

**Treballs Final de Master**  
**Màster Química Analítica**  
**Curs 18/19**

**Análisis de especies de arsénico en alimentos por HPLC-ICP-MS:  
Herramientas para el control de calidad de los resultados**  
**Ainoa González Navarro\*, Àngels Sahuquillo, José Fermín López**

*Universidad de Barcelona, Dept. d'Enginyeria Química i Química Analítica  
(UB), Martí i Franquès, 1-11-, Barcelona, España*

Arsenic is a metalloid which can be found in the environment and which originates from natural and anthropogenic sources. It is a toxic element whose degree of toxicity is mainly dependent on its chemical form and oxidation state. The inorganic arsenicals are more toxic than the organic ones and, within these two classes, the trivalent forms are more toxic than the pentavalent forms. This element is present in different foods and accumulates in large quantities in seafood, which represents a potential risk for human health and food safety. In the marine ecosystem, arsenic is mostly found as inorganic arsenous acid (As(III)) or arsenic acid (As(V)) and as methylated forms such as methylarsenic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), trimethylarsine oxide (TMAO), arsenocholine (AC) or arsenobetaine (AB).

Therefore, it is not possible to perform an adequate health risk assessment without knowing the proportions of organic and inorganic arsenic compounds present in seafood by just evaluating total arsenic content; indeed, it is necessary to identify the nature and the quantity of each arsenic species. In previous research, HPLC-ICP-MS coupling has been established as the best analytical method for the assessment of arsenic speciation. Due to the complexity of this technique and since not all laboratories can dispose of the required instrumentation, the development of an alternative analytical method based on separation by solid phase extraction (SPE) has been investigated. However, the results obtained by the SPE method demonstrate higher inorganic arsenic content than there actually is. This discrepancy arises from the quantification of other arsenic species jointly with the inorganic arsenic. For this reason, there is a need for validated analytical methods, as well as reference materials (RMs), that allow the internal control of the measurements.

In this research, a study and selection of an optimum matrix from seafood by HPLC-ICP-MS coupling was firstly carried out to prepare a RM. Subsequently, the RM was prepared from razor-clams and it was characterized using the aforementioned method. In this research, sixty units that content 5g of RM were obtained with values determinate for arsenobetaine ( $3,19 \pm 0,69 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), arsenocholine ( $0,03 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), dimethylarsinic acid ( $0,17 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), inorganic arsenic ( $1,81 \pm 0,09 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) and total arsenic ( $13,38 \pm 0,18 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ). The RM was prepared with the final objectives of *i*) being used in interlaboratory exercises for the determination of arsenic species in seafood, *ii*) validating analytical methods for analyzing arsenic species, and *iii*) providing valuable information to establish a legislation of maximum level Of these species in seafood.

## **Análisis de especies de arsénico en alimentos por HPLC-ICP-MS: Herramientas para el control de calidad de los resultados**

**Ainoa González Navarro\***, Àngels Sahuquillo, José Fermín López

*Universidad de Barcelona, Dept. d'Enginyeria Química i Química Analítica  
(UB), Martí i Franquès, 1-11-, Barcelona, España*

El arsénico es un metaloide que se puede encontrar en el medio ambiente y que se origina a partir de fuentes naturales y antropogénicas. Este es un elemento tóxico cuyo grado de toxicidad depende principalmente de su forma química y del estado de oxidación en que se encuentre. Las especies de arsénico inorgánico son más tóxicas que las orgánicas y, dentro de estas dos clases, las formas trivalentes son más tóxicas que las formas pentavalentes. Este elemento está presente en diferentes alimentos y se acumula en grandes cantidades en el marisco, lo que representa un riesgo potencial para la salud humana y la seguridad alimentaria. En el ecosistema marino, el arsénico se encuentra principalmente en forma de especies inorgánicas como el ácido arsenioso (As (III)) o el ácido arsénico (As (V)) y en formas metiladas como el ácido metilarsónico (MMA), el ácido dimetilarsínico (DMA), el óxido de trimetilarsina (TMAO) la arsenocolina (AC) o la arsenobetaina (AB).

Por lo tanto, no es posible realizar una evaluación adecuada de los riesgos para la salud solo mediante la evaluación del contenido total de arsénico, sin conocer las proporciones de los compuestos orgánicos e inorgánicos de arsénico presentes en los productos del mar; de hecho, es necesario identificar la naturaleza y la cantidad de cada especie de arsénico. En investigaciones anteriores, la técnica HPLC-ICP-MS se ha establecido como el mejor método analítico para la evaluación de la especiación de arsénico. Debido a la complejidad de esta técnica y dado que no todos los laboratorios pueden disponer de la instrumentación requerida, se ha investigado el desarrollo de un método analítico alternativo basado en la separación por extracción en fase sólida (SPE). Sin embargo, los resultados obtenidos por el método SPE demuestran un mayor contenido de arsénico inorgánico del que realmente hay. Esta discrepancia surge de la cuantificación de otras especies de arsénico conjuntamente con el arsénico inorgánico. Por este motivo, existe la necesidad de métodos analíticos validados, así como materiales de referencia (RM), que permitan el control interno de las mediciones.

En esta investigación, primero se realizó un estudio y selección de una matriz de marisco óptima para preparar una RM mediante HPLC-ICP-MS. Posteriormente, se preparó el RM a partir de las navajas y se caracterizó utilizando el método mencionado anteriormente. En esta investigación, se obtuvieron sesenta unidades de RM con un contenido de 5g, con valores determinados para la arsenobetaina ( $3,19 \pm 0,69$  mg·Kg<sup>-1</sup>), la arsenocolina ( $0,03 \pm 0,01$  mg·Kg<sup>-1</sup>), el ácido dimetilarsínico ( $0,17 \pm 0,05$  mg·Kg<sup>-1</sup>), el arsénico inorgánico ( $1,81 \pm 0,09$  mg·Kg<sup>-1</sup>) y el arsénico total ( $13,38 \pm 0,18$  mg·Kg<sup>-1</sup>). El RM se preparó con los objetivos finales de i) usarse en ejercicios de interlaboratorio para la determinación de especies de arsénico en mariscos, ii) validar métodos analíticos para analizar especies de arsénico, y iii) proporcionar información valiosa para establecer una legislación de los niveles máximos de estas especies en mariscos.

## **Propietats analítiques dels nanoclústers de plata estabilitzats per seqüències de DNA i RNA**

**Nom estudiant:** Alba Navarro i Martínez

**Nom director:** Raimundo Gargallo

Oligonucleotides are short DNA or RNA molecules that take part in many biological processes, such as gene expression or cell differentiation. A correlation between the concentration of selected oligonucleotides *in vivo*, such as microRNAs, and incidence of some diseases has been observed, thus enabling their use as biological markers. Detection of these molecules is hindered by their high sequential diversity, low molecular weight and difficulty of extraction from cells; consequently, sensitive methods are required for the determination.

Nanoclusters (NCs) are arrangements of a small number of atoms, like silver atoms (AgNCs), that display singular chemical and optical properties. Due to their size scale (<2 nm) they suffer from quantum confinement effect in which discrete energy levels arise from the valence and conduction bands. When electromagnetic radiation interacts with the material, electronic transitions between energy levels can occur, providing them with chromophore-like attributes. Spectral properties of these molecules can be modulated varying their size, geometry or ligands associated. However, NCs have a positive surface free energy that induces them to aggregate, forming the so-called nanoparticles, which do not have the same spectral properties. Therefore, electrostatic or steric stabilizers must be added to avoid aggregation of these structures.

Nucleic acids are able to coordinate through their bases with atoms in nanoclusters, avoiding aggregation phenomena that could produce nanoparticles. In addition, DNA and RNA templates showing the ability to recognize and hybridize to complementary sequences present in solution can be used to synthesize nanoclusters that will bind to biological markers and permit their sensitive detection.

In this Master's Thesis, AgNCs stabilized by nucleic acids complementary to several target microRNA sequences have been synthesized and their fluorescent properties have been studied. Nucleic acids used to stabilize AgNCs were named RedComp, YellowComp and IRComp and displayed a complementary domain to microRNA145, microRNA163 and microRNA166, respectively, as well as to their microDNA analogs. All the sequences were previously characterized by means of circular dichroism and molecular absorption spectroscopy. Although the method is intended for microRNA determination, microDNA analogs were used for preliminary analysis due to their enhanced stability against nucleases. The AgNCs were subjected to the addition of the complementary microDNA sequences to determine whether there were changes in the spectral properties, because of hybridization, that could be related to the initial oligonucleotide concentration, enabling the use of this method to analyze these short molecules. When the complementary microDNA was added a decrease on the fluorescence due to AgNCs was observed, in several occasions, along with a displacement of the emission wavelength. Furthermore, studies were made to evaluate AgNCs specificity for its microDNA, in presence of other non-complementary microDNAs. Merely the YellowComp-AgNCs showed good specificity for its complementary microDNA, microDNA163. Addition experiments were reproduced using microRNAs instead of microDNAs. In such circumstances, solely the RedComp-AgNCs showed acceptable selectivity for its complementary microRNA, microRNA145. Finally, we compared the results obtained by the duplex approximation with the ones acquired by the triplex strategy to explore whether there was a significant difference between the two procedures for microRNA determination. Results obtained in this Thesis suggested that DNA-AgNCs could potentially be used in microRNA detection although further studies must be performed in order to overcome its major drawbacks, such as its lack of robustness or performance *in vivo*.

## **Propietats analítiques dels nanoclústers de plata estabilitzats per seqüències de DNA i RNA**

**Nom estudiant:** Alba Navarro i Martínez; **Nom director:** Raimundo Gargallo

Els oligonucleòtids són petites molècules de DNA o RNA que participen en un gran nombre de processos biològics, com ara l'expressió gènica o la diferenciació cel·lular. S'ha pogut observar una correlació entre la concentració de determinats oligonucleòtids *in vivo*, com els microRNAs, i la incidència de determinades malalties, fet que possibilita la seva utilització com a marcadors biològics. Malauradament, la detecció d'aquestes molècules es veu obstaculitzada per la seva elevada diversitat seqüencial, baix pes molecular i dificultat d'extracció de les cèl·lules; en conseqüència, es requereixen mètodes sensibles per la seva determinació.

Els nanoclústers són agrupacions d'un nombre reduït d'àtoms, com ara àtoms de plata (AgNCs), que presenten unes propietats físiques i químiques úniques. A causa de la seva petita mida (<2 nm) pateixen efectes de confinament quàntic en els que sorgeixen nivells energètics discrets de les bandes de valència i conducció. Quan la radiació electromagnètica interacciona amb el material, es poden donar transicions electròniques entre nivells discrets que els doten d'atributs similars als cromòfors. Les propietats espectrals d'aquestes molècules es poden modular variant-ne la mida, geometria o lligands associats. Tanmateix, els NCs presenten una energia lliure de superfície positiva que n'indueix l'agregació, formant nanopartícules, amb propietats espectrals diferents. Conseqüentment, cal afegir estabilitzants electroestàtics o estèrics que evitin l'agregació d'aquestes estructures.

Els àcids nucleics són capaços de coordinar a través de les seves bases amb els àtoms del nanoclúster, prevenint fenòmens d'agregació que podrien provocar la generació de nanopartícules. Addicionalment, la capacitat de les molècules de DNA o RNA de reconèixer i hibridar amb seqüències complementàries en solució permet sintetitzar nanoclústers que s'uniran als marcadors biològics i en possibilitaran la seva detecció de forma sensible.

En aquest Treball Final de Màster s'han sintetitzat AgNCs funcionalitzats amb àcids nucleics complementaris a determinades seqüències de microRNAs i se'n ha estudiat les propietats fluorescents. Els àcids nucleics emprats en l'estabilització dels AgNCs, anomenats RedComp, YellowComp i IRComp; presenten un domini complementari al microRNA145, microRNA163 i microRNA166, respectivament, així com als seus microDNAs anàlegs. Les seqüències es van caracteritzar prèviament amb les tècniques de dicromisme circular i espectroscòpia d'absorció molecular. Malgrat que el mètode es va concebre per a la determinació de microRNAs, les anàlisis preliminars es van dur a terme amb microDNAs a causa de la seva major estabilitat envers nucleases. Els AgNCs s'han sotmès a experiments d'addició amb microDNAs complementaris per tal de determinar si es produïen canvis en les propietats espectrals, a causa de la hibridació, que es podrien relacionar amb la concentració inicial de l'oligonucleòtid, possibilitant la utilització del mètode per l'anàlisi d'aquestes petites molècules. En afegir el microDNA complementari s'ha observat majoritàriament un descens de la fluorescència dels AgNCs; reducció que en múltiples ocasions s'ha vist acompanyada d'un desplaçament de la longitud d'ona d'emissió. Addicionalment, s'han dut a terme estudis per avaluar l'especificitat dels AgNCs pel seu microDNA, en presència de microDNAs no complementaris. Només els YellowComp-AgNCs han demostrat tenir una bona especificitat pel seu microDNA complementari, el microDNA163. Els experiments d'addició es van reproduir emprant microRNAs enlloc de microDNAs. En aquest cas, únicament els RedComp-AgNCs van demostrar selectivitat pel seu microRNA complementari, el microRNA145. Finalment, es van comparar els resultats obtinguts per l'aproximació dúplex amb els de l'estratègia tríplex per tal d'investigar si s'apreciava alguna diferència significativa en la determinació de microRNA entre procediments. Els resultats d'aquest treball semblen indicar que, potencialment, els DNA-AgNCs es podrien emprar per a la detecció de microRNA malgrat que es requereixen estudis addicionals per tal de millorar els seus principals punts febles, tals com la seva falta de robustesa o el rendiment *in vivo*.

# **Voltammetric determination of benzotriazoles with screen-printed electrodes.**

**A. Muschietti, M.S. Díaz-Cruz, J.M. Díaz-Cruz**

## **ABSTRACT**

Benzotriazoles are widely used corrosion inhibitors and because of their persistence and unknown fate during wastewater treatment processes, they are gaining increased attention.

In this study, a new voltammetric method using screen-printed electrodes is described for the determination of the organic compounds 1H-benzotriazole (BZT) and 5-methyl-1H-benzotriazole (Me-BZT) in natural water samples.

