

ESTUDIOS DE BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE CONTAMINANTES EN MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Joel Sánchez-Piñero, Natalia Novo-Quiza, Jorge Moreda-Piñeiro, Soledad Muniategui-Lorenzo, Purificación López-Mahía

University of A Coruña, Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), University Institute of Research in Environmental Studies (IUMA), Department of Chemistry. Faculty of Sciences
Campus de A Zapateira s/n., 15071, A Coruña, Spain

1. INTRODUCCIÓN

La urbanización y la industrialización van acompañadas del consumo de energía y de la emisión a la atmósfera de cantidades significativas de contaminantes que representan un importante impacto en la calidad del aire, impulsando el cambio climático global y suponiendo un importante riesgo para la salud humana. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que la contaminación atmosférica provoca hasta 9 millones de muertes al año y la pérdida de millones de años de vida sana en todo el mundo [1,2].

El material particulado atmosférico (PM) es uno de los principales contaminantes del aire, y está constituido por partículas sólidas y líquidas con diferente composición, tamaños, formas y propiedades ópticas, dependiendo del origen (natural o antropogénico) y de las transformaciones físicas y/o químicas que se producen durante su transporte en la atmósfera.

La inhalación del PM representa una importante vía de exposición para los seres humanos, siendo clasificado como cancerígeno por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) [3]. Varios estudios epidemiológicos han asociado la exposición al PM con efectos negativos en la salud humana (como la disminución de la función pulmonar y renal, el cáncer de pulmón, el daño al ADN y las alteraciones cardiovasculares, reproductivas y endocrinas), traduciéndose en un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad entre las poblaciones expuestas.

Aunque los mecanismos por los cuales el PM ejerce efectos adversos en la salud humana aún no están claros, se cree que la toxicidad del PM depende en gran medida de la composición química de las partículas y de su tamaño. El PM₁₀ y PM_{2,5} (partículas cuyo diámetro aerodinámico es $\leq 10 \mu\text{m}$ y $\leq 2,5 \mu\text{m}$, respectivamente) han sido las fracciones de PM más estudiadas. Además, también serían interesantes los estudios con partículas de menor tamaño, como el PM₁ ($\leq 1 \mu\text{m}$).

El interés radica en su potencial para penetrar y depositarse en diferentes regiones del sistema respiratorio tras su inhalación. Además del tamaño, la composición del PM desencadena los problemas de salud más relevantes debido a los efectos adversos que provoca en el organismo [4].

Al tratarse de un contaminante atmosférico, la inhalación es la principal vía de exposición al PM, y son miles de millones de partículas que penetran en el sistema respiratorio cada día. Tras su deposición en el mismo, los contaminantes asociados a las partículas interactúan con los diferentes fluidos corporales y tejidos, pudiendo ejercer sus efectos tóxicos localmente

y/o ser absorbidos al torrente sanguíneo a través de la membrana alveolar, representando un mayor riesgo, ya que podrían alcanzar la circulación sistémica llegando a diferentes órganos del cuerpo.

Por otra parte, las partículas también están sometidas a mecanismos de eliminación pulmonar, como el aclaramiento mucociliar, pudiendo ser transportadas al tracto gastrointestinal, donde podrán ejercer su efecto tóxico y/o ser absorbidas en la sangre.

A nivel europeo, en las directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE se establecen valores límite de concentración de PM₁₀ y PM_{2,5} en aire ambiente; así como de algunos contaminantes asociados a la materia particulada, como metales pesados As, Cd, Ni y Pb, y el benzo(a)pireno (hidrocarburo aromático policíclico (HAP)). La OMS establece valores aún más restrictivos, sin embargo, recientemente la UE ha planteado la propuesta de revisión de las Directivas anteriores, sobre la calidad del aire ambiente, con el establecimiento de normas provisionales de calidad del aire de la UE para 2030 más ajustadas a las directrices de la Organización Mundial de la Salud [5].

Los valores límite de las normativas y las actuaciones derivadas de su aplicación se basan en el contenido total de contaminantes en PM. En las últimas décadas, la investigación en los estudios de evaluación del riesgo en la salud de la contaminación atmosférica da un paso más allá en la aplicación de la normativa.

