

# **Treballs Final de Master 17 - 18**

Màster Química Analítica

Universitat de Barcelona

# **Desenvolupament de nanopartícules de plata estabilitzades amb cadenes de DNA.**

**Juan Fernando García Eguiguren**

**Director: R. Gargallo**

## **SUMMARY**

Nucleic acids carry out a wide range of different processes in the body. They play important regulatory functions in biological systems, especially in the regulation of gene expression. Due to their role in physiological and pathological processes, an alternative expression of some nucleic acids has been associated with viral infections, cardiovascular disorders, and several types of cancers.

In fact, nucleic acids have been used as biomarkers for several diseases and their detection can provide valuable diagnostics and prognostic data. However, detection and quantification of these structures is a very challenging task -the detection methods need to be highly sensitive and selective for small amounts of complex samples- given their intrinsic properties, such as short length, low abundance and large variation in base composition.

In this context, the development of fast, low cost and simple analytical methods for the detection and quantification of DNA and RNA is a relevant task. In this study, we aim to employ DNA-AgNCs to detect nucleic acids. This new approach is based on two facts: the AgNCs optical properties, and the formation of triplex structures to improve the stability and sensibility of the AgNCs. In order to achieve these goals, the DNA-AgNCs and RNA-AgNCs were characterized by circular dichroism (CD) measurements, thermal denaturing curves and molecular fluorescence.

Also factors affecting the analytical method were optimized, mainly those regarding reduction conditions for the formation of AgNCs which yields the highest fluorescence properties. The highest fluorescence signals were those in presence of DNA triplex structures at pH = 4.7. In addition, AgNCs stabilized by triplex structures present great resistance in front of time and temperature, being able to see fluorescence some months later when being stored in suitable conditions (4°C).

This new approach is an essential step towards the development of an efficient and reliable method for the detection of nucleic acids for diagnostic purposes, as well as the development of applications in bioanalysis and cell-imaging.

## RESUMEN

Los ácidos nucleicos llevan a cabo una amplia gama de procesos en el organismo. Desempeñando importantes funciones, especialmente en la regulación de la expresión génica. Debido a su papel en los procesos fisiológicos y patológicos, una expresión alternativa de determinados ácidos nucleicos se ha relacionado con infecciones virales, trastornos cardiovasculares y algunos tipos de cáncer.

De hecho, los ácidos nucleicos se han usado como biomarcadores para varias enfermedades, donde su detección oportuna puede proporcionar un diagnóstico valioso. Sin embargo, la detección y cuantificación de estas estructuras es una tarea compleja -los métodos de detección deben ser suficientemente sensibles y selectivos para el análisis de pequeñas cantidades de muestras complejas-, debido a sus propiedades intrínsecas, como su tamaño pequeño, la baja abundancia y la infinidad de secuencias que se pueden originar a partir de la combinación de bases.

En este contexto, el desarrollo de un método analítico simple, rápido y de bajo costo para la detección y cuantificación de secuencias de DNA y RNA es una tarea de gran importancia. En este estudio, se pretende emplear DNA-AgNC para detectar secuencias cortas de ácidos nucleicos. Este nuevo enfoque se basa principalmente en dos hechos: las propiedades ópticas de los AgNC y la formación de estructuras triplex para mejorar la estabilidad y la sensibilidad de los AgNC. Para lograr estos objetivos, los DNA-AgNC y RNA-AgNC se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas de absorción molecular, dicroísmo circular (CD) y fluorescencia molecular.

Además, se optimizaron algunos parámetros de síntesis de AgNC, principalmente aquellos relacionados con las condiciones de reducción para la formación de AgNC que produce las propiedades de fluorescencia más altas. Las señales de fluorescencia con mayor intensidad fueron aquellas obtenidas a partir de la síntesis de AgNC con de DNA a pH = 4,7. Se observa también que los AgNCs estabilizados por estructuras triplex presentan una gran resistencia frente al tiempo y la temperatura, pudiéndose ver fluorescencia incluso algunos meses almacenados en condiciones adecuadas (4°C).

Este nuevo enfoque es un paso esencial hacia el desarrollo de un método eficiente y con gran sensibilidad para la detección de ácidos nucleicos con fines de diagnóstico, así como para el desarrollo de diversas aplicaciones en bioanálisis e imagen celular.

# Desenvolupament d'un mètode analític per a la determinació d'àcids orgànics en mostres de vins i escumosos mitjançant HPLC-UV/Vis

Aida Carretero Coo

Director: Dr. Javier Saurina

## RESUM

El vi i el cava sempre han estat molt ben valorats per la societat per les seves propietats organolèptiques. Aquests tenen una composició particular relacionada directament amb els nivells d'àcids orgànics de baix pes molecular que presenten un paper important i són components claus de la seva qualitat, ja que són indicadors d'estabilitat, vinificació i/o estat de conservació. Els mètodes analítics utilitzats per les empreses vitivinícoles són complexos i proporcionen resultats poc acurats. Per aquesta raó, es requereix un nou mètode analític selectiu, ràpid, robust i assequible, capaç de determinar els 8 àcids orgànics majoritaris simultàniament.

En aquest projecte s'ha desenvolupat un mètode basat en la cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC) amb detecció per espectroscòpia UV-Vis (210 nm), amb una columna especialment recomanable per compostos polars (150 x 4,6 mm, 5µm), una fase mòbil ACN – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5:95% (v/v) a pH 2, un cabal de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>, un volum d'injecció de 10 µL, temperatura ambient i un temps d'anàlisi de 12 minuts per mostra. Els resultats de la validació estableixen uns paràmetres amb coeficients de determinació (0,9926 – 0,9993), reproductibilitat de l'àrea de pic i temps de retenció (RSD% < de 14,70 i 0,30, respectivament), exactitud (89 – 121%), límits de detecció (0,5 – 6,6 mg·L<sup>-1</sup>) i quantificació (1,5 – 19,8 mg·L<sup>-1</sup>) i una excel·lent selectivitat entre els analits. Aquests paràmetres es consideren acceptables per a l'aplicació del mètode en la identificació i quantificació d'àcids orgànics en matrius d'aquest tipus.

Els àcids cítric, màlic i tartàric són els més abundants en les mostres i permeten diferenciar-les segons la varietat de raïm i el cupatge. Aquest fet és important pel seu control de qualitat i aplicació de correccions per a la millora de les propietats organolèptiques.

Addicionalment, fent un ús adequat d'alguna de les tècniques quimomètriques més emprades (PCA) s'han pogut establir relacions molt significatives entre les concentracions dels diferents àcids orgànics i les varietats de raïm i cupatges. Com a conseqüència, s'obre un ampli ventall de possibilitats per explorar l'ús de la quimiometria aplicada en la indústria vitivinícola.

## **ABSTRACT**

Wine and sparkling wine are highly valued in our society for their organoleptic properties. These have a particular composition related with the low molecular weight organic acids levels which presents an important role and are key components of their quality, as they are indicators of stability, winemaking and/or conservation. The analytical methods used for winemaking companies are complex and they provide unsuccessful results. For this reason, a new selective, fast, robust and affordable analytical method is required, capable of determining 8 main organic acids simultaneously.

In this project, a method based on high performance liquid chromatography (HPLC) with UV-Vis spectroscopy (210 nm) detection, with a column highly recommended for polar compounds (150 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m), a mobile phase ACN – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5:95% (v/v) at pH 2, a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, an injection volume of 10  $\mu$ L, at room temperature and run time of 12 minutes per sample has been developed. The results of the validation establish coefficient of determination (0.9926 – 0.9993), reproducibility of peak area and retention time (RSD% < 14.70 i 0.30, respectively), recovery (89 – 121%), detection limits (0.5 – 6.6 mg·L<sup>-1</sup>) and quantification (1.5 – 19.8 mg·L<sup>-1</sup>) and an excellent selectivity among the analytes. These figures of merit are considered acceptable for application in the identification and quantification of organic acids in these types of matrices.

Citric, malic and tartaric acids are those found in greater proportion in the samples and allow the differentiation according to the grape variety and the coupage. This fact is important for a permanent quality control and application of corrections for the improvement of organoleptic properties.

In additional, the use of one of the most used chemometric techniques (PCA) has allowed establishing a significant relationship between the concentration of organic acids and the varieties of grapes and coupage. As a consequence, a wide range of possibilities is opened in order to explore the use of chemometrics applied to the field of winemaking industries.

## **Characterization of the glycosylation of recombinant erythropoietin's by separation techniques and mass spectrometry.**

Marina Saball, Estela Giménez i Victòria Sanz

Glycosylation of proteins is the covalent attachment of carbohydrates, known as glycans, to the peptide backbone. Glycoproteins are known to be responsible for a wide variety of biological processes. Hence, a modification of the normal glycosylation profile of a certain glycoprotein can have consequences.

Recombinant human erythropoietin (rhEPO) is a glycoproteic hormone which has been used for the treatment of anaemia associated with different diseases such as cancer, HIV and rheumatoid arthritis. Nowadays, rhEPO has also been proved to be highly valuable and efficient for its neuroprotective effects in some animals with injuries in the nervous system. rhEPO has demonstrated to reduce the neuronal death and the number of cerebral strokes. Nevertheless, it is associated with a high danger when it is used systematically because it can produce lethal problems, such as myocardium strokes, strokes and so. For that reason, an erythropoietin with less content of sialic acids (EBCS), which it is obtained during the biotechnological production of an erythropoietin with higher sialic acid content (EACS, a rhEPO), has been developed to maintain the ability to protect the nervous tissue without stimulating erythropoiesis. Apart from that, EBCS does not present any modification in the peptide sequence that differentiate it from the endogenous EPO. All the reasons listed above, make EBCS one of the most promising proposals for the treatment of chronic and acute neurodegenerative diseases.

Nevertheless, there is a lack of detailed information about its structure and the glycosylation pattern, and the differences compared to rhEPO. For this purpose, it is necessary to perform the characterization of both EBCS and EACS. So that it would be possible to compare both glycoproteins, and consequently, the glycosylation pattern. In the present work, characterization of these glycoproteins at three different levels was carried out. The different approaches consist in the analysis of intact protein based on capillary electrophoresis with ultraviolet detection (CE-UV). Followed by analysis of glycans through zwitterionic hydrophilic interaction capillary liquid chromatography mass spectrometry ( $\mu$ ZIC-HILIC-MS). And finally, the analysis of glycopeptides by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS).

The CE-UV methodology showed the best separation of EBCS and EACS glycoforms at pH 6. Nevertheless, the composition of the background electrolyte (BGE) must be optimized to obtain an adequate method for both. The method carried out for glycan characterization showed that EBCS has higher content of less sialylated N-glycans than EACS and rhEPO. Finally, the results obtained with glycopeptides confirmed the results taken with glycans, although, only two glycosylation points were analysed: O<sub>126</sub> and N<sub>83</sub>.

## **Caracterització de la glicosilació d'eritropoetines recombinants emprant tècniques de separació i espectrometria de masses.**

Marina Saball, Estela Giménez i Victòria Sanz

La glicosilació de les proteïnes és la unió covalent dels carbohidrats, també coneguts com glicans, a la cadena peptídica. Les glicoproteïnes són responsables d'una gran varietat de processos biològics i, per tant, una modificació en el perfil de glicosilació pot tenir conseqüències.

L'eritropoetina humana recombinant (rhEPO) és una hormona glicoproteica que s'ha utilitzat per al tractament de l'anèmia associada a diferents malalties com el càncer, el VIH i l'artritis reumatoide. Actualment, també s'ha demostrat que la rhEPO és altament valuosa i eficient pels seus efectes neuroprotectors en alguns animals que presenten lesions en el sistema nerviós. La rhEPO ha demostrat reduir la mort neuronal i el nombre d'isquèmies cerebrals. No obstant, hi ha un elevat risc quan s'administra sistemàticament ja que pot produir problemes letals com infarts de miocardi, accidents cerebrovasculars, etc. És per aquest motiu que s'ha desenvolupat una eritropoetina amb menys contingut d'àcids siàlics (EBCS), que s'obté durant la producció biotecnològica d'una eritropoetina amb major contingut d'àcids siàlics (EACS, una rhEPO), i que manté la capacitat protectora del teixit nerviós sense estimular l'eritropoesi. A part d'això, l'EBCS no presenta cap modificació en la seqüència de pèptids que la distingeixi de l'EPO endògena. Tots aquests motius esmentats, fan que l'EBCS sigui una de les propostes més prometedores per al tractament de malalties neurodegeneratives cròniques i agudes.

Tanmateix, no hi ha suficient informació de la seva estructura ni del patró de glicosilació, així com tampoc de les diferències que presenta respecte a la rhEPO. Per això, és necessari realitzar la caracterització de l'EBCS i l'EACS i poder comparar les dues glicoproteïnes i, en conseqüència, el patró de glicosilació. En el present treball, es va realitzar la caracterització d'aquestes glicoproteïnes en els tres nivells. Les diferents aproximacions consisteixen en l'anàlisi de la proteïna intacta mitjançant electroforesis capil·lar amb detecció ultraviolada (CE-UV). Seguit de l'anàlisi dels glicans per cromatografia de líquids capil·lar d'interacció hidrofílica zwitteriònica acoblada a l'espectrometria de masses ( $\mu$ ZIC-HILIC-MS). I finalment, l'anàlisi dels glicopèptids per electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (CE-MS).

Amb la metodologia CE-UV es va observar que la millor separació per a les glicofomes de l'EBCS i l'EACS era a pH 6. No obstant, la composició de l'electròlit de separació (BGE) s'ha d'optimitzar per tal d'obtenir un mètode adequat per a ambdues glicoproteïnes. Amb la caracterització dels glicans es va corroborar que l'EBCS presenta un major nombre d'estructures de N-glicans amb menor contingut d'àcids siàlics en relació a l'EACS i la rhEPO. Finalment, els resultats adquirits amb l'anàlisi dels glicopèptids van confirmar els resultats obtinguts amb els glicans, tot i que només es van analitzar dos punts de glicosilació: l'O<sub>126</sub> i l'N<sub>83</sub>.





**EVALUATION OF POLYMERIC MONOLITHIC MICROCARTRIDGES MODIFIED WITH GOLD NANOPARTICLES FOR THE PRECONCENTRATION OF PROTEINS BY ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION TO CAPILARY ELECTROPHORESIS-MASS SPECTROMETRY**

Gemma Marin, Fernando Benavente, Victòria Sanz

Capillary electrophoresis (CE) is a separation method used for the characterization of complex proteins. It is particularly useful due to its high resolution, high efficiency, short analysis time and low reactive and sample consumption. The main disadvantage of this technique is its limited sensitivity in concentration units, therefore, different alternatives have been developed to decrease the limits of detection (LODs) such as the on-line coupling of solid phase extraction (SPE-CE), which allows preconcentrating and purifying the analytes present in a large sample volume before the electrophoretic separation.

In the present study, polymeric monolithic microcartridges modified with gold nanoparticles, which allow the selective capture of compounds with amino and thiol groups, have been evaluated. Transthyretin (TTR), a protein biomarker related to a neurodegenerative disease called familial amyloidotic polyneuropathy, has been used to optimize an on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry (SPE-CE-MS) method. It has been observed that the protein must be loaded into the microcartridge at a pH near to its isoelectric point (pI 5.4) in order to achieve the maximum recovery. A 10 mM ammonium acetate buffer has been used at pH 5.0 to load the sample and as a separation electrolyte. Subsequently, it is necessary to inject a solution with an appropriate composition and pH to carry out the elution. Different eluents have been evaluated, of which a solution of 30 mM ammonium phosphate at pH 9.0 resulted in the best results. Under the optimized conditions, LODs for TTR by SPE-CE-IT-MS are 50 times lower than by CE-IT-MS (5 vs 250 mg L<sup>-1</sup>). These LODs can be slightly improved by SPE-CE-TOF-MS (~1 mg L<sup>-1</sup>). These LODs are very similar than the values that were obtained using immunoaffinity microcartridges with intact antibodies against TTR (1 mg L<sup>-1</sup> by SPE-CE-TOF-MS), in previous works of the group. The SPE-CE-IT-MS method is linear between 5 and 25 mg L<sup>-1</sup> of TTR. Further, repeatability in migration times and peak areas are similar to CE-IT-MS (2.3 and 6.0%, respectively), and the microcartridges can be used more than 10 analyses. The optimized method is ready to be applied to analyse TTR in serum samples after selecting an appropriate sample pretreatment to avoid the interference of the sample matrix.

## **AVALUACIÓ DE MICROPARTUTXOS MONOLÍTICS POLIMÈRICS MODIFICATS AMB NANOPARTÍCULES D'OR PER A LA PRECONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES PER EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA EN LÍNIA A L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES**

Gemma Marin, Fernando Benavente, Victòria Sanz

L'electroforesi capil·lar (CE) és una tècnica de separació utilitzada per a la caracterització de proteïnes complexes. És especialment útil gràcies a l'elevada resolució, l'alta eficàcia, els temps d'anàlisi curts i el baix consum de reactius i mostres. El principal desavantatge d'aquesta tècnica és la limitada sensibilitat en unitats de concentració. Per això, s'han desenvolupat diferents alternatives per reduir els límits de detecció (LODs), com l'extracció en fase sòlida en línia a l'electroforesi capil·lar (SPE-CE), que permet la preconcentració i purificació dels anàlits presents en un gran volum de mostra abans de la separació electroforètica.

En aquest estudi s'han avaluat microcartutxos monolítics polimèrics modificats amb nanopartícules d'or, que permeten la captura selectiva de compostos amb grups amino i tiol. La transtiretina (TTR), una proteïna biomarcadora que està relacionada amb una malaltia neurodegenerativa anomenada polineuropatia familiar amiloide, s'ha utilitzat per optimitzar un mètode d'extracció en fase sòlida en línia a l'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (SPE-CE-MS). S'ha observat que cal introduir la proteïna al microcartutx a un pH proper al seu punt isoelèctric (pI 5,4) per així aconseguir les màximes recuperacions. S'ha emprat una solució tampó d'acetat d'amoni 10 mM a pH 5,0 per a la introducció de la mostra i també com a electròlit de separació (BGE). A continuació, és necessari injectar una solució amb una composició i un pH adequat per a l'elució. Dels diferents eluents avaluats, el que ha donat els millors resultats ha estat una solució de dihidrogenfosfat d'amoni 30 mM a pH 9,0. Emprant les condicions optimitzades, els LODs per a l'anàlisi de la TTR per SPE-CE-IT-MS són 50 vegades inferiors que per CE-IT-MS (5 vs 250 mg L<sup>-1</sup>). Aquest LOD s'ha millorat lleugerament per SPE-CE-TOF-MS (~1 mg L<sup>-1</sup>). Aquests LODs són molt semblants al valor obtingut en un treball anterior del grup de recerca fent servir microcartutxos d'immunoafinitat amb anticossos intactes contra la TTR (1 mg L<sup>-1</sup> per IA-SPE-CE-TOF-MS). El mètode de SPE-CE-IT-MS és lineal entre 5 i 25 mg L<sup>-1</sup>. A més a més, els valors de les repetitivitats per al temps de migració i les àrees dels pics són similars als obtinguts per CE-IT-MS (2,3 i 6,0 %RSD, respectivament), i els microcartutxos es poden fer servir en més de 10 anàlisis. El mètode optimitzat està a punt per ser aplicat a l'anàlisi de la TTR en mostres de sèrum humà, després de seleccionar un pretractament de mostra apropiat i així evitar les interferències de la matriu.



## CHARACTERIZATION OF HILIC COLUMNS: RETENTION MODES AND SOLVENT VOLUMES

Lidia Redón, Xavier Subirats, Martí Rosés

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is an especially suitable tool for the determination of polar substances of biological interest. However, the mechanisms responsible for the chromatographic retention are complex and are still under study.

In this work a model based on linear free energy relationships (LFER) has been applied to obtain information about the predominant retention mode in the working chromatographic conditions and the volume of mobile phase inside the column. Using columns commonly employed in HILIC with stationary phases of different support (silica and polymeric) and functionalization (zwitterionic sulfobetaine and phosphorylcholine, pentafluorophenyl, and aminopropyl), the behavior of homologous series (*n*-alkylbenzenes and *n*-alkylphenones) in mobile phases containing different concentrations of acetonitrile and methanol has been studied. Both the retention mode and the mobile phase volume are significantly affected by the composition of the mobile phase and the nature of the organic solvent used.