Different types of carbon-based screen-printed electrodes were tested and those of nanomaterials, particularly those of nanofibers, have been shown to have greater sensitivity, repeatability and reproducibility. The effect of pH, sweep rate and analyte concentration on the electrochemical behavior has been investigated.

Several water samples spiked with BZT were analysed at concentration levels similar to those observed in natural waters near airports and polar areas ( $\text{mg L}^{-1}$ ), to demonstrate that the proposed method could be successfully used to analyse natural matrices.

# **Voltammetric determination of benzotriazoles with screen-printed electrodes.**

**A. Muschietti, M.S. Díaz-Cruz, J.M. Díaz-Cruz**

## **RESUMEN**

Los benzotriazoles son inhibidores de la corrosión ampliamente utilizados y, debido a su persistencia y destino desconocido durante los procesos de tratamiento de aguas residuales, están ganando mayor atención.

En este trabajo, se describe un nuevo método voltamperométrico que utiliza electrodos serigrafiados, para la determinación de los compuestos orgánicos 1H-benzotriazol (BZT) y 5-metil-1H-benzotriazol (Me-BZT) en muestras de aguas naturales.

Se han probado diferentes tipos de electrodos serigrafiados y los de nanomateriales, en particular los de nanofibras, han demostrado tener una mayor sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad. Se ha investigado también el efecto del pH, la velocidad de barrido y la concentración de analito en el comportamiento electroquímico.

Se analizaron varias muestras de agua enriquecidas con BZT a niveles de concentración parecidos a los observados en aguas naturales cercanas a aeropuertos y a zonas polares ( $\text{mg L}^{-1}$ ), demostrando que el método propuesto podría ser utilizado con éxito para analizar matrices de tipo natural.

## Development of on-line solid-phase extraction capillary liquid chromatography-mass spectrometry for the sensitive analysis of peptide biomarkers.

Ana Hijano, Fernando J. Benavente

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

The detection of neuropeptides in biological samples is a relevant issue in biomedical research due to their importance as biomarkers of different neurological disorders. In proteomics and peptidomics research, nano-liquid chromatography-mass spectrometry (nanoLC-MS) is the most commonly used among the different modes of microscale LC-MS. Such technique allows the analysis of sample volumes in the order of nanoliters and provides an increased sensitivity, although it presents lower robustness with regards to capillary LC (capLC). With any of these high-performance microscale separation techniques, on-line solid phase extraction (SPE) can be used to reduce sample complexity, increase the analyzed volumes and decrease the limits of detection (LODs).

In this study, the analysis of three model opioid peptides, i.e. dynorphin A 1-7 (Dyn A), endomorphin 1 (End 1) and methionine enkephalin (Met) by capLC with on-line SPE (SPE-capLC) was carried out. First, a novel SPE-capLC-UV system was developed and validated which allowed until 1000-fold enhanced sensitivities compared to capLC-UV. This methodology was adapted to SPE-capLC-MS in order to further decrease the limits of detection, arriving until values of 3 ng/mL for Met and End 1. Alternatively, the target opioid peptides were analyzed by capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) using a method previously developed in our group. Peak shapes and separation resolutions were better compared to capLC-MS, but CE-MS showed poorer sensitivities. LODs by SPE-CE-MS were estimated from current experiments and previous results from our group, demonstrating that SPE-CE-MS provided the highest sensitivities among all compared techniques. Advantages and disadvantages of SPE-CE-MS and SPE-CE-MS are discussed.

The applicability of the developed capLC-MS and SPE-capLC-MS for the analysis of peptides in complex real samples was also investigated. Human plasma samples spiked with opioid peptides were analyzed by SPE-capLC-MS; however, at this moment none of the three opioid peptides were detected at the concentration levels analyzed. Thus, further experiments at higher peptide concentrations will be performed. Moreover, SPE-capLC-MS allowed enhanced sequence coverages of  $\beta$ -casein digests compared to those obtained using capLC-MS.



## Desenvolupament de mètodes de cromatografia de líquids capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses amb extracció en fase sòlida en línia per l'anàlisi sensible de biomarcadors peptídics.

Ana Hijano, Fernando J. Benavente

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

La detecció de neuropèptids en mostres biològiques és un aspecte rellevant en investigació biomèdica degut a la seva importància com a biomarcadors de diferents trastorns neurològics. En proteòmica i peptidòmica, la tècnica d'anàlisi més usada d'entre els diferents sistemes LC-MS miniaturitzats, és la nanocromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses (nanoLC-MS). Aquesta tècnica permet l'anàlisi de volums de mostra de l'ordre de nanolitres i ofereix un augment considerable de la sensibilitat, tot i que presenta una baixa robustesa en comparació amb la cromatografia de líquids capil·lar (capLC). Amb qualsevol d'aquestes tècniques de separació de micro-escala d'alta eficàcia, es pot emprar l'extracció en fase sòlida en línia (SPE) per a reduir la complexitat de la mostra, augmentar els volums analitzats i disminuir els límits de detecció (LODs).

En aquest estudi s'ha dut a terme l'anàlisi per SPE en línia amb capLC (SPE-capLC) de tres pèptids opioïdes model com són la dinorfina A 1-7 (Dyn A), l'endomorfina 1 (End 1) i la metionina encefalina (Met). En primer lloc, s'ha desenvolupat i validat una metodologia SPE-capLC-UV que ha permès assolir una millora de la sensibilitat de fins a 1000 vegades si ho comparem amb capLC-UV. La metodologia desenvolupada s'ha adaptat a la detecció per espectrometria de masses (SPE-capLC-MS) per tal de reduir encara més els LODs, arribant fins a valors de 3 ng/mL per a Met i End 1. Alternativament, els pèptids opioïdes d'interès s'han analitzat per electroforesi capil·lar acoblada a espectrometria de masses (CE-MS) emprant un mètode prèviament desenvolupat en el nostre grup. La forma dels pics i les resolucions de la separació han estat millors als obtinguts en capLC-MS, però CE-MS ha presentat sensibilitats menors. En el cas de la tècnica SPE-CE-MS, els LODs s'han estimat a partir d'experiments actuals i resultats previs del nostre grup, demostrant que SPE-CE-MS proporciona les majors sensibilitats entre totes les tècniques comparades.

L'aplicabilitat dels mètodes de capLC-MS i SPE-capLC-MS per a l'anàlisi dels pèptids en mostres reals complexes també ha estat investigada. S'han analitzat mostres de plasma fortificades amb pèptids opioïdes per SPE-capLC-MS; malauradament, cap dels tres pèptids opioïdes ha pogut ser detectat als nivells de concentració analitzats. Per tant, caldrà dur a terme experiments addicionals emprant concentracions més elevades de pèptids. A més a més, SPE-capLC-MS s'ha aplicat a l'anàlisi de digestos tríptics de  $\beta$ -caseïna, mostrant una millora de les cobertures de la seqüència respecte a les obtingudes mitjançant capLC-MS.



**Title:** Preparation and characterization of new scintillator polymeric materials for the absorption and detection of radón-222

**Student:** Arnau Coma Garcia, Màster en Química Analítica, UB

**Directors:** Dr. José Francisco García Martínez y Dr. Alex Tarancón Sanz

---

Radon-222 is a natural radionuclide that is found in the decay chain of uranium-238. It appears on Earth in the state of gas and its incorporation into the human body can occur directly by a direct inhalation, or by the ingestion of polluted water in contact with minerals with significant concentrations of radium-226 or uranium-238. It can cause different health problems, because of its rapid decay to lead-210 with the emission of 3 alpha particles and 2 beta particles.

With the aim of developing a new simple, fast and efficient technique for the detection of radon-222 in different matrices, it is intended to synthesize new scintillating polymeric materials in the form of a microspheres bases on polystyrene and polycarbonate. Following the hypothesis that a modification of the PSm synthesis process through the evaporation – extraction procedure, by using gases to produce PSm imprinted with cavities which allows the immobilization of radon-222, it is expected that the synthesized PSm present high scintillation capabilities and high absorption properties of radon-222.

In the present work, PSm have been synthesized based on polystyrene and polycarbonate, through a modification of the evaporation – extraction procedure, by the use of different gases ( $N_2$ , He and Ar), and have been characterized according to different parameters: morphologically and structurally by the use of SEM and IRS; respect to its scintillation capabilities by analysing active standards of  $^3H$  and  $^{14}C$ ; as well as their radon-222 absorption properties. In order to carry out the evaluation of the absorption properties of PSm, a methodology has been developed, which has provided less reproducible results when it was performed with the presence of PSm, a fact that presents that a modification of this methodology is needed.

The imprinted PSm had a morphology similar to the PSm synthesised by the evaporation – extraction procedure without modifications, as well as no significant changes in the polymer structures. On the contrary, it has not been possible to determine the effect of the modification of the synthesis procedure on the properties of scintillators and the absorption capabilities of PSm, due to the poor reproducibility obtained.

---

**Keywords:** radon-222, PSm, evaporation – extraction, polystyrene, polycarbonate, scintillation

**Título:** Preparación y caracterización de nuevos materiales poliméricos centelleadores para la absorción y medida del radón-222

**Estudiante:** Arnau Coma Garcia, Màster en Química Analítica, UB

**Tutores:** Dr. José Francisco García Martínez y Dr. Alex Tarancón Sanz

---

El radón-222 es un radionúclido de origen natural que se encuentra en la cadena de desintegración del uranio-238. Se presenta en la Tierra en estado de gas y su incorporación al cuerpo humano puede darse directamente por inhalación directa, o bien por ingestión de agua contaminada en contacto con minerales con concentraciones significativas de radio-226 o uranio-238. Puede causar distintos problemas de salud, como cáncer de pulmón, a causa de su rápido decaimiento a plomo-210 con la emisión de 3 partículas alfa y 2 partículas beta.

Con el objetivo de desarrollar una nueva técnica sencilla, rápida y eficaz para la detección de radón-222 en distintas matrices, se pretende sintetizar nuevos materiales poliméricos centelleadores en forma de microesfera de base de poliestireno y policarbonato. Bajo la hipótesis que una modificación del procedimiento de síntesis de PSm mediante el procedimiento de evaporación – extracción, mediante el uso de gases para producir PSm *imprinted* con cavidades para alojar el radón-222, se espera que las PSm resultantes presenten unas elevadas capacidades centelleadoras y de absorción de radón-222.

En el presente trabajo se han sintetizado PSm en base de poliestireno y policarbonato, mediante una modificación del procedimiento de evaporación – extracción, utilizando gases como porógenos (N<sub>2</sub>, He, Ar) y se han caracterizado según distintos parámetros: morfológicamente y estructuralmente mediante el uso de SEM e IRS; respecto a sus capacidades centelleadoras mediante el análisis de patrones activos de <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C; así como sus propiedades de absorción de radón-222. Para la evaluación de la absorción de radón-222 en PSm, se ha desarrollado una metodología para llevar a cabo el estudio, la cual ha proporcionado resultados menos reproducibles cuando se realiza en presencia de PSm, hecho que presenta la necesidad de una modificación.

Las PSm *imprinted* presentan una morfología similar a las PSm sintetizadas mediante el procedimiento de evaporación – extracción sin modificaciones, así como ningún cambio significativo en cuanto las estructuras de los polímeros utilizados. Por el contrario, no se ha podido determinar el efecto de la modificación del procedimiento de síntesis a las propiedades de centelleadoras y de absorción de las PSm, debido a la poca reproducibilidad obtenida.

---

**Palabras clave:** radón-222, PSm, evaporación - extracción, absorción, poliestireno, policarbonato, centelleo.

**Director:** Dr. Francisco Javier Santos Vicente

**Estudiante:** Emma Ayvazyan Arutyunyan

***Determinación de Dechlorano Plus y análogos en aguas mediante microextracción en fase sólida combinada con cromatografía de gases – espectrometría de masas.***

**ABSTRACT**

Dechlorane Plus (DP) and related compounds constitute a group of halogenated flame retardants that have been widely used over the last decades in a great variety of consumer products, such as in coatings for commercial electrical wires and cables, connectors for computers, and plastic roofing material for commercial buildings, to reduce the risk of fire accidents. These compounds were synthesized as substitutes for the banned Mirex and decabrominated diphenyl ether, because they exhibit similar fire retardant properties. Since its first detection in 2006, data on their occurrence in the environment have increased rapidly and they have even been detected from remote areas. Due to their highly lipophilic and stability properties, they are persistent and can be bioaccumulated through the food chain, causing toxic effects on the living organisms. After many studies, there is still a lack of information regarding their behavior and occurrence in the environment. Therefore, there is a need to dispose of sensitive analytical methods for the determination of these contaminants in environmental samples at low concentration levels.

The aim of the present work was to develop a fast, reliable and sensitive analytical method for the determination of Dechlorane Plus and related compounds in wastewater samples. The developed methodology consists on the headspace space solid-phase extraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination. To achieve maximum sensitivity and selectivity in the GC-MS determination, electron ionization (EI) and negative ion chemical ionization (NICI) were assessed, being the NICI the mode that provided better results, achieving low limits of detection (0.4 – 0.14 pg injected). In addition, parameters affecting the extraction and desorption of HS-SPME were investigated and optimized, and the quality parameters of the whole method were established. The HS-SPME GC-NICI-MS method provided excellent sensitivity, good precision (RSD% < 15%) and trueness (RE% < 13%, achieving low method limits detections, ranging from 0.001 to 0.08 ng/L. The methodology was successfully applying to the analysis of effluents of wastewater treatment plants, detecting the presence of the target compounds in some samples at concentrations ranging from 0.014 to 0.58 ng/L.