Los estudios más recientes en este campo se encaminan hacia la determinación de la fracción de contaminante que puede ser absorbida por el cuerpo humano, más que en la determinación de la concentración total asociada al PM, ya que esta última podría sobreestimar la toxicidad del PM.

Así, se definen:

- la bioaccesibilidad de una sustancia como la concentración máxima de esa sustancia que puede disolverse en diferentes fluidos corporales, como los pulmonares (bioaccesibilidad inhalatoria) y los digestivos/gastrointestinales (bioaccesibilidad oral);
- la biodisponibilidad de una sustancia como la fracción de una sustancia, que además de disolverse en los fluidos corporales, se puede absorber a través de las membranas celulares, como en los alvéolos pulmonares (biodisponibilidad inhalatoria) o intestino delgado (biodisponibilidad oral) y llegar al torrente sanguíneo, donde estará “disponible” para promover su acción tóxica en los diferentes órganos del individuo expuesto (Figura 1).

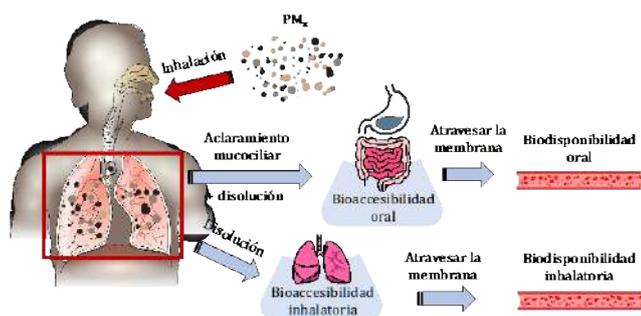


Figura 1. Esquema de las definiciones de bioaccesibilidad y biodisponibilidad oral e inhalatoria.

Ambos ensayos proporcionan información muy valiosa, al permitir una mejor comprensión de cómo las sustancias pueden interactuar con los organismos, ayudando a entender la relación entre las propiedades/componentes del PM y sus efectos en la salud humana. Y así, en los últimos años son frecuentemente utilizados en modelos de evaluación del riesgo para la salud, al ser considerados mejores indicadores que la concentración total por la sobreestimación que esta produce.

Los métodos para estimar las bioaccesibilidades y biodisponibilidades de las sustancias, se pueden clasificar en: *in vivo*, experimentando con animales de laboratorio; *in vitro*, haciendo ensayos con cultivos celulares; y ensayos de disolución *in vitro* (conocidos como *physiologically-based extraction test*, PBET), siendo este último la alternativa más extendida debido a su simplicidad, rapidez, fácil control, bajo coste y no ser éticamente polémico.

Estos ensayos implican el uso de fluidos biológicos simulados (SBFs), para la extracción de contaminantes del PM, y condiciones similares a las que se encuentran en el cuerpo humano, obteniendo las fracciones bioaccesibles y/o biodisponibles correspondientes. Posteriormente, dichas fracciones se someten a etapas de preparación de muestra y posterior análisis instrumental para determinar los compuestos de interés en las mismas, que dependerán de la naturaleza de los analitos. Además, las bioaccesibilidades y biodisponibilidades se calculan en porcentaje relativo a la concentración total de contaminante en la muestra, por lo que también será necesario determinar el contenido total, requiriendo de metodología analítica adecuada para ello.

Esta temática se encuentra dentro de las líneas de investigación del grupo de Química Analítica Aplicada (QANAP) de la Universidade da Coruña (UDC), abordándose el estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de contaminantes en matrices ambientales mediante ensayos de disolución *in vitro*, así como el desarrollo de metodologías analíticas sensibles que lo permitan. En la presente publicación, se hace un resumen de los avances alcanzados en nuestro grupo para el estudio de la bioaccesibilidad inhalatoria y la biodisponibilidad oral de contaminantes asociados al PM.