Mobile phase volumes inside the column have also been measured by pycnometric methods using pure water, acetonitrile, and methanol, and mixtures of acetonitrile/water and methanol/water. The comparison of these values with those obtained by means of the LFER approach has allowed to obtain information about the relationship between the volumes of stationary and mobile phases inside the column.

## CARACTERITZACIÓ DE COLUMNES HILIC: MODES DE RETENCIÓ I VOLUMS DE SOLVENT

Lidia Redón, Xavier Subirats, Martí Rosés

La cromatografia líquida d'interacció hidrofílica (HILIC) és especialment adequada per a la determinació de substàncies polars d'interès biològic, però els mecanismes responsables de la retenció cromatogràfica són complexos i estan encara en fase d'estudi.

En aquest treball s'ha aplicat un model basat en relacions lineals d'energia lliure (LFER) que permet obtenir informació sobre el mode de retenció predominant en les condicions cromatogràfiques de treball i el volum de fase mòbil dins de la columna. Utilitzant columnes usades habitualment en HILIC amb fases estacionàries de diferent suport (sílice i polimèric) i funcionalització (zwitterions -sulfobetaines i fosforilcolines-, pentafluorofenils i aminopropils), s'ha estudiat el comportament de sèries homòlogues (*n*-alquilbenzens i *n*-alquilfenones) en fases mòbils que contenen diferents proporcions d'acetonitril i metanol. Tant el mode de retenció com el volum de fase mòbil es veuen significativament afectats per la composició de la fase mòbil i la naturalesa del solvent orgànic utilitzat.

Els volums de fase mòbil dins de la columna també s'han mesurat mitjançant mètodes picnomètrics utilitzant aigua, acetonitril i metanol purs, i també mescles d'ells. La comparació d'aquests valors amb els obtinguts mitjançant el mètode LFER permet obtenir informació sobre la relació de volums de les fases estacionària i mòbil dins de la columna.

## Evaluation of drug-protein binding interaction between antidepressive drugs and BSA/BSF.

A. Vega<sup>1</sup>, S. Amézqueta<sup>1</sup>, C. Ràfols<sup>1</sup>

1) *Department of chemical engineering and analytical chemistry, Section of analytical chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Two of the main plasma proteins which play a key role in the transport through the bloodstream of a great variety of substances are the Serum Albumin (SA) and Serum Fetuin (SF). They are synthesized in the liver and secreted into the bloodstream. SA and SF can transport a large number of endogenous substances such as fatty acids, hormones, metabolites, bile acids, amino acids and metals, and exogenous such as nutrients and drugs. The majority of the drugs are insoluble in the bloodstream because of their physico-chemical properties and they need a specific protein conveyor like SA or SF to arrive at the target organ. The drug-protein (D-P) interaction is an essential parameter to be able to predict the bioavailability of lots of drugs into the human body. This bioavailability depends on the interaction strength and its reversibility, which must be strong enough to enable the transport and weak enough to allow the drug release in the target organ and its therapeutic action. It also depends on several factors such as the affinity of the drug for the protein binding site and the presence of other drugs competing for the same site.

Nowadays, the main D-P interactions studies have been carried out with SA and there are a few scientific publications related with SF. For this reason additional studies are needed, so in this project the BSA and BSF D-P interactions have been studied.

In the present work, the technique used for the study of drug-protein interactions is the fluorescence spectrometry (FS). BSA and BSF are a fluorophores because they contain fluorescent amino acids in their structures: Phenylalanine, Tryptophan or Tyrosine. When the complex D-P is formed, which usually is not fluorescent, the BSA and BSF fluorescence decrease (it is quenched). Isothermal titration calorimetry (ITC) has been also used to evaluate D-P interactions, which measure the heat produced when an interaction occurs and allow calculating the binding constant ( $K_b$ ), the interaction stoichiometry ( $n$ ), the free energy ( $\Delta G$ ), the enthalpy ( $\Delta H$ ) and the entropy term ( $\Delta S$ ) of each interaction studied.

Three antidepressant drugs, Trazodone, Imipramine and Nortriptyline have been selected. First, the possible interferences of different fluorophores to the proteins have been evaluated to choose the optimal working conditions. Next, the D-P interactions have been studied by FS. The double logarithm Stern-Volmer equation relates the quenching effect extent with the  $K_b$  and  $n$  values of a D-P interactions. Finally, from ITC technique, it has been related the thermodynamic values obtained with the type of interaction produced between each drug with each protein. As a conclusion, all the drug-protein complexes are formed except Nortriptyline-BSF. The interaction stoichiometries of drug-protein complexes are 1:1 and  $K_b$  values obtained they are of the order of  $10^3$ - $10^4$ .

**Key words:** *Drug discovery, drug-protein binding, fluorescence spectrometry, isothermal titration calorimetry, BSA, HSA, BSF and  $\alpha$ 2-HS-glycoprotein.*

## **Evaluación de la interacción fármaco-proteína entre fármacos antidepresivos y BSA/BSF.**

A. Vega<sup>1</sup>, S. Amézqueta<sup>1</sup>, C. Ràfols<sup>1</sup>

*1) Departamento de ingeniería química y química analítica, Sección de química analítica, Universidad de Barcelona, Barcelona, España*

Dos de las proteínas plasmáticas más abundantes en la sangre humana, las cuales juegan un papel crucial en el transporte de una gran variedad de sustancias son la Albúmina Sérica (SA) y la Fetuina Sérica (SF). Ambas son sintetizadas en el hígado y segregadas a través del torrente sanguíneo. SA y SF pueden transportar sustancias endógenas como ácidos grasos, ácidos biliares, hormonas, metabolitos y metales, y sustancias exógenas como nutrientes y fármacos. La mayoría de fármacos son insolubles en el torrente sanguíneo a causa de sus propiedades físico-químicas y por esa razón necesitan un transportador proteico como la SA o la SF que los lleve hasta el órgano diana. La interacción fármaco-proteína (D-P), es un parámetro esencial capaz de medir la biodisponibilidad de muchos fármacos en el interior del cuerpo humano. La biodisponibilidad depende en gran medida de la fuerza de interacción y del grado de reversibilidad de dicha interacción, la cual debe ser lo suficientemente fuerte para poder realizar el transporte del fármaco y lo suficientemente débil para poder permitir la liberación del fármaco en su zona diana correspondiente para que pueda efectuar su acción terapéutica. Otros factores que pueden afectar a este parámetro es la afinidad del fármaco por el sitio de unión de la proteína y la presencia de otros fármacos que también interaccionen a través del mismo sitio.

Actualmente, la mayoría de estudios de interacción D-P se han llevado a cabo a partir de la SA y se han encontrado pocas publicaciones relacionadas con la SF. Por esa razón es necesaria la realización de más estudios y, en este proyecto, las interacciones D-P con la BSA y la BSF han sido estudiadas.

En el presente trabajo, la técnica utilizado para el estudio de las interacciones D-P es la espectrometría de fluorescencia (FS). La BSA y la BSF son sustancias fluoróforas debido a que sendas proteínas contienen aminoácidos fluorescentes como la Fenilalanina, el Triptófano o la Tirosina. Cuando se forma el complejo D-P, el cual generalmente no es fluorescente, la fluorescencia global de ambas proteínas disminuye (efecto de quenching). La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) también se ha usado para evaluar las interacciones D-P, la cual mide la calor producida cuando una interacción ocurre y permite calcular la constante de enlace ( $K_b$ ), la estequiometría de interacción ( $n$ ), la  $\Delta G$ , la  $\Delta H$  o la  $\Delta S$  para cada interacción estudiada.

Tres fármacos antidepresivos, Trazodona, Imipramina y Nortriptilina, han sido seleccionados. En primer lugar, las posibles interferencias de las diferentes especies fluoróforas de ambas proteínas han sido evaluadas para elegir las condiciones óptimas de trabajo. A continuación, las interacciones D-P han sido estudiadas por FS. La ecuación del doble logaritmo Stern-Volmer relaciona el grado de efecto quenching con el valor de  $K_b$  y su  $n$  de las interacciones D-P. Finalmente, a partir de ITC, se ha relacionado los valores termodinámicos obtenidos con el tipo de interacción producida entre cada fármaco con cada proteína. Como conclusión, todos los complejos fármaco-proteína se forman

excepto el complejo Nortriptilina-BSF y presentan una estequiometría de interacción 1:1 y unos valores de  $K_b$  del orden de  $10^3$ - $10^4$ .

**Palabras clave:** Descubrimiento de fármacos, interacción fármaco-proteína, espectrometría de fluorescencia, calorimetría isotérmica de titulación, BSA, HSA, BSF y  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína.



# Comportament de fàrmacs en fluids biològics simulats

Alumna: Nawal Ayada Amgar

Directores: Clara Ràfols i Elisabet Fuguet.

Departament de Química Analítica

## SUMMARY

Since most of drugs are orally taken, knowing how a drug behaves in the gastrointestinal tract is crucial for scientists. By having this information new delivery methodologies as well as novel and optimized formulations can be developed. Two of the most important parameters to take into account when studying a drug's behaviour are the acid dissociation constant, commonly known as pKa, and the solubility. Typically, both parameters are determined in aqueous solutions or in water/organic solvents mixtures, but often results cannot be extrapolated to human gastrointestinal tract conditions.

Since *in vivo* and *in vitro* experiments are laborious and expensive, in order to minimise the error in the determination of relevant drug parameters, formulations of simulated biological fluids have been developed. In this work two different simulations of fed and fasted state gastrointestinal fluids (FeSSIF and FaSSIF respectively) have been used with the objective of determining the pKa and solubility in biorelevant media.

All the studied compounds are bases or acids and therefore contain ionisable groups. The presence of those groups implies a difference on their form at different pHs and consequently a variation on their solubility.

The pKa of the compounds has been determined using two different techniques, potentiometry and UV spectrometry. The potentiometric method is the simplest and fastest consisting in a simple titration of the studied drug. UV spectrometry also consists in a titration while recording the spectra of the ionised and non-ionised forms of the molecule at different pH values. This last method was used for poorly soluble drugs as they cannot be accurately analysed through potentiometry.

To determine the solubility the Chasing Equilibrium method has been used which is a method validated through the Shake-Flask reference methodology. The Chasing Equilibrium method is based upon the fast precipitation and redissolution of the analyte in order to determine its intrinsic solubility.

As a result, after applying the mentioned methodologies, a significant variation of the acidity constant values and the solubility of the drugs has been observed when compared to the ones obtained in experiments where only water has been used as a solvent. The presence of micellizing agents in the simulated biological media, which enclose the

molecules in micelles, displaces the equilibrium towards the formation of neutral species, rather than the ionised ones, changing significantly their solubility and pKa.

## RESUM

Donat que la majoria de fàrmacs s'administren per la via oral, conèixer el comportament d'un fàrmac al tracte gastrointestinal és crucial per als científics. Al disposar d'aquesta informació es poden desenvolupar noves metodologies d'entrega, optimitzar fàrmacs ja existents i desenvolupar noves formulacions. Dos dels paràmetres més importants a tenir en compte a l'hora d'estudiar el comportament d'un fàrmac són la constant d'acidesa, coneguda com a pKa, i la solubilitat intrínseca. Normalment, els dos paràmetres es determinen en solucions aquoses o en barreges d'aigua/dissolvents orgànics, donant resultats que no es poden extrapolar a les condicions del tracte gastrointestinal humà.

Atès que els experiments *in vivo* i *in vitro* són laboriosos i cars, per tal de minimitzar l'error en la determinació de paràmetres farmacològics rellevants, s'han desenvolupat formulacions que simulen fluids biològics. En aquest treball s'han utilitzat dues simulacions de fluids gastrointestinals, una després de menjar i una en dejú (FeSSIF i FaSSIF respectivament) amb l'objectiu de determinar el pKa i la solubilitat intrínseca. Tots els compostos estudiats són bases o àcids i, per tant, contenen grups ionitzables. La presència d'aquests grups implica una diferència en la seva forma a diferents pH i, en conseqüència, una variació de la seva solubilitat.

El pKa dels compostos s'ha determinat utilitzant dues tècniques diferents, potenciometria i espectrofotometria UV. El mètode espectrofotomètric s'ha dut a terme per a aquells fàrmacs que son insolubles i que no es poden determinar mitjançant potenciometria.

Per determinar la solubilitat s'ha utilitzat el mètode "Chasing Equilibrium" que és un mètode validat per la metodologia de referència "Shake-Flask". El mètode "Chasing Equilibrium" es basa en la ràpida precipitació i redissolució de l'analit per determinar la seva solubilitat.

Com a resultat, després d'aplicar les metodologies esmentades, s'ha observat una variació significativa dels valors de les constants d'acidesa i la solubilitat dels fàrmacs en comparació amb els obtinguts en experiments on només s'ha utilitzat aigua com a dissolvent. La presència d'agents micel·lants en els mitjans biològics simulats, que envolten les molècules dels medicaments en micel·les, desplaça l'equilibri cap a la formació d'espècies neutres, en comptes de les ionitzades, canviant significativament la seva solubilitat i pKa.

# Efecte del polimorfisme en el solubilitat i velocitat de dissolució del fàrmac norfloxacina

Judit Ovejero

Directors: E. Fuguet, X. Subirats

## Abstract

Although the phenomenon of polymorphism has been known for more than fifty years, it has been acquired importance, especially in the pharmaceutical sector, because this phenomenon can be a cause of low absorption and bioavailability of some Active Pharmaceutical Ingredients (API), such as norfloxacin, the compound studied in this work. In fact, the polymorphism can affect the solubility and dissolution rate, essential properties for the absorption of drugs, for that reason, the priority for the pharmaceutical industries is select the best crystalline form for the formulation of a new medication.

The main objective of this study is the determination of the solubility and the dissolution rate, at different values of pH corresponding to the regions of the gastrointestinal tract, of different crystalline forms of norfloxacin (polymorph A, B and C, tetrahydrate and sesquihydrate), previously synthesized. The dissolution rate was determined using a rotary disk system developed by *Sirius Analytical*, and the solubility was determined by the reference Shake-Flask (S-F) method and CheqSol potentiometric method.

To obtain the different forms of interest, different protocols have been developed and optimized, changing the solvents, the oil bath temperature, the cooling time, among others. After the synthesis, it has been concluded that the polymorph C is the most stable form.

All crystalline forms studied of norfloxacin are completely dissolved in the stomach (pH 2) and, in this pH, all had the higher dissolution rate value. Also, we have seen that as the pH of the medium increases, the dissolution rate of these forms decrease significantly.

In the study of the solid state, the transformations between forms that can occur during a determination are important to know. The CheqSol potentiometric method allows the observation of these transformations. In addition, in this study we have seen that in the determination of solubility with CheqSol method, the temperature but also the weighted quantity of solid play an important role in the behaviour variations of the solubility. The comparison of solubility results among two methods, it has been observed that the solubility obtained in potentiometric method is slightly higher than the result obtained in

Shake-Flask method, this is due to the solid collected at the end of the determination is more amorphous respect S-F

## Resum

Malgrat que el fenomen del polimorfisme es coneix des de fa més de cinquanta anys, aquest ha anat adquirint molta importància en les darreres dècada, especialment en l'àmbit farmacèutic, ja que pot ser una causa de la baixa absorció i biodisponibilitat que presenten alguns principis actius farmacèutics (API), com és el cas de la norfloxacin, compost estudiat en el present treball. De fet, el polimorfisme pot afectar a la solubilitat i la velocitat de dissolució, propietats claus per l'absorció d'un fàrmac i les de major interès, per a les indústries, a la hora de seleccionar una determinada forma cristal·lina per a la formulació d'un nou medicament.

L'objectiu principal d'aquest estudi és la determinació de la velocitat de dissolució, a diferents pHs d'interès corresponents a les regions del tracte gastrointestinal, i la solubilitat de diferents formes cristal·lines de la norfloxacin (polimorf A, B i C, tetrahidrat i sesquihidrat), prèviament sintetitzades. La velocitat de dissolució s'ha determinat mitjançant un sistema de disc rotatori desenvolupat per *Sirius Analytical*, i la solubilitat s'ha determinat pel mètode de referència *Shake-Flask* (S-F) i el mètode potenciomètric *CheqSol*.

Per l'obtenció de les diferents formes d'interès, s'han desenvolupat i optimitzat diferents protocols, tot canviant els solvents, la temperatura del bany d'oli, el temps de refredament, entre altres. A partir d'aquests s'ha conclòs que el polimorf C és el més estable.

Totes les formes cristal·lines estudiades de la norfloxacin es dissolen completament a l'estómac (pH 2) i és on presenten una major velocitat de dissolució. A mesura que augment el pH del medi disminueix significativament la velocitat de dissolució d'aquestes formes.

En l'estudi de l'estat sòlid té molta importància les transformacions entre formes que puguin produir-se durant una determinació, fet que el mètode potenciomètric *CheqSol* permet observar. A més, en aquest estudi s'ha vist que en la determinació de la solubilitat mitjançant el mètode *CheqSol* no només té implicació la temperatura, sinó que la quantitat de sòlid pesat també juga un paper important en la possible variació del comportament de la solubilitat. Comparant els resultats de solubilitat dels mètodes emprats, s'ha observat que la solubilitat obtinguda pel mètode potenciomètric és lleugerament superior a la obtinguda en el mètode *Shake-Flask* ja que el sòlid recollit al final de la determinació potenciomètrica és més amorfa.

## Resum

Els antioxidants són compostos que es troben en els aliments i poden interactuar de forma segura amb els radicals lliures per posar fi a les reaccions en cadena abans que biomolècules vitals es vegin danyades. Hi ha diferents classes d'antioxidants. Una de les principals són els polifenols (flavonoides, àcids fenòlics, tanins, lignans i estilbens). Els compostos polifenòlics estan presents en tots els productes vegetals i per tant, són part de la dieta humana. Des de la darrera part del segle XX, l'interès en els compostos fenòlics alimentaris ha incrementat a causa de les seves propietats antioxidants i d'eliminació de radicals lliures, de les activitats antiinflamatòries i antimicrobiòtiques.

En les últimes dècades, s'han desenvolupat diverses metodologies per a l'anàlisi de polifenols. Alguns mètodes s'utilitzen per estimar el contingut fenòlic total i impliquen l'avaluació de l'activitat antioxidant. Un dels més utilitzats és el mètode colorimètric Folin-Ciocalteu, que es basa en la capacitat reductora total de la mostra, no només de compostos fenòlics.

D'altra banda, també s'aplica la cromatografia de líquids (LC) per analitzar els compostos polifenòlics. En general, s'utilitzen columnes C18 de fase inversa, i la fase mòbil consisteix en un sistema de dos solvents que conté un dissolvent orgànic polar (metanol o acetonitril) i aigua acidificada. Freqüentment, s'utilitza simplement una detecció ultraviolada visible. En altres ocasions, la detecció fluorimètrica pot ser molt adequada per a alguns analits i, la detecció amb espectrometria de masses és una excel·lent eina per a l'anàlisi de mesclures complexes.

En qualsevol cas, abans de la quantificació mitjançant l'anàlisi colorimètrica o LC, s'ha de realitzar l'extracció dels analits de la matriu alimentària.

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de l'extracció i determinació dels polifenols trobats en residus del sector agroalimentari. Per tal d'extreure els analits de les diferents matrius, s'ha emprat la tècnica d'extracció assistida per ultrasons amb diferents dissolvents purs, mesclures de dissolvents i a diferents temps d'extracció.

Diversos estudis preliminars han posat de manifest que el metanol, és d'entre els assajats el dissolvent que proporciona més eficiència en la extracció.

Es van realitzar diferents assajos on es va poder concloure que les millors condicions d'extracció per extreure el major nombre de polifenols de les matrius estudiades era amb una mescla que conté 80% de metanol, un 19,9% d'aigua i 0,1% d'àcid clorhídric, sonicant durant 30 minuts.

L'anàlisi de residus agroalimentaris s'ha fet pel mètode de Folin-Ciocalteu (FC) i mitjançant la determinació cromatogràfica. Les matrius més riques són els residus

Extracció i determinació de polifenols en residus d'indústries agroalimentàries

d'olis i del vi. En els residus de la indústria dels sucres de fruites i verdures, les més riques són el raïm negre, la taronja i els espinacs.

Per últim, mitjançant calibratge PLS es va comprovar que les dades obtingudes mitjançant l'índex de Folin estan fortament relacionades amb la informació proporcionada per la cromatografia de líquids.

