

Treballs Final de Master
Màster Química Analítica
Curs 19/20

Study of the solution equilibria of quadruplex structures of nucleic acids and their interaction with silver nanoclusters

A. de la Hoz García¹, R. Gargallo²

- 1) Master's student in Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- 2) Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Nanoclusters (NCs) are aggregations of a small number of atoms, with a scale of the order of nanometers, considered the missing link between atomic and nanoparticle behaviour in metals. Due to their small size, NCs suffer quantum confinement effects and the properties of the particle become those of a quantum point, providing in the NCs different optical, electromagnetic and catalytic properties to larger particles of the same material. Oligonucleotides are small molecules of DNA or RNA that are involved in a large number of biological processes. There is a correlation between the concentration of determined oligonucleotides, such as microRNAs, and the development of certain diseases, which has made it possible to develop their application as biological markers. However, the detection and quantification of these structures is a complex task and therefore a highly sensitive analytical method is required. In this study, silver nanoclusters (AgNCs) are used, with the aim of to achieve their interaction with DNA and be able to detect short sequences of nucleic acids, characterizing the hybrid formed (DNA-AgNC) by means of spectroscopic techniques of molecular absorption, circular dichroism and molecular fluorescence. This perspective is a step towards the development of a sensitive and selective method for the detection of nucleic acids for diagnostic purposes in diseases where their timely detection can provide a valuable diagnosis.

Study of the solution equilibria of quadruplex structures of nucleic acids and their interaction with silver nanoclusters

A. de la Hoz García¹, R. Gargallo²

- 1) Master's student in Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- 2) Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Nanoclusters (NCs) are aggregations of a small number of atoms, with a scale of the order of nanometers, considered the missing link between atomic and nanoparticle behaviour in metals. Due to their small size, NCs suffer quantum confinement effects and the properties of the particle become those of a quantum point, providing in the NCs different optical, electromagnetic and catalytic properties to larger particles of the same material. Oligonucleotides are small molecules of DNA or RNA that are involved in a large number of biological processes. There is a correlation between the concentration of determined oligonucleotides, such as microRNAs, and the development of certain diseases, which has made it possible to develop their application as biological markers. However, the detection and quantification of these structures is a complex task and therefore a highly sensitive analytical method is required. In this study, silver nanoclusters (AgNCs) are used, with the aim of to achieve their interaction with DNA and be able to detect short sequences of nucleic acids, characterizing the hybrid formed (DNA-AgNC) by means of spectroscopic techniques of molecular absorption, circular dichroism and molecular fluorescence. This perspective is a step towards the development of a sensitive and selective method for the detection of nucleic acids for diagnostic purposes in diseases where their timely detection can provide a valuable diagnosis.

Preparación de una resina centelladora selectiva para actínidos

I. Giménez, A. Tarancón, H. Bagán

La medida de radionucleidos es un trabajo analítico complejo con alto coste económico y de tiempo. Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar métodos que reduzcan tanto el tiempo como el coste de análisis. En el caso de los actínidos, su determinación es necesaria ya que el parámetro alfa total, que determina la potabilidad del agua de consumo, está constituido en su mayoría por actínidos. Por otro lado, con el fin de controlar su posible extensión durante los procesos, también existe la necesidad de medida de actínidos, en los procesos de desmantelamiento nuclear.

En este trabajo se presenta un nuevo método para analizar actínidos utilizando resinas de centelleo plástico (PSresins) empaquetadas en un cartucho de extracción en fase sólida (cartucho SPE). El procedimiento propuesto unifica la separación química y la preparación de la medida de la muestra en un solo paso, reduciendo el esfuerzo, el tiempo y los reactivos necesarios para el análisis, así como la cantidad de desechos generados. Las PSresin utilizadas en este estudio están compuestas por un extractante selectivo ácido bis (2-etilhexil) metandifósfnico (H₂DEH [MDP]), también conocido como DIPEX, que tiene una gran afinidad por los actínidos tri, tetra y hexavalentes en ácidos diluidos. Este extractante es inmovilizado sobre las microesferas de centelleo de plástico (PSm) en una proporción de 1/1:6 y nos ofrece una retención y eficiencia de detección del 100% para ²⁴¹Am, ²³⁰Th, ²³⁸U y ²³⁸Pu y la retención y detección de ²²⁶Ra y ²¹⁰Po. Esta resina podría permitir el análisis del parámetro alfa total utilizando un PSA de 125 con un error de clasificación del 23%. También se sintetizan y evalúan con ²⁴¹Am nuevos extractantes de forma preliminar.

Preparation of a selective scintillator actinide resin

I. Giménez, A. Tarancón, H. Bagán

The measurement of radionuclides is a complex analytical work with a high economic and time cost. For this reason, there is a need to develop new methods and strategies where the time and economic cost are reduced. One important group to measure are the actinides since they are the main constituent of the analysis of the total gross alpha, a screening parameter for drinking water consumption. Moreover, in nuclear dismantling processes, it is necessary to control the possible extension of the released radionuclides during the process through scintillation.

This work presents a new method to analyse actinides using plastic scintillation resins (PSresins) packed in a solid phase extraction cartridge (SPE cartridge). The proposed procedure unifies the chemical separation and preparation of the sample measurement in a single step, reducing the effort, time and reagents necessary for the analysis, as well as the amount of waste generated. The PSresin used in this study are comprised of a selective extractant bis (2-ethylhexyl) methanediphosnic acid (H₂DEH [MDP]), also known as DIPEX, which has a high affinity for tri, tetra, and hexavalent actinides in dilute acids. This extractant is immobilized on the plastic scintillation microspheres (PSm) in a ratio of 1/1:6 and offers us a retention and detection efficiency of 100% for ²⁴¹Am, ²³⁰Th, ²³⁸U and ²³⁸Pu and the retention and detection of ²²⁶Ra and ²¹⁰Po. This resin could also allow the analysis of the total alpha parameter using a PSA of 125 with a misclassification error of 23%.