2. METODOLOGÍA

2.1. Ensayos de disolución *in vitro*: bioaccesibilidad inhalatoria y biodisponibilidad oral

Las metodologías de disolución *in vitro* se centran en el estudio de la solubilidad de las sustancias en los fluidos humanos o corporales, siendo un papel clave de su destino en el organismo: las sustancias disueltas tendrán un mayor potencial para atravesar las membranas celulares (epitelios) y llegar a la circulación sistémica, mientras que las más insolubles podrán ser eliminadas con mayor facilidad por diferentes mecanismos (se pueden citar algunos). Los métodos más actuales utilizan fluidos simulados (base acuosa) que se pueden preparar fácilmente en el laboratorio, reduciendo la variabilidad de fluidos biológicos entre individuos (dependiente de circunstancias personales como el estado de salud, hábitos, sexo y edad). En cuanto a las condiciones de extracción, los ensayos implican un proceso de incubación en el que la temperatura, agitación, relación cantidad muestra-fluido simulado (S/L) y tiempo de extracción son los principales parámetros a controlar.

Los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* inhalatoria se centraron fundamentalmente en metal(oid)es [6], mientras que su aplicación a compuestos orgánicos es de los últimos años [7], no existiendo hasta la fecha estudios publicados de biodisponibilidad inhalatoria. Por otra parte, los métodos de biodisponibilidad oral *in vitro* tuvieron un mayor desarrollo, siendo aplicados fundamentalmente en alimentos para estudios nutricionales [8–10]. Como valor añadido, cabe destacar que estos métodos se han aplicado extensamente en estudios farmacológicos, sirviendo como base para el desarrollo de fármacos (y portadores de fármacos) más solubles en fluidos corporales, ya que es una propiedad crucial para que pueda ejercer sus efectos en el organismo [11,12]. Como actualmente no existe una metodología estandarizada, las condiciones de ensayo más adecuadas se seleccionan tras una revisión crítica y exhaustiva de la bibliografía disponible. En la Figura 2 se indica un diagrama de flujo del procedimiento.

Para llevar a cabo los ensayos de bioaccesibilidad inhalatoria, la disolución de Gamble y el fluido lisosomal artificial (ALF) son los fluidos pulmonares simulados (SLFs) más empleados por ser representativos de diferentes regiones pulmonares. En base a estudios de deposición de partículas en el sistema respiratorio, ambos fluidos son los recomendados para evaluar PM₁₀ y PM_{2,5} respectivamente (Figura 2A).

Por otra parte, la biodisponibilidad oral se aplica fundamentalmente a la fracción gruesa del particulado (PM₁₀), al ser las partículas de entre de entre 5–10 μm las que van a ser eliminadas, con mayor facilidad, por aclaramiento mucociliar y, a continuación, ser transportadas al sistema digestivo. Por ello, en la simulación, las muestras son sometidas a una primera fase gástrica (utilizando pepsina) y a continuación, una fase intestinal (con una disolución de pancreatina y sales

biliares) en la que se incluye una membrana de diálisis para simular el paso de sustancias del intestino delgado a la sangre (disolución tampón aceptora: sal disódica del ácido 2-[4-(2-sulfoetil)piperazin-1-il]etanosulfónico, PIPES) (Figura 2B).

