

# NIR IMAGE MONITORING AND STATISTICAL ASSESSMENT OF BLENDING QUALITY OF ALIMENTARY AND PHARMACEUTICAL MIXTURES

Carla Escabias, Anna de Juan.

In recent years, there is an increasing need to monitor blending processes on pharmaceutical and alimentary industries to assess blending heterogeneity and, as consequence, the quality of the end products. Non-invasive, non-destructive and fast analytical techniques are required for this purpose and chemical imaging with NIR (NIR-CI) adapts to these needs because it provides spatial and spectral information about the samples analysed. In this work, NIR hyperspectral imaging (NIR-HSI) has been used to record in-line information from the material present in a laboratory-made blender simulating a conveyor belt. These images have been processed by using Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) to obtain the distribution map of every compound in the blending. Once these maps have been variographically analysed, distributional uniformity (DUI) and constitutional heterogeneity (CHI) indexes are obtained from each of the compounds blended.

To show the power of NIR imaging and the derived heterogeneity indexes to study the evolution and quality of a blending process, pharmaceutical blendings made using acetylsalicylic acid, starch, caffeine, cellulose and citric acid and alimentary blends using coffee, rice grits and wheat grits have been used. The blends investigated cover a wide span of material properties to determine the influence of density, shape and particle size, and the proportion of compounds in the mixture in the evolution of constitutional and distributional heterogeneity along the blending process.

**Keywords:** NIR imaging, Multivariate Curve Resolution, distributional heterogeneity, constitutional heterogeneity, variographic analysis, blending monitoring.

# SEGUIMENT PER IMATGERIA NIR I AVALUACIÓ ESTADÍSTICA DE LA QUALITAT DE PROCESSOS DE MESCLAT EN EXEMPLES ALIMENTARIS I FARMACÈUTICS

Carla Escabias, Anna de Juan.

En els últims anys, ha crescut la necessitat de monitorar els processos de mesclat en la indústria farmacèutica i alimentària per tal d'avaluar l'heterogeneïtat del mesclat i, en conseqüència la qualitat del producte final. Per fer-ho són necessàries tècniques d'anàlisi ràpides, no invasives ni destructives. És per aquest motiu que s'està començant a utilitzar la imatge química de NIR (NIR-CI), ja que proporciona informació espacial i espectral de les mostres. En aquest estudi, hem anat un pas més enllà i s'ha utilitzat la imatgeria hiperespectral de NIR (NIR-HSI) per enregistrar in-line informació del material present en un mesclador construït al laboratori, que simula una cinta transportadora. El tractament de la imatge recollida durant el mesclat mitjançant el mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS) ha proporcionat mapes de distribució de cada component de la mescla que, un cop analitzats variogràficament, han permès determinar els índexs d'uniformitat distribucional (DUI) i d'heterogeneïtat constitucional (CHI) relacionats.

Per mostrar el potencial de la imatge NIR i dels índexos estadístics proposats en l'estudi de l'evolució i qualitat del mesclat, s'han estudiat mescles de productes utilitzats en formulacions farmacèutiques, com àcid acetilsalicílic, midó, cafeïna, cel·lulosa i àcid cítric i mescles alimentàries de cafè, sèmola d'arròs i sèmola de blat. Les mescles estudiades cobreixen un ampli ventall de característiques de materials, que varien en densitat, forma i mida de partícula i també en proporció en la mescla, que han permès veure la influència d'aquests factors en l'evolució de l'heterogeneïtat constitucional i distribucional durant el mesclat.

**Paraules clau:** Imatge NIR, Corbes de resolució multivariant, heterogeneïtat distribucional, heterogeneïtat constitucional, anàlisi variogràfic, seguiment de mesclat.

**Títol del treball:** Rellevància de la ficosfera en l'atenuació de contaminants emergents.

**Nom del estudiant:** Carles Font Nomen

**Nom del director del treball:** Víctor Matamoros Mercadal

## **Resum**

Aproximadament 2 milions de tones d'aigües residuals són abocades diàriament al medi aquàtic, afectant així la qualitat de l'aigua disponible. En el darrers anys s'hi ha identificat la presència dels anomenats contaminants emergents (CE), com per exemple fàrmacs, productes d'higiene personal, pesticides, hormones o retardants de flama entre d'altres. Això es deu a què les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) no han estat dissenyades per tractar-los, per tant molts d'aquests compostos es troben en diverses concentracions en el medi aquàtic, on poden tenir efectes tòxics, fins i tot a molt baixes concentracions.

En estudis previs, el grup de recerca ha demostrat que els sistemes naturals de baix cost, com poden ser aiguamolls construïts o sistemes de microalgues, són capaços d'eliminar els CE d'aigües residuals. En aquests sistemes, la vegetació allibera una sèrie de senyals químiques (àcids orgànics, alcohols, sucres...) que incrementen la tasa de biodegradació dels contaminants orgànics. Tot i així, aquestes tècniques presenten una sèrie de limitacions, com requerir una gran àrea superficial i una continua exposició a la llum. Ser capaços d'identificar les senyals químiques que incrementen la biodegradació de CE en aquests sistemes és de gran importància a l'hora de desenvolupar tecnologies basades en aquests processos.

En aquest treball ens centrarem en el desenvolupament i optimització d'una metodologia analítica no dirigida per a la detecció d'exsudats de microalgues, tot avaluant diferents adsorbents amb diferents mecanismes de retenció. S'estudiarà la seva recuperació utilitzant la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses d'alta resolució. Els resultats indiquen que l'ús d'un adsorbent de carbó grafitat i una solució de metanol i diclorometà al 50:50 com a dissolvent d'elució dona lloc a una millora significativa en la preconcentració i posterior elució d'exsudats, en comparació al mètode emprat en estudis anteriors.

**Work title:** Relevance of the ficosphere in the attenuation of contaminants of emerging concert.

**Student name:** Carles Font Nomen

**Director name:** Víctor Matamoros Mercadal

## **Summary**

About 2 million tons of wastewater are discharged daily into the aquatic medium affecting the quality of the available water resources. During the last years, compounds known as contaminants of emerging concern (CECs) have been identified, and include substances such as pharmaceuticals, personal care products, pesticides, hormones or flame-retardants among others. Since conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to treat this type of contaminants, many of these compounds occur at different concentrations in the aquatic environment, where they may exert ecotoxicological effects even at relatively low concentrations.

In previous studies the research group has demonstrated that low-cost natural systems, such as constructed wetlands or microalgae systems, are capable of removing CECs from wastewater. In these systems, the vegetation releases chemical signals (organic acids, alcohols, sugars...) that increase the biodegradation rate of organic contaminants. However, these technologies have the problem of requiring high surface area and light exposition. Being able to identify the chemical signals that trigger the increase of the rate of biodegradation of the CECs in these systems is of great importance for developing a technology based on this process.

The aim of this study is the developing and optimization of an untargeted analytical methodology for the detection of microalgae exudates based on the evaluation of different types of sorbents with different retention mechanisms. Their recovery will be studied using gas chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometry system. The results show that the use of a graphitized carbon adsorbent and a solution of methanol and dichloromethane 50:50 as an eluent bring to a significant improvement over the preconcentration and elution of exudates in comparison to the method used previous studies.

