



Universitat Ramon Llull

TESI DOCTORAL

Títol: Anàlisi simultània d'aflatoxines i ocratoxina A en compost i avaluació de la degradació del nonilfenol en sòls.

Realitzada per Helena Navajas Cortina

en el Centre Escola Tècnica Superior IQS

i en el Departament Química Analítica

Dirigida per Dr. Lluís Comellas i Riera
Dra. Montserrat Agut Bonsfills

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi Doctoral han estat presentats en els següents congressos:

- A les XXXVIII Reunión Científica del Grupo de Cromatografía y Técnicas afines, San Sebastián (Octubre 2009): **“Evaluation of the degradation of nonylphenol in wastewater of soil”**, format pòster.
- A les XVI Jornades d’Anàlisi Instrumental JAI, Barcelona (Novembre 2008): **“Evaluation of the production of Ochratoxin A (OTA) by *Penicillium* species isolated from compost”**, format pòster.
- a les XXXVI Reunión Científica del Grupo de Cromatografía y Técnicas afines, Granada (Octubre 2007): **“Analysis of aflatoxins and ochratoxin A in sewage-sludge compost by liquid chromatography tandem mass spectrometry”**, presentació oral.

Adicionalment, els resultats s’han publicat en el següents article:

- **Análisis simultáneo de aflatoxinas y ocratoxina A en compost por HPLC-MS**
H.Navajas, F. Broto-Puig, M.Agut, L. Comellas. Afinidad 2010, 3745,

Aquest estudi s'ha realitzat en el marc del projecte del Pla Nacional titulat: "Ecotoxicidad, micotoxinas y degradación de nonilfenoles en lodos de depuradora y suelos tratados" finançat pel Ministeri d'educació i ciència amb número de referència: CTM2006-14163-C02-02, en col·laboració amb el Centre de Recerca i Aplicacions Forestals (CREAF). La present Tesi Doctoral aborda els aspectes de determinació analítica de la presència d'algunes micotoxines i l'evolució del nonilfenol.

S'ha estudiat la presència de micotoxines, concretament les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i l'ocratoxina A, produïdes per fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* en tres mostres de compost produït en dues EDAR de Catalunya.

Per això s'ha desenvolupat un mètode per a l'anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i l'ocratoxina A en compost. En primer lloc s'ha adaptat per aquestes mostres un procediment per HPLC-MS desenvolupat anteriorment en el nostre equip per a la determinació de les aflatoxines G₂, G₁, B₂ i B₁ aplicat en matrius de tipus alimentari, que s'ha estès a la determinació conjunta de les quatre aflatoxines i l'ocratoxina A. Aquest procediment ha mostrat problemes pel que fa a la recuperació i precisió dels resultats. Per això, vistes aquestes dificultats, s'ha desenvolupat un nou procediment per UHPLC-Fluorescència que permet una preparació de mostra més ràpida i simple, així com una millor sensibilitat. Aquest nou mètode ha estat validat i permet escorçar el temps d'anàlisi en aconseguir eliminar l'etapa de purificació de mostra amb cartutxos de reblert polimèric, utilitzats en el mètode emprat com a punt de partida.

Els dos procediments han permès demostrar que, en les mostres de compost estudiades no hi ha quantitats significatives de cap de les cinc micotoxines estudiades.

Pel que fa al nonilfenol, s'ha estudiat la seva evolució temporal, durant 32 setmanes, en mostres de sòl, mesclades de sòl amb torba i mesclades de sòl amb compost, a les que s'ha addicionat nonilfenol a dos nivells de concentració. De la mateixa manera, s'ha estudiat la concentració de nonilfenol en els lixiviats de les mostres de sòl i de les mesclades de sòl amb torba. Per això, s'ha posat al punt un procediment analític per HRGC-MS tant per a les mostres de sòls com per a les mostres aquoses dels lixiviats. S'ha posat de manifest la ràpida eliminació del nonilfenol en les tres mostres estudiades i que el nivell de pèrdua per lixiviació és molt baix.

En els mateixos lixiviats s'ha determinat la matèria orgànica total (TOC) i la seva toxicitat a través de l'assaig de Microtox. Les dues determinacions mostren que aquests lixiviats no presenten toxicitat i complirien les exigències per poder ser abocats a les xarxes públiques de clavegueram.

Finalment, es pot afirmar que l'ús del compost en agricultura és una pràctica segura, tant pel que fa a l'absència de les micotoxines, com per la ràpida degradació del nonilfenol en el sòl i les petites pèrdues per lixiviació.

-
- ACA: Agència Catalana de l'Aigua
 - AFB₁: Aflatoxina B₁
 - AFB₂: Aflatoxina B₂
 - AFG₁: Aflatoxina G₁
 - AFG₂: Aflatoxina G₂
 - AFM₁: Aflatoxina M₁
 - AFM₂: Aflatoxina M₂
 - AOAC: Association of Analytical Chemists
 - BOE: Butlletí Oficial de l'Estat
 - CREAM: Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals
 - CV: Coeficient de variació
 - DAD: Diode Array Detector
 - DCM: Diclorometà
 - DEHP: Ftalat de bis(2-etilhexil)
 - EDAR: Estació Depuradora d'Aigües Residuals
 - EDC: Disruptors Endocrins
 - E.I: Impacte electrònic
 - ELISA: Assaig immunosorbent amb enzim lligat (Enzim-Linked Immunosorbent Assays)
 - ESI: Ionització per electro spray (Electrospray Ionization)
 - Fluo: Fluorescència
 - Fr: Factor de resposta
 - HPLC: High Performance Liquid Chromatography
 - IAC: Columnes de immunoafinitat
 - IARC: Agència Internacional per a la Recerca sobre el Càncer (International Agency of Research on Cancer)
 - LAS: Alquilbenzens lineals
 - LD: Límit de detecció
 - LQ: Límit de quantificació
 - MF: Matèria Fresca
 - m/z: Relació massa/càrrega d'un ió
 - MS: Espectròmetre de masses
 - MSTFA/TMIS: N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoro acetamida/Trimetiliodosilano
 - NP: Nonilfenol
 - NPEO i NPEOx: Nonilfenols Etoxilat
 - NPEO1: Nonilfenol monoetoxilat
 - NPEO2: Nonilfenom dietoxilat
 - TLC: Cromatografia de capa fina
 - TMS: Trimetilsililderivats
 - TOC: Total Organic Carbon

- OTA: Ocratoxina A
- PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
- PCB: bisfenils policlorats
- PCCD: dibenzo-p-dioxinas policlorades
- PCDF: dibenzofurans policlorats
- PI: Patró intern
- PSARU: Pla de Sanejament d'Aigües Residuals Urbanes
- Q1, Q2, Q3: Primer quadrupol, segon quadrupol i tercer quadrupol
- rpm: Revolucions per minut
- SCAN: Escaneig en un rang de masses
- SIM: Selected Ion Monitoring
- SPE: Extracció en fase sòlida (Solid Phase Extraction)
- UAB: Universitat Autònoma de Barcelona
- UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography
- US: extracció per ultrasons
- UV: Detector ultravioleta

Capítol I: Introducció i objectius

1. Fangs de depuradora.....	2
1.1. Legislació vigent sobre els fangs de depuradora.....	5
1.2. Gestió de tractament dels fangs de depuradora a Catalunya.....	5
2. Posttractament dels fangs de depuradora.....	6
2.1. Compostatge.....	7
3. Destinacions.....	9
4. Contaminants orgànics.....	11
5. Altres vies de contaminació de micotoxines: Inhalació de l'aire contaminat per micotoxines.....	13
6. Objectius.....	15

Capítol II: Anàlisi de nonilfenols en mostres de sòls.