This study also compares the preparation of the PSresin modified on the basis of methandiphosphonic acid, obtaining comparable results for americium.

SEPARATION AND PURIFICATION OF POLYPHENOLS IN FOOD MATRICES USING POLYMERIC RESINS

Directores: Mercè Granados Juan y Javier Vicente Saurina Purroy

Estudiante: José Joaquín Villaplana Juan

ABSTRACT

Polyphenols, pervasive in vegetables and fruits, are of significant interest and have received more and more attention in recent years due to their bioactive functions. Agricultural and industrial residues are profitable sources of natural antioxidants, especially the by-products of the agri-food industry. These residues still contain a relevant concentration of polyphenolic compounds even after processing, and the extraction and enrichment of bioactive compounds is of increasing interest.

On the one hand, this study presents an overview of the state of the art regarding the role of polymeric resins in the recovery of polyphenols from natural samples, reviewing recent applications mostly related to the selective recovery and concentration of phenolic compounds for the revalorisation of agri-food industry by-products and the manufacture of value-added products.

On the other hand, studies of extraction of polyphenols in extracts from agricultural residues were conducted using resin MN-202. Firstly, studies about the ratio between the amount of resin and volume of solution showed that MN-202 adsorbs the polyphenols present in the samples very efficiently, as with a small ratio a high adsorption efficiency was obtained, enabling for a cost-effective future process of recovery of polyphenols. Secondly, the studies about the effect of pH revealed that the adsorption efficiency was the highest at values in the pH range 2-3, and thus this parameter should be adjusted accordingly for a successful purification to take place.

Resin MN-202 shows great promise for its use in future dynamic adsorption/desorption experiments with natural samples.

SEPARATION AND PURIFICATION OF POLYPHENOLS IN FOOD MATRICES USING POLYMERIC RESINS

Directores: Mercè Granados Juan y Javier Vicente Saurina Purroy

Estudiante: José Joaquín Villaplana Juan

ABSTRACT

Polyphenols, pervasive in vegetables and fruits, are of significant interest and have received more and more attention in recent years due to their bioactive functions. Agricultural and industrial residues are profitable sources of natural antioxidants, especially the by-products of the agri-food industry. These residues still contain a relevant concentration of polyphenolic compounds even after processing, and the extraction and enrichment of bioactive compounds is of increasing interest.

On the one hand, this study presents an overview of the state of the art regarding the role of polymeric resins in the recovery of polyphenols from natural samples, reviewing recent applications mostly related to the selective recovery and concentration of phenolic compounds for the revalorisation of agri-food industry by-products and the manufacture of value-added products.

On the other hand, studies of extraction of polyphenols in extracts from agricultural residues were conducted using resin MN-202. Firstly, studies about the ratio between the amount of resin and volume of solution showed that MN-202 adsorbs the polyphenols present in the samples very efficiently, as with a small ratio a high adsorption efficiency was obtained, enabling for a cost-effective future process of recovery of polyphenols. Secondly, the studies about the effect of pH revealed that the adsorption efficiency was the highest at values in the pH range 2-3, and thus this parameter should be adjusted accordingly for a successful purification to take place.

Resin MN-202 shows great promise for its use in future dynamic adsorption/desorption experiments with natural samples.

STUDY OF THE ORGANIC AEROSOL IN A RESIDENTIAL NEIGHBOURHOOD UNDER THE INFLUENCE OF MULTIPLE EMISSION SOURCES

A. Canals^{1,2} and B. L. van Drooge²

1) Dpt. of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

2) Dpt. of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Spain.

Summary

Studies on air quality research have gained relevance in recent years due to the link between emissions, the status of the environment and human diseases, among other reasons. Atmospheric particulate matter (PM) occurs in highly variable concentrations depending not just on emissions from multiple sources, but also on seasonal and meteorological conditions. The aim of this study is determining the temporal trends of organic compounds in PM in a residential neighbourhood that is under potential influence of multiple emission sources. A variety of organic tracer compounds that represent emission sources, such as combustion processes, soil resuspension, and vegetation, were analyzed by gas-chromatography coupled to mass-spectrometry (GC-MS) after extraction from PM₁₀ (particles with an aerodynamic diameter less than 10 µm) that was collected from October 2019 to January 2020. The chemometric method of multivariate curve resolution/alternating least squares (MCR-ALS) was applied to identify and quantify the contribution of four potential sources to the organic aerosol (OA). Two of them reflected either primary emissions related to upwhirled organic soil dust (53 % of OA) or secondary organic aerosol (SOA) formation (22 %). This later component was predominant in the warmer period. The other two components were related to combustion emissions. One of them resulted from a mixture of biomass burning and traffic emissions (13 %), which were dominant in the colder period, while the other component could be related to incomplete combustion of plastics (4 %) due to the presence of the phthalate esters and certain polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as 4-benzylbiphenyl. Whereas toxic PAHs from the above-mentioned combustion sources occur in the atmosphere of the study site, the concentration of benzo[a]pyrene, classified as carcinogenic agent (Group 1) by the International Agency for Research on Cancer (IARC), does not exceed the legal target value of 1 ng/m³ in outdoor air.