## Summary

Antioxidants are compounds which can be found in food. They can interact safely with free radicals to end chain reactions before life biomolecules are damaged. There are different kinds of antioxidants. The main group are polyphenols (flavonoids, phenolic acids, tannins, lignans and stilts). Polyphenolic compounds are present in all plant products therefore, they are part of the human diet. Since the last part of the 20th century, interest in phenolic food compounds has increased due to its antioxidant properties and the elimination of free radicals, anti-inflammatory and antimicrobial activities.

In the last decades, diverse methodologies have been developed for the analysis of polyphenols. Some methods are used to estimate total phenolic content and involve the evaluation of antioxidant activity. One of the most used is the Folin-Ciocalteu colorimetric method, which is based on the determination of the total reducing capacity of the sample, not only phenolic compounds.

The liquid chromatography (LC) is applied to analyse polyphenolic compounds. In general, reverse phase C18 columns are used, and the mobile phase consists of a two-solvent system that contains a polar organic solvent (methanol or acetonitrile) and acidified water. Frequently, a ultraviolet visible detection is simply used. Fluorometric detection can be very suitable for some analyzers, and the detection of mass spectrometry is an excellent tool for the analysis of complex mixtures.

In any case, before the quantification by means of the colorimetric analysis or LC, the analytes of the alimentary matrix must be extracted.

This work is focused on the study of the extraction and the determination of polyphenols found in wastes from the agri-food sector. In order to extract the analytes from the different matrices, an ultrasonic-assisted extraction technique has been used with different pure solvents, solvent mixtures and at different extraction times.

Some preliminary studies have shown that methanol is one of the tested solvents that provide more efficiency in extraction.

Different tests were performed to find the appropriate conditions to extract the largest number of polyphenols from the studied matrices. It was concluded that the best conditions were a mixture of solvents of 80% methanol, 20% water and 0.1% Hydrochloric acid and a sonication process of 30 minutes.

The analysis of agri-food waste has been done by the Folin-Ciocalteu (FC) method and by chromatographic determination. The richest matrices are waste oil and wine. In the

Extracció i determinació de polifenols en residus d'indústries agroalimentàries

residues of the juices of fruit and vegetables, the richest ones are black grapes, orange and spinach.

Finally, using PLS calibration, it was found that the data obtained through the Folin index are strongly related to the information provided by liquid chromatography.



---

# Caracterización de la materia orgánica disuelta en muestras de agua mediante HPSEC-DAD-FLD y fluorescencia molecular

Naroa Lopez Herguedas

## ABSTRACT

Natural organic matter (NOM) in aquatic systems is a complex heterogeneous mixture that consists of a huge variety of organic compounds as humic acids (HA), fulvic acids (FA), carbohydrates, proteins, and carboxylic acids, which are derived from the decay of plant and animal residues and from microbial activities. NOM is present in colloidal, particulate and dissolved forms, being the last the most studied one. Dissolved organic matter (DOM) is defined as the fraction of organic matter in a water sample that passes through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter.

Removal of DOM is crucial in drinking water and wastewater treatment processes due to its adverse effects, as DOM can act as media for the transport of pollutants or promoting biofilm growth in the distribution system. On the other hand, DOM can react with  $\text{Cl}_2$  in the treatment plant, giving as result several toxic disinfection by-products.

DOM analysis is currently performed by several techniques, including separation by high performance size-exclusion liquid chromatography (HPSEC), by which DOM can be fractionated as function of the apparent molecular weight (MW) of its components. Regarding the suitable detectors for DOM determination, the dissolved carbon detectors are very useful, although this is a lengthy procedure. In order to develop rapid and simple analytical methods, several studies have been conducted with detectors as molecular fluorescence (FLD) and diode-array UV absorption (DAD), since DOM includes organic molecules with chromophoric (light absorbing) and fluorophoric (light emitting) properties. In this way, HPSEC-DAD-FLD may be used to separate DOM in different components, as polysaccharides, “humic-like” and “protein-like” fractions. In addition, analysis of water samples by fluorescence excitation/emission matrix (EEM), without the need of a chromatographic separation, is very useful because of the high sensitivity allowed.

In this work, a new procedure has been applied to water samples coming from different stages of the drinking water treatment plant, on the Llobregat River in Sant Joan Despí (Barcelona).

Keywords: high performance size exclusion chromatography (HPSEC), excitation-emission matrix fluorescence (EEM), parallel factor analysis (PARAFAC), disinfection by-products (DBP), dissolved organic matter (DOM).

## RESUMEN

La materia orgánica natural (NOM) en sistemas acuáticos es una mezcla heterogénea y compleja que consiste en una amplia variedad de compuestos orgánicos, como ácidos húmicos (HA), ácidos fúlvicos (FA), carbohidratos, proteínas, y ácidos carboxílicos, que son derivados de la descomposición de las plantas y animales y de las actividades microbianas. La NOM puede estar presente en formas coloidal, particulada y disuelta, siendo esta última la más estudiada. La materia orgánica disuelta (DOM) se define como la fracción de la materia orgánica en una muestra de agua que pasa por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

La eliminación de la DOM es crucial en los procesos de tratamiento de aguas potables y residuales debido a sus efectos adversos. Estos efectos implican el servir como medio de transporte de contaminantes o promover el crecimiento de biopelículas en el sistema de distribución. Además, la DOM puede reaccionar con el  $\text{Cl}_2$  de las plantas de tratamiento, dando lugar a la formación de algunos subproductos de desinfección de carácter tóxico.

Hoy en día, el análisis de la DOM se lleva a cabo mediante varias técnicas, incluyendo la separación mediante la cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC), mediante la cual la DOM se puede separar en función del peso molecular aparente (PMA) de sus componentes. Respecto a detectores adecuados para la determinación de la DOM, hay que mencionar que los detectores de carbono disuelto son muy útiles, aunque sea un procedimiento lento. Con el fin de desarrollar métodos analíticos rápidos y simples, se han realizado varios estudios con otros detectores on-line, que consisten en la fluorescencia molecular (FLD) y absorción UV con detector de serie de diodos (DAD), ya que la DOM incluye moléculas orgánicas con propiedades cromóforas (absorben la luz) y fluoróforas (emiten la luz). De este modo, la técnica de HPSEC-DAD-FLD puede ser empleada para separar la DOM en diferentes fracciones, como polisacáridos, de tipo húmico o proteico. Además, el análisis de muestras de agua mediante matrices de excitación/emisión de fluorescencia (EEM), sin la necesidad de una separación cromatográfica, es una técnica de gran importancia debido a la alta sensibilidad que ofrece la instrumentación actual.

El procedimiento desarrollado ha sido aplicado a muestras de agua procedentes de las diferentes etapas de la planta de tratamiento de agua potable, en el río Llobregat en Sant Joan Despí (Barcelona).

Palabras clave: cromatografía de exclusión por tamaños de alta resolución (HPSEC), matrices de excitación/emisión de fluorescencia (EEM), análisis de factores en paralelo (PARAFAC), subproductos de desinfección (DBP), materia orgánica disuelta (DOM).

**Títol:** Anàlisi d'èsters d'àcid gras de 3- i 2-MCPD i de glicidol en mostres alimentàries mitjançant GC/MS.

**Estudiant:** Meritxell Rovira Fernández

**Data:** Juny 2018

**Directora:** Dra. Laura Pineda *Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona (LASPB)*

**Tutora:** Dra. Mercè Granados *Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica*

Els èsters d'àcid gras de 3-monocloro-1,2-propandiol (3-MCPD), 2-monocloro-1,3-propandiol (2-MCPD) i glicidol són contaminants produïts en l'etapa de refinament d'olis vegetals processats. S'ha constatat recentment l'alliberament de les formes lliures de MCPD i de glicidol en l'intestí humà i l'Agència Internacional per a la Investigació del Càncer ha classificat el glicidol com a probable carcinogen i el 3-MCPD com a possible carcinogen humà. En els últims anys ha anat en augment la preocupació pels efectes perjudicials per la salut que pot comportar la presència d'aquests compostos.

Conseqüentment, s'han desenvolupat molts mètodes analítics per la determinació d'aquests èsters en olis i greixos comestibles. Aquests segueixen principalment dues vies: mètode directe (*determinació dels èsters intactes per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses*) i indirecte (*determinació per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses de les formes lliures de MCPD i de glicidol derivatitzades després d'hidrolitzar els èsters*).

Al Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona (LASPB) s'ha estat utilitzant fins ara un mètode indirecte per la determinació dels èsters d'àcid gras en mostres d'oli. L'objectiu de l'estudi és ampliar el camp d'aplicació del mètode a diferents matrius alimentàries, com serien patates fregides, pa i llet infantil, i validar-lo.

Inicialment, s'extreu el greix de les mostres, de manera que s'han d'avaluar diferents tècniques d'extracció. L'etapa d'extracció s'optimitza per patates fregides i llet infantil.

Seguidament, el mètode indirecte del LASPB s'aplica al greix extret. Alguns pics cromatogràfics queden solapats per interferències, dificultant la quantificació dels anàlisis. Durant l'estudi, s'optimitza la detecció dels compostos i s'assoleixen límits de quantificació més baixos.

Per últim, el mètode es valida en llet infantil. Durant la validació es detecta cert efecte de matriu que dificulta la quantificació. Finalment, l'efecte es corregeix i s'assoleixen resultats satisfactoris.

**Title:** Analysis of 3-, 2-MCPD and glycidyl fatty acid esters in food samples by GC/MS.

**Student:** Meritxell Rovira Fernández

**Date:** June 2018

**Director:** Dra. Laura Pineda *Laboratory of Barcelona Public Health Agency (LASPB)*

**Tutor:** Dra. Mercè Granados *Dept. of Chemical Engineering and Analytical Chemistry*

Fatty acid esters of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD), 2-monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) and glycidol are contaminants produced in processed vegetable oils on refining. The release of MCPD and glycidol moieties in the human intestine has been recently reported and the International Agency for Research on Cancer has classified glycidol as probably carcinogenic and 3-MCPD as a possible human carcinogen. Concerns about possible health risks due to the presence of these compounds have increased in the recent years.

In response to that urgency, several analytical methods have been reported for the determination of these esters in edible oils and fats. These follow two main routes: direct method (determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry of intact esters) and indirect method (determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry of MCPD and glycidol moieties after hydrolysis of the parent esters and derivatization).

Until now, an indirect method has been applied at Laboratory of Barcelona Public Health Agency (LASPB) for the determination of these fatty acid esters in oil samples. In the present study, the aim is to extend the field of application of the method to different food samples, such as potato chips, bread and infant formula, and validate it.

Firstly, fat of the samples must be extracted, so some fat extraction techniques are evaluated. Extraction step is optimized for potato chips and infant formula.

Then, LASPB indirect method is applied to our fat extracts. Some chromatographic peaks are overlapped by interferences, making it difficult to quantify the analytes. During the study, the detection of the compounds is optimized and lower limits of quantification have been achieved.

At last, the method has been validated in infant formula. During the validation, it has been found that there is some matrix effect making it difficult to quantify. This effect is finally corrected and the results achieved are satisfactory.

**Title: Development of a simple treatment for the analysis of UV ink photoinitiators by Ultra-High performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) in high-fat baby food**

*Author: Noemí Inmaculada Medina Pérez*

*Directed by Encarnación Moyano, Department of Engineering Chemistry and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Av. Diagonal, 645. 08028-Barcelona (Spain)*

In the past few years, the presence of contaminants in food due to the migration of plasticizers has become a relevant problem with a high impact of social concern, as some migratory plasticizers have shown endocrine disrupting effects in human health. Benzophenone and its derivatives (BPs) are compounds commonly used as photoinitiators in the curing of UV inks used to print food packaging as well as additives to improve the characteristics of plastic materials. Although these substances are essential for the manufacture of plastic packaging, products that contain a high proportion of fat are especially affected by the transfer of the plasticizer to the food, since most of these substances are liposoluble compounds. In addition, the presence of these plasticizers in baby food is of greater concern, since the metabolism and detoxification of a baby are not as effective as in adults. Therefore, the objective of this work is to develop an analytical method for the determination of seventeen BPs in food products with high fat content for babies.

The UHPLC-HESI-MS/MS method is proposed for the analysis of BPs in baby food matrices. Chromatographic separation was performed using a C18 Thermo Accucore column (150 x 2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ) at 35°C and methanol, acetonitrile and water:formic acid/ammonium formate (25 mM, pH 3.75) as mobile phase (600  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). Data acquisition was performed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) using specific transitions (precursor-to-product ion) for quantitation and confirmation purposes. Under these conditions, instrumental detection limits (ILOD) between 0.01—0.70  $\mu\text{g kg}^{-1}$  have been estimated for most of the BPs, except for 44DHBP, BP and HMBP (1—2.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), which showed slightly different ILOD values.

An important matrix effect (ME) was observed when the UHPLC-HESI-MS/MS method was applied to the analysis of high-fat packaged food samples which could produce errors in the quantification. For this reason, a new sample treatment has been studied in this project to reduce the matrix effect removing the fat content (lipids) as much as possible. In this study, two different sorbents, Z-Sep+ and Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid), were evaluated during the clean-up step for the analysis of BPs in baby food matrices (yogurts, custards and chocolate products). The samples were first extracted with acetonitrile and the obtained extract was treated with a dispersive solid phase extraction testing the two sorbents to remove the lipid fraction. The amount of sample, and the amount of dispersive phase used are two of the critical parameters that were evaluated. In addition, the dilution or preconcentration factor of the extract has also been evaluated before injecting it into the UHPLC-HESI-MS/MS system. The EMR-Lipid sorbent showed the best results. Recoveries were greater than 75% except for the HOBP and whereas ME was below 35% for most BPs in yogurt and custard, but in chocolate products it was higher due to their viscosity and matrix complexity. Finally, the EMR-Lipid procedure combining with the UHPLC-HESI-MS/MS method allowed the determination of BPs in fatty baby foods at concentration levels up to 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for most of the compounds and matrices, except for HOBP (60—80  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) that were slightly higher in the three matrices. Instead, for 44DHBP in yogurt and custard, and for HMBP in yogurt were also slightly higher (20—29  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Moreover, BP in chocolate product had a limit of detection of 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Key words:** Benzophenone, BPs, photoinitiators, additives, sample treatment, matrix effect, Z-Sep+, EMR-Lipid.

# Título: Desarrollo de un tratamiento de muestra para el análisis de fotoiniciadores de tinta UV por cromatografía de líquidos de ultra-elevada eficacia acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) en alimentos de alto contenido graso para bebés

Autora: Noemí Inmaculada Medina Pérez

Dirigido por Encarnación Moyano, Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica

Universidad de Barcelona, Av. Diagonal, 645. 08028-Barcelona (España)

En los últimos años, la presencia de contaminantes en los alimentos debido a la migración de plastificantes se ha convertido en un problema relevante con un alto impacto de preocupación social, ya que algunos de los plastificantes migratorios han mostrado efectos disruptores endocrinos sobre la salud humana. La benzofenona y sus derivados (BPs) son compuestos comúnmente utilizados como fotoiniciadores en el curado de tintas UV utilizadas para imprimir envases de alimentos así como aditivos para mejorar las características de los materiales plásticos. Aunque estas sustancias son esenciales para la fabricación de envases de plástico, los productos que contienen una alta proporción de grasa se ven especialmente afectados por la transferencia del plastificante al alimento, ya que la mayoría de estas sustancias son compuestos liposolubles. Además, la presencia de estos plastificantes en los alimentos para bebés es de mayor preocupación, ya que el metabolismo y la desintoxicación del bebé no son tan eficaces como en los adultos. Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar un método analítico para la determinación de diecisiete BP en productos alimentarios con alto contenido de grasa para bebés.

Se propone el método UHPLC-HESI-MS/MS para el análisis de BPs en matrices de alimentos infantiles. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna C18 Thermo Accucore (150 x 2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ) a 35°C y metanol, acetonitrilo y un tampón de agua con ácido fórmico:formiato de amonio (25 mM, pH 3.75) como fase móvil (600  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). La adquisición de datos se realizó en *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) utilizando transiciones específicas (ion precursor  $\rightarrow$  ion producto) con fines cuantitativos y de confirmación. Bajo estas condiciones, se han estimado los límites de detección instrumentales (ILOD) comprendidos entre 0.01—0,70  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la mayoría de las benzofenonas, excepto para 44DHBP, BP y HMBP (1—2,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), que muestran valores ILOD ligeramente diferentes.

Al aplicar el método UHPLC-HESI-MS/MS al análisis de muestras de alimentos envasados con alto contenido graso, se observó un importante efecto matriz (EM) pudiendo producir errores en la cuantificación. Por esta razón, para reducir el efecto de matriz eliminando al máximo el contenido de grasa (lípidos), se ha estudiado un nuevo tratamiento de muestra en este proyecto. En este estudio, se evaluaron dos adsorbentes diferentes, Z-Sep+ y Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid), durante la etapa de limpieza para el análisis de BPs en matrices de alimentos infantiles (yogurt, natillas y cremas de chocolate). Las muestras se extrajeron primero con acetonitrilo y el extracto obtenido se sometió a una extracción dispersiva en fase sólida probando los dos adsorbentes para eliminar la fracción lipídica. La cantidad de muestra y la cantidad de fase dispersiva utilizada son dos de los parámetros críticos que fueron evaluados. Además, también se ha evaluado el factor de dilución o preconcentración del extracto antes de inyectarlo en el sistema UHPLC-HESI-MS/MS. El adsorbente EMR-Lipid presentó los mejores resultados. Las recuperaciones fueron superiores al 75% excepto para la HOBP y el EM se encontró por debajo del 35% para la mayoría de BPs en el yogurt y natillas, siendo mayor para la crema de cacao debido a su viscosidad y la complejidad de la matriz. Finalmente, el procedimiento EMR-Lipid en combinación con el método UHPLC-HESI-MS/MS permitió la determinación de BP en alimentos infantiles grasos a niveles de concentración hasta 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  excepto para la HOBP (60—80  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) que son ligeramente más elevados en las tres matrices. En cambio, para 44DHBP en yogurt y crema de cacao, y para HMBP en yogurt también fueron un poco más elevados (20—29  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Además, la BP en la crema de cacao presentó un límite de detección de 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Palabras clave:** Benzofenona, BPs, fotoiniciadores, aditivos, tratamiento de muestra, efecto matriz, Z-Sep+, EMR-Lipid.

## **Determination of semi-volatile fluorinated compounds in water and microwave popcorn bags by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry**

Albert Contreras Llin

Director: Dr. Francisco Javier Santos Vicente

Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) constitute a huge group of organic compounds, which are partially or totally saturated by fluorine atoms. Some PFASs, such as perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA), have drawn great attention due to their persistence, potential toxicity and ubiquitous presence in the environment. Thus, these compounds have been substituted by neutral PFASs in a wide range of industrial applications and consumer products, such as fire-fighting foams, impregnating agents, coatings, packaging materials, household products, textiles, insecticides, among others. Although neutral PFASs do not present a strong toxicity, their degradation into persistent PFOS and PFOA makes necessary to control their presence in the environment as well as in wildlife and humans. Moreover, exposure to PFASs is in debate regarding the identification of their source, partly due to the poor knowledge of their presence in food consumer products. Neutral PFASs are usually determined by gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) methods, although they usually exhibit sensitivity issues, thus the selection of an optimal pre-concentration technique is required for the accurate determination of the target compounds.

In the present work, a fast and simple analytical method for the simultaneous determination of several families of semi-volatile neutral PFASs, including fluorotelomer alcohols (FTOHs), perfluorooctanesulfonamides (FOSAs), perfluorooctanesulfonamide ethanols (FOSEs) and fluorotelomer olefins (FTOs), in water samples and microwave popcorn packaging material has been optimised and validated. For the analysis of water samples, the proposed method consists on the headspace solid-phase extraction (HS-SPME) followed by GC-MS determination. To improve the sensitivity of the developed method for the analysis of water samples, two GC-MS systems with a quadrupole analyser (Thermo GC-DSQII) and an ion-trap analyser (Varian GC-Saturn 2200) were assessed through their quality parameters, being the GC-MS with quadrupole analyser the system that provided better results overall. This method was later adapted to the analysis of microwave popcorn bags, which required an ultrasound-assisted extraction (UAE) before the HS-SPME procedure in order to adapt this method to solid samples. The use of methanol as extraction solvent for UAE made necessary the optimisation of the HS-SPME, which was carried out employing a central composite design to establish the optimal extraction conditions. Both methods developed for the analysis of waters and microwave popcorn bags provided good trueness, excellent sensitivity and high precision, achieving low method limits of detection ranging from 0.10 ng L<sup>-1</sup> to 4.5 ng L<sup>-1</sup> for water samples and between 0.002 ng cm<sup>-2</sup> and 0.1 ng cm<sup>-2</sup> for popcorn bags. After applying the method to the analysis of water samples from different origin, none of the neutral PFASs were detected. Regarding microwave popcorn bags, the presence of 6:2 FTOH was detected and quantified in some samples at concentration values ranging from 0.02 ng cm<sup>-2</sup> to 4.9 ng cm<sup>-2</sup>. In addition, greater concentrations were found after cooking than before cooking, demonstrating the significant influence of some additives present in the popcorn bags, as well as the cooking process, on the release of these compounds from the packaging material.