1. Introducció.....	17
1.1. Nonilfenols etoxilats (NPEO).....	18
1.2. Toxicitat del NPEO.....	19
1.3. Degradació dels NPEO durant el tractament d'aigües residuals.....	20
1.4. Presència dels nonilfenols en fangs de depuradora.....	21
1.5. Destí al medi ambient dels NP.....	21
2. Mètodes d'anàlisi de nonilfenols.....	22
2.1. Etapa de preparació de mostra.....	22
2.1.1. Mostra líquida.....	22
2.1.2. Mostra sòlida.....	24
2.1.3. Mostra gasosa.....	25
2.2. Mètodes cromatogràfics.....	25
2.2.1. Cromatografia líquida (HPLC).....	25
2.2.2. Cromatografia de gasos (GC).....	26
2.2.3. Electroforesi capil·lar.....	27
2.3. Mètodes no cromatogràfics.....	27
2.4. Antecedents en el grup dels mètodes d'anàlisi de nonilfenols.....	28
3. Part experimental.....	29

3.1.	Validació del mètode analític.....	34
3.1.1.	Preparació de patrons.....	34
3.1.2.	Condicions cromatogràfiques.....	35
3.1.3.	Paràmetres de validació.....	36
3.2.	Disseny dels experiments realitzats en dos tipus de substrat: mescles de sòl i compost, i mescles de sòl i torba.....	39
3.3.	Preparació de les mostres de sòl i mescles de sòl addicionat amb torba.....	41
3.4.	Preparació de les mostres de sòl i mescles de sòl addicionat amb compost...43	
3.5.	Metòdica d'anàlisi del nonilfenol.....	45
3.6.	Evolució del nonilfenol en les mostres de sòls.....	46
4.	Estudi de la disminució inicial del NP	52
5.	Resum del capítol.....	57

Capítol III: Anàlisi de nonilfenol en mostres de lixiviats

1.	Introducció.....	59
1.1.	Obtenció dels lixiviats.....	59
1.2.	Determinació de l'ecotoxicitat aquàtica.....	60
2.	Desenvolupament d'un mètode d'anàlisi de nonilfenols en lixiviats.....	61
2.1.	Validació del mètode analític.....	64
3.	Anàlisi de la concentració de nonilfenol en els lixiviats obtinguts a partir de les mescles de sòl amb torba.....	67
4.	Anàlisi del TOC en els lixiviats de les mescles de sòl i torba.....	72
5.	Assaig de toxicitat per bioluminescència: Microtox.....	75
5.1.	Assaig de toxicitat de les mostres de lixiviats.....	77
6.	Resum del capítol.....	78

Capítol IV: Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i l'ocratoxina A en mostres de compost

1.	Introducció.....	81
1.1.	Origen de les aflatoxines i l'ocratoxina A.....	81
1.2.	Naturalesa de les aflatoxines i l'ocratoxina A.....	82
1.2.1.	Aflatoxines G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁	82
1.2.2.	Ocratoxines.....	83
2.	Anàlisi de micotoxines.....	84

2.1. Etapa de mostreig.....	84
2.1.2. Etapa de preparació de mostra.....	84
2.1.2.1. Extracció en fase líquida.....	85
2.1.2.2. Purificació i concentració en fase sòlida.....	86
2.1.2.1.3. Columnes de immunoafinitat.....	88
2.1.3. Mètodes cromatogràfics.....	88
2.1.3.1. Cromatografia de capa fina (TLC).....	89
2.1.3.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).....	89
2.1.3.3. Cromatografia líquida d'ultra resolució (UHPLC).....	91
2.1.3.4. Espectrometria de masses (MS).....	93
2.1.4. Mètodes no cromatogràfics.....	98
2.1.5. Comparació dels mètodes d'anàlisi de micotoxines.....	100
2.2. Antecedents en el nostre grup dels mètodes desenvolupats en l'anàlisi d'aflatoxines i ocratoxina A.....	101
2.2.1. Anàlisi de les aflatoxines B ₁ , G ₁ , B ₂ i G ₂ en plantes medicinals (Mètode A1).....	102
3. Part experimental.....	106
3.1. Mètodes cromatogràfics posats a punt amb patrons.....	106
3.1.1. Validació del mètode analític.....	108
3.2. Comparació del mètode A1 (HPLC-DAD-MS), mètode A2 (HPLC-DAD-MS) i mètode A3 (UHPLC-UV-Fluo).....	121
3.3. Presentació de les mostres i proposta del límit de detecció a determinar en mostres de compost.....	124
3.4. Anàlisi simultània de les aflatoxines G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁ i OTA en les mostres de compost.....	125
3.4.1. Anàlisi del compost de Blanes del 2007.....	127
3.4.2. Anàlisi del compost de Blanes del 2002 per a realitzar l'estudi de la influència del pes de mostra en les recuperacions de les aflatoxines G ₁ , G ₂ , B ₁ , B ₂ i OTA.....	137
3.4.3. Anàlisi del compost de Manresa del 2007.....	145
3.4.4. Resum dels resultats obtinguts per a les tres mostres de compost analitzades.....	149
3.5. Estudi de les variacions en la metòdica d'extracció i purificació.....	152
3.5.1. Anàlisi del compost de Blanes del 2007 sense purificar la mostra i utilitzant MeOH com a solvent d'extracció.....	153
3.5.2. Anàlisi del compost de Blanes del 2007 utilitzant MeOH com a solvent d'extracció i purificant la mostra.....	154
3.5.3. Extracció de les micotoxines amb una etapa de desengreixat prèvia a l'extracció.....	156
4. Anàlisi simultània de les aflatoxines G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁ i OTA en mostres de compost per UHPLC-UV-Fluo.....	159

4.1.Anàlisi de les aflatoxines G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁ i ocratoxina A per UHPLC-UV-Fluo en el compost de Manresa del 2007 i el compost de Blanes del 2007.....	160
4.2.Validació del mètode analític.....	163
5.Resum del capítol.....	167
Capítol V: Conclusions.....	169
Capítol VI:Bibliografia.....	171

La present Tesi Doctoral s'emmarca dins del projecte titulat: "Ecotoxicidad, micotoxinas y degradación de nonilfenoles en lodos de depuradora y suelos tratados" finançat pel Ministeri d'Educació i Ciència, amb número de referència: CTM2006-14163-C02-02. La data d'inici del projecte va ser de l'1 d'octubre del 2006 i la data final va ser del 30 de setembre del 2009 prorrogat al 31 de desembre del 2009, on es plantegen les següents preguntes i propostes a estudiar:

- En els últims anys (1), s'han obtingut indicis de la formació de micotoxines durant el procés de compostatge ja que s'hi desenvolupen una gran quantitat de fongs. Entre les toxines, se'n poden incloure algunes amb efectes cancerígens per a l'ésser humà. Al ser pràcticament nul·la la investigació realitzada sobre aquest tema, es considera d'interès l'estudi dels fongs que es poden desenvolupar durant el compostatge i de la seva possible producció de toxines. La presència de toxines resultaria doblement preocupant, tant per l'efecte que podrien tenir durant la producció del compost en les plantes depuradores, com durant la seva aplicació com adob en agricultura o jardineria.
- D'altre banda, existeixen evidències suficients de què els nonilfenols etoxilats, especialment el nonilfenol, es troba en concentracions elevades en la majoria de fangs de depuradora del nostre país (2,3). Aquests superen el límit de 50mg/kg proposat en la Directiva EC per permetre la seva aplicació als sòls en agricultura. Si es manté aquest límit, tindria unes conseqüències econòmiques, ambientals i socials molt costoses ja que tampoc es podria aplicar en la restauració de sòls degradats per mineria o per incendis. És per això, que resulta fonamental estudiar si hi ha una degradació del nonilfenol en el sòl un cop aplicat, per saber si se'n pot fer un ús segur.
- Finalment, es té constància de la toxicitat del nonilfenol i que es comporta com a disruptor endocrí alterant la reproducció dels organismes aquàtics. Aquest projecte també pretén generar un coneixement sobre les dosis ecotòxiques del nonilfenol en organismes. Per això, és necessària la coordinació tant d'un equip d'analistes de contaminants orgànics com un equip especialista en ecotoxicologia. Per tant s'avaluarà l'ecotoxicitat l'inici i final d'aplicar el NP al sòl i s'analitzarà els lixiviats d'aquests sòls tractats per poder conèixer les possibles pèrdues per lixiviació, així es pot estimar el risc de transferència d'aquests contaminants a les aigües de drenatge.

A continuació s'aporta informació dels dos aspectes claus d'aquesta tesi: els fangs de depuradora i els contaminants orgànics que poden ser-hi presents.

1.Fangs de depuradora

Els fangs de depuradora, també anomenats biosòlids, són residus que s'obtenen en el procés de depuració d'aigües residuals. Estan constituïts per partícules minerals fines i una quantitat important de matèria orgànica. Així doncs, el fang de depuradora es defineix com un

subproducte procedent de la transformació microbiològica de la matèria orgànica de les aigües residuals.

El procés de depuració de les aigües consisteix bàsicament en la reducció de la matèria orgànica i altres partícules en suspensió que porten les aigües residuals. Les depuradores d'aigües residuals tenen dues línies de funcionament, la línia d'aigües i la línia de fangs. La primera correspon a la part del procés de depuració que tracta únicament les aigües residuals. La segona correspon a la part del procés que tracta els fangs o biosòlids generats com a conseqüència del procés de depuració de la línia d'aigua.

1- Línia d'aigua:

La tipologia de l'aigua residual pot ser segons el seu origen domèstica, industrial o, el que és més freqüent, una barreja de les dues anteriors en diferents proporcions (2,3).