**Director:** Dr. Francisco Javier Santos Vicente

**Estudiante:** Emma Ayvazyan Arutyunyan

***Determinación de Declorano Plus y análogos en aguas mediante microextracción en fase sólida combinada con cromatografía de gases – espectrometría de masas.***

**RESUMEN**

Declorano Plus (DP) y compuestos relacionados constituyen un grupo de retardantes de llama halogenados que se han utilizado ampliamente en las últimas décadas en una gran variedad de productos de consumo, como recubrimientos en cables eléctricos, conectores para ordenadores, materiales plásticos y en cubiertas de edificios, para reducir el riesgo de incendio. Estos compuestos fueron sintetizados como sustitutos del Mirex y el decabromodifenil éter después de su prohibición, debido a que presentan propiedades ignífugas similares. Desde su detección en 2006, los datos relativos a su presencia en el medio ambiente han aumentado rápidamente e incluso se han detectado en áreas remotas. Debido a sus propiedades lipofílicas y su elevada estabilidad, estos compuestos son persistentes y pueden bioacumularse a través de la cadena alimentaria, causando efectos tóxicos en los organismos vivos. Aunque se han realizado muchos estudios, todavía hay una falta de información sobre su comportamiento y presencia en el medio ambiente. Por lo tanto, es necesario disponer de métodos analíticos sensibles para la determinación de estos contaminantes en muestras ambientales a niveles bajos de concentración.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método analítico rápido, confiable y sensible para la determinación de Declorano Plus y compuestos relacionados en muestras de aguas residuales. La metodología desarrollada consistió en una extracción en fase sólida de espacio de espacio de cabeza (HS-SPME) seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Para lograr la máxima sensibilidad y selectividad en la determinación por GC-MS, se evaluaron la ionización electrónica (EI) y la ionización química de iones negativos (NICI), siendo el NICI el modo que proporcionó mejores resultados, permitieron alcanzar bajos límites de detección (0,4 – 0,14 pg inyectados). Además, se investigaron y optimizaron los parámetros que afectan a la extracción y desorción mediante HS-SPME, y se establecieron los parámetros de calidad. El método HS-SPME GC-NICI-MS desarrollado proporcionó una excelente sensibilidad, buena precisión (RSD% <15%) y veracidad (RE% <13%, obteniendo bajos límites de detección en el intervalo de 0,001 a 0,08 ng/L. La metodología fue aplicada al análisis de efluentes procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, detectando la presencia de DP y análogos en algunas de las muestras analizadas a concentraciones entre 0,014 y 0,58 ng/L.

**DETERMINATION AND OCCURRENCE OF BISPHENOLS AND  
BENZOPHENONE-TYPE ULTRAVIOLET FILTERS IN WHITE-  
TAILED EAGLES (*Haliaeetus albicilla*) FROM SMØLA, NORWAY**

Student: Bernat Oró i Nolla

Direction: Sílvia Lacorte and Veerle Jaspers

Synthetic chemicals have been produced and dispersed into the environment where they can affect the quality of wildlife and ecosystems. This study is focused on the analysis of bisphenols (BPs) and benzophenone – type ultraviolet filters (BzP UV-Fs) using raptor species as environmental sentinels of pollution. White-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*) were used to evaluate the occurrence of these pollutants in dead animals from Smøla, Norway. It was hypothesized that this eagle accumulates these compounds from the diet and that these contaminants can be detected in feathers, muscle and liver. Different analytical methods were developed for each matrix to prove which would be the best tissue to determine the presence of the compounds of interest. The performance of the method for the liver matrix was evaluated in terms of sensibility, limits of detection, repetitivity and recoveries. Liver was selected as the most suitable matrix among feathers and muscle as it has high potential to accumulate these pollutants and 38 liver samples were analysed with the method developed. The most ubiquitous compound was BPAF with concentrations ranging between 1,08 and 6,68 ng·g<sup>-1</sup> followed by BzP-1 with a range between 2,07 and 7,94 ng·g<sup>-1</sup>. The highest concentrations were obtained for BPA which exhibited a range from 3,36 to 33,8 ng·g<sup>-1</sup> and the lowest were found for 4-OH-BzP with values from 0,14 to 2,08 ng·g<sup>-1</sup>. Other pollutants such as BPAP, BPM, BPZ and BzP-2 were detected only in 1 to 3 samples and at low concentrations. Only BzP-8 which was only detected in two occasions, had higher concentrations (2,08 and 10,5 ng·g<sup>-1</sup>). Finally, BPF, BPB, BPS, BPP and BzP-3 were not detected. So, the concentrations found suggest that eagles can uptake these pollutants from their food and water. The impact of these compounds on eagles needs to be explored given their endocrine disruption potential.

Barcelona, July 2019

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Suprimir:**

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**DETERMINATION AND OCCURRENCE OF BISPHENOLS AND  
BENZOPHENONE-TYPE ULTRAVIOLET FILTERS IN WHITE-  
TAILED EAGLES (*Haliaeetus albicilla*) FROM SMØLA, NORWAY**

Estudiant: Bernat Oró i Nolla

Direcció: Sílvia Lacorte and Veerle Jaspers

Substàncies químiques sintètiques s'han produït i dispersat a l'entorn afectant la qualitat de la vida silvestre i dels ecosistemes. Aquest estudi se centra en l'anàlisi de bisfenols (BP) i de filtres ultraviolats de tipus benzofenona (BzP UV-Fs) utilitzant aus rapinyaires com a sentinelles ambientals de contaminació. L'àguila marina (*Haliaeetus albicilla*) es va utilitzar per avaluar l'aparició d'aquests contaminants en individus ja morts de l'illa d'Smøla, Noruega. Es va plantejar la hipòtesi que aquesta àguila acumula aquests compostos a través de la dieta i que aquests contaminants es poden detectar a les plomes, els músculs i el fetge. Es van desenvolupar diferents mètodes analítics per a cada matriu per demostrar quin seria el millor teixit per determinar la presència dels compostos d'interès. Es va avaluar el rendiment del mètode per a la matriu hepàtica en termes de sensibilitat, límits de detecció, repetitivitat i recuperacions. El fetge va ser seleccionat com la matriu més adequada entre les plomes i el múscul, ja que té un gran potencial per acumular aquests contaminants i es van analitzar 38 mostres de fetge amb el mètode desenvolupat. El compost amb més presència va ser el BPAF amb concentracions compreses entre 1,08 i 6,68 ng·g<sup>-1</sup> seguits de BzP-1 amb un rang entre 2,07 i 7,94 ng·g<sup>-1</sup>. Les concentracions més altes es van obtenir pel BPA, que van mostrar un rang de 3,36 a 33,8 ng·g<sup>-1</sup> i es va trobar el més baix per a 4-OH-BzP amb valors de 0,14 a 2,08 ng·g<sup>-1</sup>. Altres contaminants com BPAP, BPM, BPZ i BzP-2 només es van detectar en 1 a 3 mostres i en concentracions baixes. Només BzP-8, que només es va detectar en dues ocasions, tenia concentracions més altes (2,08 i 10,5 ng·g<sup>-1</sup>). Finalment, no es van detectar BPF, BPB, BPS, BPP i BzP-3. Per tant, les concentracions trobades suggereixen que les àguiles poden absorbir aquests contaminants a través de l'alimentació. Cal explorar l'impacte d'aquests compostos en àligues, donat el seu potencial de disrupció endocrina.

Barcelona, July 2019

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Suprimir:**

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt

**Formatat:** Tipus de lletra: 15 pt



## EVALUATION OF HILIC SORBENTS FOR THE ENRICHMENT OF rhEPO GLYCOPEPTIDES BY SPE-CE-MS

*Berta Torres Cobos, Dra. Victòria Sanz-Nebot and Dra. Estela Giménez López, Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry.*

In recent times, proteomics has become a growing field due to its key role in the research of new clinical biomarkers. Biomarkers are measurable indicators of a biological state. The study of these indicators is crucial in the early diagnosis, monitoring and control of diseases. Proteins are excellent biomarkers since they are involved in nearly all biological processes. Furthermore, alterations in their concentration, structure or post-translational modifications (PTM) can be the cause of pathogenesis. Glycosylation, which is the covalent attachment of carbohydrate moieties, known as glycans, to proteins, is among the most commonly altered PTMs related to disease development.

Three complementary approaches (top-down, middle-down and bottom up) can be followed in the analysis of the microheterogeneity of glycoproteins by mass spectrometry (MS). In this study, the middle down strategy, which includes tryptic digestion to characterize glycoproteins from the resulting glycopeptide mixture, will be applied since it provides information about glycosites and glycan composition and reduces the complexity of the glycoprotein, favouring MS ionization and thus, improving sensitivity.

Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) has been widely used for the analysis of proteins because of its excellent performance in the separation and characterization of the analytes of interest from small amounts of complex biological samples. However, one of the main drawbacks of this technique is its poor sensitivity caused by the small volumes of the analysed sample. To overcome this limitation, online preconcentration by solid phase extraction can be used (SPE-CE-MS). It is based on the reversible interaction between a high affinity sorbent and the analyte of interest. The sorbent is packed into a microcartridge that is assembled near the entrance of the separation capillary. The sample is loaded in high volumes ( $\mu\text{L}$ ). Then, the analytes are retained by the sorbent and later eluted into the separation capillary with a small volume of elution buffer (nL). With this process the analyte concentration is increased and the limits of detection (LOD) are reduced, consequently improving the sensitivity of the method.

In this study, an aminopropyl-HILIC sorbent was used to develop a HILIC-SPE-CE-MS method to selectively enrich and enhance the sensitivity of glycopeptides from glycoprotein digests. The selected protein was recombinant human erythropoietin (rhEPO) due to its high microheterogeneity and relevance in the biopharmaceutical and doping control fields. The method was optimized for the  $\text{O}_{126}$  glycopeptide of rhEPO. The optimized parameters were the pressure applied during the separation, the sorbent conditioning process, the composition and loading time of the sample, the elution and the background electrolyte (BGE) composition. Once optimized, repeatability, linearity and limits of detection (LODs) were evaluated for the analysis of two of the most abundant  $\text{O}_{126}$  glycopeptide glycoforms and the results were compared and with those obtained by CE-MS.

Finally, the established method was evaluated for the analysis of  $\text{O}_{126}$ , but also  $\text{N}_{83}$  glycopeptides of rhEPO. Five O-glycoforms ( $\text{O}_{126}/1\text{NeuAc}$ ,  $\text{O}_{126}/2\text{NeuAc}$ ,  $\text{O}_{126}/1\text{NeuGc}$  and  $\text{O}_{126}/1\text{NeuAc}1\text{NeuGc}$ ) and only one N-glycoform ( $\text{N}_{83}/4\text{Ant}4\text{NeuAc}1\text{Fuc}$ ) were detected. The high affinity of the sorbent for the highly sialylated glycoforms seemed to hamper their elution and therefore, also their detection. Moreover, a preferential retention of these glycoforms was observed, which was translated in a selective enrichment of the highly sialylated glycoforms. However, the sensitivity of the method was improved in two orders of magnitude in regard to the CE-MS method, allowing the analysis of low concentration samples and broadening the scope of this technique in the doping control and biopharmaceutical fields.

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

*Berta Torres Cobos, Dra. Victòria Sanz-Nebot i Dra. Estela Giménez López, Departament de Enginyeria Química i Química Analítica.*

En els últims temps, la proteòmica s'ha convertit en un camp en expansió a causa del seu paper clau en la investigació de nous biomarcadors clínics. Els biomarcadors són indicadors mesurables d'un estat biològic. L'estudi d'aquests indicadors és crucial per al diagnòstic precoç, el seguiment i el control de malalties. Les proteïnes són excel·lents biomarcadors, ja que estan implicades en gairebé tots els processos biològics. A més, les alteracions en la seva concentració, estructura o modificacions post-traduccional (PTM) poden ser la causa de la patologia. Entre les PTMs més comunament modificades relacionades amb el desenvolupament de la malaltia es troba la glicosilació, que és la unió covalent de grups de carbohidrats, coneguts com glicans, a les proteïnes.

En l'anàlisi de glicoproteïnes per espectrometria de masses (MS) es poden seguir tres enfocaments complementaris (*top-down*, *middle-down* i *bottom up*). En aquest estudi s'aplicarà l'estratègia *middle-down*, que inclou una digestió triptica per a caracteritzar les glicoproteïnes a partir de la barreja de glicopèptids resultant, ja que proporciona informació sobre els punts de glicosilació i la composició de glicà a més, es redueix la complexitat de la glicoproteïna, afavorint la ionització per MS i per tant, millorant la sensibilitat.

L'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (CE-MS) ha estat àmpliament utilitzada per a l'anàlisi de proteïnes a causa del seu excel·lent funcionament en la separació i caracterització dels analits d'interès de petites quantitats de mostres biològiques complexes. No obstant això, un dels principals inconvenients d'aquesta tècnica és la baixa sensibilitat deguda als petits volums de mostra analitzats. Per superar aquesta limitació, es pot utilitzar una metodologia de preconcentració mitjançant extracció en fase sòlida en línia (SPE-CE-MS). Aquesta es basa en la interacció reversible entre un sorbent d'elevada afinitat i l'analit d'interès. El sorbent s'empaqueta en un microcartutx que s'uneix al capil·lar de separació. La mostra es carrega en volums grans ( $\mu\text{L}$ ). A continuació, els analits són retinguts pel sorbent i posteriorment s'elueixen al capil·lar de separació amb un petit volum d'eluent (nL). Amb aquest procés s'incrementa la concentració de l'analit i es redueixen els límits de detecció (LOD), millorant així la sensibilitat del mètode.

En aquest estudi, es va utilitzar un sorbent aminopropil HILIC per al desenvolupament d'un mètode HILIC-SPE-CE-MS per enriquir i millorar la sensibilitat dels glicopèptids dels digestos de la glicoproteïna. La proteïna seleccionada va ser l'eritropoetina humana recombinant (rhEPO) degut a la seva elevada microheterogeneïtat i rellevància en els camps biofarmacèutic i de control de dopatge. El mètode es va optimitzar per al glicopèptid  $\text{O}_{126}$  de rhEPO. Els paràmetres optimitzats van ser; la pressió aplicada durant la separació, el procés de condicionament del sorbent, la composició i el temps de càrrega de la mostra, l'elució i la composició de l'electròlit de separació (BGE). Un cop optimitzats, es va avaluar la repetibilitat, la linealitat i els límits de detecció (LODs) per a l'anàlisi de dues de les glicofomes del glicopèptid  $\text{O}_{126}$  més abundants, i es van comparar els resultats amb els obtinguts per CE-MS.