# **Determinació de compostos fluorats semi-volàtils en aigua i bosses de crispetes per a microones mitjançant microextracció en fase sòlida d'espai de cap amb posterior determinació per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses**

Albert Contreras Llin

Director: Dr. Francisco Javier Santos Vicente

Les substàncies per- i polifluoroalquil (PFASs) constitueixen un enorme grup de compostos orgànics, que es caracteritzen per estar parcial o totalment saturats amb àtoms de fluor. Algunes PFASs, com ara el sulfonat de perfluorooctà (PFOS) i l'àcid perfluorooctanoic (PFOA), han rebut força atenció degut a la seva elevada persistència, toxicitat potencial i la seva presència en el medi ambient. Aquests compostos han estat substituïts per PFASs neutres en un ampli ventall d'aplicacions industrials i productes de consum com ara escuma contra incendis, esprais d'impregnació, recobriments, material d'empaquetat, productes quotidians, tèxtils, insecticides, entre altres. Tot i que les PFASs neutres no presenten una toxicitat elevada, la seva degradació per formar el PFOS i el PFOA fa necessari el seu control en el medi ambient i els organismes vius. A més, l'exposició a les PFASs encara genera força debat, especialment per la identificació de la seva font, degut al poc coneixement de la seva presència en productes alimentaris destinats al consum humà. Les PFASs neutres es determinen habitualment mitjançant cromatografia de gasos (GC) acoblada a l'espectrometria de masses (MS), tot i que aquests mètodes acostumen a presentar problemes de sensibilitat. Per aquest motiu, la selecció d'una bona tècnica de preconcentració és molt important per a la determinació acurada dels compostos diana.

En el present treball, un mètode analític ràpid i senzill per a la determinació de diverses famílies de PFASs semivolàtils neutres, que inclouen fluorotelomer alcohols (FTOHs), perfluorooctanesulfonamides (FOSAs), perfluorooctanesulfonamide etanols (FOSEs) i fluorotelomer olefines (FTOs), en mostres d'aigua i bosses de crispetes per a microones, ha estat optimitzat i validat. Per a l'anàlisi de mostres d'aigua, el mètode proposat consisteix en la microextracció en fase sòlida d'espai de cap (HS-SPME) amb posterior determinació mitjançant GC-MS. Per millorar la sensibilitat del mètode, dos sistemes de GC, un amb un analitzador de quadrupol (Thermo GC-DSQII), i l'altre amb una trampa d'ions (Varian GC-Saturn 2200) van ser avaluats mitjançant els seus paràmetres de qualitat. El sistema de quadrupol va proporcionar millor resultats en termes generals. Aquest mètode va ser adaptat posteriorment a l'anàlisi de bosses de crispetes per a microones, utilitzant una extracció assistida per ultrasons (UAE) prèvia al procediment de HS-SPME. L'ús de metanol com a dissolvent d'extracció va requerir la optimització de la HS-SPME mitjançant un disseny central compost per establir les condicions d'extracció òptimes. Els dos mètodes desenvolupats van proporcionar una bona veracitat, una excel·lent precisió, a més de proporcionar baixos límits de detecció i quantificació del mètode des de  $0,10 \text{ ng L}^{-1}$  fins a  $4,5 \text{ ng L}^{-1}$  per a mostres d'aigua i entre  $0,002 \text{ ng cm}^{-2}$  i  $0,1 \text{ ng cm}^{-2}$  per a bosses de crispetes per a microones. Un cop aplicat el mètode a mostres d'aigua de diferent procedència, cap PFASs neutres van ser detectades. Pel que fa a les bosses de crispetes per a microones, es va detectar i quantificar la presència del 6:2 FTOH en algunes mostres amb concentracions des de  $0,02 \text{ ng cm}^{-2}$  to  $4,9 \text{ ng cm}^{-2}$ . A més, concentracions més elevades d'aquest compost es van detectar després de cuinar la bossa, demostrant la influència dels additius presents i del procés de cuinat en l'alliberament d'aquests compostos del material d'empaquetat.



# DETERMINATION OF POLYPHENOLS BY ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY (UHPLC-ESI-MS/MS) FOR PAPRIKA SAMPLES CLASSIFICATION

Guillem Campmajó,

Director: Oscar Núñez

In recent years, there has been an increase interest in diets rich in food products containing bioactive compounds. Polyphenols are well-known for their health beneficial effects and for contributing to sensorial attributes. They are a large family of aromatic secondary metabolites that comprise a high number of substances with a wide structural diversity. These compounds are mainly distributed in food of plant origin such as paprika, which is a dried and ground spice obtained from red pepper. Its distinctive organoleptic properties vary depending on the variety of red pepper and certain external conditions (climate, cultivation techniques, production method, etc.). Thus, paprika can be hot, bittersweet or sweet. In Spain, only La Vera (Extremadura) and Murcia varieties are distinguished with protected designation of origin (PDO), which increases product value but also their production costs, making necessary to properly authenticate them. Polyphenolic content in these products may be employed as a source of potential descriptors to achieve their characterization and classification according to the PDO and region of production.

In this work, a UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ) method was developed to determine 36 polyphenols in paprika samples. A simple sample extraction procedure using H<sub>2</sub>O:ACN (20:80, v/v) was employed. The chromatographic separation was optimized using an Ascentis Express C18 reversed-phase (10 cm × 2.1 mm, 2.7 μm) fused-core column with an analysis time of less than 30 min. Paprika polyphenolic contents were subjected to principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) using PLS\_Toolbox 7.8.2 (Eigenvector Research).

The developed UHPLC-ESI-MS/MS method showed satisfactory limits of detection (down to 0.01 μg·L<sup>-1</sup>), linearity ( $R^2 \geq 0.995$ ), run-to-run and day-to-day precisions ( $RSD \leq 20\%$ ), and trueness (relative errors below 15%). 111 paprika samples from La Vera and Murcia (Spain), and from Czech Republic were analysed, and the polyphenolic content quantified by external calibration. Chlorogenic, ferulic and *p*-coumaric acids, hesperidin, homoplantagin, rutin, and vanillin were found in all the samples. When analysing by PCA, the plot of Scores obtained showed a successful separation in accordance with both PDO and production region. Moreover, a discrimination between Murcia and Czech Republic paprika varieties (sweet and spicy) was also possible. The PCA Loadings plots revealed that homoplantagin, syringaldehyde and kaempferol were among the most relevant polyphenols to achieve this discrimination. In addition, PLS-DA studies improved the classification and discrimination seen previously by PCA and its Loadings plots allowed a better understanding of the discrimination. Moreover, the PLS-DA model built for the discrimination between paprikas of different production region showed satisfactory sensitivity and specificity for each class.

# DETERMINACIÓ DE POLIFENOLS PER CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ULTRA-ELEVADA EFICÀCIA ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES EN TÀNDEM (UHPLC-ESI-MS/MS) PER A LA CLASSIFICACIÓ DE PEBRES VERMELLS

Guillem Campmajó,

Director: Oscar Núñez

En els darrers anys, ha augmentat l'interès en les dietes riques en productes alimentaris que contenen compostos bioactius. Els polifenols, que són metabòlits aromàtics secundaris que comprenen un elevat nombre de substàncies amb una àmplia diversitat estructural, són coneguts pels seus efectes beneficiosos en la salut humana i per contribuir a certs atributs sensorials. Aquests compostos, es troben majoritàriament en aliments d'origen vegetal com el pebre vermell, que és una espècie seca i molta obtinguda del pebrot vermell. Les seves característiques propietats organolèptiques varien en funció del tipus de pebrot vermell i de certes condicions externes (clima, tècnica de cultiu, mètode d'obtenció, etc). Així, el pebre vermell pot ser picant, agre dolç o dolç. A Espanya, només les varietats de La Vera (Extremadura) i Múrcia estan distingides amb denominació d'origen protegida (DOP), augmentant-ne el valor del producte però també les despeses en la producció i, per tant, fent-ne necessària una correcta autenticació. El contingut polifenòlic present en aquests productes pot ser empleat com a font de potencials descriptors químics per aconseguir la seva caracterització i classificació en funció de la seva DOP i la regió de producció.

En aquest treball, s'ha desenvolupat un mètode UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ) per a la determinació de 36 polifenols en mostres de pebre vermell. S'ha emprat un procediment simple d'extracció de la mostra utilitzant H<sub>2</sub>O:ACN (20:80, v/v). La separació cromatogràfica ha estat optimitzada utilitzant una columna de fase inversa Ascentis Express C18 farcida amb partícules superficialment poroses de nucli sòlid (10 cm x 2,1 mm, 2,7 µm), obtenint un temps de separació inferior a 30 min. El contingut polifenòlic en les mostres de pebre vermell ha estat estudiat quimiomètricament mitjançant anàlisi de components principals (PCA) i anàlisi discriminant amb regressió de mínims quadrats parcials (PLS-DA), utilitzant PLS\_Toolbox 7.8.2 (Eigenvector Research).

El mètode UHPLC-ESI-MS/MS desenvolupat ha mostrat límits de detecció satisfactoris (fins a 0,01 µg·L<sup>-1</sup>), de linealitat ( $R^2 \geq 0,995$ ), de repetibilitat i reproductibilitat ( $RSD \leq 20\%$ ) i de veracitat (errors relatius per sota del 15%). 111 mostres de pebre vermell provinents de La Vera, Múrcia i de la República Txeca han estat analitzades i el seu contingut polifenòlic ha estat quantificat per calibratge extern. Els àcids clorogènic, ferúlic i *p*-cumàric, l'hesperidina, l'homoplantaginina, la rutina i la vanil·lina han estat trobades en totes les mostres. En analitzar per PCA, el gràfic de *Scores* obtingut ha mostrat una separació satisfactòria tant per la DOP com per la regió de producció. A més, ha estat possible discriminar entre les varietats de Múrcia i de la República Txeca (dolça i picant). El gràfic de *Loadings* obtingut en l'estudi PCA, descriu l'homoplantaginina, el siringaldehid i el kaempferol entre els polifenols més rellevants per aconseguir aquesta discriminació. D'altra banda, els estudis per PLS-DA han millorat la classificació i la discriminació obtinguda prèviament per PCA i els seus gràfics de *Loadings*, han permès una millor comprensió de la discriminació observada. A més, el model PLS-DA construït per la discriminació entre pebres vermells de diferent regió de producció ha mostrat valors satisfactoris de sensibilitat i especificitat.

# Plutonium determination in urine samples to provide a rapid response in emergency situations

R. Rigall, M. Llauradó, J. Fons-Castells

Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona. Barcelona, Espanya.

Plutonium is a hazardous radionuclide characterized by a long physical and biological half-life. It derives from nuclear fission processes and it decays emitting alpha-particles. An alpha emitter is not particularly dangerous as an external radiation source, but it may be easily absorbed by humans through ingestion or breathing. Owing to the radioactivity and chemical toxicity of plutonium, it is radiologically important assess the human absorbed dose contamination in a nuclear emergency event, in order to report results as quickly as possible to determine if immediate medical intervention is required to reduce acute or long-term health effects.

In the last years, the conventional method used for estimation of Pu isotopes in urine samples involves pretreatment sample followed by alpha spectrometry, which takes several days to complete the analysis. Although this methodology achieves the desired detection limit, are referred as having tedious preparation techniques and long counting times, inappropriate for rapid analysis.

Urine bioassay is the most commonly method used for accurately assessing the magnitude of internal contamination by actinides. Therefore, a new procedure was developed for fast determination of  $^{239}\text{Pu}$  in urine with minimum sample preparation and adequate sensibility. The method was based on separation of the radionuclide of  $^{239}\text{Pu}$  with a selective organic extractant, named tributyl phosphate (TBP), by a liquid-liquid extraction. The extracted plutonium is directly introduced into counting vial with the scintillation cocktail and measured by liquid scintillation spectrometry (LSS). The proposed method is simple, efficiencies of counting are near 100%, and recoveries of radioisotope usually exceed 95%. Using this method, results can be reported within 5 h after the samples were received.

In emergency situations, several radionuclides derived from nuclear fission may be realized in the environment. For this reason, the optimized method was applied to samples spiked with fission products like  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$ . The results obtained will be described along with future ways to improve the ruggedness of the method.

# Determinació de plutoni en mostres d'orina per donar resposta ràpida en situacions d'emergència

R. Rigall, M. Llauradó, J. Fons-Castells

Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona. Barcelona, Espanya.

El plutoni és un element químic molt perillós degut a la seva elevada radiotoxicitat. Es genera en processos de fissió nuclear i es caracteritza per emetre partícules alfa. Un emissor alfa no és particularment perillós com a font de radiació externa, però pot ser fàcilment absorbit pels humans a través de la seva ingesta o inhalació. Degut a la radioactivitat i toxicitat química del plutoni és radiològicament important avaluar la dosi absorbida en una situació d'emergència nuclear, per tal de donar resultats el més ràpid possible per així poder iniciar els tractaments mèdics que s'escaiguin.

En els últims anys, el mètode convencional usat per a l'estimació d'isòtops de plutoni en mostres d'orina inclou una etapa de tractament de la mostra seguida de la mesura per espectrometria alfa, el qual consumeix diversos dies per completar l'anàlisi. Tot i que amb aquesta metodologia s'aconsegueixen els límits de detecció desitjats, es caracteritza per ser una tècnica amb un pretractament de mostra tedios i amb temps de mesura llargs, inapropiats per anàlisis ràpids.

El bioassaig d'orina és el mètode més comunament utilitzat per avaluar acuradament la magnitud de la contaminació interna per actínids. Així doncs, s'ha desenvolupat i optimitzat una metodologia analítica ràpida per a la determinació  $^{239}\text{Pu}$  en mostres d'orina amb un tractament de mostra mínim i una adequada sensibilitat. El mètode es basa en la separació del radionúclid de  $^{239}\text{Pu}$  amb un extractant orgànic selectiu, anomenat tributil fosfat (TBP), mitjançant una extracció L-L. El plutoni extret s'introdueix directament en el vial de mesura amb el còctel escintil·lador i es mesura per espectrometria d'escintil·lació líquida (LSS). EL mètode proposat és simple, les eficiències de comptatge obtingudes són aproximadament del 100% i les recuperacions obtingudes normalment són superiors al 95%. Amb l'ús d'aquest mètode es poden notificar els resultats amb 5 hores després de la recepció de la mostra.

En situacions d'emergència es poden alliberar al medi ambient diversos radionúclids provinents de la fissió nuclear. Per aquesta raó, el mètode optimitzat s'ha aplicat a mostres fortificades amb productes de la fissió nuclear com  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  i  $^{90}\text{Sr}$ . Els resultats obtinguts es descriuen al treball juntament amb futures vies per millorar la robustesa del mètode.

# DESENVOLUPAMENT D'UNA RESINA DE CENTELLEIG SELECTIVA PER L'ANÀLISI DE NI-63

## Summary

Due to the increasing number of nuclear power plants to be dismantled and the high amount of waste produced in this process, new methods for radionuclide analysis have to be developed in order to manage these wastes adequately.

$^{63}\text{Ni}$  is a low energy beta-emitter (67 keV) produced by neutronic activation in the nuclear power plants, with a half-life of 100.1 years. Due to its long half-life, and abundance in the wastes, the determination of  $^{63}\text{Ni}$  is a key parameter in the waste characterization in the decommissioning procedures of nuclear facilities.

The measurement of this beta emitter requires a previous separation that consumes time and reagents. Plastic scintillation shows a solid support that permits the addition of a selective extractant in its surface generating plastic scintillation resins. Plastic scintillation resins allow to perform the separation of the interfering radionuclides and the measurement in the same support reducing the time and wastes produced on the analysis.

The objective of this work is to prepare a plastic scintillation resin for the measurement of  $^{63}\text{Ni}$ .

Previous studies shows that the immobilization of the extractant by a covalent bound is the most promising way to prepare this resin.

In order to accomplish this objective, the study was divided in three parts: the resin synthesis, the study of retention and the evaluation of the parameters that affect the detection efficiency.

With this study, a synthetic route for the selective resin preparation was designed. The resin shows an adequate retention, however, does not show a good detection efficiency as a consequence of a bad encapsulation of the fluorescent solute in the polymer.

## Resum

Degut al gran nombre de reactors nuclears que s'han de desmantellar en els pròxims anys i la gran quantitat de residus provinents d'aquest desmantellament, és necessari desenvolupar nous mètodes per a l'anàlisi de radionúclids per a cobrir adequadament la gestió d'aquests residus.

El  $^{63}\text{Ni}$  és un emissor beta de baixa energia (67 keV) produït mitjançant l'activació neutrònica dels materials de construcció dels reactors nuclears amb una vida mitja de 100.1 anys. Degut a la seva elevada vida mitja i presència als residus, la determinació del  $^{63}\text{Ni}$  és un paràmetre clau a la caracterització dels residus produïts al desmantellament de les centrals nuclears.

La mesura d'aquest emissor beta requereix d'una separació prèvia que necessita temps i reactius. El centelleig plàstic presenta un suport sòlid que permet la preparació de resines de

centelleig plàstic mitjançant l'addició d'un extractant selectiu a la superfície del polímer centellejador, permetent dur a terme la separació dels interferents i la mesura conjuntament. Aquesta característica permet dur a terme l'anàlisi més ràpidament sense generar residus mixts.

L'objectiu d'aquest treball ha sigut sintetitzar una resina de centelleig plàstic per a la mesura de  $^{63}\text{Ni}$ .

Estudis previs van mostrar que l'immobilització de l'extractant mitjançant un enllaç covalent es el mètode més prometedor per a preparar la resina.

Per això el treball s'ha dividit en la síntesi de la resina centellejadora, l'estudi de la retenció i finalment l'avaluació dels paràmetres que afecten l'eficiència de detecció.

En aquest treball s'ha pogut dissenyar una ruta de síntesi per preparar una resina selectiva de níquel amb una adequada retenció. Malgrat això aquesta no presenta una bona eficiència de detecció degut a una mala encapsulació dels soluts fluorescents al polímer.

## **EFFECTO DE LA ADICION DE COMPOST Y BIOCHAR EN LA MOVILIDAD DE COBRE Y LA MEJORA DE SUELOS**

J. Estevez<sup>1</sup>, A. Rigol<sup>1</sup>, T. Sauras<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franques 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>2</sup>*Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, University of Barcelona, Martí i Franques 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

### **SUMMARY**

Human, industrial and agricultural activities affect ecosystems directly. The need to increase agricultural production has caused greater pressure in the natural cycles of soil, which is associated with a loss of fertility, increased erosion and possible soil contamination. Use and abuse of fertilizers, pesticides with high contents of Cu directly affects the natural concentrations of this metal in agricultural soils, which generates bioaccumulation of this metal in both soil and plants. Recently, organic amendments of different origins have been investigated with the aim of reducing the mobility of these metals in soils. Among the most versatile and novel proposals is the addition of biochar and compost.

In order to evaluate if the addition of amendments prevents the mobility of Cu, improves the quality of the soil and helps the growth of the plants, in a first stage the sorption and desorption behavior of Cu was evaluated in the soil (S), the compost (C) and the biochar (B). This information allowed to establish the soil contamination level and to fix it in (1000 mg Cu/kg of soil). In a second stage, an experiment was carried out, at the lysimeter scale and in the greenhouse, for which six treatments were proposed, some of them with the addition of fertilizer (F). The treatments were S, S+F, S+B, S+B+F, S+C, S+C+B and the content of amendment (B and C) for all cases was fixed at 10% by weight. The efficiency of these treatments was evaluated on sunflower plants (*Helianthus annuus*).