Resum

Actualment, els estudis de la qualitat de l'aire han guanyat rel·levància degut a la relació establerta entre les emissions, l'estat del medi ambient i les malalties que patim els humans, entre d'altres raons. La matèria particulada atmosfèrica (PM) es troba en concentracions altament variables depenent no només en les múltiples fonts d'emissió sinó també en les condicions estacionals i meteorològiques. L'objectiu d'aquest estudi és determinar les tendències temporals de compostos orgànics en PM en un barri residencial sota la potencial influència de diverses fonts d'emissió. Es va mostrejar la zona durant el període corresponent als mesos d'octubre del 2019 a gener del 2020 i se'n realitzà l'extracció de PM₁₀ (partícules amb un diàmetre aerodinàmic menor de 10 µm). Una gran varietat de compostos orgànics usats com a traçadors de determinades fonts d'emissió, com processos de combustió, resuspensió del sòl i vegetació, van ser analitzats mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS). El mètode quimiomètric de resolució multivariant de corbes a partir de l'algoritme de mínims quadrats alternats (MCR-ALS) va ser aplicat per identificar i quantificar la contribució de quatre fonts potencials de l'aerosol orgànic (OA). Dos d'aquests components plasmaven tant la presència d'emissions primàries relacionades amb la resuspensió de pols orgànica de terra (53 % de OA) com la formació d'aerosol orgànic secundari (SOA; 22 %). Aquest últim component era predominant en el període més càlid. Els altres dos es relacionaven amb emissions de combustió. Un d'ells va resultar de la mescla de crema de biomassa i emissions de tràfic (13 %), el qual era dominant en el període més fred, mentre que l'altre component es podia relacionar amb la combustió incompleta de plàstics (4 %) denotat per la presència d'èsters de ftalats i alguns hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), com el 4-benzilbifenil. Mentre que els PAHs tòxics corresponents a les fonts de combustió ja mencionats es

troben en l'atmosfera del lloc estudiat, la concentració de benzo[a]pirè, classificat per l'Agència Internacional d'Investigació del Càncer (IARC) com a agent cancerigen pels humans (Grup 1), no excedeix el valor legal d'1 ng/m³ a l'exterior.

Resumen

Actualmente, los estudios de la calidad del aire han ganado relevancia debido a la relación establecida entre las emisiones, el estado del medio ambiente y las enfermedades que sufrimos los humanos, entre otras razones. La materia particulada atmosférica (PM) se encuentra en concentraciones altamente variables dependiendo de las múltiples fuentes de emisión y, también, en las condiciones estacionales y meteorológicas. El objetivo de este estudio es determinar las tendencias temporales de compuestos orgánicos en PM en un barrio residencial bajo la potencial influencia de varias fuentes de emisión. Se muestreó la zona durante el periodo correspondiente a los meses de octubre del 2019 a enero del 2020. Se realizó la extracción de PM₁₀ (partículas con un diámetro aerodinámico menor de 10 µm). Una gran variedad de compuestos orgánicos usados como trazadores de determinadas fuentes de emisión, como procesos de combustión, resuspensión del suelo y vegetación fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El método quimiométrico de resolución multivariante de curvas a partir del algoritmo de mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) fue aplicado para identificar y cuantificar la contribución de cuatro potenciales fuentes del aerosol orgánico (OA). Dos de estos componentes plasmaban tanto la presencia de emisiones primarias relacionadas con la resuspensión de polvo orgánico de tierra (53% de OA) como la formación de aerosol orgánico secundario (SOA; 22%). Este último componente era predominante en el periodo más cálido. Los otros dos se relacionaban con emisiones de combustión. Uno de ellos resultó de la mezcla de la quema de biomasa y emisiones de tráfico (13%), el cual era dominante en el periodo más frío, mientras que el último componente se podía relacionar con la combustión incompleta de plásticos (4%) denotado por la presencia de ésteres de ftalatos y algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), como el 4-benzilbifenilo. Mientras que los PAHs tóxicos correspondientes a las fuentes de combustión ya mencionados se encuentran en la atmósfera del lugar estudiado, la concentración de benzo[a]pireno, clasificado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como agente carcinógeno para los humanos (Grupo 1), no excede el valor legal de 1 ng/m³ al exterior.

Abstract

Sorption of samarium from aqueous solutions was evaluated through batch and continuous-flow experiments in biochars derived from castor meal (CM), eucalyptus forest residues (CE), sugarcane bagasse (SB) and green coconut pericarp and compared to three other carbon-rich materials such as charcoal fines (CF) and two commercial activated charcoals (AC1, AC2) in order to elucidate techniques and recommend the most suitable materials for the removal of rare earth elements (REE) from contaminated water. Batch experiments revealed great K_d values, in the range of 10^4 - 10^5 L kg⁻¹, and allowed to obtain maximum sorption capacities at equilibrium from the Langmuir model. Continuous-flow experiments, which emulate a real water treatment situation, permitted to obtain maximum sorption capacities by mass balance and by Thomas and Yan models fitting. CF exhibited the greatest sorption capacity at every stage of the sorption process besting the commercial activated charcoals, while CM was established as the best biochar for Sm sorption, competing with AC2 but not with AC1. It was observed the samarium sorption from all materials, except AC2, was governed, to some extent, by a cation exchange mechanism. Continuous-flow sorption parameters could describe the sorption process until a certain C_t/C_o value. Maximum sorption capacities derived from Langmuir fitting of the sorption isotherms matched with maximum sorption capacities obtained from continuous-flow experiments. Both methods were confirmed to be suitable to determine the maximum samarium sorption capacity of the materials under the conditions used.

Keywords: Biochars, Carbon-enriched materials, Samarium, Water remediation, Sorption, Batch, Continuous-flow, Model fitting