Les etapes més freqüents per les quals ha de passar l'aigua residual durant el seu procés de depuració són les següents:

a) Pretractament: S'eliminen els sòlids voluminosos, les sorres i graves, i part dels greixos mitjançant tractaments físics com ara tamisat, precipitació física forçada, separació amb injecció d'aire, etc.

b) Decantació primària: Es realitza, generalment, en basses circulars (decantadors primaris) de fons cònic, on una part de la matèria orgànica i inorgànica que porta en suspensió l'aigua residual es diposita al fons per l'efecte de la gravetat.

Les depuradores biològiques poden incloure aquesta etapa, o no, en funció del grau de qualitat de l'aigua a depurar. El fang obtingut en aquesta etapa s'anomena fang primari.

c) Depuració biològica: L'aigua arriba des del pretractament o des del decantador primari a un bioreactor on la matèria orgànica continguda a les aigües residuals es digereix mitjançant l'activitat biològica dels microorganismes presents.

Aquesta activitat s'optimitza amb la incorporació d'aire, de manera que es produeix un ràpid creixement microbià alimentat per aquesta matèria orgànica i, en conseqüència, disminueix considerablement la seva concentració. Això dona lloc a grans flocs de material en suspensió que se separen en la decantació secundària. Dins d'aquest procés també es pot aconseguir la disminució dels compostos de nitrogen, fòsfor i altres nutrients presents a l'aigua residual.

d) Decantació secundària: És un procés molt semblant a la decantació primària, on es produeix la separació de l'aigua depurada dels fangs biològics. El producte que s'obté s'anomena fang biològic o fang secundari.

e) Tractament terciari: És el tractament més avançat de depuració de les aigües residuals. L'objectiu d'aquest tractament és garantir la desinfecció de l'aigua, aconseguint una qualitat superior a la dels tractaments convencionals, que la faci apte per a la seva reutilització per a usos que no requereixen una qualitat d'aigua potable.

2- Línia de fangs:

En funció del disseny de la línia d'aigua, els fangs generats poden ser primaris, secundaris o mixtos. A la línia de fangs, aquests són sotmesos a una sèrie de tractaments destinats principalment a reduir i estabilitzar la matèria orgànica (disminuint així la seva degradabilitat i conseqüentment la mala olor) i reduir el volum mitjançant l'eliminació de part de l'aigua que contenen, amb l'objectiu d'obtenir un residu de millor qualitat i de més fàcil maneig (4). Aquests tractaments consisteixen en:

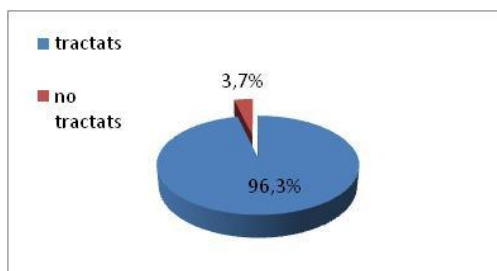
a) Recirculació: Una part dels fangs del decantador secundari són retornats al reactor biològic per assegurar l'activitat biodegradativa dels microorganismes.

b) Espessiment: L'excés de matèria decantada es purga des dels decantadors i es bombeja fins a uns espessidors, on mitjançant l'acció física de la gravetat o bé per flotació, s'homogeneïtzen i es concentren per reduir-ne el volum i poder tractar-los posteriorment amb més eficàcia. Aquest tractament permet obtenir fangs amb una concentració al voltant del 5% en matèria seca.

c) Digestió: Els fangs espessits són conduïts a un reactor per estabilitzar-los, reduint la seva part biodegradable. Aquest és un procés que es realitza aprofitant l'activitat biològica dels mateixos microorganismes presents als fangs. Pot ser de tipus aeròbic o anaeròbic, segons es desenvolupi en presència o no d'oxigen, i mesòfil o termòfil depenent de la temperatura en la que es desenvolupa el procés.

d) Deshidratació: Permet reduir el contingut d'aigua del fang minimitzant així la quantitat de residu generat a la depuradora i millorant-ne significativament les condicions de maneig. Les deshidratacions actuals son gairebé en la seva totalitat de tipus mecànic i el contingut en matèria seca del fang que s'obté oscil·la entre el 15 i el 35 % de matèria seca.

Actualment, a Catalunya operen 335 EDARs (Estació Depuradora d'Aigües Residuals) que tracten anualment 659 hm³ d'aigua residual (5). Durant l'any 2008 es van generar 584.589 tones de fangs expressades com a matèria fresca, amb una sequedat mitjana del 24%. Això determina una producció d'unes 139.279 tones de matèria seca. Els costos associats a la gestió d'aquests fangs són de 39M €/any (6).

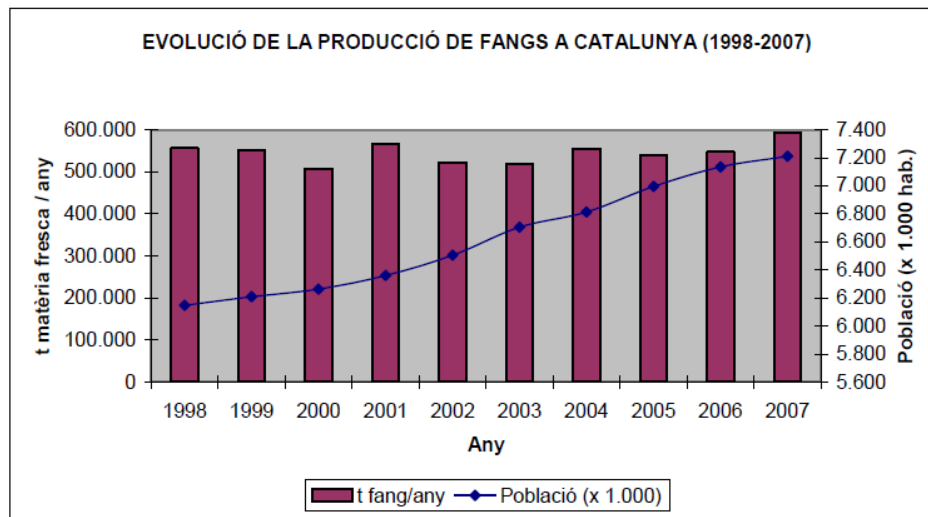


	t MF	%
tractats	563.154	96,3%
no tractats	21.435	3,7%
TOTAL FANGS GENERATS	584.589	100,0%

Gràfic 1. Fangs tractats a Catalunya l'any 2008 expressat en tones en matèria fresca (t MF).

Com es pot veure en el gràfic 1, a Catalunya dels fangs generats, un 96,3% són destinats a posttractament i un 3,7% no es tracten (7).

Malgrat l'augment de la població, la producció de fangs produïts en la línia de fangs en les EDARs, es pot considerar estable. Aquest fet es mostra en el gràfic 2 on es pot veure l'evolució de la producció de fangs a Catalunya entre el anys 1998-2007, expressats en tones de matèria fresca.



Gràfic 2. Evolució de la producció de fangs (1998-2007)

1.1. Legislació vigent sobre el fangs de depuradora

Els fangs de depuradora són residus que es poden gestionar de diferents maneres. Els procediments més habituals són la incineració, la deposició en abocadors, la valorització energètica i l'aplicació a l'agricultura. Aquesta última opció aprofita l'elevat contingut en matèria orgànica (40-80%) com adob organomineral als sòls on s'addiciona. A finals dels anys 80 es va prohibir l'abocament dels fangs de depuradora al mar, per tant l'aplicació en agricultura es va presentar com una alternativa interessant per donar sortida a les grans quantitats de fangs produïdes a les EDARs, però també van fer sorgir dubtes sobre si era respectuós amb el medi ambient. Per això, es va veure necessari regular la pràctica de l'aplicació dels fangs com a fertilitzant sota normes estrictes amb el fi de reduir al mínim els perills potencials.

A la UE, la Directiva del Consell 86/278/CEE, de 12 de juny de 1986, i a Espanya el Reial Decret 1310/1990 que incorpora la Directiva anterior relativa a la protecció del medi ambient i, en particular, dels sòls, en la utilització dels fangs de depuradora en agricultura, va establir els principis per a l'aplicació dels fangs de depuradora a l'agricultura buscant un equilibri entre l'interès agrari i l'ambiental. La Directiva especifica normes per al mostreig i l'anàlisi dels fangs i els sòls i estableix que es guardin registres detallats de les quantitats de fang produïdes, les quantitats emprades en l'agricultura, la composició i les propietats dels fangs en relació als

paràmetres a controlar (matèria seca, matèria orgànica, pH, nitrogen i fòsfor, cadmi, coure, níquel, plom, zinc, mercuri i crom), el tipus de tractament i les zones on s'ha utilitzat el fang.