Results obtained show that, the biochar was the best amendment diminishing the mobility of copper in the soil, while the addition of compost turned out to be the best additive to increase the quality of the soil and the growth of the sunflower plant.

### **RESUMEN**

Las actividades humanas, industriales y agrícolas afectan los ecosistemas. La necesidad de incrementar la producción agrícola ha ocasionado una mayor presión en los ciclos naturales de los suelos, lo que ha ocasionado una pérdida de fertilidad, una mayor erosión y una posible contaminación del suelo. El uso y el abuso de fertilizantes, pesticidas con altos contenidos de Cu afectan directamente las concentraciones naturales de este metal en suelos agrícolas lo que genera bioacumulación de este metal tanto en suelos como en plantas. En los últimos años se han investigado enmiendas de origen orgánico de varios tipos con el objetivo de reducir la movilidad de estos metales en suelos. Entre las propuestas más versátiles y novedosas se encuentra la adición de biochar y compost.

Con el fin de evaluar si la adición de enmiendas evita la movilidad de Cu, mejora la calidad del suelo y ayuda al crecimiento de las plantas, en una primera fase se evaluó el comportamiento de sorción y desorción de Cu en el suelo (S), el compost (C) y el biochar (B). Esta información permitió determinar el nivel de contaminación del suelo y fijarlo en (1000 mg Cu/kg de suelo). En una segunda fase se llevó a cabo un experimento, a escala de lisímetro y en invernadero, en el que se realizaron seis tratamientos, algunos de ellos con adición de fertilizante (F). Los tratamientos fueron S, S+F, S+B, S+B+F, S+C, S+C+B, y el contenido de enmienda (B y C) para todos los casos fue fijado en 10% en peso. La eficiencia de estos tratamientos se evaluó mediante plantas de girasol (*Helianthus annuus*).

Los resultados obtenidos muestran que, el biochar fue la mejor enmienda para disminuir la movilidad del cobre en el suelo, mientras que la adición de compost resultó el mejor aditivo para incrementar la calidad del suelo y el crecimiento de la planta girasol.

***Title:* Establishment of a procedure for the discrimination of original Benin sculptures.  
Contribution of the analytical chemistry to the restitution of the plundered heritage**

***Student:* Isabel Torralba Mora**

***Supervisor/s:* José Francisco García Martínez and Héctor Bagán Navarro**

Benin Kingdom was an African state traditionally dedicated to the bronze statuary art. These sculptures are characterized by their aesthetics and their high lead content. Their cultural and economic interest grew due to the British expedition that took place in year 1897 where more than 4.000 sculptures were extracted from the King's Palace and incorporated into museums and private collections. Later, these collections also incorporate counterfeited and more modern productions made by the own Benin craftsmen. Nowadays, the interest in restoring the heritage spoiled for colonies is growing and therefore the need to discriminate the original from the counterfeited sculptures.

The objective of this work is to study the application feasibility study of a dating method to discriminate Benin sculptures based on the determination of the activity of  $^{210}\text{Pb}$ .

To carry out this study, first, the analytical viability has been verified by the lead separation from the bronze matrix by a solid-phase chromatographic extraction using a plastic scintillation resin made with plastic scintillation microspheres coated with a selective lead extractant (4,4'(5')-di-t-butylciclohexa-18-corona-6) and later radiometric measurement, where the count rate of the blank, the lead retention and the detection efficiency have been established in different periods of decay of  $^{210}\text{Pb}$  obtaining the minimum amount of sample necessary.

Finally, the application feasibility of the method has been evaluated in ten Benin sculptures and a piece of copper raw material, from the Museum of the Five Continents of Munich. These have been analysed by X-ray Fluorescence and, based on the lead amount, selected for their sampling. The sample obtained has been separated and analysed according to the same procedure used in the analytical feasibility determining the elemental composition, the isotopic ratios of the lead stable isotopes and the activity of  $^{210}\text{Pb}$  of each sculpture.

The elemental composition does not provide evident information to classify the sculptures according to their origin, although the  $^{206}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  isotope ratio can group these sculptures. In addition, the  $^{210}\text{Pb}$  activity establishes a chronological order of the different sculptures.



**Títol: Establiment d'un procediment per a la discriminació d'escultures originals de Benín.**  
**Contribució de la química analítica a la restitució del patrimoni espoliat**

**Estudiant: Isabel Torralba Mora**

**Tutor/s: José Francisco García Martínez i Héctor Bagán Navarro**

El Regne de Benín va ser un estat africà dedicat tradicionalment a l'art estatuari realitzat de bronze. Aquestes escultures es caracteritzen per la seva estètica i per l'alt contingut de plom. El seu interès cultural i econòmic va créixer arran de l'expedició anglesa duta a terme l'any 1897 en la que més de 4.000 objectes varen ser extrets del Palau Reial i incorporats en museus i col·leccions privades. Posteriorment, aquestes col·leccions varen incorporar també objectes falsificats i produccions més modernes realitzades pel propis artesans de Benín. En l'actualitat ha aparegut l'interès de restituir el patrimoni espoliat a les colònies i, per tant, la necessitat de discriminar les originals de les produccions modernes.

L'objectiu d'aquest treball és l'estudi de la viabilitat d'aplicació d'un mètode de datació per discriminar escultures de Benín a partir de la determinació de l'activitat de  $^{210}\text{Pb}$ .

Per dur a terme l'estudi, primer, s'ha comprovat la viabilitat analítica a partir de la separació del plom de la matriu de bronze mitjançant una extracció cromatogràfica en fase sòlida amb una resina de centelleig plàstic formada per microesferes de centelleig plàstic recobertes amb un extractant selectiu de plom (4,4'(5')-di-t-butilciclohexa-18-corona-6) i posterior mesura radiomètrica, on s'ha establert la taxa de comptatge del blanc, la retenció del plom i l'eficiència de detecció en diferents períodes de decaïment del  $^{210}\text{Pb}$  obtenint la quantitat mínima de mostra necessària.

Finalment, s'ha avaluat la viabilitat d'aplicació del mètode en deu escultures de Benín i un fragment de matèria primera de coure, del Museu dels Cinc Continents de Munich. Aquestes han estat analitzades per Fluorescència de Raigs X i, en funció de la quantitat de plom, seleccionades pel seu mostreig. La mostra obtinguda ha estat separada i analitzada seguint el mateix procediment emprat en la viabilitat analítica determinant la composició elemental, la relació isotòpica dels isòtops estables de plom i l'activitat de  $^{210}\text{Pb}$  de cada escultura.

La composició elemental no proporciona informació evident per classificar les escultures segons l'època d'origen tot i que les relacions isotòpiques  $^{206}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  i  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  si que permeten agrupar-les. A més, l'activitat de  $^{210}\text{Pb}$  estableix un ordre cronològic de les diferents escultures.

# **Preparation of new standards for arsenic speciation in edible algae by HPLC-ICP-MS**

Anna Vivó Navarro

Tutors: Dr. José Fermín López i Àngels Sahuquillo

Arsenic can be found in the environment due to natural and anthropogenic sources. Once in the environment, this element is distributed in the earth crust, air, water and sediments. Lately, it has been found arsenic in drinking water in different countries, especially in Asia, which is a problem for millions of people.

This element can be bioaccumulated by organisms, which metabolize it and transform it in other species, especially in aquatic environments. Arsenic is found in the environment in inorganic and organic forms. Not all the species have the same toxicity, since inorganic arsenic is more toxic than the organic species. Arsenic is present in different foods such as rice, edible algae and seafood, which can be a risk for human health and food safety. Therefore, since arsenic species have different toxicity, it is important to develop analytical methods that detect and quantify not only total As, also arsenic species.

In edible algae, the main species of arsenic are arsenosugars. There are four common arsenosugars, which depending on the functional group are named glycerol (GLY), phosphate (PO<sub>4</sub>), sulfate (SO<sub>4</sub>) and sulfonate (SO<sub>3</sub>). To study the behavior and toxicity of arsenosugars, standards are needed to identify them chromatographically. Currently, there is a lack of commercial standards or reference material of these species. The goal of this work is to isolate arsenosugars by preparative liquid chromatography from a natural matrix in order to use them as standards.

Firstly, the algae *Fucus Vesiculosus* was chosen, which is sold commercially as food supplement. It was characterized by HPLC-ICP-MS and it was shown that it accumulates the four common arsenosugars, so this algae has been the candidate to isolate them. Anionic exchange preparative chromatography was used in order to extract them in different fractions. These fractions were characterized to verify that they contain only one arsenic specie. Finally, the identity of sulfate and sulfonate sugar was confirmed by ESI-MS.

# Preparació de nous patrons per a l'especiació d'arsènic en algues comestibles mitjançant HPLC-ICP-MS

Anna Vivó Navarro

Tutors: Dr. José Fermín López i Àngels Sahuquillo

L'arsènic està present en el medi ambient degut a fonts naturals i antropogèniques. Un cop en el medi, es distribueix per l'escorça terrestre, en aire, sediments i per dissolució en aigua. Ens els últims anys s'ha trobat contaminació d'arsènic en aigua potable en diferents punts de la terra, especialment en l'Àsia, el que suposa un problema per milions de persones.

En els medis aquàtics és pot donar bioacumulació en els éssers vius, que el metabolitzen i el transformen en altres espècies. L'arsènic es troba en forma inorgànica i orgànica, i depenent de la forma en la que es trobi, se li atribueix diferent toxicitat. Aquestes espècies d'arsènic són comuns en diferents aliments com arròs, algues comestibles i productes de la pesca, el que pot comportar un risc per a la salut humana i seguretat alimentària. Per tant, com que les espècies d'arsènic tenen diferent toxicitat, és important disposar de mètodes analítics que permetin analitzar i quantificar no només l'arsènic total, si no també les seves espècies.

En algues comestibles, les formes predominants de l'arsènic són els arsenosucres de glicerol (GLY), fosfat (PO<sub>4</sub>), sulfat (SO<sub>4</sub>) i sulfonat (SO<sub>3</sub>). Per avançar en la investigació del comportament i potencial toxicitat dels arsenosucres es necessiten patrons que permetin identificar-los cromatogràficament, però actualment no es disposa de patrons comercials ni de materials de referència d'aquestes espècies. L'objectiu d'aquest treball és aïllar arsenosucres individualment a partir d'una matriu natural que els contingui per a poder-los utilitzar com a patrons.

Primerament s'ha escollit l'alga *Fucus Vesiculosus*, que es ven comercialment en format de suplement alimentari i s'ha caracteritzat per HPLC-ICP-MS. S'ha comprovat que acumula els arsenosucres més comuns, pel que ha sigut l'alga candidata per a extreure aquestes espècies. Seguidament, s'ha utilitzat cromatografia de líquids preparativa d'intercanvi aniónic per tal d'extreure'ls i s'han recollit en diferents fraccions. Les fraccions recollides s'han caracteritzat per tal de veure que només contenen una única espècie d'arsènic. Finalment, s'ha confirmat la identitat de l'arsenosucre sulfat i sulfonat mitjançant ESI-MS.

# DETERMINATION OF INORGANIC ARSENIC IN SEAFOOD

Núria Ferré Roca

Supervisors: Dr. José Fermín López Sánchez

Dra. Àngels Sahuquillo Estrugo

Arsenic has chemical and physical properties intermediate between a metal and a non-metal, and is often referred as a metalloid or semi-metal. Arsenic can exist in four oxidation states which are -3, 0, +3, and +5. Under reducing conditions, arsenite (As(III)) is the dominant form, whereas arsenate (As(V)) is generally the stable form in oxygenated environments.

Arsenic toxicity depends on the specie it is found, having the inorganic forms as the most toxic ones, while organic forms remain as the less or non-toxic ones.

The presence of arsenic in sea waters directly affects the animals that live there. In deep water, much of the arsenic is present in the form of As(V). In shallow areas, sunlight allows microorganisms, by photosynthesis, to transform the As into reduced and methylated forms, causing the presence of species such as As(III) and methylated compounds. Small quantities of inorganic arsenic are ingested by marine animals and metabolized, mostly to non-toxic forms, such as arsenobetaine, which is the most abundant chemical form in seafood.

In previous investigations, an analytical method for the speciation of arsenic has been established by HPLC-ICP-MS coupling. Due to the complexity of this technique and because not all laboratories can dispose of the necessary instruments for the determination of arsenic by this method, the development of an alternative analytical method based on separation by solid phase extraction has been investigated.

The results obtained by the alternative method demonstrate higher inorganic arsenic content than actually it is. This can be explained due to the quantification of inorganic and also organic species.

The task carried out in the present investigation is, on the one hand, the study and optimization of the alternative method described above in order to achieve reliable results in the quantification of inorganic arsenic in seafood. On the other hand, a reference material from fresh seafood has been prepared with the final objective of being used in interlaboratory exercises for the determination of inorganic As in seafood.

## **DETERMINACIÓ D'ARSÈNIC INORGÀNIC EN PRODUCTES DE LA PESCA**

L'arsènic té propietats químiques i físiques característiques tant de metalls com de no metalls, i sovint es coneix com un metal-loide, o bé, com un semi-metall. L'arsènic pot existir en quatre estats d'oxidació que són -3, 0, +3 i +5. Sota condicions reductores, l'arsenit (As(III)) és la forma dominant mentre que l'arsenat (As(V)) és generalment la forma més estable en ambients oxigenats.

La toxicitat de l'arsènic depèn de l'espècie en que es troba, sent les formes inorgàniques les més tòxiques, mentre que les orgàniques romanen com a menys tòxiques o no tòxiques.

La presència d'arsènic en aigües marines repercuteix directament en els animals que hi viuen. En aigües profundes, gran part de l'arsènic es troba en forma d'As(V). En zones més superficials la llum solar permet als microorganismes marins, mitjançant la fotosíntesi, transformar l'As en formes reduïdes i metilades, fent que en poques profunditats hi hagi presència d'espècies com As(III) i espècies metilades. Petites quantitats d'arsènic inorgànic són ingerides pels animals marins i metabolitzades, majoritàriament, a formes no tòxiques, com és el cas de l'arsenobetaina, que és la forma química més abundant en la majoria dels productes de la pesca.

En investigacions prèvies, ha sigut necessari el desenvolupament d'un mètode analític per a l'especiació d'arsènic mitjançant l'acoblament HPLC-ICP-MS. Tot i això, degut a la complexitat d'aquesta tècnica i al fet que no tots els laboratoris disposen dels instruments necessaris per a la determinació d'arsènic inorgànic mitjançant aquest mètode, també s'ha estudiat l'aplicació d'un altre mètode analític basat en la separació mitjançant extracció en fase sòlida.

Els resultats obtinguts per aquest mètode alternatiu demostra un contingut d'arsènic inorgànic superior al real, fet que podria ser degut a la quantificació d'una espècie desconeguda.

En la present investigació es pretén, per una banda, optimitzar la separació per SPE de les espècies inorgàniques per tal d'obtenir resultats fiables, mitjançant aquest mètode, en la determinació d'As inorgànic en els productes de la pesca. Per altra banda, també s'ha dut a terme la preparació d'un material de referència a partir de productes frescos de la pesca amb l'objectiu final de ser utilitzat en un posterior assaig d'aptitud.



## **Authentication of paprika samples by liquid chromatography with UV-vis detection and chemometric methods.**

Cristina Sánchez, Núria Serrano, Óscar Núñez

*1) Department of  
Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Paprika is a seasoning made by drying and grinding different varieties of red peppers. Mainly, there are three important varieties: sweet, bittersweet and spicy. The two most popular varieties of paprika in Spain come from the region of La Vera, in Cáceres, and from Murcia.

The paprika of La Vera is distinguished from the varieties of other countries and the one of Murcia by the characteristic smoky aroma that it gives off.

Polyphenols are bioactive compounds found abundantly in natural plant food sources, such as paprika, that have antioxidant properties. There are over 8,000 identified polyphenols found in foods. These compounds are among the most interesting bioactive products that can be found in paprika.

In the present work, high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection was used to carry out the authentication of adulterated paprika samples. For that purpose, paprika samples were adulterated according to the production region (La Vera, Murcia and Czech Republic) and flavour (sweet, bittersweet and spicy). Pure and adulterated samples were analysed with the proposed HPLC-UV method to obtain discriminant chromatographic fingerprints.

The obtained chromatographic fingerprints were further processed by chemometric methods such as principal components analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA).

LDA provided a good discrimination among the adulterated samples, being able to both identify and quantify the adulterant and the adulteration level, respectively, in both cases studies (production region and flavour adulterations).

## **Autenticació de les mostres de pimentó per cromatografia de líquids amb detecció UV-vis i mètodes quimiomètrics.**

Cristina Sánchez, Núria Serrano, Óscar Núñez

*1) Departament d' Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya*

El pebre vermell és un condiment elaborat a l'assecar i moldre diferents varietats de pebrots vermells. Principalment, hi ha tres varietats importants: dolces, agredolces i picants. Les dues varietats més populars de pebre vermell a Espanya provenen de la comarca de La Vera, Càceres i Múrcia.

El pebre vermell de La Vera es distingeix de les varietats d'altres països i el pebre vermell de Múrcia es distingeix a causa del característic aroma fumat que té.

Els polifenols són compostos bioactius que es troben abundantment en fonts naturals d'aliments vegetals, com el pebre vermell, que tenen propietats antioxidants. Hi ha més de 8.000 polifenols identificats en els aliments. Aquests compostos es troben entre els productes bioactius més interessants que es poden trobar al pebre vermell.

En el present treball, la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detecció ultraviolada es va utilitzar per autenticar mostres de pebre vermell adulterat. Per a això, les mostres de pebre vermell eren adulterades segons la regió productiva (La Vera, Múrcia i República Txeca) i el sabor (dolç, agredolç i picant). Es van analitzar mostres pures i adulterades utilitzant el mètode HPLC-UV proposat per obtenir els perfils cromatogràfics discriminants.

Els perfils cromatogràfics obtinguts es van processar mitjançant mètodes quimiomètrics com ara l'anàlisi de components principals (PCA) i l'anàlisi discriminant lineal (LDA).

El LDA va proporcionar una bona discriminació entre mostres adulterades, tant identificant com quantificant el nivell de adulterants i adulteració, respectivament, en tots dos casos (regió de producció i adulteracions del gust).





Directors:  
Dra. Núria Serrano Plana  
Dr. José Manuel Díaz Cruz  
Student:  
Òscar Castilla López

## **Determination of pharmaceutical waste by voltammetry**

Over the last few years, land and aquatic pollution have increased due to anthropogenic sources. Besides classic pollutants (heavy metals, pesticides and, another agricultural products), emerging contaminants, such as personal hygiene products, pharmaceuticals and illegal drugs in concentrations from  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , have appeared.

Regarding pharmaceuticals, millions of tons of pharmaceutical products are consumed by humans, animals and plants every year for disease treatment. Once these drugs perform their function, they are excreted from the organism as a residue, either by incomplete metabolism or in the form of new metabolites reaching aquatic ecosystems and endangering biodiversity. Many of these substances have not yet been studied in their absorption of tissues or their toxicology, which makes them unknown and dangerous. Many of these pharmaceutical wastes are still not regulated by national or European legislation, but in 2016 a list of substances of priority interest was published by the European Commission.

Currently, the techniques used to detect pharmaceutical wastes require expensive instrumentation, highly qualified staff and more time of analysis. For this reason, it is increasingly sought to develop fast, reproducible, effective analytical methods that allow work in situ and the generation of the minimum amount of waste. In these terms, electroanalytical techniques play an important role.

In this master's thesis, the behavior of different carbon-based screen-printed electrodes such as screen-printed carbon electrode (SPCE), multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed electrode (SPCNTE), carbon nanofibers modified screen-printed electrodes (SPCNTE) and graphene modified screen-printed electrode (SPGPHE-) has been compared. The purpose was to determine four pharmaceutical wastes: caffeine, ibuprofen, acetylsalicylic acid and paracetamol using pulse differential voltammetry as an alternative technique to the most common chromatographic techniques.

Finally, SPCNFE, as the optimal sensor, was applied for the simultaneous voltammetric determination of ibuprofen, caffeine and paracetamol in spiked tap water.