## **Study by liquid chromatography coupled to mass spectrometry of the plant uptake of pharmaceuticals and personal care products for crops irrigated with treated wastewater.**

Gerard Quintana, M. Sílvia Díaz, José Manuel Díaz

Due to the increasing demand of water, the reuse of wastewater for agricultural irrigation has increased worldwide. Wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to remove emerging pollutants and therefore crops can adsorb PPCPs that are in the irrigation water and pass to the ground.

In this TFM, the transfer of PPCPs present in two types of treated wastewater in three crops of tomatoes (fruit), lettuce (leaves) and carrots (root) was evaluated. The effect of soil type (clay vs. sand) and type of irrigation system (drip vs. sprinkling) was studied. The PPCPs studied include 57 drugs and personal care products. The selected compounds were extracted using QuEChERS (solids) and SPE (water) and the extracts were analyzed by HPLC-MS / MS.

The results indicate that a lower concentration of PPCPs was found in the waters treated with the reactive barriers and that many of the PPCPs studied accumulated in the soil. Analyzes of lettuce, tomatoes and carrots indicate that a large number of PPCPs have bioaccumulated. The results show that to reduce the transfer of PPCPs from water to crops, wastewater treated with reactive barriers, sprinkler irrigation and clay soils should be used.

## **Estudi mitjançant cromatografia de líquids acoplada a espectrometria de masses de la bioacumulació de fàrmacs i productes de cura personal per a cultius conreats amb aigües residuals tractades.**

Gerard Quintana, M. Sílvia Díaz, José Manuel Díaz

Atès l'augment de la demanda d'aigua, la reutilització d'aigües residuals per a reg agrícola ha augmentat mundialment. Les plantes de tractament d'aigües residuals (EDARs) no estan dissenyades per eliminar contaminants emergents i, per tant, els cultius poden adsorbir els PPCPs que es troben a l'aigua de reg i passen al sòl.

En aquest TFM s'ha avaluat la transferència de PPCPs presents a dos tipus d'aigües residuals tractades a tres cultius de tomàquets (fruit), enciams (fulles) i pastanagues (arrel). Es va estudiar l'efecte del tipus de sòl (argila vs sorra) i el tipus de sistema de reg (degoteig vs aspersió). Els PPCPs estudiats inclouen 57 fàrmacs i productes de cura personal. Els compostos seleccionats s'han extret mitjançant QuEChERS (sòlids) i SPE (aigua) i els extractes s'han analitzat mitjançant HPLC-MS/MS.

Els resultats indiquen que a les aigües tractades amb les barreres reactives s'hi ha trobat una menor concentració de PPCPs i que molts dels PPCPs estudiats s'acumulaven al sòl. Els anàlisis dels enciams, tomàquets i pastanagues indiquen que s'ha bioacumulat un gran nombre de PPCPs. Els resultats demostren que per reduir la transferència de PPCPs de l'aigua als cultius s'hauria d'utilitzar aigües residuals tractades amb barreres reactives, reg per aspersió i sols argilosos.

## **Study of the Factors that Affect the Solubility and the Dissolution Rate of Drugs**

Glòria Rovira, Clara Ràfols i Xavier Subirats

The dissolution rate and the solubility are two of the most important parameters to study in the pharmaceutical compounds, since they determine the bioavailability of the medicine and its therapeutic effect. A lot of these compounds have acid or basic groups in their molecular structure, which will imply a variation of the pH and, consequently, of the solubility and the dissolution rate. The substances employed in this project: Benzthiazida, Isoxicam and Piroxicam are of a different nature; the first two are acids, while the last one is an amphoteric compound.

The solubility studies have been mainly carried out using the traditional *Shake-Flask* method. First, the pH variation in the stirring stage has been studied and it has been observed that there is no notable variation in highly insoluble substances. Then, the solubility in several media buffers and also in the biorelevant media, FaSSIF and FeSSIF, as well as the effect of the addition of excipients in these media have been studied. The obtained results show that Benzthiazida and Piroxicam follow the typical behaviour of the Henderson-Hasselbalch model for ionic compounds, while Isoxicam shows the presence of neutral aggregates. While, in general, it can be said that the solubility of the compounds increases in FaSSIF and FeSSIF, the increase of solubility due to the presence of excipients depends on the type of excipient, compound and degree of ionization of the compound. The *CheqSol* method has allowed us to see that, in Piroxicam, solubility increases with the % of Cavasol while the time of oversaturation is not affected.

The effect of the stirring rate in the measurements of the dissolution rate has been studied using the miniaturized dissolution method. This study shows that the higher the stirring rate is, the higher the dissolution rate is, which becomes more notable in the media where the substances are ionized.

## **Estudi dels factors que afecten la solubilitat i la velocitat de dissolució dels fàrmacs**

Glòria Rovira, Clara Ràfols i Xavier Subirats

La velocitat de dissolució i la solubilitat són dos dels paràmetres més importants a estudiar en els compostos farmacèutics, ja que condicionen la biodisponibilitat del fàrmac i el seu efecte terapèutic. Molts d'aquests compostos farmacèutics tenen grups àcids o bàsics en la seva estructura molecular, el que implicarà una variació del pH i consegüentment de la solubilitat i velocitat de dissolució. Les substàncies emprades en aquest treball, Benztiàzida, Isoxicam i Piroxicam, són de naturalesa diferent, els dos primers són àcids mentre que l'últim compost és un amfòlit.

Els estudis de solubilitat s'han realitzat principalment amb el mètode tradicional de *Shake-Flask*. Primer, s'ha estudiat la variació del pH en l'etapa d'agitació observant que no es produeix una variació notable en substàncies molt insolubles. A continuació, s'ha estudiat la solubilitat en diversos medis tamponats i en els medis biorelevants FaSSiF i FeSSiF i l'efecte que en aquests medis produeix l'addició d'excipients. Els resultats obtinguts mostren que la Benztiàzida i el Piroxicam segueixen el comportament típic del model de Henderson-Hasselbalch per a compostos iònics, mentre que l'Isoxicam mostra la presència d'agregats neutres. Mentre que de forma general es pot dir que la solubilitat dels compostos augmenta, en FaSSiF i FeSSiF, l'augment de la solubilitat degut a la presència d'excipients depèn del tipus d'excipient, compost i grau de ionització del compost. El mètode de *CheqSol* ha permès veure que en el Piroxicam la solubilitat augmenta amb el % de Cavasol, mentre que el temps de sobresaturació no es veu afectat.

S'ha estudiat l'efecte de la velocitat d'agitació en les mesures de la velocitat de dissolució, mitjançant el mètode miniaturitzat de dissolució. Aquest estudi ha permès veure que la velocitat d'agitació afecta als resultats, de manera que a major velocitat d'agitació major velocitat de dissolució, efecte que es fa més notable en medis on el compost es troba ionitzat.



# DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES D'ANÀLISI DIRECTE EMPRANT ESPECTROMETRIA DE MASSES PER LA DETERMINACIÓ DE COLORANTS PROHIBITS EN ALIMENTS

Sara Hammoudan Chakroun

Directora: Dra. Encarnación Moyano Morcillo

L'adulteració alimentària s'està convertint en un important problema de frau alimentari a tot el món, ja que també podria esdevenir un risc per a la salut pública. En molts productes alimentaris, es permet afegir colorants per millorar la seva qualitat i actualment, els colorants sintètics són els més utilitzats pel seu baix cost, eficàcia i estabilitat. S'ha prestat especial atenció als colorants **azoics; un grup d'additius prohibits a la indústria alimentària per la seva preocupació** en la salut humana. Molts països n'han prohibit el seu ús en aliments, i se sotmeten a regulacions, fomentant així el desenvolupament de mètodes analítics ràpids, simples i en temps real. *Ambient Ionization Mass Spectrometry* (AIMS) són un grup de tècniques analítiques relativament noves que tenen el potencial de superar les limitacions que presenten les tècniques convencionals.

**Aquest treball es centra en el desenvolupament de mètodes d'anàlisi directe** mitjançant espectrometria de masses (MS) per a la determinació de colorants prohibits en productes alimentaris: l'Anàlisi Directe en Temps Real (DART), la Ionització per Desorció per Electrosprai (DESI) i el *Paper Spray Ionization* (PSI). Amb aquest propòsit, es van comparar la ionització d'aquests compostos mitjançant la ionització per electrosprai (ESI), la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) i la fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI), així com també es va estudiar la fragmentació dels ions generats. Els resultats van mostrar que les millors eficiències de ionització es van assolir mitjançant APCI, i per tant, el DART hauria de ser la tècnica AIMS que podria funcionar millor ja que es basa en el mecanisme de ionització APCI. També es va avaluar la **combinació d'APPI amb DART i PSI**, així com *Reactive DESI per millorar l'eficiència de ionització* i disminuir els límits de detecció. Els treballs previs realitzats en el desenvolupament de mètodes DART, PSI i DESI combinats amb MS per a la detecció de colorants prohibits en productes alimentaris van mostrar un gran potencial, i es podrien proposar com a mètodes de detecció ràpida **per millorar la productivitat dels laboratoris de control d'aliments.**

# DEVELOPMENT OF DIRECT ANALYSIS METHODS USING MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF BANNED DYES IN FOOD

Sara Hammoudan Chakroun

Directora: Dra. Encarnación Moyano Morcillo

Food adulteration is becoming an important food fraud issue worldwide since it might also become a public health risk. In many food products, the addition of dyes is allowed to enhance their quality, and currently, synthetic dyes are the most used due to their low price, effectiveness and stability. Particular attention has been paid in azo dyes; a group of additives banned within the food industry due to their human health concern. Many countries have prohibited the use of most of them in food products and they are submitted to regulations, encouraging the development of fast, simple and real-time analytical methods. Ambient ionization mass spectrometry (AIMS) are relatively new analytical techniques that have the potential to overcome the limitations presented by conventional techniques.

This work is focused on the development of direct analysis methods using mass spectrometry (MS) for the determination of banned dyes in food products: Direct Analysis in Real Time (DART), Desorption Electrospray Ionization (DESI) and Paper Spray Ionization (PSI). For this purpose, the ionization of these compounds using electrospray ionization (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photoionization (APPI) were compared, as well as the fragmentation of the ions generated was studied. The results showed that the best ionization efficiencies were achieved using APCI, thus DART should be the AIMS technique that could work better since it is based on APCI ionization mechanisms. The combination of APPI with DART and PSI, and Reactive DESI were also evaluated in order to improve the ionization efficiency and decrease the limits of detection. The preliminary work in developing DART, PSI and DESI combined with MS methods for the detection of banned dyes in food products showed great potential, and they could be proposed as feasible fast screening methods to improve the productivity of food control laboratories.

## Summary

The reuse of treated wastewater for agricultural irrigation leads to the introduction of pharmaceutical residues into soil and potentially exposure of crops. Additionally, PhACs could be distributed into the soil-root-leaves system depending on its physico-chemical properties.

In order to study the uptake and translocation of 26 human PhACs and four metabolites in radish, six QuEChERS-based extraction procedures were optimized. Two novel analytical methodologies were developed and validated for roots and leaves which consists on the use of Original with formic acid and CEN 15662, respectively followed by quantitative analysis by LC-QToF using high resolution multiple reaction monitoring (MRM<sup>HR</sup>) acquisition mode.

After 21 days irrigation experiments revealed maximum exposure to clofibric acid, fluconazole and hydrochlorothiazide in roots while benzotriazole, clofibric acid and fluconazole were the most prominent PhACs in leaves. Indeed, carbamazepine, clofibric acid and metoprolol were the compounds more retained into the soil.

*Key Words* – High resolution, pharmaceuticals, QuEChERS, translocation, uptake.

## Resum

La reutilització d'aigües residuals tractades per al reg agrícola comporta la introducció de residus farmacèutics al sòl i potencialment una exposició als cultius. Adicionalment, els PhACs es podrien distribuir en el sistema sòl-arrel-fulles depenent de les seves propietats físico-químiques.

Per estudiar la captació i la translocació de 26 PhACs humans i quatre metabòlits al rave, es van optimitzar sis procediments d'extracció basats en QuEChERS. Es van desenvolupar i validar dues noves metodologies analítiques per a les arrels i les fulles, que consisteix en l'ús de Original amb àcid fòrmic i CEN 15662, respectivament, mitjançant d'anàlisis quantitativus per LC-QToF mitjançant el mode d'adquisició multiple reaction monitoring (<sup>HR</sup>MRM) d'alta resolució.

Després de 21 dies, els experiments de reg van revelar una exposició màxima a l'àcid clofibric, al fluconazol i a la hidroclorotiazida a les arrels, mentre que el benzotriazol, l'àcid clofibric i el fluconazol eren els PhACs més destacats de les fulles. A més, la carbamazepine, l'àcid clofibric i el metoprolol van ser els compostos més retinguts al sòl.

*Key Words* – Alta resolució, fàrmacs, QuEChERS, translocació, captació.

## **Abstract**

This work is part of a project dedicated to the valorisation of residues from different types of industries; in particular, this study is focused on the determination of the polyphenol content in residues obtained in the production of olive oil and wine.

Polyphenols are natural antioxidants that are present in different food products of vegetable origin such as fruits, vegetables, and cereals. Different studies have related this antioxidant action to the prevention of different types of cancer, cardiovascular and neurological diseases. In recent years, research related to these compounds has been trying to achieve such beneficial effects that we know they are beneficial to our health.

Basically, two different analytical strategies can be undertaken to determine the polyphenol content of food samples, one based on liquid chromatography and the other on the quantification of antioxidant capacity using spectrophotometric techniques. In this sense, it is necessary to control the equivalence of the results provided by the different methods.

The aim of this TFM is to evaluate the polyphenol content of a wide variety of residues obtained in the production of olive oil and wine, using liquid chromatography with UV detection and various assays of antioxidant capacity: Folin Ciocalteu, DPPH, ABTS and FRAP.

Using the chemometric technique of Principal Component Analysis (PCA), the results of the different methods have been studied in correlation. For the COC methods, the best correlations are observed between the ABTS-DPPH and ABTS-FC FC assays, while the best correlation is observed between the FRAP- DPPH assays. Finally, overall, there is a satisfactory correlation between the results of different AOC assays and liquid chromatography.