Finalment, es va avaluar el mètode establert per a l'anàlisi dels glicopèptids  $\text{O}_{126}$  i  $\text{N}_{83}$  de la rhEPO. Es van detectar cinc glicofomes del  $\text{O}_{126}$  ( $\text{O}_{126} / 1\text{NeuAc}$ ,  $\text{O}_{126} / 2\text{NeuAc}$ ,  $\text{O}_{126} / 1\text{NeuGc}$  i  $\text{O}_{126} / 1\text{NeuAc}1\text{NeuGc}$ ) i només una del  $\text{N}_{83}$  ( $\text{N}_{83} / 4\text{Ant}4\text{NeuAc}1\text{Fuc}$ ). L'elevada afinitat del sorbent per les glicofomes altament sialilades semblava dificultar la seva elució i, per tant, també la seva detecció. A més, es va observar una retenció preferent d'aquestes glicofomes, la qual es va traduir en un enriquiment selectiu de les glicofomes altament sialilades. No obstant això, la sensibilitat del mètode es va millorar en dos ordres de magnitud respecte al mètode CE-MS, permetent així l'anàlisi de mostres de baixa concentració i ampliant l'abast d'aquesta tècnica en els camps de control de dopatge i biofarmacèutic.

# Total polyphenol content in agri-food wastes: assessment of antioxidant activity assays

Alcalde, B.<sup>1</sup>, Granados, M.<sup>1</sup>, Saurina, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí I Franquès, 1-11, E08028 Barcelona, Spain.

**Abstract:** Polyphenols are natural antioxidants present in fruits, vegetables, and cereals that react with different reactive species that are involved in oxidation processes in human bodies. Four spectrophotometric methods to determine the total polyphenol content; Folin-Ciocalteu, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), 2,-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), as well as liquid chromatography, were applied to different types of food samples to contrast the information resulting from these assays<sup>1,2</sup>. In spite of there is controversy about the equivalence of the values obtained with each assay. In this work there was some relationship between the spectrophotometric methods, the best correlation coefficient was with the sample among TEAC and Folin-Ciocalteu ( $R = 0.93$ ), the comparison of the other methods showed a lower values of correlation. Apart from that, chemometric methods were applied to try to predict the antioxidant and antiradical abilities from chromatographic fingerprints of the samples. A satisfactory correlation between the information from the different spectrophotometric indexes and the chromatographic data was observed.

**Keywords:** Polyphenols; FRAP; Folin-Ciocalteu; TEAC; DPPH; liquid chromatography; voltammetry; fruits; vegetables; oils; lees; chemometrics

1. Manach, C. Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **81**(1): 230S-242S.
2. Bhooshan, P.K., & Rizv, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2**:270-2

# Contingut total de polifenols en residus agroalimentaris: avaluació dels assaigs d'activitat antioxidant

Alcalde, B.<sup>1</sup>, Granados, M.<sup>1</sup>, Saurina, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona, 1-11, E08028 Barcelona, Espanya,

**Resum:** Els polifenols són antioxidants naturals que es troben en fruites, verdures, i cereals els quals reaccionen amb diferents espècies reactives que estan involucrades en els processos d'oxidació del cos humà. S'utilitzen quatre mètodes espectrofotomètrics per tal de determinar el contingut total de polifenols; Folin-Ciocalteu, poder antioxidant reductor del ferro (FRAP), 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), i capacitat antioxidant d'equivalents de trolox (TEAC), addicionalment també s'utilitza la cromatografia de líquids per a analitzar diferents tipus de mostres per tal de contrastar els resultats obtinguts en els diferents assajos. No obstant, existeix una certa controvèrsia en la correlació dels valors obtinguts dels diferents tipus de mètode analítics. En aquest treball es va trobar una certa correlació entre els diferents mètodes espectrofotomètrics, la millor relació es troba en les mostres entre els mètodes de Folin-Ciocalteu i el TEAC ( $R = 0.93$ ), la comparació entre els altres mètodes té un coeficient de correlació menor. A part d'això, s'apliquen mètodes quimiomètrics per tal de predir la capacitat antioxidant i antiradical de les emprems cromatogràfiques de les mostres. S'observa una correlació satisfactòria entre la informació dels diferents índexs espectrofotomètrics i les dades cromatogràfiques.

**Paraules clau:** Polifenols; FRAP, Folin-Ciocalteu; TEAC; DPPH; cromatografia de líquids; voltametria; fruites; verdures; olis; lies; quimiometria

1. Manach, C. Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **81**(1): 230S-242S.
2. Bhooshan, P.K., & Rizv, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2**:270-278

## **Seguimiento de la materia orgánica disuelta en diferentes etapas de una ETAP mediante cromatografía de exclusión molecular y fluorescencia EEM.**

C.M Medina-Ramos, J.L Beltràn-Abadía

La gestión y la calidad del agua potable es un problema para los países desarrollados, cuya regulación es cada vez más estricta. Uno de los requisitos de una estación de tratamiento de agua potable (ETAP) es la eliminación de gran parte de la materia orgánica disuelta (DOM) que se encuentra en el agua. La DOM es una mezcla heterogénea y compleja que consiste en una gran variedad de compuestos orgánicos como ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), carbohidratos, proteínas y ácidos carboxílicos, que se derivan de la descomposición de los residuos vegetales y animales, a partir de actividades microbianas. La DOM se define como la fracción de materia orgánica presente en el agua que pasa a través de un filtro de 0.45 µm. El control de la DOM es necesario ya que tiene efectos negativos sobre la calidad del agua y sus procesos de tratamiento. Además, es la causa principal de la formación de productos derivados de la desinfección (DBP), que son perjudiciales para la salud.

Actualmente el análisis de la DOM se lleva a cabo mediante varias técnicas, incluyendo la separación mediante cromatografía líquida de exclusión molecular de alta resolución (HPSEC), mediante la cual la DOM se puede separar en función del peso molecular aparente (PMA) de sus componentes. Uno de los detectores más utilizados son los detectores de carbono disuelto, aunque el procedimiento sea lento. Para 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 sustancias de bajo peso molecular, fracciones "similares a los húmicos" y "similares a proteínas". Además, el análisis de muestras de agua mediante espectrometría de fluorescencia por matriz de de excitación y emisión (EEM), sin la necesidad de una separación cromatográfica, es una técnica de gran importancia debido a la alta sensibilidad que ofrece la instrumentación actual.

En este estudio se ha aplicado un nuevo procedimiento, durante un período de cuatro meses, a la caracterización de muestras de agua provenientes de diferentes etapas de la planta de tratamiento de agua potable que se encuentra en el río Llobregat, en Sant Joan Despí. Las muestras se han analizado mediante HPSEC-DAD-FLD y fluorescencia EEM.

**Palabras clave:** Espectrometría de fluorescencia por matriz de de excitación y emisión (EEM), Detector de fluorescencia molecular (FLD), absorción UV de serie de diodos (DAD), materia orgánica disuelta (DOM), cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), deconvolución.

## **Monitoring of organic matter dissolved in different stages of a DWTP by size exclusion chromatography and EEM fluorescence.**

C.M Medina-Ramos, J.L Beltràn-Abadía

The management and quality of drinking water is a problem for the developed countries, which the regulation is increasing stricter. One of the requirements of a drinking water treatment plant (DWTP) is the removal of most of the dissolved organic matter (DOM) found in the water. DOM 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 as well as from microbial activities. DOM is defined as the fraction of organic matter in water that passes through a 0.45  $\mu$  m filter. The control of the DOM is necessary because of the negative effects on the quality of water and its treatment processes. Moreover, it is the main cause of the formation of disinfection by-products (DBP), harmful to health.

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 low molecular substances, "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 study, a new procedure has been applied, during four months, to water samples coming from different stages of the drinking water treatment plant (DWTP) located in the Llobregat River in Sant Joan Despí. The samples have been analyzed by HPSEC-DAD-FLD and EEM fluorescence.

**Keywords:** Excitation-emission matrix fluorescence (EEM), Detectors as molecular fluorescence (FLD), Diode-array UV absorption (DAD), Dissolved organic matter (DOM), high performance size exclusion chromatography (HPSEC), deconvolution.

## Interactions evaluation between drug and simulated intestinal fluids

S. Domínguez<sup>1</sup>, C. Ràfols<sup>1</sup>, S. Amézqueta<sup>1</sup>

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

The oral route has been and is likely to be the most popular one for drug administration. Due to ethical, experimental and economical constraints it is important to know the luminal behaviour of orally administered drugs before performing the preclinical and clinical studies (2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> steps of the drug discovery process, respectively). Several physicochemical drug properties related to this behaviour are pH,  $pK_a$ , solubility, lipophilicity and drug-protein interactions. These last can be evaluated *in vitro* using different aqueous media. However, they do not reflect what's actually happening inside the body. Biorelevant media are more complex solutions that contain natural surfactants found in the small intestine which can have a big effect on the drug absorption. In our research group we are moving from traditional to biorelevant media to obtain more accurate biological information. When performing  $pK_a$  experiments with both media a shift between the values for some drugs has been observed. For this reason, the aim of this project is to determine possible interactions between these drugs and the compounds present in the biorelevant media that produce this shift. Fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC) are two interesting analytical techniques to determine binding constants.

In this work, the possible interactions between different drugs (warfarin, bendroflumethiazide, propranolol, tetracaine, ketoprofen, diclofenac and pindolol) and the biorelevant media FaSSIF-V2 and FeSSIF-V2 have been evaluated using the fluorescence technique. After evaluating the possible interferences and establishing the optimum work conditions, the drug-FeSSIF-V2 union constant ( $K_b$ ) has been determined based on the Benesi-Hildebrand equation. It has been observed that warfarin, bendroflumethiazide and propranolol show two differentiated tendencies. Instead, it has been seen that tetracaine only presents one. The  $K_b$  values obtained for drugs-FeSSIF-V2 have been in the order of  $10\text{-}10^2\text{ M}^{-1}$ . The interaction for ketoprofen, diclofenac and pindolol could not be evaluated because they did not present fluorescence signal.

In addition, it has also been seen that ITC represents an alternative technique to carry out a qualitative study of FaSSIF-V2 and FeSSIF-V2 media. These studies have allowed to optimize working conditions for the subsequent  $K_b$  determinations of drug-FaSSIF-V2 and drug-FeSSIF-V2 systems.

## Avaluació d'interaccions entre fàrmacs i fluids intestinals simulats

S. Domínguez<sup>1</sup>, C. Ràfols<sup>1</sup>, S. Amézqueta<sup>1</sup>

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

La via oral ha estat i és probable que sigui la més popular per a l'administració de fàrmacs. A causa de limitacions ètiques, experimentals i econòmiques, és important conèixer el comportament d'aquest fàrmacs, administrats per via oral, dins del nostre cos abans de realitzar els estudis preclínic i clínic (2a i 3a etapa del *drug discovery*, respectivament). Diverses propietats fisicoquímiques relacionades amb aquest comportament són el pH, el p*K*<sub>a</sub>, la solubilitat, la lipofilitat i les interaccions fàrmac-proteïna. Aquestes últimes es poden avaluar *in vitro* utilitzant diferents medis aquosos. No obstant això, aquests medis no acaben de reflectir el que passa realment dins del cos. En canvi, els fluids biològics simulats (*biorelevant*) són solucions més complexes que contenen tensioactius naturals. Aquests es troben a l'intestí prim i poden tenir un gran efecte en com són absorbits els fàrmacs. En realitzar determinacions de p*K*<sub>a</sub> en ambdós medis s'ha observat un desplaçament entre els valors d'alguns fàrmacs. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquest treball és determinar possibles interaccions entre aquests fàrmacs i els compostos presents en els fluids biològics simulats que puguin ser causants d'aquests canvis. L'espectroscòpia de fluorescència i l'*isothermal titration calorimetry* (ITC) són dues tècniques analítiques interessants per a determinar constants d'unió.

En aquest treball, s'ha avaluat les possibles interaccions entre diferents fàrmacs (warfarina, bendroflumethiazida, propranolol, tetracaïna, ketoprofè, diclofenac i pindolol) i els medis biològics simulats FaSSIF-V2 i FeSSIF-V2 mitjançant la tècnica de fluorescència. Després d'avaluar les possibles interferències i d'establir les condicions òptimes de treball, s'ha determinat la constant d'unió (*K*<sub>b</sub>) fàrmac-FeSSIF-V2 a partir de l'equació de Benesi-Hildebrand. S'ha observat com tant la warfarina, bendroflumethiazida i propranolol mostren dues tendències diferenciades. En canvi, s'ha vist com la tetracaïna només en presenta una. Els valors de *K*<sub>b</sub> entre els fàrmacs i el medi han estat del ordre de 10-10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>. Pels fàrmacs ketoprofè, diclofenac i pindolol no s'ha pogut avaluar la interacció perquè aquests no han mostrat senyal de fluorescència.

A més, també s'ha vist com l'ITC representa una tècnica alternativa per a poder estudiar qualitativament els medis FaSSIF-V2 i FeSSIF-V2. Els estudis que s'han realitzat en el treball han permès optimitzar les condicions de treball per als posteriors estudis de determinació de *K*<sub>b</sub> dels sistemes fàrmac-FaSSIF-V2 i fàrmac-FeSSIF-V2



***Study of the calcium oxalate hydrates transformation. A comparative study by different spectroscopical techniques***

Calcium oxalates can precipitate as monohydrate or dihydrate forms. The second one is thermodynamically unstable, and it is transformed into the first one. Both monohydrate calcium oxalates, transformed and originally monohydrate, are often confused by the commonly used characterization techniques as IR spectroscopy, since chemically are identical. This confusion could lead to misdiagnose and increase the recurrence of nephrolithiasis, since their origin is different and each one is directly related to a different pathology. Therefore, a proper methodology is necessary to understand the transformation process during the nephrolith development and to distinguish between the monohydrate phases. To achieve these goals, the crystalline structure of oxalocalcic renal calculi with different degrees of transformation were studied by synchrotron radiation based  $\mu$ -X-ray diffraction. The study was divided in the study of both linear and 2D diffraction images. Moreover, a nano-indentation study was performed to explore the possible hardness differences between monohydrate phases and its dihydrate form. Finally, to further understand the studied transformations, an in-vitro study was carried out and with the application of Multivariate Curve Resolution two transformation behaviours were observed (linear and random) leading to a deeper understanding of the dihydrate calcium oxalate transformation has been achieved. Moreover, the results obtained in the synchrotron experiment showed that linear diffractograms and common techniques as IR do not differentiate between monohydrate phases, but with the use of the 2D diffraction images and nano-indentation a close approach, based on a texture/hardness study to a distinction of the monohydrated phases.