Abstract

Es va estudiar la sorció de samari en solucions aquoses mitjançant experiments en batch i en continu utilitzant biochars derivats de la flor de ricí (CM), residus d'eucaliptus (CE), remòlta de canya de sucre (SB) i pericarp de coco (PC) i es van comparar amb tres materials rics en carboni com els fins de carbó (CF) i dos carbons actius comercials (AC1, AC2) per tal d'avaluar les dues tècniques i suggerir els materials més adients per al tractament d'aigües contaminades per terres rares (REE). Els experiments en batch van demostrar valors de K_d alts, en el rang de $10^4 - 10^5$ L kg⁻¹, i l'ajust pel model de Langmuir va permetre obtenir capacitats de sorció màximes en equilibri. Els experiments en continu, que van emular una situació real de tractament d'aigües, van permetre obtenir capacitats de sorció màximes per balanç de massa i mitjançant l'ajust pels models de Thomas i de Yan. El material CF va exhibir la major capacitat de sorció en tots els trams del procés de sorció, superant els dos carbons actius comercials, mentre que el CM va resultar ser el millor biochar per a la sorció de samari, competint amb el AC2 però no amb el AC1. Es va poder observar que la sorció de samari per part de tots els materials, excepte AC2, va estar regida en gran part per un mecanisme de bescanvi catiònic. Els paràmetres de sorció obtinguts mitjançant els experiments en continu van poder descriure el procés de sorció fins a un cert valor de C_t/C_o . Les capacitats màximes de sorció derivades de l'ajust amb el model de Langmuir van resultar ser molt semblants a les obtingudes pels experiments en continu. D'aquesta manera, es va confirmar que ambdós mètodes van ser adequats per a determinar la capacitat de sorció màxima de samari dels materials en les condicions experimentades.

Paraules clau: Biochars, Materials rics en carboni, Samari, Remeiació d'aigües, Sorció, Batch, Continu, Ajust del model

Katerina Savva - FATE AND EFFECTS OF BIOMICROPLASTICS IN WATER ECOSYSTEMS

ABSTRACT

The plastic materials characteristics such as malleability, low weight, tunable properties, low cost of production and resistance to degradation, have contributed to their increasing production and use during the last 50 years. However, some of these characteristics such as their resistance to degradation, have conducted one of the bigger ecological problems of the modern era, which requires increased efforts in order to deal with it. Once enter the oceans, may undergo various physical, chemical and biological mechanisms that lead to their fragmentation, sedimentation and migration. In addition, the buoyancy of small plastic fragments facilitates their ingestion by the aquatic biota entering the aquatic food chain. During the last years, to disconnect plastic production from the oil industry and to find sustainable materials contributing to a more circular economy, bioplastics have been developed. However, there is a gap of information about the potential impact of these new materials in the environment. Therefore, there is a need to monitor the fate and the effects of bioplastics and biomicroplastics (bioMPLs) under relevant environmental conditions. The current master thesis aims to characterize the weathering of two types of bioMPLs, thus polylactic acid (PLA) and polyhydroxybutyrate (PHB), in water systems under realistic environmental conditions in microcosm experiments and analyse any chemical degradation product by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Also, to assess the adsorption of co-contaminants on bioMPLs. The adsorption of three model pesticides (fenitrothion, malathion and diuron), three pharmaceuticals (two carbapenemes from the family of β -lactam antibiotics (imipenem and meropenem) and the antibacterial triclosan, has been assessed on bioMPLs surface. Results show similarities on the adsorption profile between the two types of bioMPLs but higher values in seawater than in freshwater. These results evidenced that bioMPLs can act as transfer vectors for selected contaminants. Finally, some plastic additives in the weathering effects experiment were tentatively identified after two months. This result highlight that another problem associated with the presence of bioMPLs into aquatic media is the lixiviation of plastic additives which could have some toxic and recalcitrant effects.

RESUMEN

Las características de los materiales plásticos como maleabilidad, bajo peso, propiedades sintonizables, bajo costo de producción y resistencia a la degradación, han contribuido a su creciente producción y uso durante los últimos 50 años. Sin embargo, algunas de estas características, como su resistencia a la degradación, han conducido a uno de los mayores problemas ecológicos de la era moderna. Los residuos plásticos una vez entran en el océano, pueden sufrir diversos mecanismos físicos, químicos y biológicos que conducen a su fragmentación, sedimentación y migración. Además, los pequeños fragmentos de plástico flotante facilitan ser ingeridos por la biota acuática e ingresa a la cadena alimentaria acuática. Durante los últimos años para desconectar la producción de plástico de la industria petrolera y encontrar materiales más sostenibles en el marco de la economía circular se han desarrollado 5 bioplásticos. Sin embargo, existe una brecha de información sobre el impacto potencial de estos nuevos materiales en el medio ambiente. Por lo tanto, existe la necesidad de monitorear el destino y los efectos de los bioplásticos y biomicroplásticos (bioMPL), bajo condiciones ambientales relevantes. El presente máster tiene como objetivo caracterizar los efectos de erosión ambiental de dos tipos de bioMPL, el ácido poliláctico (PLA) y el polihidroxibutirato (PHB), en sistemas acuáticos bajo condiciones ambientales relevantes en microcosmos. Los posibles productos de degradación se han analizado mediante cromatografía de

líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS). Por otro lado, se ha evaluado la adsorción de distintos cocontaminantes en los bioMPL incluyendo tres pesticidas (fenitrotión, malatión y diurón) y tres productos farmacéuticos (dos carbapenemas de la familia de los antibióticos β -lactámicos (imipenem y meropenem) y el antibacteriano triclosán). Los resultados muestran similitudes en el perfil de adsorción entre los dos tipos de bioMPL, pero con valores más altos en el agua de mar que en el agua dulce, indicando que los bioMPLs pueden actuar como vectores de contaminación para estos contaminantes. Finalmente, en el experimento de degradación, se ha realizado la identificación tentativa de algunos aditivos plásticos. Esto demuestra que la contaminación por bioMPLs también conlleva un aumento de contaminación del medio acuático debido a la lixiviación de los aditivos los cuales pueden presentar toxicidad o ser recalcitrantes.

CHARACTERIZATION OF A SIMULATED INTESTINAL FLUID FOR ITS USE IN THE SUBROGATION OF THE PARTITIONING OF BIOLOGICAL OR ENVIRONMENTAL PROCESSES

Laura Muñoz Villanova, Elisabet Fuguet i Jordà, Clara Ràfols Llach

In this work, the FeSSIF system has been characterized using the solvation parameter model in order to see if it can emulate systems of biological or environmental interest. A group of compounds that are neutral at pH 5.8 (pH in the small intestine after the food intake), selected because of their wide variety of chemical properties, has been used in the characterization.