**Keywords:** Polyphenols, Antioxidant Capacity, Correlation Indexes, Waste agri-food.

## Resum

Els polifenols són antioxidants naturals que es troben presents a productes alimentaris d'origen vegetal com fruites, verdures i cereals. La ingesta d'aquests productes és la porta d'entrada dels polifenols i aquests poden reaccionar amb espècies oxidants presents al nostre cos. Diferents estudis relacionen directament aquesta acció antioxidant amb la prevenció de diferents tipus de càncer, i malalties cardiovasculars i neurològiques. Els últims anys la investigació relacionada amb aquests compostos està a l'alça degut als efectes beneficiosos que se sap que tenen a la nostra salut.

Es poden emprar, fonamentalment, dues estratègies analítiques diferents per a determinar el contingut de polifenols en mostres alimentàries, una es basa en la cromatografia de líquids i l'altra, en assajos de quantificació de capacitat antioxidant mitjançant tècniques espectrofotomètriques. En aquest sentit, hi ha força controvèrsia sobre l'equivalència dels resultats proporcionats pels diferents mètodes.

L'objectiu d'aquest TFM ha estat determinar el contingut en polifenols d'una àmplia varietat de residus obtinguts en la producció d'oli d'oliva i de vi, mitjançant cromatografia de líquids amb detecció UV i diversos assajos de capacitat antioxidant (Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS i FRAP), i avaluar la correlació entre els resultats obtinguts amb els diferents mètodes.

Mitjançant la tècnica quimiomètrica d'Anàlisi de Components Principals (PCA), s'ha estudiat com es correlacionen els resultats dels diferents mètodes. Pel que fa als mètodes AOC, les millors correlacions s'observen entre els assaigs ABTS-DPPH, i ABTS-FC FC, mentre que la pitjor correlació s'observa entre els assaigs FRAP- DPPH. Per últim, globalment, s'observa una correlació satisfactòria entre els resultats dels diferents assaigs AOC i de la cromatografia de líquids.

**Paraules clau:** Polifenols, Assajos de Capacitat Antioxidant, Cromatografia de líquids, Correlació, Residus agroalimentaris.

**Title: Development of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of glucosinolates in cauliflower samples processed with different cooking treatments.**

Student: Laura Cayero Jiménez

Supervisor: Oscar Núñez Burcio

Nowadays consumers are more aware of the importance of a good diet and this has led to an increase in the consumption of natural ingredients and healthy and nutritious foods. The consumption of a diet rich in vegetables of the genus Brassica has been associated with neuroprotective effects, and to a reduction in cardiovascular disease, intestinal bacteria, and some types of cancer. Cruciferous vegetables are consumed frequently and in large quantities and are considered an important source of nutrients and bioactive compounds in a diet. These vegetables are rich in health-promoting phytochemicals such as vitamins, phenolic compounds, flavonoids, minerals and glucosinolates. Glucosinolates have awakened the interest of researchers because they have anti-cancer activities. Several studies have shown that exist a certain association between glucosinolate intake and the prevention of some serious diseases such as cancer. Therefore, the intake of glucosinolates improves body's defence efficiency and immune systems.

In this work, a UHPLC-ESI-MS/MS method has been developed to determine six glucosinolates in cauliflower samples. The chromatographic separation was optimized using a C18 reverse-phase (150 mm x 2.1 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) fused-core column obtaining a separation time of 17 min. The method has been validated and satisfactory results have been obtained for the quality instrumental parameters. Detection limits are less than  $1.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a good linearity has been obtained ( $R^2 \geq 0.982$ ), a good run-to-run and day-to-day precisions ( $\text{RSD} < 12.4\%$ ) and a good trueness (relative error  $< 4.2\%$ ).

In future works it is expected to use chemometric techniques such as PCA or PLS-DA to process the data and to determine the effect that different heat treatments have on glucosinolate content in the two varieties of cauliflower. In this way, the best heat treatments can be established to preserve the nutritional properties of cauliflower.

**Títol: Desenvolupament d'un mètode LC-ESI-MS/MS per a la determinació de glucosinolats en mostres de coliflor processades amb diferents tractaments de cuinat**

Estudiant: Laura Cayero Jiménez

Director: Oscar Núñez Burcio

Avui dia, els consumidors són més conscients de la importància d'una bona dieta, i això ha provocat un creixement en el consum d'ingredients naturals i d'aliments saludables i nutritius. El consum d'una dieta rica en verdures del gènere *Brassica* s'ha associat a efectes neuroprotectors, i a una reducció de malalties cardiovasculars, de bacteris intestinals, i d'algun tipus de càncer. Les verdures crucíferes es consumeixen freqüentment i en gran quantitat, i es consideren una font important de nutrients i compostos bioactius en una dieta. Aquestes verdures són riques en productes fitoquímics que promouen la salut, com ara vitamines, compostos fenòlics, flavonoides, minerals i glucosinolats. Els glucosinolats han despertat l'interès dels investigadors degut a que presenten activitats anti-cancerígenes. Diversos estudis han demostrat que existeix una certa associació entre la ingesta de glucosinolats i la prevenció d'algunes malalties greu com pot ser el càncer. Per tant, la ingesta de glucosinolats millora l'eficiència de la defensa del cos i dels sistemes immunes.

En aquest treball s'ha desenvolupat un mètode UHPLC-ESI-MS/MS per a la determinació de sis glucosinolats en mostres de coliflor. La separació cromatogràfica s'ha optimitzat utilitzant una columna de fase inversa C18 (150 mm x 2,1 mm, 2,7 µm) farcida amb partícules superficialment poroses de nucli sòlid, obtenint un temps de separació de 17 min. El mètode s'ha validat i s'han obtingut resultats satisfactoris per als paràmetres instrumentals de qualitat. En quant a límits de detecció, aquests són inferiors a  $1,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , s'ha obtingut una bona linealitat dins de l'interval de treball ( $R^2 \geq 0,982$ ), una bona repetibilitat i reproductibilitat ( $\text{RSD} < 12,4\%$ ) i una bona veracitat (error relatiu  $< 4,2\%$ ).

En futurs treballs s'espera utilitzar tècniques quimiomètriques com ara el PCA o el PLS-DA per tractar les dades i poder determinar l'efecte que els diferents tractaments tèrmics tenen en els nivells de glucosinolats en les dues varietats de coliflor. D'aquesta manera es podrà establir els millors tractaments tèrmics per conservar les propietats nutricionals de la coliflor.



# **Deconvolution of overlapping chromatographic peaks using exponentially modified Gaussian functions and parallel factor analysis.**

*Lydia Guerrero, J.L. Beltrán*

Although the Gaussian curve is the basic function defining the ideal chromatographic peaks, real data differ mainly in the front and tail parts of the peaks. So, alternative equations have been developed, presenting a better fit to the experimental data, as the describing the chromatographic profiles are used to fit the experimental data, as the EMG function.