Com ja s'ha dit, els fangs són un residu, motiu pel qual la seva planificació ha de complir els principis i s'ha d'orientar a la consecució dels objectius que deriven de la legislació de residus europea, bàsica estatal i de la mateixa Generalitat, tal com resulta de la Directiva 2006/12/CE del Parlament Europeu i del Consell, de 5 d'abril de 2006, relativa als residus, de la Llei bàsica estatal 10/1998, de 21 d'abril, i el Decret legislatiu 1/2009, de 2 de juliol, pel qual s'aprova el text refós de la Llei reguladora dels residus.

1.2. Gestió i tractament dels fangs de depuradora a Catalunya

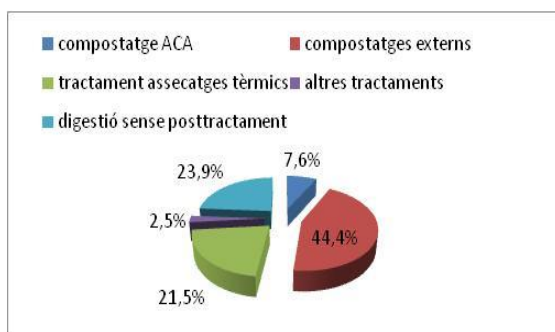
A Catalunya, l'entitat responsable del sanejament de les aigües residuals, dels seus abocaments i del control de la qualitat de les aigües és actualment l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA), entitat pública adscrita al Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya. Aquesta entitat es va crear l'any 1998 mitjançant la Llei 25/1998, de 31 de desembre, i de la seva normativa substantiva en matèria d'aigües mitjançant l'aprovació de la Llei 6/1999, de 12 de juliol, d'ordenació, gestió i tributació de l'aigua, actualment refoses en el Decret legislatiu 3/2003, de 4 de novembre. Per tant, és l'entitat responsable de desenvolupar el Pla de Sanejament de Catalunya (6).

El Programa de sanejament d'aigües residuals urbanes 2005 (PSARU 2005) (7) és un instrument de la planificació hidrològica que desenvolupa el Pla de sanejament de Catalunya aprovat pel Govern de la Generalitat, en data 7 de novembre de 1995, que té com a objectiu la definició de totes les actuacions destinades a la reducció de la contaminació originada per l'ús domèstic de l'aigua, que permetin l'assoliment dels objectius de qualitat de l'aigua.

El PSARU 2005 s'emmarca entre la Directiva 91/271/CEE sobre el tractament d'aigües residuals urbanes, i la Directiva 2000/60/CE, per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües, adreçada a la protecció de les aigües i que pretén aconseguir abans de l'any 2015 un bon estat de les masses d'aigua superficials, mitjançant el desenvolupament de mesures de protecció, millora i regeneració d'aquestes masses.

2. Posttractament dels fangs de depuradora

Els fangs poden rebre diferents tipus de posttractament, sent el més freqüent l'assecat tèrmic i el compostatge. Les plantes de posttractament constitueixen una destinació intermèdia del fang, on es realitzen l'estabilització i la reducció de la massa i el volum del material per millorar-ne la gestió i adequar-lo a la seva destinació final. El gràfic 3 mostra els percentatges destinats al diferents tipus de posttractaments dels fangs durant l'any 2008.



	t MF	%
compostatge ACA	42.091	7,5%
compostatges externs(altes gestors)	245.384	43,6%
tractament assecatges tèrmics	123.404	21,1%
altres tractaments	14.665	2,5%
digestió sense posttractament	137.610	23,5%
FANG TRACTAT	563.154	96,30%
FANG NO TRACTAT	21.435	3,70%
TOTAL FANG GENERAT	584.589	100,00%

Gràfic 3. Posttractaments dels fangs de depuradora on les quantitats són expressades en tones en matèria fresca (t MF) i percentatges.

Com es pot observar en el gràfic 3, durant l'any 2008 a Catalunya, de les 563.154 tones de fangs expressat en matèria fresca, un 51% es va utilitzar per a la producció de compost (en el gràfic 3 està separat entre els compostatges realitzat a l'ACA i per altres gestors), un 21% va tenir com a posttractament el assecatge tèrmic i un 23% es va sotmetre a una digestió sense posttractament.

Del tipus de posttractament que es poden aplicar als fangs, la present Tesi Doctoral es centra en el compostatge, ja que el compost es l'objectiu d'estudi.

2.1. Compostatge

Catalunya disposa de cinc plantes de compostatge situades a Sant Adrià del Besòs, Vilaseca-Salou, Blanes, Manresa i Olot (només considerant les de fangs de depuradores urbanes). El procés de compostatge consisteix en la descomposició aeròbica de la matèria orgànica, causada per l'acció de microorganismes, que dona lloc a un residu anomenat compost.

Aquest residu, és més estable que el material de partida i es pot utilitzar com adob en agricultura i floricultura. El compost és el producte resultant d'un procés d'oxidació biològic que converteix la matèria orgànica i sòlida en partícules fines i homogènies de material parcialment humificat. Amb el procés de compostatge s'aconsegueix reduir el volum i pes del fang, així s'obté un producte més estable i sanejat. El compostatge es desenvolupa en diverses etapes principals, on les poblacions de microorganismes van canviant durant el procés d'acord amb les transformacions del medi.

La primera etapa és la de preparació d'una mescla de fang deshidratat amb l'agent estructurant (com per exemple estelles de fusta, restes de poda o materials prèviament compostats) que permeten donar una porositat necessària per a poder mantenir les condicions aeròbiques de la mescla durant tot el procés de compostatge.

Després té lloc el procés de compostatge, pròpiament dit, que dura entre dues i tres setmanes. Aquest es pot fer en pila, en túnel obert i en túnel tancat. En una pila, es col·loca el fang amb les estelles en forma allargada exposades a l'aire lliure.

El compostatge en túnel obert, es dona en un túnel que té una longitud d'uns 100 metres, i que va girant mitjançant un cargol sense fi per assegurar l'entrada necessària d'oxigen a l'interior. Es controla la humitat i cal que la temperatura arribi a 55°C en tot el túnel perquè es destrueixin els organismes patògens. El moviment és mecànic i els nivells d'oxigen estan estrictament controlats i registrats, també es controla la velocitat d'entrada i sortida d'aire, eliminant les males olors. A continuació el compost es deixa en maduració en piles fins passats 3 mesos.

En els túnels tancats, el compostatge es realitza en túnels rectangulars que tenen una longitud d'uns 25 metres. L'aire s'injecta a través de la base del túnel, la qual aireja la massa on s'estarà estàtica uns 14 dies. Posteriorment el compost es treu del túnel tancat i es deixa en maduració en piles uns 3 mesos.

Durant el compostatge, la descomposició de la matèria orgànica es dona en funció de la temperatura i de l'activitat dels microorganismes. A l'inici del compostatge, anomenada **etapa mesofílica**, la massa està a temperatura ambient i hi abunden els bacteris i els fongs mesofílics, mentre que el número d'actinomicets, que també són bacteris, és relativament baix. Els bacteris mesofílics són els encarregats de descompondre la matèria orgànica, ja que posseeixen una àmplia gamma d'enzims capaços de trencar químicament una gran varietat de compostos orgànics. Són organismes unicel·lulars de formes variades. Els fongs mesofílics, són els responsables de descompondre polímers vegetals complexos, massa secs, àcids o pobres en nitrogen per després ser descompostos per bacteris, permetent a aquests continuar el procés de descomposició tan bon punt la major part dels esmentats polímers han estat degradats. La majoria d'aquests fongs són floridures i viuen a les capes externes del compost. Aquestes, creixen en forma de filaments generalment, formant colònies blanques o grises de miceli en la superfície.

A causa de l'activitat metabòlica de tots aquests microorganismes, la temperatura va augmentant fins a 40°C, el pH disminueix des d'un valor neutre fins 5,5-6 a causa de la descomposició de lípids i glúcids en àcids pirúvics i de proteïnes en aminoàcids. És en aquest moment quan podrien créixer els fongs micotoxigènics ja que es donen les condicions òptimes de creixement.