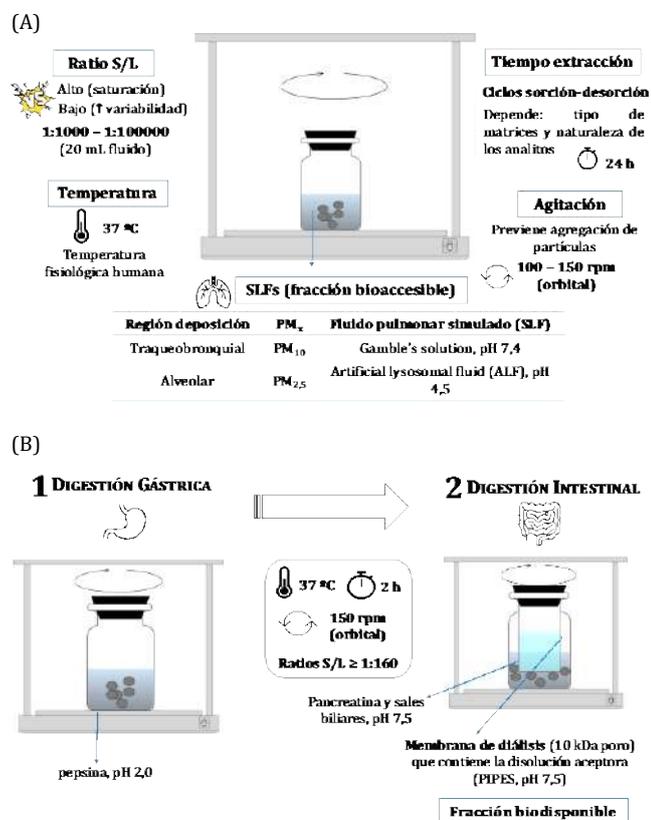


Figura 2. Esquema de los procedimientos empleados para el estudio de: (A) bioaccesibilidad inhalatoria y (B) biodisponibilidad oral.

En este contexto, las bioaccesibilidades y biodisponibilidades no están solamente afectadas por las condiciones de ensayo seleccionadas, sino también los factores internos relacionados con las propiedades de las sustancias químicas (por ejemplo, la hidrofobicidad) y de la naturaleza de las matrices objeto de estudio. Por este motivo, los estudios de bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad son frecuentemente acompañados de estudios de caracterización química de las muestras.

2.2. Determinación del contenido total y en las fracciones bioaccesibles/biodisponibles de diversos contaminantes

Los primeros estudios que se abordaron en el grupo fueron los de bioaccesibilidad inhalatoria de compuestos orgánicos para las dos fracciones granulométricas (PM₁₀ y PM_{2,5}). Así, para HAPs en PM₁₀, se analizó el contenido total mediante una extracción asistida por microondas (MAE), *clean-up* por extracción en fase sólida (SPE) y posterior análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD), mientras que para los HAPs disueltos en la disolución de Gamble (fracción bioaccesible inhalatoria de PM₁₀) se empleó

una microextracción líquido-líquido asistida por vórtex (VALLME) y cuantificación mediante HPLC-FLD [13]. Se continúan los estudios con la fracción granulométrica más fina (PM_{2,5}) ampliando el abanico de contaminantes a 5 familias de compuestos orgánicos: HAPs, ftalatos (PAEs), retardantes de llama organofosforados (OPFRs), compuestos de almizcle sintéticos (SMCs) y bisfenoles (BPs) con el desarrollo y aplicación de métodos multiresiduo. Para el contenido total se realizó una extracción mediante ciclos de extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos + vórtex (UASE + vórtex), *clean-up* por extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE) asistida por vórtex y un paso final de determinación mediante inyección con vaporización a temperatura programada-cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (PTV-GC-MS/MS) [14]. Para analizar los contaminantes disueltos en el fluido ALF (fracciones bioaccesibles inhalatorias de PM_{2,5}) se realizó una extracción VALLME (con adición de NaCl) y posterior cuantificación por PTV-GC-MS/MS [15].

Paralelamente en el tiempo, se han realizado estudios de biodisponibilidad oral de HAPs y metal(oid)es con el desarrollo de metodología analítica para su aplicación. Los HAPs totales en PM₁₀ se analizaron con mediante extracción con agua caliente presurizada (PHWE), extracción líquido-líquido asistida con membrana (MASE) y cuantificación con PTV-GC-MS/MS (debido a la mayor cantidad de muestra empleada) [16], mientras que los metal(oid)es totales se analizaron mediante digestión ácida y posterior determinación con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente ICP-MS [18]. Los HAPs se extrajeron de la disolución tampón aceptora (PIPES) (fracción biodisponible oral) mediante VALLME-HPLC [17], y los metal(oid)es disueltos en el PIPES fueron determinados directamente por ICP-MS.

Las validaciones de los métodos se realizaron en términos de linealidad, límites de cuantificación y detección (LODs y LOQs), recuperaciones analíticas, repetibilidad y precisión intermedia.