***Estudio de la transformación de hidratos de oxalatos de calcio. Un estudio comparativo mediante diferentes técnicas espectroscópicas***

Los oxalatos de calcio pueden precipitar en forma de monohidrato o dihidrato. El segundo es termodinámicamente inestable, y se transforma en la primera forma, monohidrato. Ambos los oxalatos de calcio monohidrato, el transformado o el originalmente monohidrato, se confunden a menudo con las técnicas de caracterización comúnmente utilizadas como la espectroscopia de infrarrojos, ya que son químicamente idénticos. Esto da lugar a un diagnóstico incorrecto y provoca un aumento de la recurrencia de la nefrolitiasis, debido a que el origen de ambos cálculos es diferente y cada uno está relacionado con una patología distinta. Por lo tanto, es necesaria una metodología adecuada para comprender el proceso de transformación durante el desarrollo del nefrolito y distinguir entre las fases de monohidrato. Para lograr estos objetivos, se estudió la estructura cristalina de los cálculos renales oxalocálcicos con diferentes grados de transformación mediante micro difracción de rayos X basada en la radiación de sincrotrón. Este primer estudio se dividió en el análisis de difractogramas lineales e imágenes 2D de difracción. Además, se realizó un estudio de nano-indentación para explorar las posibles diferencias de dureza entre las fases de monohidrato y su forma de dihidrato. Finalmente, para comprender mejor las transformaciones del estudio, se llevó a cabo un estudio in vitro y, con la aplicación de la Resolución de Curva Multivariable, se observaron dos comportamientos de transformación (lineal y aleatorio) que conducen a una comprensión más profunda de la transformación del oxalato de calcio dihidratado. Además, los resultados obtenidos en el experimento de sincrotrón mostraron que los difractogramas lineales y las técnicas comunes no diferencian entre las fases del monohidrato, pero mediante el uso de imágenes de difracción 2D y la nano-indentación permite construir un primer método de distinción de las fases monohidratadas basado en un estudio de textura/dureza.

# FUSION OF HYPERSPECTRAL IMAGES FOR THE STUDY OF VEGETAL TISSUES

Adrián Gómez-Sánchez and Anna de Juan

*Universitat de Barcelona, Dpt. of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, Martí i Franquès, 1-11, 08028, Barcelona (Spain). [agomezsa29@alumnes.ub.edu](mailto:agomezsa29@alumnes.ub.edu)*

Hyperspectral images (HSI) are formed by pixels that contain chemical information about samples encoded in spectroscopic measurements. Therefore, HSI are a useful tool to study the chemical variation in the spatial direction of samples. Several chemometric methods, such as Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares (MCR – ALS), are helpful to analyze and interpret the information collected by hyperspectral imaging techniques. Actually, MCR-ALS provides the pure spectral signatures and concentration maps of the sample constituents using only the raw image measurement as initial information. In addition, images from different techniques can be fused using MCR – ALS in order to improve the data quality and the interpretation of the sample information.

In this work, cross-sections from rice leaves were studied by Raman, synchrotron infrared and fluorescence imaging techniques. These techniques have similar spatial resolution but provide complementary chemical information on the samples analysed. Separate analyses were carried out on the set of leaves measured by each imaging technique and different number and identity of components were found by using the different platforms. Thus, two lignins were detected by fluorescence in structural cell walls, whereas only one lignin signature was seen in Raman and synchrotron infrared images. Chlorophyll, found in mesophyll cells, was specifically linked to fluorescence images, while  $\beta$ -carotene, in mesophyll cells, could be only probed by Raman imaging. To achieve a more complete description of vegetal tissues, fluorescence images, synchrotron infrared images and Raman images were fused for the first time in a single data structure and treated with MCR – ALS. This coupling required a first spatial match of the images acquired and a balance of the slight differences of spatial resolution and image area scanned. The fusion helped to interpret the data acquired by fluorescence, synchrotron infrared and Raman imaging and to clarify the identity and location of the different constituents in vegetal tissues.

**Keywords:** Plant tissue, Hyperspectral imaging, Fluorescence imaging, Synchrotron infrared imaging, Raman imaging, Multivariate Curve Resolution, Data fusion.

# FUSIÓN DE IMÁGENES HIPERESPECTRALES PARA EL ESTUDIO DE TEJIDOS VEGETALES

Adrián Gómez-Sánchez y Anna de Juan

*Universitat de Barcelona, Dpt. de ingeniería química y química analítica, Martí i Franquès, 1-11, 08028, Barcelona (España). [agomezsa29@alumnes.ub.edu](mailto:agomezsa29@alumnes.ub.edu)*

Las imágenes hiperespectrales (HSI) están formadas por píxeles que contienen información química sobre las muestras, por lo que las hacen ser una herramienta útil para estudiar la variación química en la dirección espacial de las muestras. Algunos métodos quimiométricos, como la resolución multivariante de curvas mediante mínimos cuadrados alternados (MCR - ALS), son útiles para analizar e interpretar la información recopilada por las técnicas de imagen hiperespectral. El MCR - ALS proporciona, utilizando únicamente los datos originales de partida, las firmas espectrales puras y los mapas de concentración de los constituyentes de la muestra utilizando. Además, las imágenes de diferentes técnicas se pueden fusionar utilizando el MCR - ALS para mejorar la calidad de los datos y poder interpretar los resultados con mayor facilidad.

En este trabajo se estudiaron las secciones transversales de las hojas de mediante imagen de Raman, de luz infrarroja de sincrotrón y de imagen de fluorescencia. Estas técnicas tienen una resolución espacial similar pero proporcionan información química complementaria. En este trabajo se han llevado a cabo diferentes análisis sobre las hojas de arroz a través de cada técnica. Se encontraron diferentes componentes según la plataforma utilizada; se detectaron dos ligninas por fluorescencia en zonas estructurales de la hoja, mientras que solo se observó una lignina en las imágenes infrarrojas de Raman y de sincrotrón. La clorofila, que se encuentra en las células mesofílicas, fue hallada gracias a las imágenes de fluorescencia, mientras que el  $\beta$ -caroteno, también en las células mesofílicas, solo se pudo analizar mediante imágenes Raman. Para lograr una descripción más completa de los tejidos vegetales, las imágenes de fluorescencia, las imágenes infrarrojas de sincrotrón y las imágenes de Raman se fusionaron por primera vez en una única estructura de datos y se trataron con MCR - ALS. Este acoplamiento requirió un preprocesado espacial para alinear las diferentes imágenes de las diferentes técnicas. La fusión ayudó a interpretar los datos adquiridos por fluorescencia, infrarrojos de sincrotrón y de Raman y a aclarar la identidad y la ubicación de los diferentes componentes en los tejidos vegetales..

**Palabras claves:** Tejido vegetal, imagen hiperespectral, imagen de fluorescencia, imagen de infrarrojo de sincrotrón, imagen de raman, resolución multivariante de curvas mediante mínimos cuadrados alternados, fusión de datos.

## Abstract

This project studies the identification and quantification of  $^{89}\text{Sr}$  and  $^{90}\text{Sr}$  isotopes, the main problem about these radionuclides is the possibility of spectra overlapping. On the one hand,  $^{89}\text{Sr}$  presents utilities in the medical field and it is used in nuclear facilities. It has a half-life of 50,6 days and its beta radiation energy is 1,5keV. On the other hand,  $^{90}\text{Sr}$  isotope takes part in some nuclear reactions and it can join different processes that alter human health, it has a half-life of 28,8 years and its beta radiation energy is 0,5keV. It is very important to improve a rapid method that can identify and quantify them in case of radiostrontium contamination. This project aims to improve an experimental procedure and develop a mathematical model in order to make the complete method less time-consuming, reduce reactive waste and quantify both strontium radioisotopes.

The methods that have been developed so far present certain inconveniences; e.g. in the case of IAEA'S procedure, Cherenkov measurements of  $^{89}\text{Sr}$  must be carried out just after the separation to avoid over quantification by the presence of  $^{90}\text{Y}$  ( $^{90}\text{Sr}$  descendent). Liquid scintillation counting (LSC) can be used to obtain a numeric value of counts per minute (CPM) or a complete spectrum. However, to quantify  $^{89}\text{Sr}$  and  $^{90}\text{Sr}$  using CPM, two values are needed (the ones obtained just after the separation and the other obtained after secular equilibrium between  $^{90}\text{Sr}$  and  $^{90}\text{Y}$ ). Obtaining and working with full spectra is one possible solution, as it allows a range of time in case of measurement delaying and it reduces the time required to quantify the two radioisotopes.

The radiochemical procedure used consisted on a solid extraction chromatography using specific resin (Sr-resin) containing a crown ether that could strongly retain strontium in acid medium and the other radionuclides being eluted with solutions of nitric acid of different concentrations. The possibility of lead interferences as a natural radionuclide was previously studied, and the conclusion was that the method could be used without taking into account the presence of this radionuclide. The complete procedure was based on the ones used at the University of Barcelona Environmental Radiological Laboratory (LRA), with some changes incorporated in order to reduce the duration of the procedure and obtain better LSC results and better recoveries. A mathematical model (PLS inverse multivariant calibration model) was created with LSC spectra. This PLS model combined the spectra obtained at different concentration and time of the  $^{89}\text{Sr}$  and  $^{90}\text{Sr}$  standards (X block) with the calculated and corrected  $^{89}\text{Sr}$  and  $^{90}\text{Sr}$  concentrations (Y block) using cross validation and finding the optimal latent variables (LV). For method validation, spectra of  $^{89}\text{Sr}$  and  $^{90}\text{Sr}$  mixtures were obtained using the experimental procedure.

The experimental procedure had a recovery between 78-95% (including all the improvement changes). For the calibration of PLS model, 3 LV were used and venetian blinds were studied as cross validation method. The bias obtained in the validation part of the PLS model fluctuated between 0,5 and 36% in absolute value. This result was accepted while using this method in case of radioactive leak or accident. Lastly, the method was applied using reference materials (MRs) or different matrixes such as powdered milk. In case of MRs, the obtained bias was between 4-6% (these MRs had only  $^{90}\text{Sr}$ ), and in case of powdered milk the obtained bias was 15% obtaining a recovery of 26%.



## Resumen

Este Proyecto estudia la identificación y cuantificación de los isótopos  $^{89}\text{Sr}$  y  $^{90}\text{Sr}$ , el principal problema de estos isótopos es la posibilidad de solapamiento en los espectros. Por un lado, el  $^{89}\text{Sr}$  presenta utilidades en el campo médico y es utilizado en instalaciones nucleares, tiene una vida media de 50,6 días y su energía de radiación beta es de 1,5 keV. Por el otro lado, el  $^{90}\text{Sr}$  procede de algunas reacciones nucleares y puede participar en diferentes procesos que alteren la salud humana, tiene una vida media de 28,8 años y su energía de radiación beta es de 0,5 keV. Es muy importante optimizar un método rápido que permita identificar y cuantificar estos radionúclidos en caso de contaminación de radioestroncio. Este proyecto pretende optimizar el procedimiento experimental y desarrollar un modelo matemático para crear un método completo de menos duración, reducir el gasto de reactivos y cuantificar los dos radioisótopos de estroncio.

Los métodos que se han desarrollado hasta ahora presentan ciertos inconvenientes; por ejemplo, en el caso del procedimiento de la IAEA, las medidas de Cherenkov de  $^{89}\text{Sr}$  tienen que llevarse a cabo justo después de la separación para evitar la sobre cuantificación por la presencia de  $^{90}\text{Y}$  (descendiente del  $^{90}\text{Sr}$ ). El contador de centelleo líquido (LSC) puede utilizarse para obtener un valor numérico de cuentas por minuto (CPM) o un espectro completo. Sin embargo, para cuantificar  $^{89}\text{Sr}$  y  $^{90}\text{Sr}$  utilizando CPM se necesitan dos valores (el que se obtiene justo después de la separación y el otro que se obtiene después de equilibrio secular entre  $^{90}\text{Sr}$  y  $^{90}\text{Y}$ ). Obtener y trabajar con un espectro completo es una posible solución a los problemas planteados, permite un margen de tiempo en caso de retrasos en las medidas y reduce el tiempo requerido para cuantificar los radioisótopos.

El procedimiento radioquímico utilizado consistía en una cromatografía de extracción en fase sólida utilizando una resina específica (Sr-resin) que contenía un éter corona que podía retener fuertemente estroncio en medio ácido y el resto de radionúclidos fueron eluidos con diferentes concentraciones de ácido nítrico. La posibilidad de interferencias de plomo como radionúclido natural fueron estudiadas con anterioridad y la conclusión fue que el método podría utilizarse sin tener en cuenta la presencia de este radionúclido. El procedimiento completo se basó en el utilizado en el Laboratorio de Radiología Ambiental de la Universidad de Barcelona con diferentes cambios incorporados para reducir la duración del procedimiento y obtener mejores resultados de LSC y mejores recuperaciones. Se creó un modelo matemático (PLS modelo de calibración multivariante inversa) con espectros de LSC. Este modelo PLS combinaba los espectros obtenidos a diferentes concentraciones y tiempos de patrones de  $^{89}\text{Sr}$  y  $^{90}\text{Sr}$  (matriz X) con las concentraciones de  $^{89}\text{Sr}$  y  $^{90}\text{Sr}$  calculadas y corregidas (matriz Y) utilizando validación cruzada y encontrando el número de variables latentes (LV) óptimas. Para la validación del método, se obtuvieron los espectros de las mezclas de  $^{89}\text{Sr}$  y  $^{90}\text{Sr}$  utilizando el procedimiento experimental.

El procedimiento experimental tuvo recuperaciones entre el 78 y 95% (incluyendo todos los cambios de mejora). Para la calibración del modelo PLS, se utilizaron 3 LV y se estudió *venetian blinds* como método de validación cruzada. Los bias obtenidos en la parte de validación del modelo PLS oscilaban entre 0,5 y 36% en valor absoluto. Estos resultados fueron aceptados al utilizar el método en caso de fuga radiactiva o accidente. Finalmente el método se aplicó utilizando materiales de referencia (MRs) o diferentes matrices como la leche en polvo. En el caso de los MRs, el bias que se obtuvo fue entre 4 y 6% (considerar que los MR solo tenían  $^{90}\text{Sr}$ ), y en caso de leche en polvo el bias calculado fue del 15% obteniendo una recuperación del 26%.