Directors:  
Dra. Núria Serrano Plana  
Dr. José Manuel Díaz Cruz  
Estudiant:  
Òscar Castilla López

## **Determinació de residus farmacèutics per voltamperometria**

En els darrers anys, la contaminació en els medis terrestres i aquàtics a causa de la petjada antropogènica és cada cop més pronunciada. Als contaminants clàssics (metalls pesants, pesticides, productes agrícoles) s'hi sumen des de fa uns anys nous contaminants, anomenats contaminants emergents. Com a exemple de contaminants emergents trobem els productes d'higiene personal, els productes farmacèutics o les drogues il·legals en concentracions des de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  fins  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En el cas concret dels productes farmacèutics, milions de tones de productes farmacèutics són consumits per humans, animals i plantes cada any pel tractament de malalties. Un cop aquests fàrmacs realitzen la seva funció, són excretats de l'organisme en forma de residu, ja sigui per la metabolització incompleta o en forma de nous metabòlits arribant a ecosistemes aquàtics i posant en risc la biodiversitat. De moltes d'aquestes substàncies no se n'ha estudiat la seva absorció als teixits o la seva toxicologia, el que les converteix en desconegudes i perilloses. Molts d'aquests residus farmacèutics encara no estan regulats ni per la legislació nacional ni europea, però sí que existeix un llistat de substàncies d'interès prioritari de l'any 2016 publicat per la comissió europea.

Actualment les tècniques emprades per detectar els residus farmacèutics requereixen d'una instrumentació cara, personal altament qualificat i temps d'anàlisi elevats. És per aquest motiu que cada cop es busca desenvolupar mètodes analítics ràpids, reproduïbles, eficaços, que permetin treballar *in-situ* i que generin el mínim de residus, i en aquests termes, les tècniques electroanalítiques juguen un paper important.

En aquest treball final de màster, s'ha comparat el comportament de diferents elèctrodes serigrafiats basats en carboni com són l'elèctrode de grafit (SPCE), l'elèctrode modificat amb nanofibres de carboni (SPCNFE), l'elèctrode modificat amb nanotubs de carboni (SPCNTE) i l'elèctrode modificat amb grafè (SPGPHE), per a la determinació de quatre residus farmacèutics: la cafeïna, l'ibuprofè, l'àcid acetilsalicílic i el paracetamol utilitzant la voltamperometria diferencial d'impulsos com a tècnica alternativa a les més usuals tècniques cromatogràfiques.

Finalment, s'ha portat a terme la determinació voltamperomètrica de cafeïna, ibuprofè i paracetamol en una aigua de consum fortificada amb un SPCNFE com a sensor òptim.

# POSSIBILITIES OF THE ADSORPTIVE STRIPPING VOLTAMMETRY USING DIMETHYLGLYOXIMA FOR THE DETERMINATION OF METALS OF THE PLATINUM GROUP

E. Escriche-Fernández, C. Ariño, X. Cetó

Platinum groups elements (PGE) such as Pt(II), Pd(II) and Ir(II) are associated with contamination and toxicity of the environment and ecosystems as well as being harmful and dangerous to human health. The concentration of these ions in the environment is increasing because they have been commonly used as catalysts and in some industrial processes. Therefore, the search of new methods for its accurate determination is necessary. Voltammetric techniques are a group of instrumental techniques very common in the analysis of heavy metals. Among them, stripping methods have been demonstrated to be very useful for the determination of trace metals due to their accessibility, their low-cost, miniaturized size and the possibility to connect them to portable instrumentation. Traditionally, these methods are linked to the use of working mercury electrodes. However, mercury is nowadays considered a toxic compound, and its uses are restricted. For this reason, recent research is focused on the development of alternative working electrodes and methodologies for the determination of trace heavy metals. Nowadays the screen-printing technology is a recognized method for the fabrication of sensors for determination of metals ions in several applications.

In the present work, we want to establish adsorptive stripping voltammetric (AdSV) methodologies using dimethylglyoxime (DMG) as a chelating agent for the analysis of PGEs, specifically platinum and iridium. To do this, two sensors have been considered. On the one hand, a screen-printed carbon electrode modified with antimony (Sb-SPCE). On the other hand, a screen-printed carbon electrode modified with DMG (DMG-SPCE). Sb-SPCE sensor was used to determined Pt(II). The other sensor was used at first to determined Ni(II), for validated it. After it was used to determined other metals of the platinum group like Pt(II), Pt(IV), Ir(IV) and Pd(II).

The results allowed us to conclude that using the Sb-SPCE sensor with AdSV and using DMG as a chelating agent, the determination of Pt(II) was not possible, because possibly the high stability of the Pt-DMG complex. This complex could be electroinactive. So the kinetics of the dissociation of the complex will be slower than the kinetics of the platinum redox process. The preparation of DMG-SPCE was satisfactory. This device was optimized and validated analyzing Ni(II). Its application to determine other metals like Pt(II), Pt(IV), Ir(IV) and Pd(II) was not satisfactory. Possibly due to the kinetics of the processes involved.

# POSIBILIDADES DE LA VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN POR ADSORCIÓN UTILIZANDO DIMETILGLIOXIMA PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES DEL GRUPO DEL PLATINO

E. Escriche-Fernández, C. Ariño, X. Cetó

Los elementos del grupo de platino (PGE) como Pt(II), Pd(II) e Ir(II) están asociados con la contaminación y la toxicidad del medio ambiente y los ecosistemas, además de ser nocivos y peligrosos para la salud humana. La concentración de estos iones en el medio ambiente está aumentando a causa de su uso habitual como catalizadores y en algunos procesos industriales. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos métodos para su determinación exacta es necesaria. Las técnicas voltamperométricas son un grupo de técnicas instrumentales muy comunes en el análisis de metales pesados. Entre ellos, los métodos de redisolución han demostrado ser muy útiles para la determinación de trazas de metales debido a su accesibilidad, su bajo costo, pequeño tamaño y la posibilidad de conectarlos a instrumentación portátil. Tradicionalmente, estos métodos están relacionados con el uso de electrodos de mercurio. Sin embargo, el mercurio se considera hoy en día un compuesto tóxico y su uso está restringido. Por esta razón, las investigaciones recientes se centran en el desarrollo de electrodos de trabajo alternativos y metodologías para la determinación de trazas de metales pesados. Hoy en día, la tecnología de serigrafía es un método reconocido para la fabricación de sensores para la determinación de iones metálicos en varias aplicaciones.

En el presente trabajo, queremos establecer metodologías voltamperométricas de redisolución con etapa previa de adsorción (AdSV) usando dimetilglioxima (DMG) como agente quelante para el análisis de PGEs, en concreto platino e iridio. Para ello, se han considerado dos sensores. Por un lado, un electrodo de carbono serigrafiado modificado con antimonio (Sb-SPCE) y por otro lado, un electrodo de carbono serigrafiado modificado con DMG (DMG-SPCE). El sensor Sb-SPCE se usó para determinar Pt(II) y el otro sensor se utilizó en primer lugar para determinar Ni(II), y de esta forma poder validarlo. Y en segundo lugar se usó para determinar otros metales del grupo del platino como Pt(II), Pt(IV), Ir(IV) y Pd(II).

Los resultados nos permitieron concluir que al utilizar el sensor Sb-SPCE con AdSV y DMG como agente quelante, la determinación de Pt (II) no fue viable. La causa de ello podría ser la elevada estabilidad del complejo Pt-DMG. Este complejo podría ser electroinactivo debido a que la cinética de disociación del complejo sería más lenta que la cinética del proceso redox del platino. Se optimizó la preparación de DMG-SPCE, el cual fue validado analizando níquel. La aplicación de la determinación de otros metales (Pt(II), Pt(IV), Ir(IV) y Pd(II)) no dio resultados satisfactorios. La causa de ello podría ser la cinética de los procesos involucrados.



# **Title: UV filters in the environment: Study using electrochemical techniques and HPLC-MS/MS**

**Nom:** Adrià Sunyer Caldú

**Directors:** José Manuel Díaz Cruz i M. Silvia Díaz Cruz

## **SUMMARY IN ENGLISH**

UV filters (UVFs) are added in a wide range of personal care products because they can absorb or reflect ultraviolet radiation and protect against its harmful effects. After its use, they can be easily transferred to water environments where, because of their hydrophobicity and stability, could bioaccumulate and biomagnificate through the food chain.

Although toxicity studies about UVFs are scarce, some of them demonstrate their endocrine disruption capability, thus affecting gene expression, physiology and reproduction. This, combined with their persistence in the environment, could produce fatal consequences.

Despite the high concentration of these chemicals can reach in species that are at the top of the trophic chain, the concentrations in water can be very low (ng/L), complicating their analysis. Works in this field focused on determining UVFs in sediments, biota and water (among others) with analytical techniques such as liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry. However, these techniques are complex, time consuming and expensive.

In the present work, octocrylene (OCR) and benzophenone-3 (BP3) were simultaneously determined by voltammetry by adapting a previous method developed for mercury drop electrodes to the most versatile and less toxic carbon-based screen-printed electrodes. The quality parameters of the new voltammetric methodology were determined with water samples spiked with OCR and BP3.

Some experimental conditions have been optimized to improve the quality of the results, such as the use of CTAB to facilitate the dissolution of some compounds, and the proportion of methanol:water in the solutions.

In addition, the same chemicals were analysed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) according to a previously developed procedure to compare the performance of both methods. The analysis of several water samples and commercial sunscreen products by both voltammetry and HPLC-MS/M produced results quite consistent with each other.

Thus, a simple, fast and economic voltammetric method using screen-printed electrodes was developed for the screening of OCR and BP3 in water samples complementing the accurate and sensitive yet more expensive HPLC-MS/MS technique. Furthermore, this method could be optimized in the future for the *in field* screening of water samples due to the easy handling of screen-printed electrodes and portable voltammetric instruments.

## RESUM EN CATALÀ

Els filtres UV (UVFs) són ingredients en una àmplia gamma de productes d'higiene i cura personal perquè poden absorbir radiacions UV i protegir-nos dels seus efectes nocius. Després del seu ús, es poden transferir fàcilment a entorns aquàtics on, a causa de la seva hidrofobicitat i estabilitat, es poden bioacumular i biomagnificar al llarg de la cadena alimentària.

Tot i que els estudis de toxicitat sobre UVFs són escassos, alguns demostren la seva capacitat d'alteració endocrina. Això, unit a la seva persistència en el medi ambient, podria produir conseqüències fatals.

Tot i l'alta concentració d'aquests productes químics en espècies que es troben a la part superior de la cadena tròfica, les concentracions en aigua poden arribar a ser molt baixes (ng/L), cosa que complica la seva anàlisi. Els estudis en aquest camp s'han centrat en la determinació de UVFs en sediments, biota i aigua (entre d'altres) amb tècniques analítiques com la cromatografia de líquids d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS). No obstant això, aquestes tècniques són complexes, lentes i costoses.

En el present treball, l'octocrilè (OCR) i la benzofenona-3 (BP3) es van determinar simultàniament per voltamperometria adaptant un mètode previ desenvolupat per a elèctrodes de gota de mercuri als elèctrodes de carboni "screen-printed", que són més versàtils i menys tòxics. Els paràmetres de qualitat de la nova metodologia voltamperomètrica es van determinar amb mostres d'aigua amb OCR i BP3. En el procés s'han optimitzat algunes condicions experimentals per millorar la qualitat dels resultats, com ara l'ús del CTAB per facilitar la dissolució d'alguns compostos i la proporció de metanol:aigua en les solucions.

A més, l'OCR i la BP3 van ser analitzats mitjançant HPLC-MS/MS, com a metodologia de referència. L'anàlisi de diverses mostres d'aigua i de productes comercials tant per voltamperometria com per HPLC-MS/MS van produir resultats consistents entre si.

D'aquesta manera, es va desenvolupar un mètode voltamperomètric simple, ràpid i econòmic mitjançant elèctrodes screen-printed per a la detecció d'OCR i BP3 en mostres d'aigua que complementen la tècnica HPLC-MS/MS, més sensible i precisa, però més costosa. A més, aquest mètode podria optimitzar-se en el futur per l'anàlisi *in situ* de mostres d'aigua degut a la fàcil manipulació dels elèctrodes screen-printed i la portabilitat dels instruments voltamperomètrics.



# Estudio de la degradación de pesticidas apolares mediante el hongo *Trametes versicolor*

**Andrea Peris Domes**

**Directora: Ethel Eljarrat Esebag**

## Summary

A new multi-residue method for the analysis of nonpolar pesticides by GC-MS/MS in water and sediment matrices has been successfully developed. The final method includes 31 and 25 compounds for water and sediments, respectively. The method of analysis in water is based on a classic liquid-liquid extraction in which recoveries ranging between 39 and 102% are obtained, relative standard deviation (RSD) percentages lower than 13%, mLODs of 0.42-15.2 ng/L and mLOQs of 0.72-50.8 ng/L. The method of analysis in sediments is based on a PLE extraction in which recoveries ranging between 37 and 133% are obtained, RSD percentages lower than 17%, mLODs of 0.01-0.16 ng/g dw and mLOQs of 0.02-0.52 ng/g dw. The applicability of both methods has been evaluated in real water and sediment samples obtained in a sampling in Delta del Ebro. In total, 10 and 13 compounds have been detected in the aqueous samples and sediments, respectively. Total concentration levels range between 10.7-53.9 ng/L and 25.3-1707 ng/g dw, respectively. Likewise, based on the results obtained, environmental risk assessment at aquatic level has been evaluated, with the results being that aquatic risk in all the samples is not negligible. Although oxadiazon herbicide is found at higher concentrations and more frequently in the samples, the risk resulting from its presence is lower than the other insecticides such as chlorpyrifos and methiocarb because, in general, insecticides cause more toxicological effects than herbicides. Finally, the effectiveness of the white rot fungi *Trametes versicolor* has been studied to degrade chlorpyrifos, dicofol and cypermethrin pesticides. Different essays have been carried out in order to determine the elimination of pesticides by degradation and adsorption to the fungus. It has been concluded that *Trametes versicolor* is able to degrade chlorpyrifos, dicofol and cypermethrin pesticides with minimum biodegradation percentages of 75, 88 and 73% in 14 days.

## Resumen

Se ha desarrollado satisfactoriamente un método multi-residuo de análisis de pesticidas apolares por GC-MS/MS en matrices de agua y sedimento. El método final incluye un total de 31 y 25 compuestos para aguas y sedimentos, respectivamente. El método de análisis en aguas se basa en una extracción líquido-líquido clásica en la que se obtienen recuperaciones que oscilan entre el 39 y 102%, porcentajes de desviación estándar relativa (RSD) inferiores al 13%, mLODs de 0.42-15.2 ng/L y mLOQs de 0.72-50.8 ng/L. El método de análisis en sedimentos se basa en una extracción PLE en la que se obtienen recuperaciones que oscilan entre el 37 y 133%, porcentajes RSD inferiores al 17%, mLODs de 0.01-0.16 ng/g dw y mLOQs de 0.02-0.52 ng/g dw. Se ha evaluado la aplicabilidad de ambos métodos mediante su aplicación en muestras de agua y sedimento reales obtenidas en un muestreo en el Delta del Ebro. Se han detectado un total de 10 compuestos en las muestras acuosas, y un total de 13 en los sedimentos. Los niveles totales de concentración se mueven entre 10.7-53.9 ng/L y 25.3-1707 ng/g dw, respectivamente. Asimismo, a partir de los resultados obtenidos, se ha evaluado el riesgo ambiental a nivel acuático, observándose que en ninguna de las muestras analizadas el riesgo acuático es despreciable. Si bien el herbicida oxadiazón se encuentra con mayor frecuencia y concentración en las muestras, el riesgo derivado de su presencia es inferior que el de otros insecticidas, como el clorpirifós y metiocarb porque, en general, los insecticidas provocan mayores efectos toxicológicos que los herbicidas. Finalmente, se ha estudiado la efectividad del hongo *Trametes versicolor* para degradar los pesticidas clorpirifós, dicofol y cipermetrina. Se han llevado a cabo diversos experimentos a fin de determinar la eliminación de pesticidas por adsorción al hongo y por degradación. Se ha concluido que el hongo *Trametes versicolor* es capaz de degradar los pesticidas clorpirifós, dicofol y cipermetrina con porcentajes de biodegradación mínima del 75,

**Títol:** Analysis of biological tissues through mass spectrometry imaging and infrared hyperspectral imaging  
*Anàlisi de teixits biològics a través d'imatges per espectrometria de masses i espectroscòpia infraroja*

**Estudiant:** Laura Alcaide Martín

**Tutor/s:** Dr. Romà Tauler i Ferrí i Dra. Carmen Bedia Girbés (IDAEA-CSIC)

## RESUM

Les imatges hiperespectrals formen part d'un camp altament multidisciplinari que es pot definir com l'adquisició simultània d'imatges espacials en moltes bandes espectralment contigües. Per tant, la formació d'HSI és una tècnica molt potent per caracteritzar i analitzar superfícies complexes ja que permeten capturar conjuntament informació morfològica i química gràcies a la possibilitat d'enregistrar un espectre complet per a cada píxel en un temps raonable.

L'objectiu del present projecte és l'anàlisi i exploració de mostres biològiques, en concret teixits tumorals de càncer de mama. Per a aquest propòsit, les HSI dels teixits van ser adquirides mitjançant dues tècniques diferents: l'espectrometria de masses (MSI) i l'espectroscòpia infraroja (IR-HSI). A més, la distribució espacial es va complementar amb la informació proporcionada per una tinció histològica clàssica. Tanmateix, la gran complexitat de les dades obtingudes requereix l'aplicació d'eines quimiomètriques per extreure la informació oculta en les mostres, especialment quan s'utilitzen estudis no dirigits.

Per aquest treball, s'han requerit diferents metodologies quimiomètriques des de la compressió de dades només per a imatges d'espectrometria de masses mitjançant la selecció de les regions d'interès (estratègia ROI), fins a la resolució de dades mitjançant el mètode de resolució de corbes multivariants per mínims quadrats alternants (MCR-ALS). L'anàlisi quimiomètric de les dades va proporcionar els mapes de distribució de les diferents espècies de la imatge i els corresponents espectres purs d'IR o de MS sense pèrdua d'informació espectral.

Els resultats de MSI van permetre la detecció de compostos lipídics i la seva identificació provisional. La combinació de resultats de MSI i d'IR-HSI han permès la interpretació química i biològica dels teixits. Els resultats de la segmentació *K-means* i les imatges tenyides histològicament han mostrat l'heterogeneïtat dels teixits, permetent la distinció de la part interna necròtica de una part invasiva més perifèrica.

La idoneïtat de combinar les dues tecnologies d'imatges rau en el poder de la diferent informació obtinguda a partir d'ambdues imatges hiperespectrals proporcionant una millor recuperació de la informació espacial i estructural. L'estratègia seguida ha evidenciat que la combinació de tecnologies hiperespectrals amb eines quimiomètriques avançades és un enfocament prometedori amb aplicacions potencials en estudis dirigits i no dirigits en el camp de l'òmica.

## SUMMARY

Hyperspectral Imaging (HSI) is a highly multidisciplinary field that can be defined as the simultaneous acquisition of spatial images in many spectrally contiguous bands. Therefore, HSI is a very powerful technique for characterizing complex surfaces since it allows to jointly capture morphological and chemical information due to the possibility of collecting a complete spectrum for each pixel in a reasonable time.

The aim of the present project is the analysis and exploration of biological samples, specially tumoral tissues of breast cancer. For this purpose, hyperspectral images of the tissues were acquired through two different techniques: Mass Spectrometry Imaging (MSI) and Infrared Hyperspectral Imaging (IR-HSI). Besides, the spatial distribution was complemented with the information provided by a classical histological staining. However, the high complexity of the data obtained requires the application of chemometric tools to extract the hidden information of the samples, especially when untargeted approaches are used.

For this work, different chemometric methodologies were required from data compression only for mass spectrometry images by the selection of Regions Of Interest (ROI strategy) to data resolution by means of the Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares method (MCR-ALS). The chemometric analysis provide the distribution maps of the different species in the image and its related pure IR or MS spectra without loss of spectral information.

MSI results enabled the detection of lipid constituents and their tentative identification. The combination of MSI and IR-HSI results allowed chemical and biological interpretation of the tissues. *K-means* segmentation and histological stained images revealed the heterogeneity of the tissues, enabling the distinction of the necrotic inner part from a more peripheral invasive one.

The suitability of combining both imaging technologies lies on the power of the different information obtained from both hyperspectral images to provide an improved recovery of both spatial and structural information. The strategy followed evidenced that the combination of hyperspectral technologies with advanced chemometric tools is a promising approach with potential applications in targeted and untargeted -omics type of studies.