In this study, different procedures for the deconvolution of overlapped chromatographic peaks have been compared. First, a function based on the EMG has been developed (EMG-POLI), and their efficiency has been compared with the original EMG in the deconvolution of the chromatographic peaks corresponding to a series of B-vitamins, obtained by HPLC-DAD. Then, the function has been applied to the calibration of these substances and the resolution of several mixtures of them.

On the other hand, we have analyzed the DOM in samples of phreatic water of Besos river, also by HPLC-DAD. In this case, we have recorded the UV absorption spectra at each retention time. The experimental data have been treated with the function EMG-POLI, and also by using the method PARAFAC that allows to obtain the absorption spectra of the pure compounds and the chromatographic profiles of each components. In this work, we have compared the chromatographic profiles obtained by PARAFAC with those obtained by the deconvolution by EMG-POLI.

# **Deconvolución de picos cromatográficos solapados mediante funciones gaussianas modificadas exponencialmente y análisis de factores en paralelo.**

*Lydia Guerrero, J.L. Beltrán*

Aunque la curva gaussiana es la función básica que define los picos cromatográficos ideales, los datos reales difieren principalmente en las partes frontal y posterior de los picos. Por lo tanto, se han desarrollado ecuaciones alternativas que se ajustan mejor a los datos experimentales, como la función EMG.

En este estudio se han comparado diferentes procedimientos para la deconvolución de picos cromatográficos. En primer lugar, se ha desarrollado una función basada en la EMG (EMG-POLI) y se ha comparado su eficacia con la EMG original mediante la deconvolución de picos cromatográficos correspondientes a una serie de vitaminas del grupo B, obtenidos mediante HPLC-DAD. A continuación, se ha aplicado la función desarrollada al calibrado para estas sustancias y a la resolución de mezclas de ellas.

Por otro lado, también se ha realizado un análisis del contenido de DOM en muestras de agua freática del río Besós. En este caso, se han obtenido los espectros UV a cada tiempo de retención. Los datos experimentales se han tratado mediante la función EMG-POLI, y también se han analizado con el método de análisis PARAFAC que permite obtener los espectros de absorción de los compuestos puros y a los perfiles cromatográficos de cada componente. En este caso se han comparado los perfiles resueltos por PARAFAC con los perfiles obtenidos mediante deconvolución por EMG-POLI.

**Title:** Lipidomic evaluation of single and combined effects of polyethylene microplastics and two PCB congeners on human hepatoma cells

**Author:** Albert Menéndez Pedriza

Plastic pollution has become one of the leading environmental threats nowadays due to their persistence, ubiquity and intrinsic toxic potential. Special attention has been posed on microplastics (MPs), small pieces of plastic with an upper size of 5 mm and an inferior size of 1  $\mu\text{m}$  that occur in the environment as a consequence of plastic pollution. The potential harm that microplastics impose on ecosystems varies from physical effects (i.e., entanglement and ingestion) to chemical effects. Chemical effects may be attributed to plasticizers and chemical additives added to plastics during the manufacturing process. However, recent studies have raised concern on chemical effects due to the ability of MPs to sorb on their surface environmental pollutants (e.g. heavy metals, persistent organic compounds or pharmaceuticals). Indeed, these works put emphasis on the called “Trojan Horse” effect, which indicates that the actual toxic effects induced by MPs on biota would be higher than those intrinsically expected. Their ability to concentrate multiple harmful pollutants with an important lipophilic behavior, facilitating their entrance to the food chain, may explain this fact. Among the different lipophilic environmental pollutants that have a great capacity to be sorbed by MPs due to their lipophilic behavior, it is worth mentioning polychlorinated biphenyls (PCBs). These chemicals constitute an important group of artificial bicyclic chlorinated hydrocarbons formed by 209 congeners.

In this work, single and combined ecotoxicological effects of two PCB congeners (PCB 101 and PCB 126) and polyethylene microplastics (PE-MPs) have been analysed in terms of lipidomic changes for the first time. In this study, HepG2 cell line (i.e. immortalized cell line derived from the liver tissue of a 15-year-old Caucasian male who had a well-differentiated hepatocellular carcinoma) has been employed as *in-vitro* model. Since the liver plays a central role in the metabolism and elimination of xenobiotic products, liver cell cultures are interesting *in-vitro* models to study the effects of these environmental pollutants on health.

This assessment has been divided into different sections. Firstly, sorption and desorption rates of both PCB chemicals by PE-MPs at different experimental conditions have been studied using a GC-MS methodology. Secondly, cell lethality induced by both pollutants on hepatoma cells at a wide range of concentrations has also been examined. This study, together with the analysis of the different changes produced in the lipidome of HepG2 cells due to the exposure of different concentrations of PCBs, have allowed the determination of the exposure concentrations used in the acute toxicity assessment for both pollutants. For both PCB chemicals, 5  $\mu\text{M}$  have been selected as the minimum PCB concentration in which significant lipidomic changes were recorded after 48 hours of exposure. Regarding MPs exposure concentration, 50 mg /L has been used. Lastly, four different treatments have been performed to study their single and combined toxicity for 48 hours: (1) PCBs alone, (2) MPs alone, (3) PCBs and MPs coexposed and (4) PCBs pre-incubated on MPs.

Results obtained in the LC-MS approach have been analysed applying different chemometric tools in order to determine which variables (lipidomic changes) were the most relevant to discriminate among treated and non-treated samples. Results acquired from the individual expositions of both PCBs suggested a relevant perturbation of glycerophospholipid levels. Despite that, important dissimilarities among both treatments were achieved. Regarding MPs single exposure, the most remarkable change detected was the enhancement of triglyceride content. For combined exposures, results demonstrated that sorbed PCBs may produce an increase of the toxic effects induced by MPs, as their desorption have occurred. Moreover, the presence of MPs might also change the PCB toxicity due to their sorption.

Therefore, results indicate that the “Trojan Horse” effect of MPs may play a crucial role in aquatic ecotoxicology, becoming a potential source of lipophilic chemicals for bioaccumulation and biomagnification by facilitating their entrance to the food chain.

**Keywords:** microplastics; PCBs; “Trojan Horse” effect; environmental lipidomics; chemometrics

**Títol:** Lipidomic evaluation of single and combined effects of polyethylene microplastics and two PCB congeners on human hepatoma cells

**Autor:** Albert Menéndez Pedriza

En els últims anys, els plàstics han destacat com un dels contaminants més rellevants al medi ambient. La seva elevada persistència, omnipresència en tots els ecosistemes a nivell mundial i toxicitat potencialment elevada, ha convertit els plàstics en una de les majors amenaces a nivell mediambiental. Especialment alarmants són els efectes que els microplàstics (MPs), partícules plàstiques de fins un màxim de 5 mm de diàmetre, poden produir tant als éssers humans, com a la resta d'éssers vius. Els danys que aquestes partícules poden produir en els diferents ecosistemes són diversos variant des d'efectes físics (*i.e.* obstrucció vies respiratòries o digestives) fins a efectes químics. Els efectes químics són produïts pels additius afegits als plàstics durant el procés de manufactura i per l'habilitat dels MPs d'adsorbir una diversitat de contaminants ambientals (*e.g.* metalls pesants, contaminants orgànics persistents o productes cosmètics). Aquest últim tipus d'efecte, ha despertat un especial interès per l'anomenat efecte "Cavall de Troia" que indicaria que la toxicitat real dels MPs seria molt més elevada que la esperada considerant únicament la seva toxicitat intrínseca, donat la seva capacitat per preconcentrar determinats contaminants altament hidrofòbics en la seva superfície. Entre els diferents contaminants ambientals lipofílics que presenten una gran capacitat per ser adsorbits pels MPs, cal destacar els bifenils policlorats (PCBs), un important grup de hidrocarburs bicíclics clorats constituït per 209 congèneres.