For the characterization of the FeSSIF system, the retention factor (k) of the different compounds has been calculated in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using FeSSIF as pseudostationary phase.

Once the $\log k$ of all the compounds has been calculated, the characterization of the FeSSIF system has been done using the solvation parameter model. In order to calculate the coefficients, a multiple linear regression has been made using $\log k$ and the descriptors E , S , A , B and V of the different substances. The regression provides the equation that characterizes the system ($\log k = c + e E + s S + a A + b B + v V$), obtaining the values of the different coefficients.

Then, a comparison between the FeSSIF system with other systems of biological or environmental interest characterized through the same model has been made. The normalized coefficient of the solvation parameter model of the different systems have been compared, using two comparative methods: the distance parameter (d) and the principal component analysis (PCA).

Analyses of the glycopeptides from rhEPO with fused-silica capillaries and permanent coating by CE-MS

In this study is described a capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) method for the analysis of the glycopeptide glycoforms obtained from the tryptic digestion of recombinant human erythropoietin.

Different mass spectrometers were tested (CE-TOF-MS and CE-QTOF-MS) for the analysis of the glycopeptide O₁₂₆ glycoforms.

The use of capillary coating with thermal stabilized hydroxypropyl cellulose (HPC) was also tested for the analysis of O₁₂₆ and N₈₃ glycopeptides glycoforms using CE-TOF-MS.

The analysis by CE-QTOF-MS showed better results than CE-TOF-MS, especially, less error between the difference of theoretical and experimental mass of the glycopeptides glycoforms. Nevertheless, no new glycoforms were detected.

The use of permanent coating demonstrated a greater reproducibility compared with fused-silica capillary, with no differences between the detected glycoforms

Análisis de los glicopéptidos de la rhEPO con capilares de sílice fundida y recubrimientos permanentes por CE-MS

Es este estudio se describe un método de análisis de las glicoformas de los glicopéptidos obtenidos de la digestión con tripsina de la eritropoyetina humana recombinante en electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masas (CE-MS)

Se realizaron análisis de las glicoformas del glicopéptido O₁₂₆ utilizando diferentes espectrómetros de masas (CE-TOF-MS y CE-QTOF-MS).

También se evaluó el uso de capilares con recubrimiento permanente para la detección de las glicoformas de los glicopéptidos O₁₂₆ and N₈₃ por CE-TOF-MS.

El análisis por CE-QTOF-MS mostró unos mejores resultado en el análisis de las glicoformas respecto CE-TOF-MS, especialmente en la exactitud del error de masas. Sin embargo no se detectaron nuevas glicoformas.

El uso de recubrimientos permanentes de HPC demostró un aumento en la reproducibilidad de los resultados respecto el uso de capilares de sílice fundida no hubo diferencias entre las glicoformas detectadas.

Títol: UHPLC-ESI-MS / MS per a l'avaluació dels canvis en la composició fitoquímica dels ametllers micorrizats (*Prunus dulcis*) en resposta a la infecció de *Phytophthora spp.*

Nom del estudiant: Aina Cuixart

Nom del director: Oscar Nuñez

Phytophthora spp. és un patògen que causa putrefacció a les arrels i el coll de la planta de l'ametller. Els fongs formadors de micorrizes són un tipus de fongs que degut a la seva capacitat de fer simbiosi amb la planta, afavoreixen la captació de nutrients i aigua, essent una solució per millorar la salut de la planta i així controlar la malaltia. La hipòtesi d'aquest treball és que la inoculació de plantes d'ametller amb fongs formadors de micorrizes podrien proporcionar tolerància a la malaltia i modificar el metaboloma de la planta. Per tal de validar aquesta hipòtesi, es van fer servir dos fongs formadors de micorrizes (*Rhizoglonus irregulare* i *Rhizoglonus intraradices*) i el fong patògen (*Phytophthora cactorum*). La cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses ha permès desenvolupar i validar un mètode per la detecció de 16 compostos relacionats amb la defensa de les plantes. En futurs treballs, es tractaran les dades obtingudes, per trobar correlacions entre les mostres i lligar aquesta informació amb els compostos estudiats. Aquesta informació serà clau per entendre millor les vies metabòliques i les interaccions entre l'ametller, el patogen i els fongs formadors de micorrizes.

Title: UHPLC-ESI-MS/MS for the Evaluation of Changes in the Phytochemical Composition of Mycorrhized Almond Trees (*Prunus dulcis*) in Response to *Phytophthora spp.* Infection

Student: Aina Cuixart

Director: Oscar Nuñez

Phytophthora spp. is a pathogen that causes rot in the roots and neck of the almond tree. Mycorrhizal fungi are a type of fungus that due to their ability to form symbiosis, promote the uptake of nutrients and water, being a solution to improve the health of the plant and thus control the disease. The hypothesis of this work is that inoculation of almond plants with mycorrhizal fungi could provide disease tolerance and modify the plant's metabolome. In order to validate this hypothesis, two mycorrhizal-forming fungi (*Rhizoglyphus irregularis* and *Rhizoglyphus intraradices*) and the pathogenic fungus (*Phytophthora cactorum*) were used. A LC-MS/MS method was developed and validated for the detection of 16 compounds related to plant defense. In future work, data obtained will be treated, to find correlations between the samples and link this information with the studied compounds. This information will be key understand of metabolic pathways and interactions between almond, pathogen, and mycorrhizal fungi.

Summary

Biogenic amines (BAs) are basic compounds with a low molecular mass that participate in metabolic pathways of living beings. BAs as a biologically active molecules can take part in multiple cellular functions but can be toxic in high amounts. The determination of BAs in food products has an increasing interest because of their implications in toxicological and food quality issues.

In general, BAs have poor absorptions within the UV-Visible region, so they have to be derivatized to improve their sensitivity and selectivity of detection.