En algunos casos, las metodologías analíticas empleadas para la determinación de las fracciones bioaccesibles/biodisponibles y totales fueron validadas de forma conjunta a través balances de masa empleando muestras reales y materiales de referencia certificados (SRM 1648a, ERM-CZ100 y ERM-CZ120) de PM.

Para ello, se analizaron las fracciones no-bioaccesibles/no-biodisponibles usando metodologías de contenido total y se realizó la comparación estadística entre y el contenido total y el sumatorio de las fracciones bioaccesible/biodisponible y no-bioaccesible/no-biodisponible, para cada analito.

En general, se obtuvieron resultados de validación satisfactorios para la mayoría de los analitos bajo estudio, mostrándose un resumen de las metodologías empleadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Detalles, recuperaciones analíticas (R, %), límites de cuantificación (LOQs) y referencias (Ref) de las metodologías empleadas para los diferentes estudios.

Analitos, matriz y metodología	R (%)	LOQs (pg m ⁻³)	Ref
Bioaccesibilidad inhalatoria de HAPs en PM₁₀			
Contenido total 16 HAPs en PM ₁₀	Balance de masa (79 - 111) muestra de PM ₁₀ y ERM-CZ100	5,3 - 561	[13]
Fracción bioaccesible 16 HAPs en disolución de Gamble		2,9 - 67,5	
Bioaccesibilidad inhalatoria multiresiduo en PM_{2,5}			
Contenido total 18 HAPs, 12 PAEs, 12 OPFRs, 6 SMCs y 2 bisfenoles en PM _{2,5}	HAPs	83 - 107	[14]
	PAEs	57 - 115	
	OPFRs	37 - 127	
	SMCs	90 - 107	
	BPs	89 - 96	
Fracción bioaccesible 18 HAPs, 12 PAEs, 11 OPFRs, 6 SMCs y 2 bisfenoles en disolución ALF	HAPs	62 - 114	[15]
	PAEs	81 - 120	
	OPFRs	53 - 156	
	SMCs	98 - 114	
	BPs	88 - 89	
Biodisponibilidad oral de HAPs y metal(oid)es en PM₁₀			
Contenido total 16 HAPs en PM ₁₀	Balance de masa (74 - 115) ERM-CZ100	1,2 - 75,0	[16]
Fracción biodisponible 16 HAPs en disolución PIPES		0,01 - 0,52	[18]
Contenido total y fracción biodisponible 16 metal(oid)es en PM ₁₀ y en PIPES	Balance de masa (82 - 108) SRM 1648a ERM-CZ120	31,2 - 4400	[17]

3. RESULTADOS

3.1. Bioaccesibilidad inhalatoria de HAPs en PM₁₀ y PM_{2,5}

Se evaluó la bioaccesibilidad inhalatoria de 12 HAPs en muestras de PM₁₀ (n=65) y PM_{2,5} (n=52) recogidas en una zona urbana de A Coruña [13] y en otra industrial de Vigo [15] durante el año 2017, obteniéndose ratios de bioaccesibilidad medias de 23% y 31 %, respectivamente. Además, se observó una correlación (Spearman) negativa entre la hidrofobicidad de los HAPs (logaritmo de los coeficientes de partición octanol-agua, logK_{ow}) y las ratios de bioaccesibilidad inhalatoria de HAPs en muestras de PM₁₀ al 95 % de confianza, mientras que no se observó para PM_{2,5} (Tabla 2). Asimismo, se exploraron las correlaciones, mediante análisis de componentes principales (PCA), de las ratios de bioaccesibilidad de HAPs con otras características del PM: iones mayoritarios, contenido carbonoso (carbono negro equivalente, eBC; materia absorbente de radiación ultravioleta, UVPM) y metal(oid)es traza. En el caso de PM₁₀ se observa una correlación negativa con el contenido carbonoso, mientras que es positiva para el PM_{2,5} (Tabla 3).

Tabla 2. Coeficiente de correlación Spearman (con su p-valor asociado entre paréntesis) y correlaciones obtenidas mediante el PCA.