En aquest treball, s'han avaluat per primera vegada els efectes tòxics a nivell lipídomic causats per dos congèneres de PCBs (PCB 101 i el PCB 126) i els microplàstics de polietilè (PE-MPs) de forma individual i combinada. Aquest estudi s'ha dut a terme emprant la línia cel·lular HepG2 formada per cèl·lules hepàtiques humanes modificades genèticament per augmentar la seva capacitat de reproducció. Donat que el fetge juga un paper fonamental en el metabolisme i eliminació de compostos xenobiòtics, les línies cel·lulars hepàtiques són considerades models altament útils i fiables per a estudis toxicològics, donat que mostren característiques genotípiques i fenotípiques similars a les cèl·lules hepàtiques normals.

Aquest estudi s'ha dividit en diferents parts. En primer lloc s'ha avaluat la capacitat de sorció i desorció dels dos congèneres per part dels PE-MPs a diferents temps d'exposició i concentració mitjançant una metodologia basada en GC-MS. D'altra banda, s'ha estudiat la capacitat de produir mort cel·lular per ambdós tipus de contaminants a diferents concentracions, per tal de determinar les concentracions òptimes d'exposició a utilitzar posteriorment en els estudis lipídomics. Addicionalment, per duu a terme una elecció més acurada, s'ha examinat estadísticament quina concentració per ambdós PCBs era la mínima per induir canvis significatius en el lipidoma de les cèl·lules. Per tots dos congèneres, la concentració utilitzada ha estat 5 µM, mentre que pels PE-MPs, la concentració d'exposició utilitzada ha estat 50 mg /L. Per últim, els canvis de composició de lípids produïts pels PCBs i els PE-MPs han estat estudiats mitjançant 4 tractaments diferents: (1) cada congènere de PCB sol (2) PE-MPs sols (3) cada congènere de PCB coexposat amb PE-MPs (4) PE-MPs prèviament incubats amb els PCBs durant 48 hores.

Finalment, els extractes lipídics cel·lulars s'han analitzat per LC-MS i les dades resultants s'han processat utilitzant diferents eines quimiomètriques, per tal de determinar les variables (canvis lipídics) més rellevants per discriminar entre els diferents tipus de mostres. Els resultats obtinguts per les exposicions individuals d'ambdós PCBs suggereixen una gran pertorbació en els glicerofosfolípids. Tot i així, els canvis lipídomics produïts en ambdós casos difereixen entre sí. Respecte els canvis lipídomics produïts pels MPs, cal destacar l'augment considerable dels nivells de triglicèrids. Pel que fa les exposicions combinades, els resultats han demostrat com la presència de PCBs prèviament sorbits en els MPs augmenten el seu potencial tòxic. A més, la presència de MPs també tindria la capacitat de variar la toxicitat induïda pels PCBs.

Per tant, aquests resultats indiquen com el efecte "Cavall de Troia" dels MPs pot estar jugant un paper clau en la bioacumulació i biomagnificació d'aquest tipus de contaminants.

**Paraules clau:** microplàstics; PCBs; efecte "Cavall de Troia"; lipídica ambiental; quimiometria

# CARACTERITZACIÓ D'UN FLUID INTESTINAL SIMULAT PER AL SEU ÚS EN LA SUBROGACIÓ DE PROCESSOS DE PARTICIÓ BIOLÒGICS O AMBIENTALS

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

En aquest treball s'ha caracteritzat el sistema FeSSIF mitjançant el model de paràmetres de solvatació per veure si pot emular sistemes d'interès biològic o ambiental. En la caracterització s'ha utilitzat un conjunt de compostos neutres a pH 5,8 (pH a l'intestí prim després de la ingesta d'aliment), seleccionats en base a la seves propietats químiques.

Per dur a terme la caracterització del sistema FeSSIF, primerament s'ha determinat el factor de retenció ( $k$ ) dels diferents compostos mitjançant la cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC) utilitzant el preparat de FeSSIF com a fase pseudoestacionària.

Un cop determinats els  $\log k$  de tots els compostos s'ha prosseguit amb la caracterització del sistema FeSSIF mitjançant el model de paràmetre de solvatació. Per tal de predir el coeficients s'ha realitzat una regressió lineal múltiple entre el  $\log k_{\text{exp}}$  i els descriptors  $E$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $B$  i  $V$  de les diferents substàncies. Mitjançant la regressió s'obté l'equació que caracteritza el sistema ( $\log k = c + e E + s S + a A + b B + v V$ ), obtenint el valors dels diferents coeficients.

A continuació, s'ha fet la comparació del sistema FeSSIF amb altres sistemes d'interès biològic o ambiental caracteritzats per mitjà del mateix model. S'han comparat els coeficients normalitzats del model de paràmetre de solvatació dels diferents sistemes mitjançant dos mètodes de comparació: el paràmetre de distancia ( $d$ ) i l'anàlisi de components principals (PCA).

**Study of the degradation of Oxibenzone in the managed recharge of aquifers  
with reactive barriers  
by HPLC-MS/MS and electrochemical techniques.**

Naima Mohamed-Rodríguez, Nuria Serrano, M. Silvia Díaz-Cruz

**Abstract.**

Restoring ecological services related to freshwater ecosystems and replenishing depleted aquifers requires a comprehensive analysis of the pathogens and emerging anthropogenic chemical contaminants that may be present, in order to reduce risk and ensure human health and environmental protection.

Among the hundreds of environmental chemical contaminants, specifically, we will study oxybenzone, also known as benzophenone 3 (BP3) and its derivatives. This organic ultraviolet (UV) filter is a representative of the wide range of anthropogenic chemicals of current emerging concern (CEC). BP3 is found in products intended for personal care and the protection of polymeric materials against the harmful effects of UV light. UV filters have an uncontrolled flow to the receiving environment at the time of application or through common activities such as swimming or bathing, and also indirectly by the wastewater treatment plants (WWTPs) effluents where they are not eliminated. This continuous release together with its poor degradation have led them to be considered persistent pollutants. It is necessary to monitor BP3, since the endocrine disrupting effects it causes in the organisms that inhabit aquatic ecosystems and also the exposure of human beings have been documented.

In this work, a bibliographic search will be made that includes the last ten years works on the origin, occurrence, and removal of BP3, and especially its derivatives, since some of them have been found to produce even more harmful effects than the parent compound. Unfortunately, there are very few studies that help us to understand how the degradation products of BP3 originate and to know the toxic effects that they can cause at environmental and human levels.