A continuació, en l'**etapa termofílica** actuen els microorganismes termòfils, els quals transformen el nitrogen en amoníac. A 60°C les poblacions de bacteris i fongs mesofílics moren o romanen en estat de latència mentre que els bacteris termofílics, actinomicets i fongs termofílics es troben en el seu punt òptim, generant fins i tot més calor que els mesofílics. Els actinomicets donen l'olor característica a terra, i són especialment importants en la formació de l'humus. Són bacteris filamentosos que formen filaments multicel·lulars com els fongs, la qual cosa els fa molt similars a aquests. Els seus enzims els permeten trencar químicament residus

rics en cel·lulosa, lignina, quitina i proteïnes. Posseixen una forma allargada amb filaments que s'estenen com teranyines grises.

Aquests organismes són els encarregats de descompondre els greixos, proteïnes i hemicel·lulosa. La degradació dels àcids obtinguts en l'etapa anterior provoca un increment de pH, passant des de 5,5 fins a 7,5, on romandrà gairebé constant fins al final del procés. El color del compost es va tornant més fosc i l'olor original es comença a substituir per olor a terra.

Posteriorment, es dona **l'etapa de refredament** on els nutrients comencen a escassejar i l'activitat dels microorganismes termofílics baixa i conseqüentment, la temperatura disminueix fins a temperatura ambient, provocant la parada de l'activitat termòfila i la reaparició de l'acció dels microorganismes mesofílics, els que descomponen la cel·lulosa al passar pels 40-45°C. En baixar de 40°C el pH del medi disminueix lleugerament.

Un cop finalitzada aquesta primera etapa, comença **l'etapa de maduració**, on la temperatura i el pH s'estabilitzen. Si el pH és àcid indica que el compost encara no està madur. Els actinomicets adquireixen especial importància en la formació d'àcids húmics i són freqüentment productors d'antibiòtics que inhibeixen el creixement de bacteris i patògens, mentre que els macroorganismes com nematodes, rotífers, escarabats, cucs etc., incrementen la seva activitat ocupant la funció de remoure, excavar, moldre, mastegar i en general trencar físicament els materials, incrementant l'àrea superficial d'aquests per a permetre l'accés dels microorganismes. El color del producte final ha de ser negre o marró fosc i la seva olor a terra de bosc.

Finalment la mescla compostada és traslladada a l'exterior on estarà durant tres mesos en forma de pila a temperatura ambient. És necessari assegurar l'aireació a través d'un volteig mecànic ocasional i la humitat a través d'addició d'aigua quan sigui necessari. En aquesta etapa es donen reaccions secundàries de condensació i polimerització de l'humus.

Al final del procés de compostatge, el volum del fang es redueix fins un 50% en volum i un 40% en pes. Per contra, la matèria orgànica i els contaminants no biodegradables es concentren. Per això és important saber la qualitat del fang de partida, perquè la qualitat del compost disminuirà com més contaminants tingui i més tòxics siguin. Aconseguint un compost de bona qualitat, proporciona moltes avantatges sobretot en la seva aplicació al sòl. Aquestes avantatges són:

- Millora les propietats físiques del sòl. La matèria orgànica afavoreix l'estabilitat de l'estructura dels agregats del sòl agrícola, redueix la densitat aparent, augmenta la porositat, la permeabilitat i augmenta la capacitat de retenció d'aigua en el sòl.
- Millora les propietats químiques. Augmenta el contingut en macronutrients (N, P, K) , micronutrients i augmenta la capacitat d'intercanvi catiònic.
- Millora l'activitat biològica del sòl. Actua com a suport i aliment dels microorganismes ja que utilitzen la matèria orgànica del humus pel seu creixement i contribueixen a la seva mineralització.

3. Destinacions

El Pla Nacional de Fangs de Depuradores d'aigües Residuals 2001-2006 estableix com a principals destinacions finals dels fangs de depuradora: l'aplicació en agricultura, la valorització energètica i evocar-los en dipòsit controlat.

Aquestes fangs han de complir diversos paràmetres de qualitat seguint la normativa, per això en usos com agricultura s'ha de tenir en compte la lixiviació dels sòls. Aquests lixiviat dels sòls, han de complir també diversos paràmetres de qualitat que s'han d'estudiar abans de ser tractats.

a) **Aplicació al sòl** (bé sigui com a valorització agrícola o com aplicació en altres usos, com ara restauració d'activitats extractives i terrenys marginals, jardineria, etc.). Es presenta com una de les opcions més atractives en l'actualitat, l'ús d'aquests fangs com a fertilitzants organominerals. En un principi, l'aplicació d'aquests fangs es contemplava únicament en sòls agrícoles, actualment una altre alternativa és l'aprofitament en aplicacions forestals i recuperacions de terrenys degradats

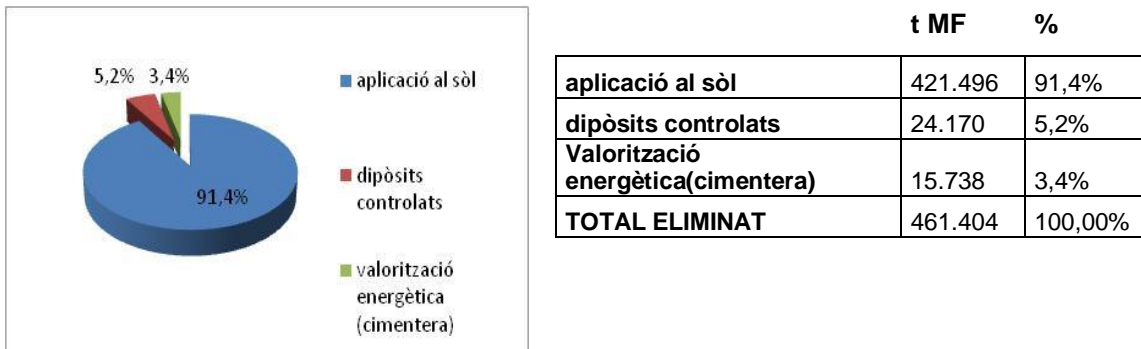
b) **Valorització energètica**: Consisteix en una via de gestió prioritària a la destinació a dipòsits controlats no aptes per a l'ús agrícola, on s'asseca el fang i s'assimila a un combustible derivat de residus, sempre que el poder calorífic sigui millor que altres combustibles. Actualment, a Europa es tendeix cap a l'aplicació de tractaments tèrmics que permeten una valorització energètica dels fangs. La valorització energètica en cimenteres consisteix en la destrucció del residu al mateix temps que s'aprofita l'energia al introduir-lo en el forn de ciment, en substitució parcial de combustibles fòssils. La valorització energètica de fangs és un procediment habitual en països europeus com Suïssa, França i Bèlgica.

La valorització energètica resol un problema social de gestió de residus, a més de disminuir el consum de combustibles fòssils (com el coc del petroli o el carbó), fet que permet la reducció de les emissions de diòxid de carboni, com indiquen les directrius del tractat de Kyoto.

c) **Disposició en dipòsit controlat**: Aquesta aplicació queda limitada per la regulació genèrica imposada per la legislació vigent que no permet una humitat superior al 65% en els fangs dipositats en aquest tipus d'abocadors.

d) **Altres formes de valorització material**: Utilització en materials de construcció, en subbases per a carreteres, etc.

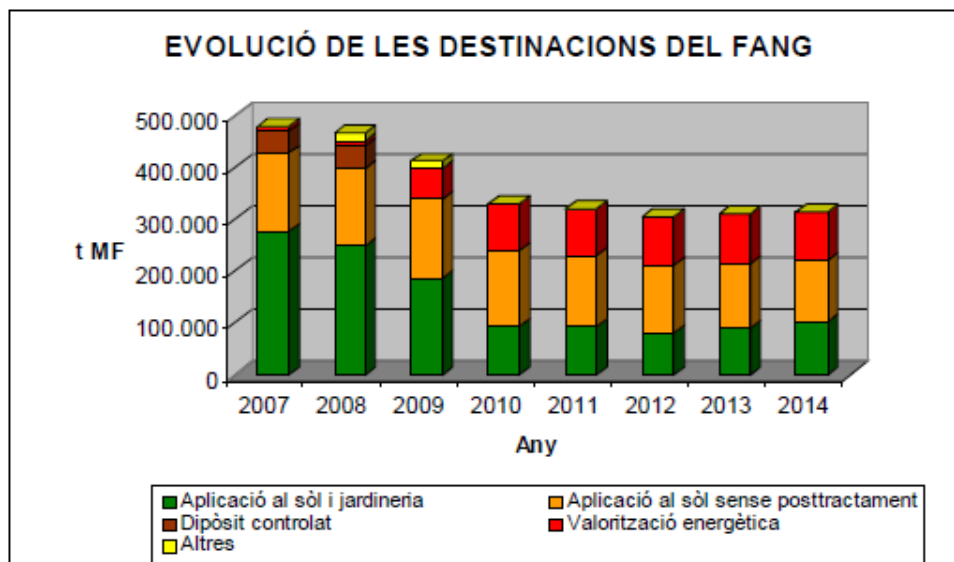
En el gràfic 4, es mostren els percentatges de la destinació final dels fangs un cop fet el posttractament durant l'any 2008 a Catalunya.



