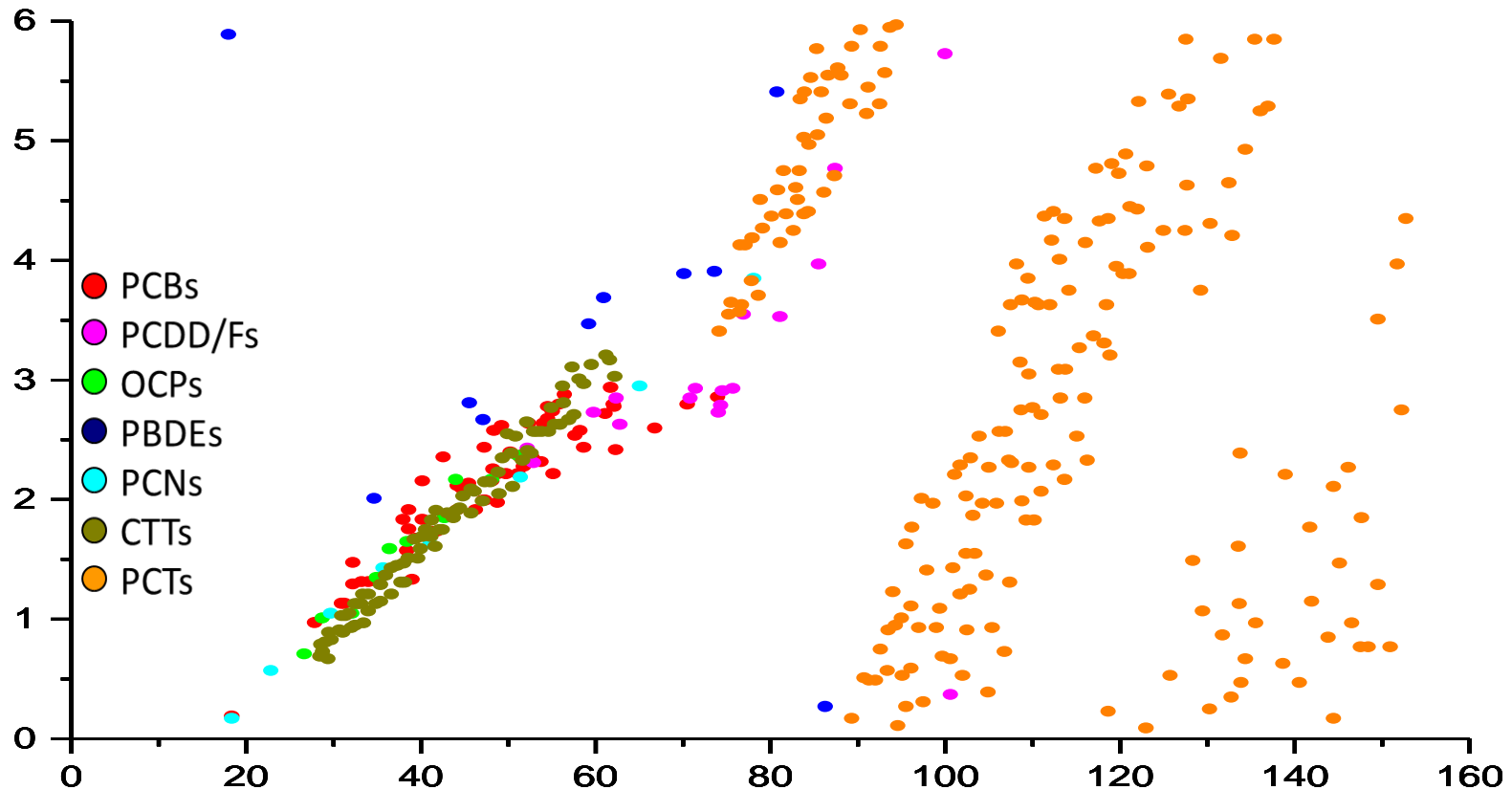
# EQUIPO GC×GC-μECD



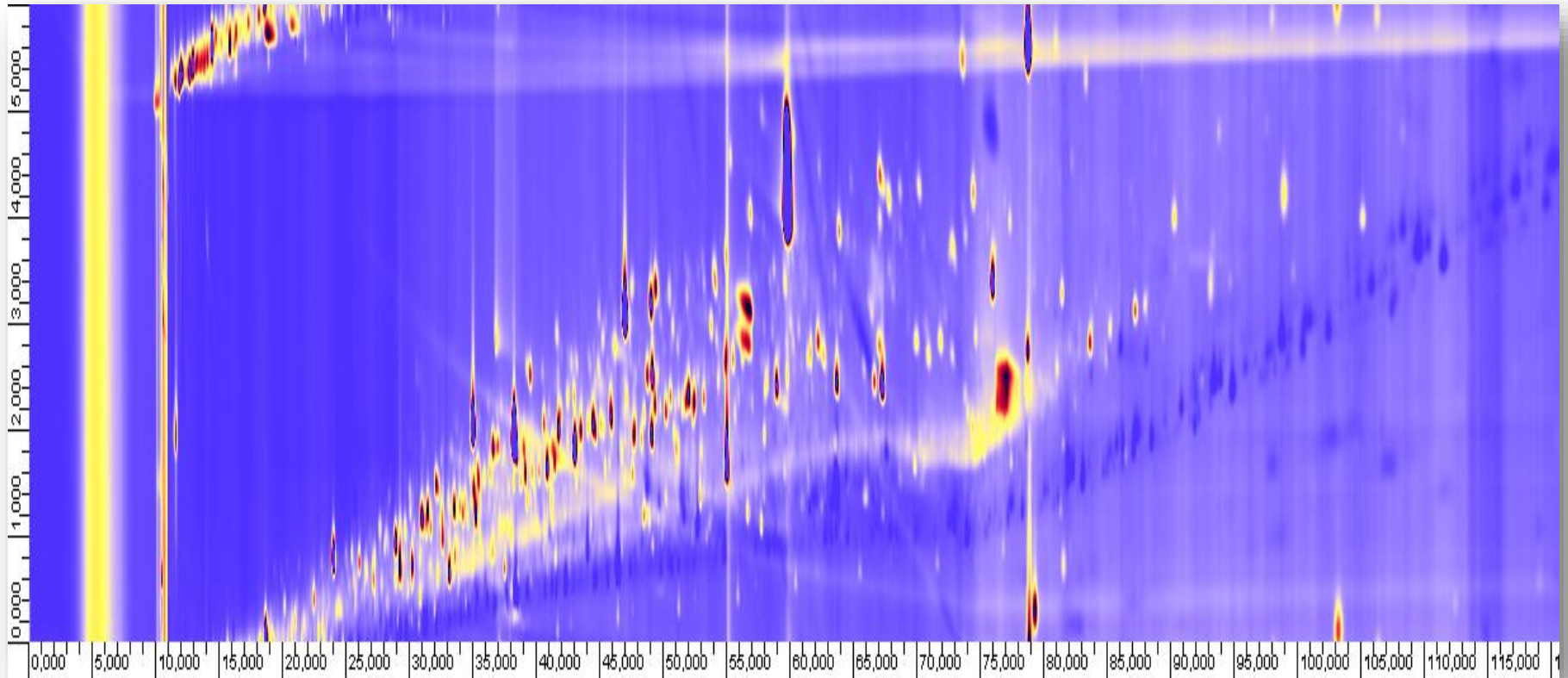
## Horno Secundario



## ELABORACIÓN DE PLANTILLAS HT-8 × BPX-50



## Leche materna



## Reto 3. Limitaciones de las muestras humanas

### Características

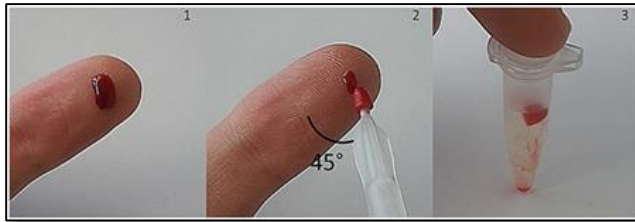
- La matriz debe ser la adecuada para evaluar la exposición del individuo
- Fácilmente accesibles
- Volumen suficiente
- Contaminantes en niveles suficientes para su medida con las técnicas instrumentales disponibles



- ✓ Muestras invasivas (sangre)
- ✓ Población vulnerable (bebés/niños)

## Tendencias

a) Desarrollo de métodos miniaturizados que involucren tamaño de muestra muy pequeños (10-50  $\mu\text{L}$ )



Micro-muestreo de adsorción volumétrica (VAMS)

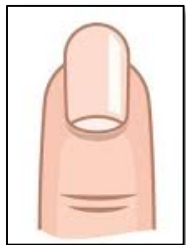


Muestreo de gotas de sangre seca (DBS)



Ej. Determinación cuantitativa de diez clases diferentes de PFAS (43 compuestos) en una gota de sangre, 25  $\mu\text{L}$  de muestra, mediante LC-MS/MS (doi: 10.1016/j.aca.2017.10.038)

b) Empleo nuevas matrices no invasivas.



HAP, PCB y retardantes de llama



PCB, retardantes de llama, metales