A novel HPLC method for determining biogenic amines in sparkling wine samples is described. It involves pre-column derivatization of the analytes with 1,2-naphthoquinone-4- sulfonate (NQS) and liquid-liquid extraction of derivatives with chloroform for analyte preconcentration and sample clean-up. A linear gradient elution based on 0.1% of formic acid aqueous solution and acetonitrile is used to separate the amine derivatives in a C8 column. The eluted compounds are detected spectrophotometrically at 480 nm.

The optimization of derivatization conditions for determining histamine, tyramine, tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, spermine and spermidine in sparkling wines is accomplished. Furthermore, a study of the stability of these derivatives has been carried out for one month.

In collaboration with Raventós Codorníu SA., the proposed method has been applied to the analysis of samples of sparkling wine from different coupage, vinification and aging.

Keywords: Biogenic amines; Derivatization; NQS; High-performance liquid chromatography (HPLC); Wines; Sparkling Wines.

Resum

Les amines biògenes (BAs) són compostos bàsics amb una baixa massa molecular que participen en les vies metabòliques dels éssers vius. Les BAs com a molècules biològicament actives poden participar en múltiples funcions cel·lulars, però poden ser tòxiques en quantitats elevades. La determinació de les BAs en productes alimentaris té un interès creixent a causa de les seves implicacions en temes toxicològics i de qualitat alimentària.

En general, les BAs tenen una baixa absorció a la regió UV-Visible, de manera que han de ser derivatitzades per millorar la seva sensibilitat i selectivitat de detecció.

En aquest treball es descriu un nou mètode per determinar amines biògenes en mostres de cava per HPLC. Aquest implica la derivatització pre-columna dels analits amb NQS i l'extracció líquid-líquid del derivats amb cloroform per a la preconcentració de l'analit i el *clean-up* de la mostra. Per separar els derivats de les BAs en una columna C8 s'utilitza una elució de gradient lineal que consisteix en una barreja del 0,1% de solució aquosa d'àcid fòrmic i acetonitril. Els compostos eluïts es detecten espectrofotomètricament a 480 nm.

S'ha realitzat l'optimització de les condicions de derivatització per determinar histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, espermina i espermidina en caves. A més, durant un mes s'ha dut a terme un estudi de l'estabilitat d'aquests derivats.

En col·laboració amb Raventós Codorníu SA., el mètode proposat s'ha aplicat a l'anàlisi de mostres de caves de diferent cupatge, vinificació i cria.

Paraules clau: Amines Biògenes; Derivatització; NQS; Cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC); Vins; Caves.

SUMMARY

Primary aromatic amines (PAAs) are organic substances that are present in some plastic materials and can be transferred from containers or kitchen utensils to foodstuffs. Some of these amines may have carcinogenic effects in humans and, for this reason, it is necessary to develop analytical methods to detect and quantify PAAs in plastic materials, containers, and food.

Nowadays, although mass spectrometry has become an almost indispensable tool in many analytical laboratories working in the field of food safety, many of the analyses require prior tedious sample treatment and chromatographic separation to detection or determination. These procedures are often the slowdown of many food control laboratories.

In the last decade, desorption/ionization methods at atmospheric pressure have been developed and they allow rapid direct analysis of any type of sample, with minimal or without additional sample treatment or chromatographic separation. These methods are named Ambient Ionization Mass Spectrometry (AIMS).

In this master's thesis, three AIMS techniques, desorption electrospray ionization (DESI), paper spray ionization (PSI) and direct analysis in real time (DART), have been studied to explore their applicability in the analysis of PAAs in materials that can come into contact with food and in the food itself, to develop methods that can be implemented in food control laboratories and that can increase their productivity.

Keywords: Primary aromatic amine (PAA), Ambient Ionization Mass Spectrometry (AIMS), desorption electrospray ionization (DESI), paper spray ionization (PSI), direct analysis in real time (DART).

Project: Direct analysis of primary aromatic amines by mass spectrometry: materials in contact with food and packaged foods

Student: Adriana Alí Cladellas

Tutor: PhD Encarnación Moyano Morcillo

RESUMEN

Las aminas primarias aromáticas (PAAs) son sustancias orgánicas que están presentes en algunos materiales plásticos y pueden ser transferidas de los envases o de los utensilios de cocina que estén hechos con estos materiales a los alimentos que entran en contacto con ellos. Algunas de estas aminas han resultado ser cancerígenas para los humanos y, por este motivo, es necesario desarrollar métodos analíticos que permitan su detección y cuantificación en los propios materiales y en los alimentos.

Aunque hoy en día, la espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta casi indispensable en muchos laboratorios analíticos que trabajan en el campo de la seguridad alimentaria, muchos de los análisis requieren un tratamiento de muestra (laborioso y tedioso) y una separación cromatográfica previos a la detección/determinación por espectrometría de masas. Estos procedimientos suelen ser el cuello de botella de muchos laboratorios de control alimentario.

En esta última década se han empezado a desarrollar métodos de desorción/ionización a presión atmosférica que hacen posible el análisis rápido por espectrometría de masas de cualquier tipo de muestra evitando los tediosos tratamientos de muestra y separaciones cromatográficas. Estos métodos se denominan *Ambient Ionization Mass Spectrometry* (AIMS).

En este trabajo de fin de máster se han estudiado tres técnicas AIMS, *desorption electrospray ionization* (DESI), *paper spray ionization* (PSI) y *direct analysis in real time* (DART), para explorar su aplicabilidad en el análisis de PAAs en materiales que pueden entrar en contacto con los alimentos y en los propios alimentos, con el objetivo de desarrollar métodos que puedan implementarse en los laboratorios de control alimentario y que permitan aumentar su productividad.

Palabras clave: *Primary aromatic amine* (PAA), *Ambient Ionization Mass Spectrometry* (AIMS), *desorption electrospray ionization* (DESI), *paper spray ionization* (PSI), *direct analysis in real time* (DART).