# Ús de Biochar i fins de carbó com a sorbents per a l'eliminació de samari en aigües contaminades: avaluació mitjançant l'ús d'una tècnica de sorció en continu

M. Domínguez, A. Rigol, M. Vidal

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

Els lantànids, anomenats també terres rares, tenen un paper molt important des de fa uns anys en aplicacions tecnològiques degut a les seves bones propietats magnètiques i luminescents, entre altres. El seu ampli ús industrial i sobretot les activitats mineres, han fet que augmentin les concentracions d'aquests elements en el medi ambient. La presència d'aquests en aigües contaminades preocupa com a conseqüència dels possibles efectes perjudicials en els éssers vius. Una de les formes d'atenuar l'impacte de lantànids en aigües contaminades és l'ús de sorbents.

Un dels sorbents més comuns és el carbó activat, però és un material molt car. Per tant s'estan investigant altres alternatives més ecològiques, barates i igualment efectives com són el biochar o subproductes rics en carboni, entre altres. Aquests materials, que s'obtenen de residus vegetals, animals o com a residus de la indústria metal·lúrgica presenten una elevada porositat i una capacitat elevada per retenir contaminants.

En aquest treball s'estudia la idoneïtat del biochar provinent del pericarpí de coco (PC) i dels fins de carbó (CF) provinents de la indústria metal·lúrgica per eliminar lantànids presents en aigües contaminades. S'avalua la sorció de samari mitjançant una tècnica de sorció en continu avaluant l'efecte del cabal i de la concentració per veure la seva influència en la capacitat de sorció. També es realitza un estudi de desorció per avaluar si es pot recuperar el lantànid per posteriors usos, així com regenerar els sorbents. Finalment, s'intenta elucidar possibles mecanismes de sorció del samari en els materials.

S'observa que ni el cabal ni la concentració de samari tenen influència en la capacitat de sorció dels dos materials, sent el CF un millor sorbent amb una capacitat de  $37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Respecte a mecanismes de sorció, en el cas dels fins de carbó s'observen dos processos de sorció, un més ràpid i majoritari, que podria correspondre a bescanvi catiònic i un més lent, que en aquest cas podria ser un difusió a llocs més interns del material. En canvi, en el PC, amb una capacitat de sorció menor no s'han pogut acabar d'identificar els mecanismes de sorció. Respecte la recuperació de samari en el CF mitjançant un experiment de desorció amb HCl com a extractant es troba que hi ha una recuperació del 84%.

**Paraules clau:** Biochar, Terres Rares, samari, sorció en continu, fins de carbó, pericarpí de coco



# Use of biochar and charcoal fines as a sorbents for the removal of samarium from contaminated waters. Evaluation through a continuous-flow sorption technique

M. Domínguez, A. Rigol, M. Vidal

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

The lanthanides, also called as rare earths, have played a very important role in technological applications in the last years, due to their good magnetic and luminescent properties, among others. Because of its wide industrial use and specially to mining activities, it has increased the concentrations of these elements in the environment. The presence of lanthanides in contaminated waters is concerned because of the harmful effects on living organisms. Contaminated waters need to be intervened to mitigate their impact, using materials to remove contaminants.

One of the most common sorbents is activated carbon, but it is a very expensive material. Therefore, other alternatives that are more ecological, cheap and equally effective are being investigated, such as biochar or carbon rich by-products, among others. These products that are obtained from vegetable and animal waste or as a waste from the metallurgical industry have a high porosity and high capacity to remove organic and inorganic pollutants.

In this work, biochar from coconut pericarp (PC) and charcoal fines (CF) from metallurgical industry have been chosen to remove lanthanides present in contaminated waters. Sorption of samarium has been evaluated using a continuous-flow sorption technique evaluating the effect of the flow and concentration to see its influence on the sorption capacity. Also, a desorption study was carried out to observe whether the lanthanide can be recovered for subsequent uses, as well as regenerating the sorbents. Finally, possible sorption mechanisms between sorbents and samarium have also been tried to elucidate.

It has been observed that the initial concentration and the flow have not influence in the sorption capacity of the two materials, being CF a better sorbent with a sorption capacity of 37 mg·g<sup>-1</sup>. Regarding sorption mechanisms, in the case of charcoal fines, two sorption processes are observed, one faster and majority, which could correspond to cation exchange and a slower, which in this case could be a diffusion to more internal sites of the material. On the other hand, in the PC, with a lower sorption capacity, the sorption mechanisms could not be identified. Concerning the samarium recovery in the CF by a desorption experiment using HCl as an extractant agent, it shows that there are a recovery of 84% of samarium.

**Key words:** Biochar, Rare Earths, samarium, continuous-flow sorption, charcoal fines, coconut pericarp

## Subproductes de desinfecció en aigua residual regenerada: anàlisi per espectrometria de masses d'alta resolució i determinació de la toxicitat emprant assajos in vitro.

*Maria del Carmen Aznar Luque*

*Dra. Cristina Postigo i Dra. Cinta Porte*

L'aigua residual regenerada és un recurs hídric que ja s'utilitza en sectors com a l'indústria o l'agricultura i que requereix l'eliminació prèvia de contaminants químics i patògens. Pel cas d'aquests últims, l'eliminació es realitza utilitzant desinfectants com el clor, les cloramines, el diòxid de clor, l'ozó o emprant radiació UV. Durant el procés de desinfecció, el desinfectant pot reaccionar amb la matèria orgànica present a l'aigua i amb contaminants que no s'hagin eliminat totalment formant una sèrie de productes que es coneixen com a subproductes de desinfecció (DBPs). Actualment, s'han identificat uns 600 DBPs, però més de la meitat del material halogenat format durant els processos de desinfecció per cloració i ozonització és encara desconegut. Addicionalment, alguns estudis epidemiològics conclouen que l'exposició a aquests compostos pot presentar efectes adversos per a la salut, com per exemple efectes cancerígens, efectes a nivell reproductiu i sobre el desenvolupament embrionari. Per tota aquesta problemàtica, hi ha un alt interès per part de la comunitat científica en l'anàlisi i l'estudi de DBPs en aigua residual regenerada, amb la finalitat d'identificar aquells més tòxics i minimitzar la seva formació.

En aquest treball, es van avaluar diferents metodologies d'extracció per generar mesclures concentrades i representatives de DBPs. Es va seleccionar l'extracció en fase sòlida emprant el sorbent TELOS ENV i l'extracció líquid-líquid per extreure DBPs d'aigua residual regenerada i d'aigua potable. La composició dels extractes es va caracteritzar emprant cromatografia de gasos i cromatografia de líquids d'alta eficàcia ambdues acoblades a espectrometria de masses d'alta resolució. Els resultats confirmen la formació d'una gran diversitat de DBPs halogenats durant el procés de desinfecció per cloració, essent els àcids haloacètics i els trihalometans les famílies més detectades.

Addicionalment, la toxicitat de sis DBPs emprant dos assajos in vitro es va avaluar en una línia cel·lular de placenta humana (JEG-3). Els assajos de citotoxicitat van determinar que els compostos més tòxics són l'àcid iodoacètic, l'àcid bromoacètic i l'àcid tribromoacètic. Els assajos d'estrès oxidatiu van suggerir que aquesta toxicitat podria estar relacionada amb la formació d'espècies reactives d'oxigen.

Finalment, la compatibilitat dels mètodes d'extracció seleccionats amb els assajos in vitro es va determinar a través de l'anàlisi dels blancs. Els resultats van mostrar que el mètode d'extracció en fase sòlida emprant el sorbent TELOS ENV no permetria avaluar la toxicitat de les mesclures de DBPs en aigües, ja que es van observar alts nivells de ROS en les cèl·lules exposades. Aquest fet es podria atribuir a l'elució d'algun compost tòxic del sorbent durant el procediment d'extracció.

## Disinfection by-products in reclaimed water: analysis by high resolution mass spectrometry and determination of the toxicity using in vitro assays.

*Maria del Carmen Aznar Luque*

*Dra. Cristina Postigo and Dra. Cinta Porte*

Reclaimed water is a water resource that is currently being used in the industry and agriculture, and requires prior elimination of pollutants and harmful pathogens. In the case of pathogens, its removal is achieved using disinfectants like chlorine, chloramines, chlorine dioxide, ozone or UV radiation. During the disinfection, the disinfectant can react with organic matter and pollutants that have not been eliminated before resulting in the formation of products that are known as disinfection by-products (DBPs). To date, more than 600 DBPs have been identified, but a half of halogenated compounds formed during the disinfection process is still unknown. Furthermore, some epidemiological studies conclude that the exposition to these products could have adverse effects in human health, for example carcinogenic effects, and some effects on the reproduction and the embryonic development. For all these issues, there is a high interest from the scientific community in the analysis and study of DBPs in reclaimed water in order to identify the most toxic compounds and reduce their formation.

In this work, different methods of extraction were evaluated to generate representative DBPs mixtures. Solid phase extraction using a TELOS ENV sorbent and liquid-liquid extraction were selected to extract DBPs in reclaimed water and drinking water. DBPs mixtures were chemically characterized using gas chromatography and high-performance liquid chromatography coupled in both cases to high resolution mass spectrometry. The results confirm the formation of a large diversity of halogenated DBPs during the disinfection process, being the most detected families the haloacetic acids and trihalomethanes.

In addition, the toxicity of six DBPs using two in vitro assays was evaluated in a human placental cell line (JEG-3). Cytotoxicity assays showed that the most toxic compounds are iodoacetic acid, bromoacetic acid and tribromoacetic acid. Oxidative stress assays suggested that this toxicity could be related to the formation of reactive oxygen species.

Finally, the compatibility of the selected extraction methods with in vitro assays was determined through the analysis of blank extracts. The results showed that solid phase extraction using a TELOS ENV sorbent would not allow the evaluation of toxicity of DBPs in water, as high levels of reactive oxygen species were observed in the exposed cells. This fact could be attributed to the elution of a toxic component of the sorbent during the extraction process.

## **ELÈCTRODES SERIGRAFIATS MODIFICATS AMB CISTEÏNA PER A LA DETERMINACIÓ DE METALLS PESANTS**, per Miguel Rosal Soria sota la supervisió de la Dra. Núria Serrano

Els problemes relacionats amb la contaminació amb ions metàl·lics s'han conegut des de fa anys. La quantitat de metalls emesos al medi ambient i el seu caràcter no biodegradable, fa que encara sigui important desenvolupar nous mètodes analítics per a la determinació d'ions metàl·lics a nivell traça *in situ*. Entre totes les tècniques analítiques disponibles per a la determinació d'ions metàl·lics, les tècniques electroquímiques són especialment adequades i, més específicament, la voltamperometria de redissolució anòdica (ASV). Les mesures per ASV compleixen tots els requisits analítics (alta reproductibilitat i repetitivitat, límits de detecció baixos, alta sensibilitat, determinació multielement...) i al mateix temps, proporcionen mesures ràpides amb equips portàtils de baix cost. Aquestes últimes característiques es veuen reforçades amb l'utilització d'elèctrodes serigrafiats (SPE), que són dispositius miniaturitzats, versàtils, d'un sol ús i econòmics que es poden produir en massa de manera reproductible.

Les mesures ASV estan fortament influenciades per l'elèctrode de treball escollit. S'han reportat diversos tipus d'elèctrodes de treball per a la determinació d'ions metàl·lics, però entre tots aquests, els elèctrodes modificats químicament presenten l'avantatge de poder millorar la sensibilitat i la selectivitat amb la incorporació d'un grup funcional convenient a la superfície de l'elèctrode. En particular, els pèptids són coneguts per la seva afinitat amb diferents ions metàl·lics a causa del gran nombre d'àtoms potencialment donadors continguts tant en la columna vertebral del pèptid, com els grups carboxils i els grups amino, i en les cadenes laterals d'aminoàcids, com ara, els grups tiol.

Una bona estratègia per a la immobilització de pèptids i lligands en general a sobre una superfície electròdica. Es van comparar dues estratègies de modificació diferents per *electrografting* de sals de diazoni per al desenvolupament de sensors voltamperomètrics. En aquest sentit, la L-cisteïna es va immobilitzar sobre un elèctrode de nanofibres de carboni, a través del seu grup  $-NH_2$  o del seu grup  $-COOH$  i es va provar la resposta dels sensors modificats resultants per a la determinació simultània de Pb(II) i Cd(II) per ASV. Els resultats obtinguts indiquen que la immobilització a través del grup  $-COOH$  de la cisteïna, tot i ser una estratègia menys freqüent, millora la resposta analítica del sensor resultant aconseguint LODs menors, a nivells de  $\mu g/L$  baixos per a Cd(II) i Pb(II). A més, aquesta estratègia permet quantificar ambdós ions metàl·lics per sota dels límits legals establerts per la Directiva Marc Europea de l'aigua, la qual cosa representa una gran millora respecte a sensors similars registrats a la literatura.

## **CYSTEINE MODIFIED SCREEN-PRINTED ELECTRODES FOR HEAVY METALS DETERMINATION**, by Miguel Rosal Soria under the supervision of Dr. Núria Serrano.

The problems associated with metal ions contamination have been known for years. The amount of metals emitted to the environment and their non-biodegradable character, makes it still important to develop new analytical methods for the determinations of *on-site* trace metal ions. Among all the available analytical techniques for metal ions determination, electrochemical techniques and, more specifically anodic stripping voltammetry (ASV), are particularly suitable. ASV measurements fulfil all the analytical requirements (high reproducibility and repeatability, low detection limits, high sensitivity, multielement determination...) and at the same time provide fast measurements with relatively low cost and portable equipment. These last features are further enhanced by the coupling of ASV measurements with screen-printed electrodes (SPE), which are miniaturized, versatile, disposable and economical devices that can be mass-produced in a reproducible manner.

ASV measurements are strongly influenced by the chosen working electrode. Several types of working electrodes have been successfully reported for metal ion determination but among all of these, chemically modified electrodes present the advantage that sensitivity and selectivity can be regulated by the incorporation of a convenient functional group onto the electrode surface. In particular, peptides are effective ligands for a great variety of metal ions because they contain a large number of potentially donor atoms. In any peptide, a metal ion can interact through the amino groups, the amide nitrogen and/or the carboxylic group present on its backbone and, additionally, this peptide-metal interaction can be further enhanced by other donor groups present in the side chains, such as thiols groups.