Gràfic 4. Destinació final dels fangs després del posttractament expressat en tones en matèria fresca (t MF) i percentatges.

Com es pot veure en el gràfic 4, durant l'any 2008 a Catalunya, de les 584.589 tones de fangs generats (matèria fresca, veure gràfic 3 de l'apartat 2) no s'han aconseguit gestionar la totalitat d'aquestes sinó que s'han tractat 461.404 tones de matèria fresca. D'aquestes, un 91,4% es van destinar a l'aplicació al sòl, un 5,2% es destinen a dipòsits controlats i un 3,4% a la valorització energètica.

A continuació, en el gràfic 5 es mostra l'evolució que es preveu del 2007 al 2014 de les destinacions dels fangs de depuradora (8).



Gràfic 5. Evolució de les destinacions dels fangs.

Com es pot veure en el gràfic 5, es preveu una reducció important de la massa de residus valorada en el 34% respecte l'actualitat, una disminució dels fangs aplicats al sòl sense haver fet un posttractament així com, un increment en la valorització energètica. Finalment, es preveu una redistribució de les destinacions principals, entre l'aplicació al sòl de fang compostat (32%), l'aplicació de fang deshidratat tractat (38%) i la valorització energètica (30%).

4. Contaminants orgànics

Com s'ha dit anteriorment, els fangs de depuradora apart de la matèria orgànica i nutrients, poden contenir diferents tipus de contaminants retinguts durant el procés de tractament de les aigües residuals. Aquest fet implica un risc ambiental que és necessari prevenir i quantificar. La comissió de la UE, arran de la revisió de la directiva existent UE 1986/278, va generar un document amb el nom de *Working Document on Sludge 3rd Draft 2000* (9). Aquest document, apart de fer referència als nivells de metalls pesats, dona valors límit per a un nombre de determinats contaminants orgànics en els fangs de depuradora perquè es puguin aplicar com a fertilitzants. La taula 1 presenta aquests valors límits.

Compostos orgànics	Valors límits (mg/kg m.s.)
AOX ¹	500
LAS ²	2600
DEHP ³	100
NPE ⁴	50
PAH ⁵	6
PCB ⁶	0.8
PCCD/F ⁷	100 ⁸

Taula 1. Valors límits dels compostos orgànics en fangs de depuradora

¹ Suma de compostos orgànics hal·logenats, ² Alquilbenzens sulfonats lineals, ³ Di(2-etilhexil)ftalat, ⁴ Inclou els compostos nonilfenol i nonilfenol polietoxilat amb 1 o 2 grups etoxi, ⁵ Suma dels següents hidrocarburs aromàtics policíclics: acenafè, fenantrè, fluorè, fluorantè, pirè, benzo(b+j+k)fluorantè, benzo(a)pirè, indeno(1,2,3-c,d)pirè, ⁶ Suma dels congèneres dels bifenils policlorats amb nombre 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, ⁷ Dioxines i dibenzofurans policlorats, ⁸ ng TE/kg m.s.

El 30 d'abril del 2003, es donà la nova proposta per a la Directiva del Parlament i el Consell Europeu sobre l'aplicació dels fangs al sòl. Com a novetat respecte al *Working Document on Sludge 3rd Draft 2000*, diferència entre sòls agrícoles i no agrícoles. Però pel que fa els límits establerts respecte als metalls pesats i als contaminants orgànics, segueix mantenint els mateixos que els establert en el *Working Document on Sludge 3rd Draft 2000*.

El compostatge dels fangs és un dels procediments més eficaços per sanejar i biodegradar la majoria de contaminants orgànics (2,3), però hi ha estudis que demostren que la concentració de nonilfenol supera el límit de 50mg/kg (2,3) malgrat fer aquest tractament. Per exemple, segons Bagó i Mejía (2,3) el compostatge en fang de Banyoles, tot i que aconsegueix disminuir la concentració total de NP/NPEO₁₊₂ en més d'un 40% (passa de 153mg/kg m.s. a 86mg/kg m.s.) la seva concentració encara està per sobre el límit de 50mg/kg.

En el cas del fang deshidratat de la depuradora de Blanes durant el procés de compostatge el NP només disminueixen un 69% (passa de 514mg/kg m.s. a 159mg/kg m.s.).

Per tant aquest fet és preocupant en el moment que es vol aplicar el compost com adob en agricultura, en jardineria o en regeneració de sòls. Així doncs, és interessant estudiar la degradació del nonilfenol un cop es barreja el compost amb el sòl.

Per estudiar la toxicitat del nonilfenol en sòls i lixiviats s'ha utilitzat un altre material orgànic que és la torba com adob organomineral. S'ha pensat en aquest altre tipus de material orgànic de característiques semblants al compost, però que no porti contaminants al sòl. La torba és un material orgànic compacte format per gramínies, jonc i molsa que quan moren es descomponen i s'acumulen en les torberes. La torba es forma com a resultat de la putrefacció i carbonificació de la vegetació en l'aigua de pantans, marismes o zones humides. La formació d'una torbera es relativament lenta a conseqüència de l'escassa activitat bacteriana i la baixa concentració d'oxigen, el pas dels anys produeix l'acumulació de torba que pot arribar a tenir diversos metres d'espessor, a un ritme de creixement entre mig i deu centímetres cada cent anys.

Així doncs, la torba com que és un producte natural que pateix una lixiviació durant tots els anys de creixement, aporta menys contaminants orgànics que el compost en el moment d'aplicar-la com adob organomineral, en jardineria o en regeneració de sòls. A continuació es presenten, en la taula 2, les concentracions de metalls pesats detectats en compost i es comparen amb la torba, que com es pot veure en la torba són menors que en el compost.

Metall	Torba (mg/kg)	Compost (mg/kg)
Cr	14	60
Ni	7	21
Pb	7	38
Cu	16	276
Zn	42	492
Hg	0,02	1,08
Cd	0,2	0,9

Taula 2. Concentració de metalls pesats en la torba i en el compost

Per altre banda, un altre aspecte que podria ser preocupant del procés de compostatge, és que durant les diferents etapes d'aquest procés puguin créixer fongs capaços de produir micotoxines com ara les aflatoxines i l'ocratoxina A, ja que la temperatura òptima de creixement d'aquests fongs és entre 27-30°C i la màxima és entre 40-42°C.

Si hi hagués hagut la producció de toxines durant el procés de compostatge, aquestes romandrien en el compost ja que per destruir-les caldrien temperatures superiors a 250°C, fet que, evidentment, no es dona (10).

Un fet que està demostrat és que en el compost hi ha fongs de gèneres descrits com a productors de les aflatoxines i l'ocratoxina A. Per tant, s'ha d'estudiar si les soques presents en el compost tenen la capacitat genètica per fer-ho i si el substrat és adequat perquè produeixin les micotoxines (11). Cal destacar la poca bibliografia existent sobre l'anàlisi de micotoxines en compost, ja que fins ara, i per motius obvis, les matrius més estudiades han estat els aliments, sent aquestes la principal via de contaminació per a l'ésser humà.

5. Altres vies de contaminació de micotoxines: Inhalació de l'aire contaminat per micotoxines

Actualment, s'han començat a tenir en compte altres fonts de contaminació com podria ser la inhalació de pols de gra contaminat amb micotoxines o la inhalació d'aire contaminat pels treballadors de plantes de compostatge.

Existeixen pocs casos descrits sobre episodis de malalties per la inhalació de toxines, encara que alguns d'aquests casos s'han relacionat amb diverses formes de càncer provocat per l'exposició d'aflatoxines en el medi ambient, com pot ser en granges o durant la manufactura de productes contaminats. L'aire contaminat per micotoxines és transportat al teixit superficial alveolar, on pot interferir en l'eliminació normal de partícules pel sistema macròfag. Pot produir-se, a més un increment de les infeccions per bacteris oportunistes (12).

Molts fongs produeixen micotoxines i tot i que els fongs no són abundants en l'aire exterior, es troben en nivell elevats durant activitats agrícoles, i és llavors quan poden ser contaminants habituals en ambients interiors. Com que les micotoxines no són substàncies volàtils, només existeix l'exposició per inhalació quan passen el medi ambient part dels fongs o les espores, en les quals s'ha comprovat que existeix una concentració elevada de toxines, com per exemple la pols del gra.