PM _x	Coeficiente Spearman (p-valor)	Correlaciones PCA
PM ₁₀	- 0,850 (< 0,01)	Correlación negativa con: eBC, UVPM, Cl ⁻ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Sb y Cu
PM _{2,5}	— ^a (0,380)	Correlación positiva con: eBC, UVPM y NO ₃ ⁻ Correlación negativa con: SO ₄ ⁻ y NH ₄ ⁺

^a No existe correlación al 95 % de confianza, p-valor >0,05

Atendiendo a la bibliografía disponible, estas diferencias podrían atribuirse a los diferentes pH y composiciones de los SLFs empleados para la evaluación de cada una de las fracciones, más que a la composición del PM. Por otra parte, la presencia de algunos iones o metal(oid)es podrían dificultar la movilización de HAPs al SLF.

3.2. Bioaccesibilidad inhalatoria de otros compuestos orgánicos en PM_{2,5}

Para el PM_{2,5} recogido en un área industrial próximo a Vigo, también se estimaron las ratios de bioaccesibilidad inhalatoria de 2 ftalatos (PAEs), 3 retardantes de llama organofosforados (OPFRs) y para el bisfenol A (BPA) [15]. De entre todos ellos, el BPA fue el contaminante que mostró la mayor ratio de bioaccesibilidad inhalatoria (83% de media), mientras que para los PAEs y OPFRs, se obtuvieron bioaccesibilidades promedio del 41 % y 68 %, respectivamente. Para estos compuestos, se observó una correlación inversa entre las bioaccesibilidades y sus logK_{ow} (coeficiente de Spearman de -0,829, p-valor=0,03) en las muestras estudiadas, lo que sugeriría una mayor influencia de sus hidrofobicidades que para los HAPs.

En cuanto a la correlación con los componentes del PM, se observaron correlaciones positivas con el contenido carbonoso del PM (al igual que para los HAPs en PM_{2,5}), además de para otros iones (Tabla 3). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre la bioaccesibilidad del BPA y los componentes del PM considerados.

Tabla 3. Correlaciones obtenidas mediante el PCA para los PAEs, OPFRs y BPA.

Compuestos	Correlaciones PCA
PAEs	Correlación positiva con: eBC, UVPM, SO ₄ ²⁻ , C ₂ O ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺ y K ⁺ Correlación negativa con: Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ y Na ⁺
OPFRs	Correlación positiva con: eBC, UVPM y Ca ⁺ Correlación negativa con: NO ₃ ⁻
BPA	No se encontró correlación

3.3. Biodisponibilidad oral de HAPs y metal(oid)es en PM₁₀

El estudio de la biodisponibilidad oral se realizó con muestras de PM₁₀ recogidas en el área de A Coruña durante el año 2015, enfocándose en HAPs [19] y metal(oid)es [18]. En el caso de los HAPs, la ratio de biodisponibilidad promedia fue del 0,7 %, siendo muy inferior a las ratios de bioaccesibilidad oral encontradas en la bibliografía, probablemente debido a la inclusión

de una membrana de diálisis en el ensayo PBET. Por otra parte, se estimó una biodisponibilidad media del 28 % para metal(oid)es, pudiendo atribuirse a su mayor solubilidad en disoluciones acuosas, como son los fluidos simulados. A través de los balances de masa realizados, no se aprecia que exista degradación de HAPs durante el ensayo *in vitro*.

4. CONCLUSIONES

En el presente artículo se muestran algunos de los resultados obtenidos por el grupo de investigación QANAP relativos al estudio de la bioaccesibilidad inhalatoria y biodisponibilidad oral de contaminantes asociados al PM, demostrando su interés dado el potencial que podrían tener muchos de estos compuestos para solubilizarse en fluidos biológicos y ser absorbidos en la sangre, pudiendo llegar a diferentes órganos por circulación sistémica. Con el objetivo de obtener resultados más realistas, se seleccionaron los parámetros de ensayo más apropiados basándose en una revisión crítica y exhaustiva de la bibliografía al respecto, suponiendo un avance hacia una futura estandarización y obtener resultados más comparables entre sí. También, la metodología analítica desarrollada resulta ventajosa al ser herramientas interesantes para futuros trabajos en el campo. Por otra parte, se evidencia la complejidad de este tipo de estudios, ya que se encontraron algunas correlaciones entre las bioaccesibilidades y las características del PM, variando con las fuentes de generación.