A good strategy for the immobilization of peptides and ligands in general onto carbon surfaces is based on the aryl diazonium salt electrografting. Two different modification strategies by means of aryl diazonium salt electrografting were compared for the development of voltammetric sensors. In this sense, L-cysteine was immobilized onto a screen-printed carbon-based electrode surface through either its  $-NH_2$  or its  $-COOH$  group and the performance of the resulting modified sensors was tested for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) by anodic stripping voltammetry. The results obtained indicate that attachment through the  $-COOH$  group of cysteine, despite being a much less frequent electrografting strategy, improves the analytical performance of the resulting sensor achieving lower LODs, at low  $\mu g/L$  levels, for Cd(II) and Pb(II). Furthermore, this strategy allows the quantification of both metal ions below the legal limits established by the European Water Framework Directive, which represents a great improvement with respect to similar sensors reported in the literature.

**Títol: Explorando la química de la simbiosis mediante espectrometría de masas de alta resolución. Proyecto SIMAGUA.**

Director: Víctor Matamoros Mercadal

Estudiant: Néstor Salinas González

L'escassetat d'aigua degut al dèficit hídric o a la contaminació d'aquest recurs és un dels grans reptes que la humanitat haurà d'afrontar en els propers anys. Segons l'ONU, cada dia a nivell mundial, 2 milions de tones d'aigües residuals, urbanes, industrials i agrícoles es descarreguen al medi aquàtic, afectant la qualitat dels recursos hídrics disponibles.

El canvi d'estil de vida dels humans ha fet que es desenvolupin noves substàncies químiques com fàrmacs i productes d'higiene personal que acaben generant residus que les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) no estan preparades per a eliminar. En aquest sentit, la presència d'aquestes substàncies químiques, també anomenades contaminants emergents, en els efluent d'EDAR, és un problema mundial pels seus efectes potencialment adversos en l'ecosistema i la salut humana.

Malgrat que avui en dia existeixen tecnologies de tractament que poden solucionar aquest problema, com l'oxidació avançada o membranes, aquestes requereixen d'un consum energètic i costos de construcció i manteniment elevats. En estudis anteriors s'ha demostrat que existeixen tractaments alternatius de baix cost, com són els aiguamolls construïts, capaços d'atenuar aquests contaminants emergents. A més, s'ha evidenciat que la vegetació té un paper molt important en l'increment de la taxa de biodegradació d'aquests contaminants. No obstant això, aquestes tecnologies requereixen d'àrees superficials molt grans i llum per realitzar la fotosíntesi. La vegetació, a part de la degradació o incorporació directa dels contaminants allibera una sèrie de senyals químiques o exsudats que tal i com s'ha comprovat en estudis anteriors incrementen la taxa de biodegradació de contaminants orgànics. L'objectiu principal d'aquest treball radica en desenvolupar una metodologia analítica capaç d'identificar la presència d'exsudats en resposta a la presència de contaminants emergents. Un cop seleccionada la metodologia analítica aquesta s'aplicarà en dos sistemes diferents; plantes en columnes de sorra, simulant un aiguamoll construït i plantes en medi hidropònic. En tots dos casos es compararan sistemes amb plantes exposats i no exposats a contaminants emergents, així com sistemes control sense plantes.

Estudiar les senyals químiques que controlen la simbiosi planta-bactèria provocant un increment de la biodegradació de contaminants serà clau per dissenyar tecnologies de tractament d'aigües basades en processos simbiòtics simulats. La química analítica junt amb la metabolòmica esdevindran eines molt importants a l'hora d'extreure, analitzar i interpretar les dades que aquest projecte planteja.

**Paraules clau:** contaminants, metabolòmica, metaboloma, vegetació, exsudats.

**Title: Explorando la química de la simbiosis mediante espectrometría de masas de alta resolución. Proyecto SIMAGUA.**

Director: Víctor Matamoros Mercadal

Student: Néstor Salinas González

Water scarcity and water pollution are some of the crucial issues in today's world. According to ONU, every day, 2 Mio tones of residual waters, industrial and agricultural wastes are discharged into the aquatic medium affecting the quality of available water resources.

Changing lifestyle of humans have conducted to the development of new chemical substances such as drugs and personal hygiene products that eventually generate wastes that wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to eliminate. In this sense, the occurrence of emerging pollutants in effluents of WWTPs is a worldwide problem due to its potential adverse effects on the ecosystem and human health. Although it exists technologies to eliminate these contaminants such as advanced oxidation or membrane, they require a high level of energy consumption and are expensive to build and maintain. The research group has demonstrated that there are low-cost natural treatment systems, such as constructed wetlands and microalgae systems, capable of removing emerging contaminants from wastewater. In addition, it has been proven that vegetation plays a very important role in the enhancement of the biodegradation rate of pollutants. However, these vegetation-based technologies have the problem of requiring very high surface area and light exposition. Vegetation, apart from the degradation or incorporation of pollutants, releases chemical signals that, as it has been reported in other studies, increases the biodegradation rate of organic contaminants. The main objective of this study is to develop an analytical methodology capable of identifying the presence of exudates in response of exposure to emerging contaminants. Once, the analytical methodology is selected, it will be applied in two different systems; plants in sand columns, simulating a constructed wetland and hydroponic plants. In both cases we will compare systems with plants exposed and unexposed to emerging contaminants, as well as control systems without plants.

Studying the chemical signals that lead the symbiosis between plant and bacteria that increase the rate of biodegradation of contaminants will be a very important aspect to design novel wastewater treatment technologies based in simulated symbiosis. Analytical chemistry together with metabolomics will become very important tools in the processes of extraction, anlyse and interpret data that this project proposes.

**Key words:** contaminants, metabolomics, metabolome, vegetation, exudates.

*Título:* **Characterization and Classification of coffees of different varieties and origins by liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV), fluorescence (HPLC-FLD) and low and high mass spectrometry (LC-MS, LC-HRMS), using chemometric methods**

*Estudiante:* Nerea Núñez Téllez

*Fecha:* Julio 2019

*Supervisor:* Dr. Oscar Núñez Burcio

Nowadays, the quality of natural products is an issue of great interest in our society, especially when dealing with natural products.

In the present work, C18 reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) technique coupled to ultraviolet (UV), fluorescence (FLD) and mass spectrometry (MS) detection have been applied to achieve the characterization and classification of Arabica and Robusta coffee samples from different production regions.

The high performance liquid chromatography method was performed using a Kinetex<sup>®</sup> C18 reversed-phase column (100 × 4.6 mm i.d., 2.6 µm particle size) under gradient elution conditions employing 0.1% formic acid aqueous solution and methanol as mobile phase components.

The proposed methods were applied to the analysis of 240 coffee samples belonging to different groups depending on the variety (Arabica and Robusta), the growing region (Central and Sud America, Ethiopia, Colombia, Nicaragua, Indonesia, India, Uganda and Brazil), and the roasting degree. Analytes were recovered using an extraction method employing only water as extracting solvent (coffee brewing).

The data obtained corresponding to HPLC-UV, HPLC-FLD and HPLC-MS methods were considered as a source of potential descriptors to be exploited for the characterization and classification of the analyzed coffees.

The plot scores obtained after chemometric analysis by PLS-DA using UV, FLD and MS fingerprints revealed patterns that were perfectly correlated to the production regions, both coffee varieties and the different roasted grade of samples. Moreover, sample classification and discrimination tend to be related to polyphenolic content.

The results obtained suggested that the fingerprints obtained of the different methods can be useful for the characterization and classification of coffee samples to authenticate their variety and production region with the aim of preventing consumer frauds.



**Título:** Caracterización y Clasificación de cafés de diferentes especies y orígenes mediante cromatografía de líquidos con detección ultravioleta (HPLC-UV), fluorescencia (HPLC-FLD) y espectrometría de masas de baja y alta resolución (LC-MS, LC-HRMS), empleando métodos quimiométricos

**Estudiante:** Nerea Núñez Téllez

**Fecha:** Julio 2019

**Supervisor:** Dr. Oscar Núñez Burcio

Hoy en día, la calidad de los productos naturales es uno de los aspectos de mayor interés para la sociedad, especialmente cuando se trata de productos de origen natural.

En este trabajo, se ha usado la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en fase invertida (C18) acoplada a la detección ultravioleta (UV), fluorescencia (FLD) y espectrometría de masas (MS) para lograr la caracterización y clasificación de muestras de café Arábica y Robusta de diferentes regiones de producción.

La cromatografía de alta eficacia se ha llevado a cabo haciendo uso de una columna de fase invertida Kinetex<sup>®</sup> C18 (100 × 4,6 mm i.d., 2,6 µm de medida de partícula) bajo condiciones de elución en gradiente haciendo uso de una solución acuosa con un 0,1% de ácido fórmico y metanol como componentes de la fase móvil.

Los métodos propuestos se aplicaron al análisis de 240 muestras de café pertenecientes a diferentes grupos dependiendo de la variedad (Arábica y Robusta) y la región de origen (América Central y del Sud, Etiopía, Colombia, Nicaragua, Indonesia, India, Uganda y Brasil). Los analitos se obtuvieron mediante un método de extracción que emplea solo agua como disolvente de extracción (preparación de café).

Los datos obtenidos correspondientes a los métodos de HPLC-UV, HPLC-FLD y HPLC-MS se consideraron una fuente de potenciales descriptores químicos para ser explotados para la caracterización y clasificación de los cafés analizados.

Los gráficos de *scores* obtenidos después del análisis quimiométrico por PLS-DA usando las huellas dactilares obtenidas usando UV, FLD y MS revelaron patrones que estaban perfectamente correlacionados con las regiones de producción, ambas variedades de café y el diferente grado de tueste de las muestras. Además, la clasificación y discriminación de las muestras tendían a estar relacionadas con el contenido polifenólico.

Los resultados obtenidos sugirieron que las huellas dactilares obtenidas de los diferentes métodos pueden ser útiles para la caracterización y clasificación de las muestras de café para autenticar su variedad y región de producción con el objetivo de prevenir fraudes al consumidor.

## Physicochemical characterization of drugs in biological fluids

Núria Górriz López, Dra. Elisabet Fuguet i Jordà, Dra. Clara Ràfols i Llach

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

In the drug discovery process many compounds are synthesised but only few of them have success as a drug candidate. There is a need for optimising current preclinical approaches to increase the chances of successfully completing a clinical trial leading to the approval of a new drug.

The most used routes of administration of drug substances are oral and parenteral. To understand the *in vivo* behaviour of a drug is necessary to use simulated biological fluids, since they can give a better approximation of the release mechanism. Most drugs are acids or bases, so drugs properties are pH dependent. Then  $pK_a$  determination is crucial in early steps of the study to predict the bioavailability of the drug. When working with water, the solubility and  $pK_a$  measurements are not always representative of the properties in the physiological fluids, particularly for drugs which are low soluble and very lipophilic.

The main two biorelevant media simulating preprandial and postprandial conditions in the upper small intestine are Fasted-State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) and Fed-State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF), respectively.

In this project, three media were studied and characterised, FaSSIF, FeSSIF and bovine serum. Then, 21 ionizable drugs  $pK_a$  were determinate in water, FaSSIF and FeSSIF by potentiometric and spectrophotometric methods. The results obtained by both methods do not present significant differences between them.

However, to evaluate the effect of bovine serum on drugs  $pK_a$  it would be necessary a more exhaustive characterisation of the medium and develop a system for the treatment of the data.

A difference between water and biorelevant media drugs  $pK_a$  was observed. The greater difference was found in FeSSIF due to the higher amount of surfactants in the media, where micelles are formed.

Acidic compounds presented an increment their  $pK_a$  value in biorelevant media while basic compounds presented a decrease in their  $pK_a$  value. In both cases, this phenomenon can be explained by the interaction of the neutral form of the drug with the micelles present in the medium. However, there is not a generalized behaviour found in all basic compounds.

Some studies have been done to understand the behaviour of those drugs that presented a difference between drugs  $pK_a$  in water and biorelevant media. It has been found that those drugs that present a great  $\log P_{o/w}$  value tend to interact more with media micelles and hence, have greater bioavailability. The Abraham solvation equation seems to correlate the increments in acidic  $pK_a$ , even though there are few samples to assure it. It has also been found that there can be a difference in the dissociation degree in biorelevant media against in water. To conclude, it can be said that the measurement of drug  $pK_a$  in biorelevant media is relevant.

## Caracterització fisicoquímica de fàrmacs en medis biològics

Núria Górriz López, Dra. Elisabet Fuguet i Jordà, Dra. Clara Ràfols i Llach

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

El descobriment de fàrmacs és un procés laboriós. Cada any es sintetitzen molts compostos, però només alguns tenen èxit com a candidats. Hi ha una necessitat d'optimitzar l'enfocament dels assajos preclínic actuals per augmentar les possibilitats de completar els assajos clínics arribant a l'aprovació d'un nou fàrmac.

La via oral és el mètode més comú per l'administració de fàrmacs. Per entendre el comportament *in vivo* dels fàrmacs s'han d'emprar medis biològics simulats, ja que permeten una millor comprensió de l'alliberament dels fàrmacs. La majoria de fàrmacs són àcids o bases, per tant, les seves propietats depenen del pH i la determinació del  $pK_a$  és crucial per a predir la biodisponibilitat del fàrmac. Quan es treballa en aigua, les mesures de solubilitat i  $pK_a$  no sempre són representatives de les propietats del tracte gastrointestinal, especialment per a fàrmacs poc solubles i molt lipòfils.

Els dos medis biològics més emprats per simular el fluid intestinal en dejú i després d'haver menjat són el FaSSIF i el FeSSIF respectivament.

En aquest projecte s'ha estudiat i caracteritzat tres medis, FaSSIF, FeSSIF i sèrum de boví adult. A continuació, s'ha determinat el  $pK_a$  de 21 fàrmacs en aigua, FaSSIF i FeSSIF mitjançant els mètodes potenciomètric i espectrofotomètric. Els resultats obtinguts mitjançant els dos mètodes no presenten diferències significatives entre ells.

Tanmateix, l'efecte del sèrum en el  $pK_a$  dels fàrmacs no s'ha pogut avaluar, ja que és necessari realitzar una caracterització més exhaustiva del medi per desenvolupar un sistema de tractament de dades.

S'ha observat una diferència en els valors de  $pK_a$  dels fàrmacs en els medis biològics respecte de l'aigua. En el FeSSIF s'ha observat una major variació a causa de la major concentració de surfactants presents en el medi i la formació de micel·les.