Un dels pocs casos relativament ben definits sobre intoxicació per inhalació va ser una exposició a l'aire interior d'una casa on es van trobar nivells elevats de toxines (13). La contaminació de l'aire va ser produïda per una fuga d'aigua lenta durant un llarg període que va afectar al sostre i als conductes de l'aire. Es va comprovar, mitjançant les analítiques pertinents, que els ocupants no estaven intoxicats per metalls pesats ni per pesticides. Es van prendre mostres de l'aire les quals van revelar nivells elevats de nombroses espores fúngiques no habituals en edificis. També es van aïllar del material procedent de sostre i dels conductes de l'aire, micotoxines altament tòxiques.

En la dècada dels anys 70 a Canadà va tenir lloc un altre cas per intoxicació per inhalació de micotoxines en un edifici on els treballadors van desenvolupar símptomes semblants al cas anterior. Aquests símptomes es van associar a les floridures trobades en l'edifici (14).

Un altre fet demostrat, és que la presència de biota fúngica procedent del medi natural, retarda la producció de micotoxines per part d'altres que s'incorporin a partir de l'ambient. La presència de floridures en un sistema de ventilació, climatització i calefacció no és suficient per confirmar

l'existència de la posterior contaminació per micotoxines. Cal tenir en compte, les condicions particulars de cada sistema de ventilació, climatització i calefacció (humitat, temperatura, substrat nutritiu per dipòsit d'aerosols i de pols) i l'existència o no de compatibilitat entre la diferent biota fúngica (13).

Es coneixen altres casos d'intoxicació per inhalació de micotoxines en ambients laborals, com és el cas dels treballadors d'una fàbrica de cotó al sud de Rússia i el cas d'uns grangers que treballaven amb fenc florit (15).

L'estudi sobre l'exposició d'aire contaminat per aflatoxines s'ha centrat en grangers i altres treballadors agrícoles. S'han analitzat mostres de la recol·lecció, trasllat en cintes transportadores, emmagatzematge i de la pols del gra de blat contaminat. Els resultats obtinguts van demostrar l'existència de perill d'inhalació de aflatoxines en la pols. A causa de la seva alta toxicitat, es van suggerir mesures de protecció als treballadors (16). Un altre camp on preocupa l'exposició a la inhalació d'aire contaminat per aflatoxines i/o ocratoxina A és en les plantes de depuració d'aigües urbanes, on en el procés de compostatge del fang de depuradora a causa de les diferents etapes que té poden créixer diferents gèneres de fongs i produir toxines.

Per tant, per tot el plantejat fins ara, és raonable preguntar-se si els fangs de depuradora, fins i tot compostats, es poden seguir aprofitant com s'ha fet durant tots aquests anys per aquests motius:

- Ha quedat pal·lés en els punts anteriors, que el compost que s'incorpora al sòl per regenerar-lo, procedent de les plantes de compostatge del nostre país, supera el límit permès de 50mg/kg. Per tant, aquesta aplicació ja no es podria dur a terme si la proposta de la normativa prospera. És per això que s'estudia si el NP es degrada en el sòl durant un curt període de temps.
- Fins ara les micotoxines s'han controlat en aliments, però actualment es planteja una altra via de contaminació que seria a través del compost. Aquest fet es podria donar perquè el compost s'utilitza com adob en agricultura. Per tant, si aquest conté les toxines aquestes podrien arribar a les plantes i per cadena tròfica a l'ésser humà. (17)
- Si durant el procés de compostatge es generen micotoxines, podria ser que els treballadors de les plantes de compostatge les inhalessin junt amb la pols del gra i inhalen també les espores fúngiques que transportessin micotoxines sobre elles (1). Aquesta via de contaminació també es podria donar en persones que manipulin el compost contaminat.

6.Objectius

Per tot el que s'ha exposat prèviament, en la present Tesi Doctoral es plantegen els següents objectius:

- Determinar la concentració de les micotoxines en el compost. Això fa necessari posar a punt un mètode d'anàlisi simultània per a les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i ocratoxina A en aquesta matriu.
- Estudiar la degradació del nonilfenol en sòls, i comparar l'evolució del nonilfenol en dos tipus de substrat; sòl addicionat amb compost i sòl addicionat amb torba.
- Estudiar la quantitat de nonilfenol que es lixivia de les mostres de sòls addicionat amb torba, on també s'analitza el TOC (Carboni Orgànic Total) i avaluar la toxicitat amb l'assaig Microtox d'aquests lixiviats.

1.Introducció

Actualment, el reciclatge de fangs de depuradora està regit pel RD 1310/90, transposició de la Directiva Europea 86/278/CEE, que limita les dosis dels fangs a aplicar en funció del seu contingut en metalls pesats en el fang i en el del sòl receptor, a més d'establir unes aportacions màximes anuals (1). Els beneficis de l'aplicació del fang de depuradora al sòl pot veure's limitat per risc de contaminació del sòl, els cultius, les aigües i organismes edàfics. Aquesta contaminació és deguda a què els fangs de depuradora poden contenir una gran diversitat de contaminants que poden afectar al medi ambient (2). Entre els principals contaminants hi ha els organismes patògens, nitrats (generats en la mineralització de la matèria orgànica nitrogenada), metalls pesants i compostos orgànics. La presència de quantitats excessives de qualsevol d'aquests hauria de restringir els nivells d'aplicació del fang en el sòl.

L'última versió redactada l'any 2000 (*3rd Draft working document on sludge*, (3) sobre l'aplicació de fangs al sòl és la que es manté actualment. Els límits de contaminants segueixen vigents com ja s'ha dit en la introducció de la present Tesi Doctoral.

Les tendències actuals respecte al tractament final dels fangs de depuradora són el compostatge i l'assecat tèrmic, front la deshidratació parcial. El compostatge s'ha mostrat com un procediment adequat, per a la reducció dels nivells de la majoria de contaminants per sota els límits exigits per les normatives vigents. No obstant, fins ara, ni el compostatge ha demostrat suficient eficàcia per disminuir el nivell del nonilfenol habitualment presents en els fangs de les EDAR catalanes, com ja s'ha dit anteriorment. Segons bibliografia, el compostatge disminueix el contingut de DEHP en un 85% i els NPEOs en un 79% en els millors del casos (4,5). A més a més, el compostatge redueix la quantitat i toxicitat d'altres contaminants biodegradables (4).

En canvi, en el cas de l'assecat tèrmic, es redueix els nivells de DEHP només en un 15% i els NPEOs en un 33% (4,5). Cal destacar, que l'assecat tèrmic manté o inclús pot arribar a concentrar el nivell de contaminants orgànics biodegradables (4).

Aquest fet és important donat que s'assumeix que els contaminants orgànics no persistents són ràpidament biodegradats. Per tant, especialment en el cas dels NPE, s'hauria de fer més recerca sobre la seva degradació durant el compostatge, en l'evolució de la seva toxicitat i el temps de vida en el sòl, ja que la seva degradació si no és total en sòls tractats, podria acumular-se en certs organismes.

1.1. Nonilfenols etoxilats (NPEO)

Els nonilfenols etoxilats són compostos químics que es produeixen en gran quantitat i que s'han estat utilitzant durant més de 50 anys com a detergents, emulsionants, agents humectants, i en agricultura com additius en formulacions de pesticides. Una gran quantitat de productes que contenen nonilfenol etoxilats són utilitzats en molts sectors industrials que inclouen la fabricació de tèxtils, el processament del cuir, el procés de producció del paper, pintures, resines i recobriments protectors, en la indústria del petroli, fabricació d'acer, polietilè, PVC, etc (6).

Des de la indústria s'han promogut diverses accions amb el propòsit de disminuir la utilització del NP i els NPEO. A la Unió Europea la Directiva 2003/53/EC s'estableix que no es pot comercialitzar o utilitzar com a substàncies o constituents de preparats en concentracions iguals o superiors al 0,1% de nonilfenol o 1% de nonilfenol etoxilat (6).

Actualment, en la majoria de països europeus, els NPEO degut a la seva persistència i efectes estrogènics dels productes de degradació dels NPEOs, s'han substituït per altres tensioactius no iònics, com per exemple, els alcohols polietoxilats (AEO). Tot i això, a causa del seu baix cost els NPEO encara s'utilitzen en la indústria dels detergents.

Amb el nom genèric de nonilfenols polietoxilats es coneixen els compostos formats per un nucli de fenol amb una o diverses cadenes nonil, ramificades i isomèriques, i amb un grup etoxilat (polietilenglicol hidrofílic). La molècula d'aquest tensioactiu consisteix d'una part hidrofòbica (cadena alquíllica) i una hidrofílica (cadena etoxilada) que poden tenir de 1 a 20 grups etoxilats(veure figura 1.1.1.). Els NPEO comercials són una mescla de monoalquilfenols polietoxilats, predominant els homòlegs para substituïts. La longitud de la cadena etoxilada respecte a la cadena arilparafínica, té una gran influència en les propietats específiques d'aquests productes.