Título: Análisis directo por espectrometría de masas de aminas primarias aromáticas: materiales en contacto con alimentos y alimentos envasados.

Alumna: Adriana Ali Cladellas

Tutora: Dra. Encarnación Moyano Morcillo

SUMMARY : *Estudi de la interacció entre fàrmacs i medis intestinals simulats*

During the drug discovery process, many studies about the bioavailability of drugs must be done. The *in vivo* bioavailability and action of drugs administered orally will depend on their absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME properties). These properties depend on drug physicochemical parameters such as pK_a , solubility or lipophilicity. To have a correct prediction of the *in vivo* behaviour of the drugs, it is essential to evaluate the physicochemical parameters under conditions that closely resemble the key parameters of human physiology, especially those of the gastrointestinal tract. Because it is ethically questionable to work directly with gastrointestinal fluids, scientists have begun to work with simulated gastrointestinal media. The studies of physicochemical parameters are now performed using fasted simulated intestinal fluid (FaSSIF) and/or fed simulated intestinal fluid (FeSSIF). Initial studies have shown that solubility and pK_a are different if they are measured in water or in simulated intestinal fluids. The main reason would be the existence of interactions between drugs and components of simulated intestinal fluids such as micelles. Therefore, the present study is focused on the evaluation of these interactions.

In this work, the binding constant (K_b) of diflunisal to FeSSIF has been evaluated in the presence and absence of micelles using fluorescence spectroscopy. On the one hand, a K_b of 766 ± 28 has been obtained when there are not micelles. On the other, in presence of micelles, a K_b of 106 ± 26 has been obtained. Also, the critical micelle concentration (CMC) of the simulated FeSSIF media has been measured and a value of 3.52 mM has been obtained, similar to the one reported in the literature. Finally, a comparison of binding constants has been performed from results of the research group of PhysChem.

RESUM: Estudi de la interacció entre fàrmacs i medis intestinals simulats

Durant el procés de descobriment de fàrmacs, cal fer molts estudis sobre la biodisponibilitat dels medicaments. La biodisponibilitat i acció *in vivo* dels medicaments administrats per via oral dependran de la seva absorció, distribució, metabolisme i excreció (propietats ADME). Aquestes propietats depenen de paràmetres fisicoquímics de fàrmacs com pK_a , la solubilitat o la lipofilitat. Per aconseguir una bona predicció del comportament *in vivo* dels fàrmacs, és molt important avaluar els paràmetres fisicoquímics en condicions que s'assemblen molt als paràmetres clau de la fisiologia humana, especialment les del tracte gastrointestinal. Com que és èticament qüestionable treballar directament amb fluids gastrointestinals, els científics han començat a treballar amb medis gastrointestinals simulats. Els estudis de paràmetres fisicoquímics actualment es realitzen en els fluids intestinals simulats de dejuni (FaSSIF) i/o alimentat amb fluid intestinal simulat (FeSSIF). Els primers estudis han demostrat que la solubilitat i el pK_a són diferents si es mesuren en aigua o en fluids intestinals simulats. El motiu principal seria l'existència d'interaccions entre fàrmacs i components de fluids intestinals simulats com les micel·les. Per tant, el present estudi se centra en l'avaluació d'aquestes interaccions.

En aquest treball, s'ha valorat la constant d'unió (K_b) del diflunisal en FeSSIF en presència i absència de micel·les mitjançant espectroscòpia de fluorescència. D'una banda, s'ha obtingut un K_b de 766 ± 28 quan no hi ha micel·les. D'altra banda, en presència de micel·les, s'ha obtingut una K_b de 106 ± 26 . També es va mesurar la concentració micel·lar crítica (CMC) dels medis simulats FeSSIF i s'ha obtingut un valor de 3,52 mM, similar al trobat a la literatura. Finalment, s'ha fet una comparació de constants d'unió a partir dels resultats del grup de recerca PhysChem.

Analysis of arsenic species in food by HPLC-ICP-MS: optimization of methodologies and development of tools for quality control of results

Arsenic, due to the diversity of forms that it presents, is easily absorbed by many organisms, resulting in its bioaccumulation. The arsenic species in the environment are classified into organic species and inorganic species, with inorganic species being more toxic than organic ones.

As arsenic is found in many places, many of the foods consumed today contain arsenic, which is transferred to them by different means. It is important to know which arsenic species are present in each type of food, as each arsenic species differs in its toxicity.

Edible algae, a type of food that contain arsenic and that its consumption is growing around the world, contain the major part of their arsenic in compounds called arsenosugars. The most common arsenosugars have as functional groups a glycerol (cation), a phosphate, a sulfate or a sulfonate (anions). The main problem in this research area is that there is no commercial availability of arsenosugar standards.

The objective of this work is to optimize the working conditions of a preparative chromatographic technique to obtain and characterize standards for each arsenosugar using a sample of *Fucus vesiculosus* algae.

In this project, the algae has been characterized using an HPLC-ICP-MS technique and it has been found to contain all four arsenosugars. The separation conditions of the anionic arsenosugars have been optimized by preparative liquid chromatography and fractions of the sulfonate and sulfate arsenosugars have been obtained, while the phosphate arsenosugar has not been isolated. SPE analyses have been performed with the isolated sulfonate arsenosugar to purify and preconcentrate it and the expected results have not been obtained. To achieve them, it would be necessary to optimize the working conditions of the SPE analysis in subsequent studies. Finally, a SOP that describes how the liquid chromatograph should be used to carry out the fractionation studies has been written.

Análisis de especies de arsénico en alimentos por HPLC-ICP-MS: optimización de metodologías y desarrollo de herramientas para el control de calidad de los resultados

El arsénico, debido a la diversidad de formas que presenta, es fácilmente absorbido por muchos organismos, resultando en su bioacumulación. Las especies de arsénico en el medio ambiente se clasifican en especies orgánicas y en especies inorgánicas, siendo las inorgánicas más tóxicas que las orgánicas.