El valor de  $pK_a$  dels àcids en els medis biològics ha augmentat, mentre que en les bases ha disminuït. En tots dos casos, aquest fet es pot explicar mitjançant la interacció de la forma neutra amb les micel·les presents en el medi. S'ha vist que aquest comportament no és generalitzat en les bases, mentre que en els àcids sí que ho és.

S'ha realitzat alguns estudis per tal d'entendre el comportament dels fàrmacs que han tingut una variació en el valor de  $pK_a$ . S'ha trobat que els fàrmacs que tenen un valor de  $\log P_{o/w}$  elevat presenten una major variació en el valor de  $pK_a$ , per tant, tenen una major biodisponibilitat. L'equació de solvatació de l'Abraham podria correlacionar els increments de  $pK_a$  dels àcids, tot i que hi ha poques mostres per poder-ho assegurar. També s'ha vist que hi ha una diferència en el grau de dissociació en els medis biològics simulats respecte en aigua. Per tot l'esmentat

anteriorment, es pot concloure que la mesura del  $pK_a$  dels fàrmacs en medis biològics simulats és important.

## Development of High Performance Liquid Chromatography methods (HPLC) for the determination and characterization of flavanols on dietary supplements

Òscar Vidal, Javier Saurina and Santiago Hernández

The pharmaceutical industry produces dietary supplements made of cranberries (*Vaccinium macrocarpon*), which contain a rich polyphenolic profile and high content of procyanidins (PACs), specifically of A-type, that are ideal for the treatment and prevention of Urinary Tract Infections (UTIs). For this reason, they are very used to elaboration of dietary products [1].

PACs, also known as condensed tannins, are dimers, oligomers and polymers composed by flavanols monomer, mainly catechin and epicatechin, that are linked by A-type and B-type interflavanol bonds, which apart from the different chemistry structure, the most relevant is that the only A-type can inhibit the *Escherichia coli* adhesion of urinary tract walls. It is one of the most characteristics benefits of PACs, so it is very useful for UTIs cure [2].

As a cause of positive effects of PACs on health, specifically the A-type, there has been very researches to find the most effective method to quantify them. The analytic procedure that uses pharmaceutical industry to determine the total content of PACs is based on spectrophotometric method of 4-dimethylaminocinnamaldehyd (DMAC) and the result is expressed as catechin equivalents, because on comparison of the other spectrophotometric methods researched, the DMAC method offers a high sensibility and selectivity for the reaction with flavanols and PACs [3].

In this work, the reaction of derivatized flavanols with DMAC was studied to optimize the temperature and reaction time, the chromatographic separation of them, and later, determine the content of PACs in dietary samples, that are produced from different fruits. Also, the chromatographic profiles of these samples from two different methods, a method with previous derivatization and other method without derivatization, was compared. The separation was made by HPLC, using a reverse C18 phase column with detection by molecular absorption Diode Array (DAD) and fluorescence (FLD). The derivatization DAD method with DMAC was registered to 640 nm (selective condition to flavanols) and the underivatized DAD method to 280 nm, that is representative of global polyphenolic content, and FLD detection to  $\lambda_{\text{excitation}} = 280$  nm and  $\lambda_{\text{emission}} = 320$  nm, that is selective to flavanols. Finally, a chemometric treatment called Principal Component Analysis was used to distinguish and classify the samples.

---

### References

- [1] Prior Ronald, Gu Liwei, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2264-2280.
- [2] Amy Howell, Jess Reed, Christian Kruege, Ranee Winterbottom, David Cunningham, Marge Leahy, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2281-2291.
- [3] Taylor Wallace, Monica Giusti, *J. Food Chem*, **2010**, 75, 619-625.

## Desenvolupament de mètodes de cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC) per a la determinació i caracterització dels flavanols en suplementes dietètics

Oscar Vidal, Javier Saurina i Santiago Hernández

La indústria farmacèutica elabora suplementes dietètics a partir dels nabius americans (*Vaccinium macrocarpon*), que contenen un perfil ric de polifenols i un contingut elevat de procianidines (PACs), concretament del tipus A, que els fan ideals per al tractament i la prevenció de les infeccions del tracte urinari (UTIs). Per aquest motiu, són molt utilitzats en l'elaboració dels productes dietètics [1].

Les PACs, també conegudes com a tanins condensats, són dímers, oligòmers i polímers formats per monòmers de flavanols, principalment la catequina i epicatequina, els quals s'uneixen a través d'enllaços interflavanols del tipus A i tipus B, que a part de la diferent estructura química, el més rellevant és que només el tipus A és capaç d'inhibir l'adhesió de la bactèries d'*Escherichia coli* a les parets del tracte urinari, essent un dels més característics beneficis d'aquestes PACs, ja que és molt útil en la cura de les UTIs [2].

A causa dels efectes positius de les PACs sobre la salut, especialment les del tipus A, s'han realitzat moltes recerques, per tal de trobar el mètode més eficaç per a la seva quantificació. El procediment analític que utilitza la indústria per determinar el contingut total de PACs es basa en el mètode espectrofotomètric del 4-dimetilaminocinamaldehyd (DMAC), expressat el seu valor com a equivalents de catequina, perquè en comparació amb els altres mètodes espectrofotomètrics investigats, el mètode del DMAC proporciona una sensibilitat i selectivitat més elevada per a la reacció amb els flavanols i les PACs [3].

En aquest treball, s'avalua la reacció de derivatització dels flavanols amb el DMAC per poder determinar el contingut d'aquests en mostres dietètiques produïdes a partir de diferents fruits. També es comparen els perfils cromatogràfics d'aquestes mostres, a partir de mètodes amb i sense derivatització pre-columna, basant-se en una separació per HPLC, utilitzant una columna de fase invertida (C18) amb detecció per absorció molecular diode array (DAD) i fluorescència (FLD). El mètode de derivatització DAD amb DMAC es realitza a la  $\lambda = 640$  nm (condició selectiva als flavanols) i el mètode sense derivatització per DAD a la  $\lambda = 280$  nm, que és representativa del contingut global dels polifenols i per FLD a la  $\lambda_{\text{excitació}} = 280$  nm i  $\lambda_{\text{emissió}} = 320$  nm, que correspon a una detecció selectiva dels flavanols. Posteriorment, mitjançant un tractament quimiomètric per Anàlisi de Components Principals (PCA) es diferencien i es classifiquen les mostres.

---

### Referències

- [1] Prior Ronald, Gu Liwei, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2264-2280.
- [2] Amy Howell, Jess Reed, Christian Kruege, Ranee Winterbottom, David Cunningham, Marge Leahy, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2281-2291.
- [3] Taylor Wallace, Monica Giusti, *J. Food Chem*, **2010**, 75, 619-625.

## **Determinación de los antibióticos, metabolitos y los productos de transformación en suelos**

**Nom estudiant:** Edward Jair Pastor López

**Tutors:** Dr. José Francisco García Martínez, Dr. Josep María Bayona Termens.

Una gran cantidad de antibióticos son utilizados con el objetivo de prevenir o curar infecciones que sufren las personas, animales y plantas. Sin embargo, la utilización inapropiada ha estimulado la producción de toneladas de antibióticos que pueden entrar, con relativa facilidad, a los ecosistemas terrestres mediante la utilización frecuente de enmiendas orgánicas (deyecciones ganaderas, biosólidos, etc) y aguas residuales tratadas, generando la resistencia bacteriana en el microbioma del suelo pudiéndose incorporar a los cultivos pudiendo provocar efectos nocivos a la salud humana.

Durante la última década, se han desarrollado diferentes metodologías analíticas para la determinación de diferentes familias de antibióticos (fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, etc), que permiten evaluar el riesgo y determinar otros compuestos de forma simultánea. No obstante, el desarrollo de procedimientos analíticos para determinar la fracción ligada de antibióticos en suelos, así como los posibles productos de transformación (PTs) es escasa.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el comportamiento del trimetoprim (TMP) (antibiótico bactericida de amplio espectro utilizado en humanos y animales) en un suelo de agricultura ecológica, bajo dos condiciones de incubación diferentes (sin y con control de hidratación). Este objetivo conlleva estudiar la combinación del antibiótico con la matriz y la identificación de PTs, generados a partir de la degradación del TMP, utilizando la cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (LC-HRMS).

El procedimiento analítico de la fracción libre proporciona límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 28,5-29,1 ng/g y 43,2-49,4 ng/g respectivamente y un intervalo de recuperación del 47,1-80,3%. Para el método de la fracción enlazada, el LOD es de 29,1-31,4 ng/g y el LOQ es de 51,8-53,8 ng/g y presenta un intervalo del % recuperado del 11,2-24,1%. Por otro lado, se han identificado un total de 6 PTs, con una tolerancia en el error, en la masa detectada, inferior a los 5 ppm.

**Palabras claves:** Trimetopim, antibióticos, productos de transformación, suelo agrícola, UHPLC-DAD, LC-HRMS.



# **Determination of antibiotics, metabolites and transformation products in soils**

**Student name:** Edward Jair Pastor López

**Directors:** Dr. José Francisco García, Dr. Josep María Bayona Termens

A wide variety of antibiotics are used as drugs for prevent or treating human, animal and plant infections. However, an inappropriate use has stimulated the production of thousands of tons of antibiotics. Antibiotics can enter easily into the terrestrial environment by organic soil amendments (cattle droppings, biosolids, etc) and irrigation with treated wastewater. These agricultural practices can promote the bacterial resistance on soil microbiome and can be uptaken by crops with unknown effects to human health. Analytical methodologies for determination of different chemical classes of antibiotics (fluoroquinolones, sulphonamides, tetracyclines, etc) in environmental matrices have been developed during the last decade, which make possible to the proper assessment of their occurrence and risk. However, analytical procedures for determination of the bound fraction of antibiotics in soil, as well as the possible transformation products (TPs) are still limited.

The aim of this work is to evaluate the behaviour of trimethoprim (TMP) (bacteriostatic antibiotic with broad spectrum used in humans and animals) in soil from organic farming in two different conditions of incubation (one without hydration control and another one with hydration control). This aim involves studying the combination between antibiotic and soil matrix and TPs identification, which are generated from the degradation of the TMP, using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS).

Analytical procedure of free fraction provides a limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 28.5-29.1 ng/g and 43.2-49.4 ng/g respectively. The recovery range is 47.1-80,3%. For bound fraction method, LOD is 29.1-31.4 ng/g and LOQ is 51.8-53.8 ng/g with a recovered fraction of 11.2-24.1%. One the other hand, 6 TPs were identified by LC-HRMS with tolerance error in mass detected less than 5 ppm.

**Keywords:** Trimethoprim, antibiotics, transformation products, agriculture soil, UHPLC-DAD, LC-HRMS.

*Títol:* **Determination of active pharmaceutical ingredients in water by DPV using SPE**

*Estudiant:* Marc Zaguirre Garijo

*Data:* Juliol 2019

*Supervisora:* Dra. Cristina Ariño Blasco  
*Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica*  
*Secció Departamental de Química Analítica*

Cada any es consumeixen al món milions de tones de productes farmacèutics. Aquests productes són utilitzats fonamentalment pel tractament de malalties en humans i en animals. Un cop aquests fàrmacs realitzen la seva funció, són excretats de l'organisme en forma de residu tot arribant als ecosistemes aquàtics i posant en risc la biodiversitat.

La majoria dels mètodes descrits a la literatura per a determinar productes farmacèutics inclouen una etapa de separació cromatogràfica i en molts casos l'utilització de l'espectrometria de masses. L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode analític de cribatge per determinar residus farmacèutics d'una manera ràpida, econòmica i que permeti treballar in-situ generant el mínim de residus possibles.

En aquest treball s'ha desenvolupat un mètode per determinar quatre residus farmacèutics (acetaminophen, àcid salicílic, trimethoprim i cafeïna) en mostres d'aigua mitjançant voltamperometria diferencial d'impulsos tot emprant diferents elèctrodes serigrafiats basats en carboni: elèctrode serigrafiat basat en carboni sense modificar (SPCE), elèctrode serigrafiat basat en carboni modificat amb nanotubs de carboni (CNT-SPCE), elèctrode serigrafiat basat en carboni modificat amb nanofibres de carboni (CNF-SPCE) i elèctrode serigrafiat basat en carboni modificat amb grafè (GPH-SPCE). Primer de tot s'han establert els paràmetres de qualitat per la seva determinació individual i simultània amb elèctrodes serigrafiats. Un cop establerts els paràmetres i seleccionant l'elèctrode més convenient, s'han determinat els residus farmacèutics en mostres fortificades d'aigua destil·lada i d'aigua de l'aixeta i finalment, en aigües del Perú, on se sap que aquests residus estaven presents.

**Paraules clau:** productes farmacèutics, elèctrodes serigrafiats, voltamperometria diferencial d'impulsos, mostres d'aigua.

*Title:* **Determination of active pharmaceutical ingredients in water by DPV using SPE**

*Student:* Marc Zaguirre Garijo

*Date:* July 2019

*Supervisor/s:* Dra. Cristina Ariño Blasco  
*Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica*  
*Secció Departamental de Química Analítica*

Millions of pharmaceuticals are consumed every year in the world. These products are used in humans and animals to treat some diseases. A growing number of pharmaceuticals have been detected in final effluents from wastewater treatment plants indicating incomplete removal or degradation of these bio-active compounds.

These products are commonly determined by GC-MS or HPLC-MS. Electroanalytical techniques appear as a good option due to their sensibility, selectivity, the possibility to be adapted for in-situ measurements for their determination. In this work the possibilities to apply voltammetry using carbon based screen-printed electrodes has been studied to determine some pharmaceuticals in water.

Bare screen-printed carbon electrodes (SPCE), screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes (CNT-SPCE), screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanofiber (CNF-SPCE) and screen-printed carbon electrodes modified with graphite (GPH-SPCE) are considered for the simultaneous determination of acetaminophen, salicylic acid, trimethoprim and caffeine by differential pulse voltammetry in water. Study of repeatability and reproducibility and determination of LODs and LOQs have been performed to determine which electrode is the most appropriate to determine pharmaceuticals considered.

Once the electrode has been chosen, the proposed method was applied to their simultaneous determination in spiked deionized water, spiked tap water and spiked and non-spiked water from a lake in Peru.

**Keywords:** pharmaceuticals, screen-printed electrodes, differential-pulse voltammetry, water determination.