Ona Humbert

Director: R. Tauler

## 1. SUMMARY

In those last years, there has been a significant increase in the use of antibiotics in both medicines for humans and for animals. These drugs have become one of the most important in the pharmaceutical industry. Antibiotics are used both for its antimicrobial properties as the growth promoter's capacity they offer.

Despite not being as persistent as other organic compounds, many recent studies released that type of compound in the aquatic media. Those drugs have been detected in rivers, lakes and effluents in different concentrations.

Antibiotics, such high organic compounds, usually suffer different photochemical processes both in the atmosphere and in the aquatic environment. Given the resistance of certain antibiotic to biodegradation, one of the most common devices and used to remove this component is its photodegradation.

The aim of that study is framed in the investigation of the photodegradation process of the antibiotic Sulfamethoxazole that is present in remarkable concentration in the aquatic media. This is one of the most commonly used antibiotics in the world and has been found present in different rivers and effluents from over the Europe.

In this study, a combination of experimental methods combined in liquid chromatography, mass UV-Visible spectrophotometry, and a treatment of data obtained from chemometric methods. In this study the antibiotic, Sulfamethoxazole, will undergo a controlled source of UV radiation in the laboratory, which simulates the ambient solar radiation (Suntest).

Additionally, a monitoring of the photodegradation reaction is made from UV Spectrophotometric measurements. In addition, a study of the acid-base properties of this compound is carry out in order to see how the pH can affect the speciation of this compound.

During the study of photodegradation, different aliquots are taken for analysis by LC-DAD-MS. These analyses will generate a significant amount of data about the evolution of the photodegradation process. These, will be analysed using advanced chemometric procedures (multivariate resolution by MCR-ALS), which allow us to describe the process and the degradation reaction carefully with the resolution of the different photoproducts of the reaction and to enable their identification.

That previous degradation with UV spectrophotometric measurements let us take during the process sample aliquots in order to be analysed by LC-DAD-MS. These analyses generate a big amount of data, which will be analysed with advanced chemometric procedures (MCR-ALS multivariate resolution analysis) that will allow us to describe the degradation process, detect the photoproducts of the reaction and identify the possible photoproducts formed.

Because of the study, the degradation process has been detailed from a total of four photoproducts species: first that correspond to the initial compounds and the others three species that represents the different degradation photoproducts. Those photoproducts were identified respectively.

**Key words:** photodegradation, environmental pollutants, photoproducts, LC-DAD-MS, UV-Visible spectrophotometry, mass spectroscopy, chemometric methods, MCR-ALS, Sulfamethoxazole.

## **Determinació de Contaminants Orgànics en Llacs d'Alta Muntanya del Pirineu Català**

*Núria Penalva Arias*

*Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'Aigua (IDAEA-CSIC), Barcelona, Espanya*

### **Resum**

La contaminació difusa representa el nivell de contaminació de fons al qual tots els organismes vius, inclosos els humans, estan exposats i pot ser l'agent causant de diferents efectes nocius sobre la salut. Aquesta contaminació basal inclou tant residus de compostos utilitzats en el passat, com ara els compostos orgànics persistents (COPs), com l'ús actual i continuat de plaguicides (organofosforats i derivats de l'organonitrogen), retardants de flama, plastificants o herbicides. Altres compostos presents són el hidrocarburs aromàtics policíclics (HAPs) originats per processos de combustió incompleta de matèria orgànica. L'interès en l'estudi d'aquests compostos es deu a la seva distribució mundial, toxicitat, persistència i capacitat de bioacumulació. L'objectiu principal del present treball de màster és estudiar la presència d'alguns COPs, HAPs i retardants de flama emergents en mostres d'aire i aigua recollides en diversos llacs del Pirineu català, com a ecosistemes sentinella per l'avaluació de la contaminació difusa. S'han estudiat també els HAPs en àrees properes a fonts potencials d'emissió, concretament en punts de Barcelona i Granada amb característiques de contaminació de fons urbà.

Les mostres d'aire (PUFs i filtres) van ser recollides utilitzant mostrejadors actius i passius. Els compostos d'interès van ser extrets via Soxhlet i la quantificació es va realitzar amb GC-MS. S'ha desenvolupat un mètode per l'anàlisi d'OPFRs en mostres d'aigua de llacs d'alta muntanya, que inclou extracció en fase sòlida (PPL Bond) i anàlisi amb GC-MS/MS. Les mostres d'aire (filtres) provinents de Granada i Barcelona van ser extretes utilitzant el bany d'ultrasons i la quantificació es va dur a terme amb GC-MS.

Els contaminants orgànics han sigut detectats tan en la fase particulada (filtres) com la fase gas (PUFs) de l'atmosfera dels sis llacs. Els HAPs amb baix pes molecular dominen en la fase gas. Els paràmetres de GC-MS/MS per l'anàlisi dels OPFRs en aigües de llacs d'alta muntanya han sigut optimitzats satisfactòriament. No obstant, la detecció d'aquests compostos en aigües de llac no van ser reproduïbles, especialment en els punts de la recta de calibració, probablement pel dissolvent d'injecció. Els resultats preliminars de les mostres d'aigua de llac indiquen la presència d'OPFRs en aquests ecosistemes. Els traçadors moleculars de crema de biomassa han sigut detectats tant en llacs d'alta muntanya com en àrees properes a les fonts d'emissió (Barcelona i Granada). Les concentracions més elevades d'HAPs han sigut trobades en PM<sub>1</sub>, confirmant que els processos de combustió són la principal font de sutge en el medi ambient.

La contaminació de fons ha sigut detectada en àrees d'alta muntanya. No obstant, aquests resultats estan basats en un període curt de mostreig (Juliol 2017 – Gener 2018). És necessari continuar recollint més mostres i estudiar els resultats en relació a la influència de les diferents variables ambientals (temperatura de l'aire, altitud o situació geogràfica).

## Summary

Diffuse pollution represents the background contamination level at which all living organisms, including humans, are exposed and can be the causal agent of different harmful effect on health. This baseline pollution is constituted by compounds used in the past such as persistent organic pollutants (POPs), and the continuous current use of pesticides (organophosphorus and organonitrogen derivatives), flame retardants, plasticizers or herbicides. Other significant constituents are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) originated by incomplete combustion processes of organic matter. The interest in the study of these compounds is due to their worldwide distribution, toxicity, persistence and bio-accumulation capacity. The main objective of the present master thesis is to study the presence of some POPs, PAHs and emergent flame retardants in air and water samples collected in six lakes of the Catalan Pyrenees, as sentinel ecosystems for assessing diffusive pollution. In addition, PAHs have been also studied in areas close to potential emission sources, i.e. urban background sites in Barcelona and Granada.

Air samples (PUFs and filters) were collected using passive and active samplers. The compounds of interest were extracted via Soxhlet and the quantitative determination was carried out by GC-MS. A method for the analysis of OPFRs in high mountain lake water samples was developed, which include solid phase extraction (PPL Bond) and GC-MS/MS analysis. Air samples (filters) from Granada and Barcelona were extracted using ultrasonic bath and the quantitative determinations was performed by GC-MS.

Organic contaminants have been detected both in the particulate phase (filters) and in the gas phase (PUFs) of the atmosphere over the six lakes. Low molecular weight PAHs dominating the gas phase. The parameters for the analysis of OPFRs in high mountain lake waters by GC-MS/MS has been satisfactory optimized. However, the detection of these compounds in lake waters was non-reproducible, especially in the points of the calibration curve, probably due to the solvent of injection. Preliminary results of lake water samples shows the presence of OPFRs in these ecosystems. Molecular tracers of biomass burning have been detected both in high mountain lakes and in areas close to the emission sources (Barcelona and Granada). The higher concentrations of PAHs had been found in PM<sub>1</sub>, confirming that combustion processes are the main source of soot in the environment.

Background pollution has been detected in high mountain areas. Nevertheless, they are based in a short sampling period (July 2017-January 2018). It is necessary to continue collecting more samples and studying the results in the context of the influence of different environmental variables (air temperature, altitude or geographical situation).

## Untargeted lipidomic study of carrot plants exposed to glyphosate.

### Abstract

In agriculture, the use of herbicides and pesticides is very common. Because of that, their safety must be evaluated under strict control in order to prevent health issues in human, the environment and food. As a consequence, the European Union has established the Maximum Residues Limits (MRLs) of pesticides and herbicides in plants and animals. In addition, from the environmental point of view, the effects of herbicides on the non-targeted plants must be studied.

In the present work, an untargeted lipidomic study has been done to investigate the effects of glyphosate in carrots. To perform this analysis, some experimental parameters have been optimized such as the carrot variety, lipid extraction procedure and chromatographic method. Once these parameters were set, the lipidomic study of the effects of different glyphosate concentrations were performed using an UHPLC-ESI-TOF. Each sample of the lipidomic study contains a vast quantity of data which, after processing, provided useful statistical information. This data processing was divided into three steps: the compression of the data using the ROI approach, the resolution of the chromatographic peaks by means of the MCR-ALS, and the statistical assessment to interpret the information. In this work, the statistical tools used were ASCA, PCA and PLS-DA. ASCA allowed the identification of the statistically significant factors, the analyzed tissue in this case. In contrast, PCA was used to perform a preliminary exploration of the obtained data. In addition, PLS-DA analysis allowed the separation between the classes set previously and the selection of potential biomarkers using the model VIP Scores. Finally, a kinetic study was performed to assess the effects of glyphosate exposure in carrot tissues over time.

Results of this work demonstrated that glyphosate affected the development of the plant at extremely low concentration. In addition, although the performed treatment was foliar, both the leaf and the carrot were significantly affected.

**Keyword:** Glyphosate, Carrots, UHPLC-TOF, ROIMCR, Chemometrics

## Resum

A l'agricultura, l'ús d'herbicides i pesticides és molt comú. A l'agricultura, l'ús d'herbicides i pesticides és molt comú. Per això, la seva seguretat ha de ser avaluada sota estricte control per prevenir problemes de salut en humans, el medi ambient i els aliments. Com a conseqüència, la Unió Europea ha establert els límits màxims de residu (LMR) de pesticides i herbicides en plantes i animals. A més, des del punt de vista mediambiental, cal estudiar els efectes dels herbicides sobre les plantes a les quals no estan dirigits.

En aquest treball, s'ha realitzat un estudi lipidòmic no dirigit per investigar els efectes del glifosat en les pastanagues. Per realitzar aquesta anàlisi, s'han optimitzat alguns paràmetres experimentals com la varietat de pastanaga emprada, el procediment d'extracció de lípids i el mètode cromatogràfic. Un cop establerts aquests paràmetres, es va realitzar l'estudi lipidòmic dels efectes de diferents concentracions de glifosat utilitzant UHPLC-ESI-TOF. Cada mostra de l'estudi lipidòmic conté una gran quantitat de dades que, després del tractament, han proporcionat informació estadística útil. Aquest processament de dades es va dividir en tres passos: la compressió de les dades mitjançant l'aproximació del ROI, la resolució dels pics cromatogràfics mitjançant MCR-ALS i l'estudi estadístic per interpretar la informació. En aquest treball, les eines estadístiques utilitzades van ser ASCA, PCA i PLS-DA. ASCA va permetre la identificació dels factors estadísticament significatius, el teixit analitzat en aquest cas. En canvi, PCA es va utilitzar per realitzar una exploració preliminar de les dades obtingudes. A més, l'anàlisi PLS-DA va permetre la separació entre les classes establertes anteriorment i la selecció de possibles biomarcadors utilitzant el model VIP Scores. Finalment, es va realitzar un estudi cinètic per avaluar els efectes de l'exposició al glifosat en els teixits de pastanaga al llarg del temps.

Els resultats d'aquest treball demostren que el glifosat afecta el desenvolupament de la planta a concentracions extremadament baixes. A més, encara que el tractament realitzat era foliar, tant la fulla com la pastanaga es van veure significativament afectades.

**Paraules clau:** Glifosat, Pastanagues, UHPLC-TOF, Quimiometria



# **Disrupción endocrina en el crustáceo *Daphnia magna*. Determinación analítica de neurotransmisores y otras hormonas por LC-MS/MS**

**Xavier García Rovira**

**Directors: C. Gónez y C. Barata**

## **ABSTRACT**

In the last years, there is a growing interest in biological models to investigate the neurotransmitter dysregulation on the structure and function of the central nervous system (CNS). The increased consumption of pharmaceutical and their continuous release through domestic and industrial wastewater effluents into aquatic systems shows that they are emerging contaminants in the environment. *Daphnia magna* and zebrafish (*Danio rerio*), two widely used species in aquatic environment and neurotoxicity, have been used as a toxicity model to assess the effect of nine neuro-drugs.

In this work, the performance of liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for the multiresidue analysis of 43 neurotransmitters and related metabolites has been evaluated. In addition, the performance of the analytical method has been evaluated in terms of linearity, sensitivity and precision. The best performance was obtained with a Synergi Polar-RP 80 Å column (250mm x 4.6 mm ID, particle size 4 µM), which permitted the separation of all target compounds in 30 minutes.

The developed analytical method was able to quantify 34 neurochemicals analyzed in 4 day post-fertilization *Daphnia magna* and 29 neurochemicals in 8 day post-fertilization zebrafish larvae. Studying changes in the neurotransmitter system in the organisms after the exposure of the nine neuro-active pharmaceuticals allows evaluating the risk of these drugs to the aquatic environment.

## RESUM

En els darrers anys, hi ha un interès creixent en els models biològics per investigar la desregulació dels neurotransmissors sobre l'estructura i la funció del sistema nerviós central (CNS). L'augment del consum de productes farmacèutics i el seu alliberament continu a través d'efluents d'aigües residuals domèstiques i industrials en sistemes aquàtics demostren que són contaminants emergents en el medi ambient. *Daphnia magna* i peix zebra (Danio rerio), dues espècies àmpliament utilitzades en l'entorn aquàtic i la neuro-toxicitat, s'han utilitzat com a model de toxicitat per avaluar l'efecte de nou neuro-fàrmacs.

En aquest treball, s'ha avaluat el rendiment de la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses d'alta resolució (LC-HRMS) per a l'anàlisi multiresidu de 43 neurotransmissors i metabòlits relacionats. A més, el rendiment del mètode analític s'ha avaluat en termes de linealitat, sensibilitat i precisió. El millor rendiment es va obtenir amb una columna Synergi Polar-RP 80 Å (250 mm x 4,6 mm, 4 µM de mida de partícula), que va permetre la separació de tots els compostos objectiu en 30 minuts.

El mètode analític desenvolupat va ser capaç de quantificar 34 neuro-químics analitzats en 4 dies després de la fertilització de la *Daphnia magna* i 29 neuro-químics en larves de peix zebra 8 dies després de la fertilització. Estudiant els canvis en el sistema de neurotransmissors als organismes després de l'exposició dels nou fàrmacs neuro-actius permet avaluar el risc d'aquests fàrmacs en l'entorn aquàtic.

**USE OF LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY  
FOR THE DETERMINATION OF THE DISTRIBUTION AND METABOLISM OF DRUGS IN  
CULTIVATED LETTUICES IN GREENHOUSE CONDITIONS**

Adriana Juan Polo, Nicola Montemurro, and Sandra Pérez Solsona

The use of treated municipal wastewater (TWW) for irrigation has become a very common practice in many Mediterranean countries characterized by an arid climate where water resources are extremely limited. Spanish Autonomous Communities such as the Region of Murcia and Valencian Community have the highest consumption of reclaimed water for irrigation purposes. In fact, TWW is considered a valuable resource due to its high nutrient content that may reduce or even eliminate the need for expensive chemical fertilizers<sup>1</sup>. Despite the associated benefits, the irrigation with TWW may prove harmful to plants and the environment because it constitutes a major source of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) which have not been efficiently removed during conventional wastewater treatment.<sup>2</sup> The determination of pharmaceutically active compounds in crops is essential to assess the risk that these compounds may pose to human health.

The QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe”) approach<sup>3</sup> has been successfully applied to analyse pesticides in a variety food matrices, including fruits, vegetables, and cereals, and represents a valid alternative to traditional approaches used to analyse PPCPs in solid matrices, that are time consuming and require a large volume of solvents.<sup>4</sup>

In this work, two different QuEChERS extraction salts were compared to evaluate the uptake of diclofenac, ibuprofen, and triclosan into lettuce leaves after irrigation with fortified water (100 ng·mL<sup>-1</sup>) and TWW. The new quadrupole time-of-flight MS system SCIEX X500R QTOF was used to measure the target compounds in lettuce tissue. MRM<sup>HR</sup> (Monitor Reaction Monitoring) data acquisition was employed and the generated high resolution MS/MS data were compared for accurate compound detection and quantification.

The limits of detection were 0.2, 0.3, and 17 ng·g d.w.<sup>-1</sup> for diclofenac, ibuprofen, and triclosan, respectively. The compounds were detected in plant leaves at levels of around 20 ng·g<sup>-1</sup> for diclofenac and ibuprofen and 200 ng·g<sup>-1</sup> for triclosan, which was not detected in lettuce irrigated with TWW.

**Keywords:** pharmaceuticals, wastewater reuse, QuEChERS, lettuce.

**USO DE LA CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN Y METABOLISMO DE FÁRMACOS EN LECHUGAS CULTIVADAS EN INVERNADERO**

Adriana Juan Polo, Nicola Montemurro y Sandra Pérez Solsona

El uso de agua residual tratada para el riego se ha convertido en una práctica común en los países mediterráneos caracterizados por un clima árido con un recurso hídrico extremadamente limitado. Comunidades autónomas españolas como la Región de Murcia y la Comunidad Valenciana presentan el mayor consumo de agua regenerada para fines de riego. El uso de agua reutilizada presenta beneficios ya que su alto contenido en nutrientes puede reducir o incluso eliminar la necesidad de emplear fertilizantes químicos.<sup>1</sup> En contraposición, esta actividad puede resultar perjudicial para las plantas y el medio ambiente ya que es una fuente importante de productos farmacéuticos y productos de cuidado personal (PPCPs) debido a que éstos no se eliminan de manera eficiente durante el tratamiento convencional de aguas residuales.<sup>2</sup> La determinación de PPCPs en cultivos es esencial para evaluar el riesgo que estos compuestos pueden representar para la salud humana y el medio ambiente.

La metodología QuEChERS (acrónimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*)<sup>3</sup> se ha aplicado con éxito para analizar plaguicidas en muchas matrices de alimentos (por ejemplo: Frutas, verduras y cereales) y representa una alternativa válida a otros enfoques, tradicionalmente utilizado para analizar PPCP en matrices sólidas, que requieren mucho tiempo y un gran volumen de disolventes.<sup>4</sup>

En este trabajo, se compararon diferentes sales de extracción QuEChERS (Original y CEN) para evaluar la absorción de diclofenaco, ibuprofeno y triclosán en hojas de lechuga tras el riego con agua fortificada ( $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y aguas de depuradas. El nuevo sistema de espectrometría de masas (MS) de alta resolución con un cuadrupolo acoplado a un detector de tiempo de vuelo SCIEX X500R QTOF se usó para identificar los analitos en hojas de lechuga. Se empleó la adquisición de datos MRM<sup>HR</sup> (Monitor Reaction Monitoring) para la detección y cuantificación de los analitos.

En la validación del método, los límites de detección fueron  $0.2$ ,  $0.3$  y  $17 \text{ ng}\cdot\text{g d.w.}^{-1}$  para diclofenaco, ibuprofeno y triclosan, respectivamente. Se detectaron los tres compuestos en las hojas de las plantas a niveles de, aproximadamente,  $20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  para el diclofenaco y el ibuprofeno y  $200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  para el triclosan, el cual no se detectó en la lechuga regada con agua depurada.

**Palabras clave:** fármacos, reutilización de aguas residuales, QuEChERS, lechuga

**Título:** Estudio comparativo de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem y de alta resolución para la determinación de sustancias perfluoroalquiladas en biota.