# **Study of the degradation of Oxibenzone in the managed recharge of aquifers with reactive barriers**

**by HPLC-MS/MS and electrochemical techniques.**

Naima Mohamed-Rodríguez, Nuria Serrano, M. Silvia Díaz-Cruz

## **Resumen.**

Restaurar los servicios ecológicos relacionados con los ecosistemas de agua dulce y reponer los acuíferos agotados requiere un análisis exhaustivo de los patógenos y los contaminantes químicos antropogénicos emergentes que pueden estar presentes, a fin de reducir el riesgo y garantizar la salud humana y la protección del medio ambiente.

Entre los cientos de contaminantes químicos ambientales, específicamente, se estudiará la oxibenzona, también conocida como benzofenona 3 (BP3), y sus derivados. Este filtro ultravioleta (UV) orgánico es un representante de la amplia gama de productos químicos antropogénicos que son contaminantes ambientales de preocupación emergente (CEC). BP3 se encuentra en productos destinados al cuidado personal y la protección de materiales poliméricos contra los efectos nocivos de la luz UV. Los filtros UV tienen un flujo incontrolado hacia el ambiente receptor en el momento de la aplicación o mediante actividades cotidianas como nadar o bañarse, y también indirectamente por los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) donde no se eliminan de forma efectiva. Esta liberación continua, junto con su pobre degradación los han llevado a ser considerados contaminantes ambientales persistentes. Es necesario hacer un seguimiento de la BP3, ya que se han documentado los efectos disruptores endocrinos que causa en los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos y también a los seres humanos.

En este Trabajo Final de Máster, se realizará una búsqueda bibliográfica que incluye los últimos diez años de publicaciones sobre la presencia, origen y eliminación de BP3 y especialmente sus derivados, ya que algunos de ellos desarrollan efectos más nocivos que el compuesto del que provienen. Desafortunadamente, hay muy pocos estudios que nos ayuden a comprender cómo se originan los productos de degradación de BP3 y a conocer los efectos tóxicos que pueden causar a nivel ambiental y humano.

## **Master's Degree Final Project summary**

**Title:** Evaluation of different microextraction techniques for the determination of phthalates in consumer products by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS)

**Student's name:** Adrià Simon Ortiz

**Director's name:** Francisco Javier Santos Vicente

### **Summary:**

The present work consists in the determination and quantifications of phthalates. Phthalates are esters of phthalic anhydride, primarily used as plasticizers, in other words, additives added to plastic so as to enhance its flexibility, transparency, durability and longevity. They are mainly used to soften PVC, representing around 80% of the world's industrial production. Though they are not meant to be used in the manufacturing of PET, they have been found in the liquids inside those bottles, given the hazards phthalates represent to human health, diverse legislation has been written trying to tackle this problem. It is then necessary to monitor the present levels, and to that end we need fast, reliable, and affordable analytical methodologies. The aim of this work consists in developing a new headspace – SPME method for the extraction of phthalates and comparing it to the more established DLLME. Finally, with the most optimal method, real samples are going to be analyzed.



## **RESUM TFM**

**Títol:** Avaluació de tècniques de microextracció per la determinació de ftalats en productes envasats per cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS)

**Nom estudiant:** Adrià Simon Ortiz

**Nom director:** Francisco Javier Santos Vicente

### **Resum:**

El vigent treball tracta sobre la determinació i quantificació dels ftalats. Aquests son un grup d'èsters de l'àcid ftàlic, emprats principalment com plastificants, és a dir, substàncies afegides als plàstics que augmenten la seva flexibilitat, transparència, durabilitat i longevitat. Dintre dels plàstics que els fan servir, el PVC representa vora el 80% del seu àmbit. Encara que no es fan servir en el PET, concentracions de ftalats han estat trobades en líquids continguts pel mateix, donat el perill que presenten per la salut això ha provocat diverses legislacions restringint les concentracions ingeribles. És necessari, per tant, monitoritzar els nivells presents i per això es necessiten de metodologies analítiques ràpides, fiables i assequibles. L'objectiu d'aquest treball seria desenvolupar un nou mètode basat en *headspace* – SPME (microextracció en fase sòlida) per l'extracció dels ftalats i comparar-lo amb el vigent DLLME (microextracció líquid-líquid dispersiva). Finalment s'analitzarien mostres reals amb el mètode més òptim.

## EVALUATION OF PBA SORBENTS FOR PRECONCENTRATION OF rhEPO GLYCOPEPTIDES BY SPE-CE-MS

**L. Molina, E. Giménez, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa**

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

Glycoproteins play an essential role in clinics since they provide relevant information about biological states. As a result of pathological processes, this kind of biomolecules can experience alterations in both posttranslational modifications (PTMs), including N- and O- glycosylation, and its structure. Thus, glycoproteins are considered potential disease biomarkers. In this study, recombinant human erythropoietin (rhEPO) glycoprotein has been selected due to its relevance as biopharmaceutical and in doping control.

Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) was previously used to detect and characterize O- and N-glycopeptide glycoforms of rhEPO following a middle-down approach. Although CE-MS is recognized as a powerful tool for the analysis of biomolecules, offering versatility and highly efficient separation, it shows difficulties to detect low abundant glycoproteins in biological fluids. In this context, on-line solid phase extraction capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (SPE-CE-MS) is presented as an excellent alternative to CE-MS, providing higher sensitivity.

Regarding the SPE-CE configuration, a microcartridge, filled with a proper sorbent that shows affinity for the compounds of interest, is integrated in-line near the inlet of the separation capillary to carry out the clean-up and preconcentration steps. Analytical strategies have been developed previously using titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) and silica-based aminopropyl (HILIC) as sorbents for selective analysis of O<sub>126</sub> and N<sub>83</sub> glycopeptide glycoforms obtained from tryptic digests of rhEPO. Those methodologies achieved successful separation of O<sub>126</sub> and N<sub>83</sub> glycoforms and showed repeatable results in terms of migration times and peak areas. However, these sorbents showed higher affinity for sialylated glycoforms with smaller carbohydrate moiety and, consequently, the complete study of the glycosylation profile of rhEPO was not possible. Hence, new sorbents and experimental conditions need to be evaluated to fill this gap of knowledge in the analysis of rhEPO glycopeptides.

The present study aimed to investigate phenylboronic acid (PBA) as a sorbent in SPE-CE-MS to selectively retain and enrich glycopeptides from enzymatic digests of rhEPO glycoprotein. Providing a reversible covalent interaction with the carbohydrate-containing analytes, PBA achieved selectivity, and hence separation of rhEPO glycoforms. The optimized method allowed the detection of nine N<sub>83</sub> glycopeptide glycoforms and five O<sub>126</sub> glycopeptide glycoforms, including those with glycolylneuraminic acid in their structure, which is crucial to distinguish between endogenous and recombinant hEPO. Additionally, the novel PBA-SPE-CE-MS strategy showed a sensitivity enhancement in comparison with CE-MS. Although PBA sorbent demonstrated a higher affinity for less sialylated glycoforms, the method developed is promising. Further studies are required to evaluate the potential of PBA for the analysis of glycopeptides with different glycan composition and regardless of the protein derived from.