HAP, cromo



Bisfenoles

## Reto 4. Programas para el aseguramiento y control de la calidad, muestras humanas.

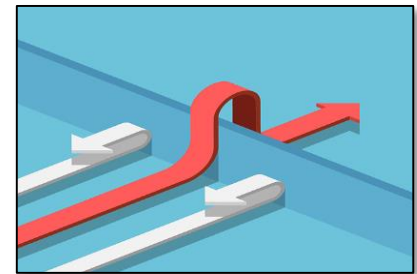
Mayor camino por recorrer para análisis de muestras humanas que medioambiental o alimentos.

- ✓ Nuevos compuestos
- ✓ Nuevas matrices
- ✓ Nuevas técnicas



### Limitaciones

- Materiales de referencia certificados en matriz (sangre, orina, pelo...). Concentración certificada
- Ejercicios de intercomparación-interlaboratorios.
- Patrones de calibración. Patrones internos marcados isotópicamente



## Tendencias

a) Coordinación y sinergias a nivel europeo entre laboratorios de biomonitorización para el desarrollo e implantación de programas de control y aseguramiento de la calidad



- ✓ Intercomparación (contaminantes emergentes y tradicionales)
- ✓ Materiales de referencia
- ✓ Cualificaciones de laboratorios
- ✓ Red europea de laboratorios



- ✓ Evaluación de nuevas matrices (aire exhalado, meconio)
- ✓ Desarrollo y validación de métodos (non-target)
- ✓ Desarrollo y validación de métodos miniaturizados (VAMS, DBS)
- ✓ Contaminantes emergentes y tradicionales

# MUCHAS GRACIAS, POR LA ATENCIÓN