**Nombre estudiante:** Alejandro Terrero González

**Director (CSIC):** Dr. Josep Caixach Gamisans

**Directora (CSIC):** Dra. Cintia Flores Rubio

**Tutora (UB):** Dra. Encarnación Moyano Morcillo

## Resumen

Las sustancias poli- y perfluoroalquiladas (PFASs) son una clase de compuestos químicos antropogénicos con una amplia gama de aplicaciones industriales y de consumo. Se han utilizado durante varias décadas como espumas contra incendios, material de revestimiento, envasado de alimentos, pinturas, adhesivos, etc. Esta familia de contaminantes orgánicos se caracteriza por una cadena alquílica fluorada, que proporciona una elevada estabilidad física y química. Por este motivo, las PFASs están consideradas persistentes, bioacumulativas y están presentes de forma ubicua en el medio ambiente. Entre las PFASs, los ácidos carboxílico (PFOA) y sulfónico (PFOS) perfluorooctanoicos son los más conocidos y las sustancias encontradas con más frecuencia. Como consecuencia, se está aplicando legislación de forma reciente para reducir la concentración de estas sustancias en el medio ambiente. La presencia de PFASs ha sido ampliamente estudiada en biota en el medio acuático como almejas, ostras, mejillones y algas, pero sobretodo en peces. Por ello, el PFOA y el PFOS se han sustituido por sustancias de sus propias familias, los ácidos perfluoroalquilados carboxílicos (PFCAs) y sulfónicos (PFSAs), respectivamente, con diferente número de carbonos, además de otros grupos conocidos como fluorotelómeros de alcohol (FTOHs), fosfatos de ésteres polifluorados (PAPs), etc.

En este trabajo se han optimizado dos metodologías de análisis de PFASs en peces, *target analysis* y *suspect screening* mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS, QqQ) y de alta resolución (LC-HRMS, Orbitrap). Además, de ambas metodologías se han estudiado y comparado los parámetros de calidad: linealidad, sensibilidad, recuperaciones, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad y especificidad.

Con el objetivo de hacer un *suspect screening* se ha construido una base de datos interna, basada en una búsqueda bibliográfica exhaustiva, que incluye las masas exactas de los homólogos de las principales familias de PFASs para su posterior análisis por HRMS.

Finalmente, se han analizado un total de 52 muestras de peces (carpas, truchas, barbos y bagres) de aguas continentales superficiales. Para ello, se necesitaba de un método de tratamiento de muestra, el cual implicaba la optimización de los procesos de extracción y de análisis.

## **Abstract**

Poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) are a class of anthropogenic chemicals with a wide range of industrial and consumer applications. They have been used for several decades for textile processing, fire-fighting foams, material coatings, food-packaging, etc. This family of chemicals is characterized by a fluorinated alkyl chain which provides high physical and chemical stability. Because of that, PFASs are considered persistent, bioaccumulative and are ubiquitously present in the environment. Among PFASs, perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) are widely known and the most common founded substances. As a consequence, recent legislation is being applied in order to reduce the concentration of these substances in the environment. The presence of PFASs in aquatic biota such as clams, oysters, mussels and algae, but mainly fishes has been widely studied. Thus PFOA and PFOS have been replaced with substances of their own families, Perfluoroalkyl Carboxylic Acids (PFCAs) and Perfluoroalkane Sulfonic Acids (PFSA), respectively, with different number of carbons, in addition to other known groups such as Fluorotelomer Alcohols (FTOHs), Polyfluoroalkyl Phosphate Esters (PAPs), etc.

Two analytical approaches for target analysis and suspect screening by liquid chromatography coupled to tandem (LC-MS/MS, QqQ) and high resolution (LC-HRMS, Orbitrap) mass spectrometry of PFASs in biota were performed. Moreover, quality parameters such as linearity, sensitivity, recoveries, repeatability, reproducibility, selectivity and specificity, were studied and compared for both methodologies as well.

Additionally, a homemade database including exact mass of analogues of the main PFASs families was constructed based in an exhaustive bibliographic search for suspected screening by HRMS.

In this study, a total of 52 fish samples (carps, trouts, barbels and chubs) from continental surface freshwater have been analyzed. For this purpose, a sample preparation method was required, which involved the optimization of the extraction and analysis procedures.

## **Metabolomics approach to investigate the potential effects of dust pollutants**

Loreto Ferrer Cebrian, Sílvia Lacorte (directora)

### **Abstract**

As the composition of dust is variable due to the source, it is important to assess the potential toxicological effects of its components. For the present study, pollutants present in dust have been selected from different sources. The cytotoxicity of dust pollutants nicotine, bisphenol A (BPA), 4,4-dichlorodiphenyltrichloroethane (4,4-DDT), lindane, tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) and diisobutyl phthalate (DiBP) was investigated in the human lung adenocarcinoma cell line A549 using MTT assay. In the present study, cells were exposed to the selected pollutants for 24 h at dosage levels between 1.5 and 200  $\mu$ M and proved to reduce cell viability at the highest concentrations. Metabolic alterations were evaluated using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). This study demonstrated the impact of different dust pollutants on different metabolic pathways, including biosynthesis of amino acids and catecholamine metabolism.

### **Resumen**

Debido a que la composición del polvo varía según su procedencia, es importante evaluar los potenciales efectos toxicológicos de sus componentes. Para el siguiente estudio, hemos seleccionado contaminantes presentes en el polvo procedente de distintas fuentes. Se investigó la citotoxicidad de los contaminantes nicotina, bisfenol A (BPA), 4,4-Dicloro-Difenil-Tricloroetano (4,4-DDT), lindano, tris (1,3-dicloro-2-propilo) fosfato (TDCPP) y diisobutilftalato (DiBP) en la línea celular del pulmón humano A549 utilizando ensayos MTT. La exposición a los contaminantes seleccionados fue de 24h con una dosis de entre 1,5 y 200  $\mu$ M llevó a una reducción de la viabilidad de las células. Se evaluaron las alteraciones metabólicas utilizando cromatografía líquida junto con espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS). Este estudio ha demostrado el impacto de los distintos contaminantes del polvo en las diferentes rutas metabólicas, incluyendo la síntesis de aminoácidos y el metabolismo de las catecolaminas.

# EFFECTE DEL CUINAT EN LA DETERMINACIÓ DE PENV, ELS SEUS METABÒLITS I PRODUCTES DE TRANSFORMACIÓ, EN TEIXITS DE POLLASTRE PER LC-MS.

Javier Giménez López

**Tutores:** Dolores Barrón Bueno i M. Cristina Minguillón Llobart

## Resum

Els antibiòtics com els derivats  $\beta$ -lactàmics (penicil·lines, etc.) son medicaments emprats habitualment tant en medicina humana com veterinària pel tractament d'infeccions. Si no es compleixen els temps d'espera regulats entre l'administració del fàrmac i el sacrifici de l'animal, residus d'aquests antibiòtics poden entrar a la cadena alimentària humana originant diversos problemes com al·lèrgies o resistències. Per tal d'evitar això, la Unió Europea (UE) va establir Límits Màxim de Residus Permesos (LMRs) per a diverses famílies d'antibiòtics, com les penicil·lines, en aliments. No obstant, les normatives europees dels LMRs no inclouen metabòlits o productes de transformació (TPs) dels antimicrobians en qüestió.

Gran part de les referències que aporten informació sobre els residus dels medicaments en aliments d'origen animal, ho fan en teixits crus. Però degut a que la gran part d'aquests aliments es consumeixen cuinats, la informació de l'efecte del cuinat sobre aquests residus (metabòlits i/o TPs) és clau per fer una estimació més precisa del possible efecte d'aquests compostos sobre les persones.

Aquest projecte s'emmarca en l'avaluació de l'efecte del cuinat sobre fenoximetilpenicil·lina (PENV) i els seus metabòlits i TPs en diferents teixits (fetge i múscul) de pollastres, procedents d'animals sotmesos a un procés farmacològic. En aquest sentit, s'han aplicat diferents cuinats (planxa i bullit) a mostres dels teixits comestibles abans esmentats. S'han analitzat les mostres crues, cuinades a la planxa, bullides i també l'aigua del bullit.

L'extracció de l'antibiòtic s'ha realitzat mitjançant metodologia QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) per a les mostres de teixit i extracció en fase sòlida (SPE) per a l'aigua del bullit. S'ha quantificat la PENV mitjançant LC-QqQ i s'ha utilitzat LC-HRMS (LTQ-Orbitrap) per a l'estudi de metabòlits i TPs. L'anàlisi de dades de HRMS s'ha portat a terme mitjançant el software Compound Discoverer 2.1.



## **Abstract**

Antibiotics, such as  $\beta$ -lactam derivatives (penicillins, etc.), are drugs widely used in both human and veterinary medicine to treat bacterial infections. If the time between drug administration to animals and their sacrifice is not long enough, drug residues may be incorporated to the human food chain producing several health issues, such as allergy or bacterial resistance. In order to prevent such effects, the European Union (UE) has established Maximum Residue Limits (MRLs) for different families of antibiotics, such as the penicillins, in food. However, the European regulation does not include in the MRLs the metabolites or the transformation products (TPs) of each antimicrobial.

Most of the literature that provides information about drug residues in foodstuffs of animal origin, they do it in raw tissues. Taking into account that food is hardly ever eaten without being processed or cooked, it is interesting to know what happens to the antibiotic (metabolites and/or TPs) during these processes to make a more accurate estimation of the possible effect of these compounds on the consumers.

This project focuses in the evaluation of the effect of the cooking on phenoxymethylpenicillin (PENV) and its metabolites and TPs in different tissues (liver and muscle) of chicken, from animals subjected to a pharmacological process. In this way, different cooking processes (grilling and boiling) were applied to edible chicken tissues of the medicated animals. Raw, grilled, boiled and boiled water has been analysed.

The extraction of the antibiotic was made by using QUEChERS methodology (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) for the tissue samples while solid-phase extraction (SPE) was applied for the water of the boiling process. Samples were analysed by LC-QqQ for quantification of PENV, whereas LC-HRMS (LTQ-Orbitrap) was used for the study of metabolites and TPs. The data analysis of HRMS was performed using the Compound Discoverer 2.1 software.

# OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE LC-HRMS PARA LA DETECCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS EN ACEITE DE OLIVA

Javier López Perales, Dolores Barrón Bueno, Stefania Vichi

## Resumen

El Fraude alimentario se puede definir como el uso intencional de engaños para obtener un beneficio por medio de los alimentos. Este tipo de fraudes no necesariamente deben suponer un problema para la salud, pero si pueden tener un impacto moral y sobretodo económico por lo que es importante encontrar maneras de evitarlo.

Uno de los alimentos donde se han detectado fraudes alimentarios es el aceite de oliva. El contenido de los triacilgliceroles (TAGs), ésteres de glicerol compuestos por tres moléculas de ácidos grasos, componentes mayoritarios de los aceites vegetales se ha visto que es característico de los diferentes aceites i por ello se pueden utilizar para controlar diferentes tipos de fraude como son adulteraciones, denominaciones de origen, etc. Para el estudio de los TAGs se propone un método de análisis *fingerprint* utilizando una separación cromatográfica de líquidos acoplada a espectrometría de masas. El nuevo método pretende mejorar los métodos actuales, como podría ser el método oficial que utiliza una separación cromatográfica acoplada a un detector de índice de refracción y también el método actual del grupo de investigación que utiliza también un análisis del tipo *fingerprint* utilizando espectrometría de masas pero sin la separación previa por cromatografía de líquidos.

En este trabajo se ha optimizado la separación cromatográfica estudiando diferentes factores que intervienen en la separación como puede la fase móvil, el flujo o la temperatura. Finalmente se llegó a la conclusión de que las condiciones óptimas para la separación son en una columna Agilent Infinity Lab Poroshell 120 C18 (100 x 2.1 mm, 2.7  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Alemania). Es una fase móvil 73:27 ACN/1-pentanol a un flujo isocrático de 0.8 mL/min y a una temperatura de 28°C.

En la detección por HRMS se optimizaron diferentes parámetros como la resolución y la energía de fragmentación. Se han analizado un conjunto 30 muestras de aceite virgen genuinas y sus mezclas con 10 diferentes aceites de girasol y 10 diferentes aceites de soja. 30 de las mezclas contenían el 2% del adulterante y otras 30 contenían el 5% mediante LC-HRMS. Los datos generados en los análisis han sido analizados mediante una herramienta quimiométrica como es la regresión PLS, capaz de predecir la concentración de las muestras del modelo, mejorando el método actual de análisis en FIA.

## **Summary**

Food fraud can be defined as the intentional use of deception to obtain benefits through food. This type of fraud should not necessarily pose a health problem, but it can have a moral and, above all, economic impact, so it is important to find ways to avoid it.

One of the foods where food fraud has been detected is olive oil. The triacylglycerols (TAGs), major components of vegetable oils are glycerol esters composed of three molecules of fatty acids, and have been seen to be characteristic of different oils. For this reason, its content can be used to control different types of fraud such as adulterations, appellations of origin, etc. For the study of the TAGs, a method of fingerprint analysis using a liquid chromatographic separation coupled to mass spectrometry is proposed. The new method aims to improve current methods, such as the official method that uses a chromatographic separation coupled to a refractive index detector and also the current method of the research group that also uses a fingerprint analysis using mass spectrometry in FIA mode.

In this work, the chromatographic separation has been optimized by studying different factors that affect the separation, such as the mobile phase, the flow or the temperature. Finally, it was concluded that an adequate separation are obtained in an Agilent Infinity Lab Poroshell 120 C18 column (100 x 2.1 mm, 2.7  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Germany) using a mobile phase 73:27 ACN / 1-pentanol at an isocratic flow of 0.9 mL/min and at a temperature of 28°C. In the HRMS detection, different parameters were optimized, such as resolution and fragmentation energy. A total of 30 samples of genuine virgin oil and their mixtures with 10 different sunflower oils and 10 different soybean oils have been analyzed. 30 of the mixtures contained 2% of the adulterant and another 30 contained 5% by LC-HRMS. The data generated in the analyses have been analysed using a chemometric tool such as the PLS regression, able to predict the concentration of the model samples, improving the current method of analysis in FIA.

# Anàlisi d'àcids haloacètics en aigües potables per UHPLC-ESI-MS/MS

Joan Dalmau Soler

Director: Dra. Maria Rosa Boleda

Tutor: Dra. Encarnación Moyano

## 1. ABSTRACT

Water disinfection has been one of the greatest achievements of humankind. This process eliminates pathogens from the water, improves its quality and makes it safe for human consumption. Consequently, throughout the 20<sup>th</sup> century, the spread of waterborne diseases in developed countries has decreased, and life expectancy has increased considerably. However, disinfectants can react with natural organic matter, inorganic precursors or anthropogenic contaminants existing in raw water, and produce unwanted and toxic byproducts, known as disinfection byproducts (DBPs). Many of them have genotoxic and carcinogenic properties. Haloacetic acids (HAAs) are the second most abundant group of disinfection byproducts after trihalomethanes. Brominated and chlorinated haloacetic acids (HAA<sub>9</sub>) are included in the next European Drinking Water Directive. The proposed parametric value is 80 µg/L for the sum of these 9 substances in tap water.

In this study a simple, rapid and direct injection method for the simultaneous determination of 10 HAAs (regulated HAA<sub>9</sub> and monoiodoacetic acid, an emerging disinfection product) using ultra-high performance liquid chromatography coupled to negative electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) has been developed and validated. The method quantification limits for the 10 HAAs were between 4 and 6 µg/L. Some factors affecting the chromatographic separation such as the mobile phase or the column type have been investigated and reported, and the critical role that formic acid concentration plays both in liquid chromatography and in mass spectrometry has been discussed. The method has been applied to several drinking water samples collected in Barcelona metropolitan area. Results confirm that in no case the legislation values were exceeded.

**Keywords:** haloacetic acids, disinfection byproducts, drinking water, tandem mass spectrometry, UHPLC.

## 2. RESUM

La desinfecció de l'aigua ha estat un dels grans èxits de la humanitat. Aquest procés elimina els microorganismes patògens de l'aigua, en millora la seva qualitat i la fa segura per al consum humà. Conseqüentment, al llarg del segle XX, la propagació de les malalties transmiseses per l'aigua als països desenvolupats ha disminuït i l'esperança de vida ha augmentat considerablement. No obstant això, els desinfectants emprats poden reaccionar amb la matèria orgànica natural, amb precursors inorgànics o amb contaminants antropogènics presents en l'aigua i produir subproductes tòxics i no desitjats, coneguts com a subproductes de desinfecció (DBPs). Molts dels quals tenen propietats genotòxiques i cancerígenes. Els àcids haloacètics (HAAs) són el segon grup de subproductes de desinfecció més abundants després dels trihalometans. Els àcids haloacètics bromats i clorats (HAA<sub>9</sub>) s'inclouen en la futura directiva europea sobre aigües potables. El valor paramètric proposat és de 80 µg/L per la suma d'aquestes 9 substàncies en aigües potables.

En aquest estudi s'ha desenvolupat i validat un mètode simple, ràpid i amb injecció directa per a la determinació simultània de 10 àcids haloacètics (els HAA<sub>9</sub> regulats més l'àcid monoiodoacètic, un subproducte de desinfecció emergent) emprant cromatografia de líquids d'ultra alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses en tàndem amb ionització per electroesprai en mode negatiu (UHPLC-ESI-MS/MS). Els límits de quantificació van ser entre 4 i 6 µg/L. S'han identificat alguns factors que afecten a la separació cromatogràfica com la fase mòbil o el tipus de columna. S'ha discutit el paper crític que juga la concentració d'àcid fòrmic tant en la separació cromatogràfica com en l'espectrometria de masses. El mètode s'ha aplicat a diverses mostres d'aigua potable recollides a l'àrea metropolitana de Barcelona. Els resultats confirmen que en cap cas es superen els valors legislats.

**Paraules clau:** àcids haloacètics, subproductes de desinfecció, aigua potable, espectrometria de masses en tàndem, UHPLC

## **SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE PUNTS DE CARBONI PER A L'ANÀLISI DE METALLS PESANTS**

### SUMMARY:

Research for new automated and miniaturized analytical procedures and instrumentation for the continuous monitoring of chemical and biochemical parameters, for example, those affecting water quality, has acquired special importance in the last years. In this sense, Lab-on-a-chip devices are increasingly employed with this purpose due to the high integration and automation that they allow. Besides, the use of nanoparticles with analytical purposes has demonstrated to improve the sensitivity and detection limits of optical methods.

Carbon Dots have recently drawn great attention due to their excellent luminescent properties, high biocompatibility, ease of preparation and low cost. These properties make them suitable for a wide range of applications, such as (bio)sensing, bioimaging or nanomedicine. They usually exist in the size of less 10 nm, showing a satisfactory fluorescent performance.

Three types of Carbon Dots were synthesized by different methods using a carbon source and three different nitrogen compounds to functionalize its surface, to make them selective to different heavy metals. Their selectivity was studied by fluorescence quenching. Finally, a microfluidic device with an optical detection system was developed based on a reverse flow injection strategy to automatically determine the amount of heavy metals in water samples. The synthesized Carbon Dots exhibit a strong fluorescence emission band at around 450 nm, sensitivity to pH variations and different selectivity depending on the surface modifiers.

### RESUM:

La recerca de nous procediments analítics i instrumentació més automatitzats i miniaturitzats, per a la monitorització contínua de paràmetres químics i bioquímics, per exemple, els que afecten a la qualitat de l'aigua, ha adquirit una especial importància en els darrers anys. En aquest sentit, els dispositius Lab-on-a-chip són cada vegada més emprats amb aquest propòsit, a causa de l'alta integració i automatització que permeten. L'ús de nanopartícules amb finalitats analítiques ha demostrat una millora en la sensibilitat i els límits de detecció dels mètodes òptics.

Recentment, els punts de carboni han generat molta atenció degut a les seves excel·lents propietats luminescents, alta biocompatibilitat, facilitat de preparació i baix cost. Aquestes propietats les fan adequades per a una àmplia gamma d'aplicacions, com ara la (bio)detecció, la bioimatge o la nanomedicina. Normalment, tenen mides inferiors als 10 nm, mostrant un comportament fluorescent satisfactori.

Es van sintetitzar tres tipus de punts de carboni mitjançant diferents mètodes, utilitzant una font de carboni i tres compostos de nitrogen diferents per funcionalitzar la seva superfície, fent-los, així, selectius a diferents metalls pesants. La seva selectivitat va ser estudiada per atenuació de fluorescència. Finalment, es va desenvolupar un dispositiu microfluidic amb un sistema de detecció òptica basat en una estratègia d'injecció en flux revers per determinar automàticament la quantitat de metalls pesants en mostres d'aigua. Els punts de carboni sintetitzats presenten una forta banda d'emissió de fluorescència al voltant dels 450 nm, sensibilitat a variacions de pH i diferent selectivitat en funció dels modificadors superficials.