# AVALUACIÓ DE SORBENTS DE PBA PER A LA PRECONCENTRACIÓ DE GLICOPÈPTIDS DE LA rhEPO PER SPE-CE-MS

**L. Molina, E. Giménez, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa**

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

Les glicoproteïnes juguen un paper crucial en biomedicina, ja que proporcionen informació rellevant dels estats biològics. Com a resultat de processos patològics, aquest tipus de biomolècules poden patir alteracions en les modificacions post-traduccional (PTMs), com la N- i la O-glicosilació, i en la seva estructura. En aquest estudi, s'ha seleccionat la eritropoetina recombinant (rhEPO) com a glicoproteïna model donada la seva importància en els àmbits de control de qualitat farmacèutic i del control de dopatge.

L'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (CE-MS) s'ha emprat prèviament per detectar i caracteritzar els glicopèptids de la rhEPO, seguint una estratègia *middle-down*. Tot i que la CE-MS és considerada una tècnica excel·lent per l'anàlisi de biomolècules, oferint versatilitat i elevada eficàcia en la separació, presenta dificultats en la detecció de glicoproteïnes poc abundants en fluids biològics. En aquest context, l'extracció en fase sòlida en línia a l'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (SPE-CE-MS) es considera una excel·lent alternativa a la CE-MS, aportant una major sensibilitat.

En la configuració SPE-CE, un microcartutx, empaquetat amb partícules d'un sorbent que mostra afinitat pels compostos d'estudi, es col·loca en línia a prop de l'entrada del capil·lar de separació per dur a terme les etapes de *clean-up* i de preconcentració. En el nostre grup de recerca, s'han desenvolupat diferents metodologies analítiques utilitzant sorbents de diòxid de titani (TiO<sub>2</sub>) i de sílice d'aminopropil (HILIC) per l'anàlisi dels glicopèptids O<sub>126</sub> i N<sub>83</sub> de la rhEPO. Aquests mètodes van assolir una separació satisfactòria de les glicofomes del O<sub>126</sub> i del N<sub>83</sub>, i, a més, van mostrar resultats reproduïbles en termes de temps de migració i àrea de pic. No obstant, es va observar que els sorbents de TiO<sub>2</sub> i HILIC tenen una major afinitat per les glicofomes amb un major contingut d'àcids siàlics, fet que dificulta l'estudi complet dels perfils de glicosilació. D'aquí sorgeix la necessitat d'avaluar nous sorbents i noves condicions experimentals per l'anàlisi de glicopèptids.

El present estudi es va centrar en l'avaluació d'un sorbent d'àcid fenilborònic (PBA) per la retenció i preconcentració de glicopèptids en digestos tríptics de rhEPO per SPE-CE-MS. A través d'una interacció covalent reversible amb els glicans, el PBA permet separar de manera selectiva les diferents glicofomes de la rhEPO. El mètode optimitzat va permetre la detecció de cinc i nou glicofomes dels glicopèptids O<sub>126</sub> i N<sub>83</sub>, respectivament, incloent les glicofomes amb àcid glicolilneuramínic, fet que resulta indispensable per la distinció entre la rhEPO endògena i la recombinant. A més, el nou mètode PBA-SPE-CE-MS desenvolupat mostra un increment en la sensibilitat en comparació amb CE-MS. Malgrat el PBA mostri una major afinitat per les glicofomes amb un menor nombre d'àcids siàlics, el mètode proporciona resultats prometedors.

## MASTER'S FINAL PROJECT

**Title of the project:** Estudi del comportament del ferro(II) en manuscrits escrits amb tinta ferro-gàlica (Study of Fe(II) behaviour in manuscripts written with iron gall ink)

**Student:** Víctor Vallès Nebot

**Directors:** Héctor Bagán Navarro, José Francisco García Martínez

### Abstract

Iron gall ink, due to the acid and the free iron(II) ions that contains, causes the acid hydrolysis and the oxidation of cellulose that degrades the manuscripts. There are, among others, deacidifying and antioxidant conservation treatments, but the study of the second ones is very scarce. For that reason, this research aims to establish a method of absorption in the UV-Vis able to quantify, thanks to a complexing agent, the manuscripts' concentration of iron(II) to study the effect of antioxidant treatments on their conservation.

The preparation of the standards and the order of the necessary reagents were optimized, concluding that the best is to dissolve  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  in 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and to dilute them with 0.001 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to the desired concentration. The method is linear up to 2 mg Fe/L and able to quantify Fe(II), Fe(total) and, by difference, Fe(III). It was found that with 0.001 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  up to 65.98% of the iron can be extracted from the manuscript, and that a 2-cm<sup>2</sup> sample is sufficient to quantify it. The manuscript fragment must be shaken for two hours to extract the iron. Finally, after adding the complexing agent (o-phenanthroline), it is necessary to wait about 20 minutes to start the absorbance measurement.

Shortly, medium and highly degraded manuscripts with and without applied conservation methods (deacidifiers and/or antioxidants) were evaluated, concluding that in highly degraded ones more iron can be extracted, and the ratio of Fe(II) and Fe(III) is more similar than the shortly and medium degraded ones. The pH of the manuscript seems to influence the amount of iron that can be extracted from it. Finally, it seems that antioxidant treatment does not have a significant effect on the amount of Fe(II) if applied individually.

## TREBALL FINAL DE MÀSTER

**Títol del treball:** Estudi del comportament del ferro(II) en manuscrits escrits amb tinta ferro-gàl·lica

**Estudiant:** Víctor Vallès Nebot

**Directors:** Héctor Bagán Navarro, José Francisco García Martínez

### Resum

La tinta ferro-gàl·lica, per l'àcid i els ions de ferro(II) lliures que conté, provoca la hidròlisi àcida i l'oxidació de la cel·lulosa que degraden els manuscrits. Existeixen, entre d'altres, tractaments de conservació desacidificants i antioxidants, però l'estudi dels segons és molt escàs. Per això, aquest treball pretén establir un mètode d'absorció a l'UV-Vis capaç de quantificar, gràcies a un agent complexant, la concentració de ferro(II) present als manuscrits per estudiar l'efecte dels tractaments antioxidants en la seva conservació.

Es va optimitzar la preparació dels patrons i l'ordre dels reactius necessaris, conclouent que el millor és dissoldre  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M i diluir-los amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,001 M fins a la concentració desitjada. El mètode és lineal fins a 2 mg Fe/L i capaç de quantificar Fe(II), Fe(total) i, per diferència, Fe(III). Es va comprovar que amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,001 M es pot extreure fins a un 65,98% del ferro del manuscrit, i que una mostra de 2 cm<sup>2</sup> és suficient per quantificar-lo. El fragment de manuscrit s'ha d'agitar dues hores per poder extreure'n el ferro. Finalment, després d'afegir el complexant (o-fenantrolina), cal esperar uns 20 minuts per iniciar la mesura d'absorbància.

Es van avaluar manuscrits poc, mig i molt degradats amb tractaments de conservació aplicats (desacidificants i/o antioxidants) i sense, conclouent que dels molt degradats se'n pot extreure més ferro, i que la relació de Fe(II) i Fe(III) és més similar que als poc i mig degradats. Sembla que el pH del manuscrit influeix en la quantitat de ferro que se'n pot extreure. Finalment, el tractament antioxidant no sembla tenir un efecte massa rellevant sobre la quantitat de Fe(II) si s'aplica de manera individual.