5. NUEVOS RETOS

A la vista de los resultados obtenidos, y con el fin de contribuir en este campo, el grupo sigue avanzando en la investigación con: (1) el estudio más exhaustivo de la correlación de las bioaccesibilidades y biodisponibilidades con el origen de PM (fuentes emisoras); (2) la aplicación de las disoluciones ALF y Gamble en las mismas muestras de PM para evaluar el efecto de sus propiedades; (3) del estudio de la biodisponibilidad inhalatoria incluyendo una membrana de diálisis, como para la biodisponibilidad oral; (4) explorar la posible degradación de los contaminantes durante los ensayos PBET *in vitro*; (5) estimar y comparar las ratios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad con ensayos químicos de estimación del riesgo (potencial oxidativo) o estudios de citotoxicidad empleando cultivos celulares.

Agradecimientos

Se obtuvo financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN), la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (refs: RT2018-101116-B-I00 y PID2021-1252010B-I00), la Xunta de Galicia (ref: ED431C 2021/56) y el FEDER-Ministerio de Economía y Empresa (MINECO) (UNLC15-DE-3097, cofinanciado (80/20 %) por la Xunta de Galicia). J. Sánchez-Piñero agradece a la Xunta de Galicia por la concesión de una ayuda de apoyo a la etapa de formación posdoctoral (ED481B-2022-002). N. Novo-Quiza agradece al MCIN y al Fondo Social Europeo (FSE) por la concesión de una ayuda para la formación de doctores (PRE2019-088744). Se agradecen al Concello de A Coruña y al laboratorio de Medio Ambiente de Galicia (LMAG)-Xunta de Galicia por facilitar las muestras de PM₁₀ y PM_{2,5}, respectivamente.

REFERENCIAS

- [1] WHO, Global air quality guidelines. Particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide (2021) <https://www.who.int/publications/i/item/9789240034228>.
- [2] EEA, Air quality in Europe - report (2021) <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2021>.
- [3] IARC. National Statistics Institute (2017).
- [4] Guevara, M. et al. *R. Soc. Chem*, 1–34 (2016).
- [5] European Green Deal: Commission proposes rules for cleaner air and water (2022) https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/ail/es/ip_22_6278.
- [6] Kastury, F. et al. *Sci. Total Environ.* 574, 1054–1074 (2017).
- [7] Ren, H. et al. *Environ. Pollut.* 265, 115070 (2020).
- [8] Miller, D. et al. *J. Clin. Nutr.* 43, 2248–2256 (1981).
- [9] Moreda-Piñero, J. et al. *Food Chem.* 205, 146–154 (2016).
- [10] Moreda-Piñero, J. et al. *TrAC*, 30, 324–345 (2011).
- [11] Forbes, B. et al. *AAPS J.* 17, 837–52 (2015).
- [12] Gerde, P. et al. *Technol.* 15, 77–88 (2017).
- [13] Sánchez-Piñero, J. et al. *Chemosphere.* 263, 127847 (2021).
- [14] Sánchez-Piñero, J. et al. *Talanta Open.* 4, 100057 (2021).
- [15] Sánchez-Piñero, J. et al. *Environ. Pollut.* 307, 119577 (2022).
- [16] Ramos-Contreras, C. et al. *J. Chromatogr. A.* 1606, 460381 (2019).
- [17] Moreda-Piñero, J. et al. *Water Air Soil Pollut.* 226, 2240 (2015).
- [18] Moreda-Piñero, J. et al. *Atmos. Environ.* 2019, 213, 104–115 (2019).
- [19] Sánchez-Piñero, J. et al. *Environ. Chem. Lett.* 20, 49–57 (2022).