Debido a que el arsénico se encuentra en multitud de lugares, muchos de los alimentos que se consumen hoy en día contienen arsénico, el cual se transfiere a éstos por distintos medios. Es importante conocer qué especies de arsénico contiene cada alimento, pues cada especie de arsénico difiere en su toxicidad.

Las algas comestibles, alimentos que contienen arsénico y que su consumo está creciendo, contienen gran parte de su arsénico en unos compuestos llamados arsenoazúcares. Los más comunes tienen como grupos funcionales un glicerol (catión), un fosfato, un sulfato o un sulfonato (aniones). El principal problema en esta área de investigación es que no hay disponibilidad comercial de patrones de arsenoazúcares.

El objetivo de este trabajo es optimizar las condiciones de trabajo de una técnica cromatográfica preparativa con el fin de obtener patrones de cada arsenoazúcar utilizando una muestra de alga *Fucus vesiculosus*.

En este proyecto, se ha caracterizado el alga mediante la técnica HPLC-ICP-MS y se ha visto que contiene los cuatro arsenoazúcares. Se han optimizado las condiciones de separación de los arsenoazúcares aniónicos mediante cromatografía de líquidos preparativa y se han obtenido fracciones de los arsenoazúcares de sulfonato y de sulfato, mientras que el arsenoazúcar de fosfato no se ha logrado aislar. Se han hecho análisis de SPE con el arsenoazúcar de sulfonato aislado para purificarlo y preconcentrarlo y no se han obtenido los resultados esperados. Para lograrlos, habría que optimizar las condiciones de trabajo del análisis de SPE en estudios posteriores. Finalmente, se ha redactado un PNT que describe cómo se debe emplear el cromatógrafo de líquidos para llevar a cabo los estudios de fraccionamiento.

Summary

Metabolomics can be defined as the measurement of the concentration level of intracellular and extracellular metabolites to obtain characteristic profiles. These profiles provide direct information on metabolic phenotypes, which can be later related with other omics sciences as genomics and proteomics. Amino acids are an important part of metabolome as they are the basic structural units of proteins and they also have relevance in metabolic pathways. One of the most appropriate techniques for amino acid analysis is capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS). CE allows the separation of amino acids as a function of their charge-to-mass ratio and MS an accurate detection and characterization for an unambiguous identification and quantification.

In the present study, a CE-MS method for the analysis of 31 amino acids has been developed using a new CE-MS instrument with a Q-TOF mass spectrometer and a triple tube sheath liquid (SL) interface adapted to *JetStream* technology. Different operational variables related to the CE-MS interface, the BGE for the CE separation and other parameters from the mass spectrometer ionization source were optimized. Under the optimized conditions, a good separation and detection of 31 amino acids in less than 12 min was achieved, with good repeatability in the electrophoretic peak areas and migration times (average values of the relative standard deviation in percentage (%RSD) were 3% and 0,3% , respectively). The BGE used was 1 mol/L formic acid (HFor), and the SL 0,05% (v/v) HFor in 60:40 (v/v) isopropanol:water delivered at a flow rate of 8 $\mu\text{L}/\text{min}$. In the best cases, the method was linear between 0,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ and 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (coefficients of determination, $R^2 > 0,99$), with LODs slightly lower than 0,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$. With these quality parameters, the method shows potential for its future application in metabolomic studies using biological fluids. Previously, the development of appropriate off-line (conventional) and on-line sample pretreatment methods for biological samples will be needed.

Keywords: Amino acids; capillary electrophoresis-mass spectrometry; targeted metabolomics.

Resum

La metabolòmica es pot definir com la mesura dels nivells de concentració dels diferents metabòlits, tant intracel·lulars com extracel·lulars, per obtenir perfils característics. Aquest perfils donen informació directa sobre els fenotips metabòlics, que poden relacionar-se més tard amb altres ciències òmiques com la genòmica i la proteòmica. Els aminoàcids són una part important del metaboloma degut a que són les unitats estructurals bàsiques que formen les proteïnes i també tenen rellevància en les rutes metabòliques. Una de les tècniques més adequades per a l'anàlisi d'aminoàcids és l'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (CE-MS). La CE permet al separació dels aminoàcids en funció de la seva relació càrrega-massa, i la MS una detecció i caracterització precisa per quantificar-los i identificar-los inequívocament.

En aquest estudi, s'ha desenvolupat un mètode de CE-MS per a l'anàlisi de 31 aminoàcids emprant un nou instrument de CE-MS que disposa d'un espectròmetre de masses Q-TOF amb una interfase de sheath líquid (SL) de triple tub adaptada a la tecnologia *JetStream*. S'han optimitzat diferents variables operacionals relacionades amb la interfase de CE-MS, el BGE per la separació en CE i d'altres paràmetres de la font d'ionització de l'espectròmetre de masses. En les condicions optimitzades s'ha obtingut una bona separació i detecció de 31 aminoàcids en menys de 15 min, amb bones repetibilitats en àrees dels pics electroforètics i temps de migració (valors mitjans de desviació estàndard relativa en percentatge (%RSD) del 3% i 0,3%, respectivament). El BGE emprat era àcid fòrmic (HFor) 1 mol/L, i el SL HFor 0,05% (v/v) en isopropanol:aigua 60:40 (v/v) a 8 µL/min. En els millors casos, el mètode era lineal entre 0,5 µmol/L i 250 µmol/L (coeficients de determinació, $R^2 > 0,99$), amb LODs lleugerament inferiors a 0,5 µmol/L. Amb aquests paràmetres de qualitat el mètode presenta potencial per a la seva futura aplicació a estudis metabolòmics amb fluid biològics. Abans s'hauran de desenvolupar mètodes adequats pel pretractament de les mostres biològiques, convencionals (*off-line*) i en línia (*on-line*).

Paraules Clau: Aminoàcids; Electroforesi capil·lar-espectrometria de masses; Metabolòmica dirigida.