L'obtenció industrial dels nonilfenols etoxilats consisteix en fer reaccionar l'òxid d'etilè i el grup hidròxid del nonilfenol. La reacció s'inicia mitjançant una catàlisi alcalina, normalment amb KOH, NaOH o K_2CO_3 en concentracions entre 0,1-2% p/p respecte al grup hidrofòbic, seguit de l'atac nucleòfil de l'anió del grup hidrofòbic sobre un dels àtoms de carboni de l'òxid d'etilè.

La quantitat de mols d'òxid d'etilè condensat determina l'ús dels NPEO. Així doncs, els que tenen entre 7 i 15 mols d'òxid d'etilè tenen les millors propietats emulsionants i humectants.

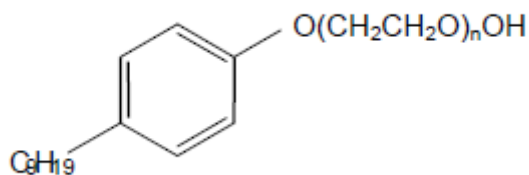


Figura 1.1.1. Estructura molecular dels nonilfenols etoxilats on n=1-20.

1.2. Toxicitat dels NPEO

Com ja s'ha comentat, en els últims anys, els NPEO han rebut una considerable atenció degut als efectes com a disruptors endocrins dels seus productes de degradació primària (NP i NPEO amb una i dos unitats etoxi).

Els disruptors endocrins (EDCs) es defineixen com aquelles substàncies exògenes que alteren el funcionament del sistema endocrí i en conseqüència provoquen efectes adversos sobre la salut d'un organisme o bé sobre la seva descendència. Els EDCs són un grup de compostos que generen preocupació degut a l'elevada presència, persistència, bioacumulació i potencials efectes adversos en el funcionament de l'ecosistema i en la salut humana. Aquestes substàncies químiques es poden produir per processos naturals o bé per l'activitat industrial. En els darrers anys hi ha hagut un creixent interès envers els efectes dels EDCs (7).

Hi ha treballs pocs publicats sobre els efectes del nonilfenol etoxilats en organismes aquàtics (7), i encara hi ha menys literatura sobre els seus efectes en organismes del sòl. La toxicitat dels NPEO creix a mesura que disminueix el número d'unitats etoxilats, sent el 4-nonilfenol el més tòxic dels compostos de degradació. Aquest provoca efectes perjudicials sobre els ecosistemes terrestres (8) i també pot inhibir el creixement de les plantes.

En el cas dels tensioactius es considera que el factor a determinar en la seva avaluació toxicològica és la diferència de biodegradació entre ells. En general, s'accepta que els productes de cadena lineal són prou biodegradables per complir amb els requisits de les diverses legislacions, però no els productes ramificats. Aquesta afirmació genera una certa incertesa en relació als efectes biològics dels tensioactius no iònics com els NPEOs.

Diversos estudis publicats mostren que el NP, el NPEO1 i el NPEO2 presenten una elevada activitat estrogènica. Els resultats indiquen que la toxicitat dels NPEOs creix a mesura que decreix el nombre d'unitats etoxilades. Per tant, la toxicitat de les substàncies originals, abans de la degradació, és inferior a la toxicitat dels metabòlits (NP > NPEO1 > NPEO2). La toxicitat aguda i crònica dels NP sobre organismes aquàtics s'ha revisat en els últims anys. S'observa

que el NP ha mostrat toxicitat (DL_{50} = dosis necessària per produir la mort del 50% dels individus després d'un cert temps) pels peixos a concentracions des de 17 a 3000 μ g/L. Per altre banda, els invertebrats es mostren sensibles al NP en un rang de concentracions de DL_{50} de 21 a 3000 μ g/L per les algues, la DL_{50} es situa 27 i 2500 μ g/L. A més a més, l'embriotoxicitat en crustacis (*Daphnia magna*) ha sigut registrada a nivells de 44 μ g/L (6).

Per tal d'eliminar qualsevol efecte tòxic advers pels humans i altres organismes, diversos països han prohibit o bé han regulat recentment la producció i l'aplicació de NPEOs. Com a mesura de reducció del risc en l'ús de NPEOs, dins la Unió Europea s'ha plantejat imposar una sèrie de restriccions sobre les aplicacions i la comercialització d'aquests productes, seguint el reglament (CEE) n°76/769 del Consell. D'acord amb aquest es prohibirà l'ús d'aquests productes en (9):

- Detergents i productes de neteja domèstics
- Productes d'higiene personal
- Neteja industrial
- Agents de la indústria tèxtil
- Agents de la indústria del cuir o pell
- Indústria metal·lúrgica
- Indústria del paper
- Veterinària

1.3. Degradació dels NPEO durant el tractament d'aigües residuals

Els mecanismes de biodegradació dels NPEOs durant els tractaments de depuració i més tard quan s'aboquen al medi ambient han estat objecte de debat a la bibliografia (10,11). Tot i així, actualment es considera generalment acceptat que els processos de degradació aeròbia resulten en un escurçament i/o oxidació de la cadena etoxilada via carboxilació del grup alcohol terminal, produint nonilfenols etoxicarboxilats (NPECs) (12) i NPEOs de cadena etoxilada curta (13), principalment NPEO2 (14), així com una oxidació de la cadena hidrocarbonada ramificada (15).

Per altre banda, la degradació anaeròbia dels NPEOs pot donar lloc a compostos de cadena etoxilada més curta amb la possible formació i acumulació de NP (16).

1.4. Presència dels nonilfenols en fangs de depuradora

Els NPEOs, utilitzats bàsicament en forma de solució aquosa, arriben al medi ambient a través de les aigües residuals (12). A les plantes depuradores durant el procés de tractament, els NPEOs es poden degradar generant productes més tòxics, estrogènics i lipofílics com el NP, el NPEO1 i el NPEO2. Aquests productes de degradació presenten una baixa solubilitat en aigua i per tant tendeixen a quedar adsorbits i concentrats en els fangs (13). Altres compostos orgànics d'origen industrial i que s'han degradat durant el procés de tractament i també s'han absorbit en el fang de depuradora poden ser derivats del petroli, com olis i greixos minerals, tensioactius, plastificants, pintures, pigments, etc..

Existeixen evidències que l'addició de fangs de depuradora a sòls agrícoles augmenta les concentracions en sòl de DEHP, NP, LAS, PAH, tot i que també s'ha demostrat que les concentracions es redueixen de manera important amb el temps (4,5). En el cas del NP s'ha demostrat (16,17) que bona part del NP que s'aplica al sòl desapareix en un període entre 50-100 dies, quan la concentració de NP addicionada és de 50mg/kg. Aquesta disminució es dona tant en condicions aeròbies o anaeròbies i tant si l'activitat microbiana està inhibida o no (16,17).

1.5. Destí al medi ambient dels NP

S'estima que un 10% del NP alliberat en el medi ambient s'acumula en el sòl. Tot i que existeixen pocs estudis sobre nivells de NP en sòls contaminats, les dades disponibles indiquen valors per sota dels límits de detecció actuals.

Una de les principals fonts de NP en els sòls agrícoles és l'aplicació de fangs de depuradora, ja que, com ja s'ha dit, poden contenir aquesta substància en elevades quantitats podent augmentar la concentració en els valors de 0,3-4,7 mg/kg segons la dosi i els sòls receptors (18).

En el cas de la present Tesi Doctoral, per tal d'estudiar el comportament del nonilfenol, es realitza una addició voluntària de NP a dos nivells. En concret, s'ha aplicat una dosi alta de 50mg/kg i una dosi baixa de 25mg/kg com s'explica seguidament en el punt 2. Aquests nivells d'addició són més elevats dels que aportaria un fang contaminat al sòl. Els objectius de l'addició a aquests dos nivells en sòls són els que s'exposen a continuació:

- Permetran realitzar un estudi sobre l'efecte del NP en organismes del sòl. Així doncs, la verificació de l'ecotoxicitat del NP permetrà disposar de criteris objectius per a discutir

la validesa del límit de 50mg/kg proposat en l'esborrany de treball de la nova directiva sobre fangs. Aquest estudi s'ha realitzat al CREAM-UAB.

- Es podrà fer un estudi sobre les possibles pèrdues del NP per lixiviació per estimar el risc de transferència d'aquests contaminants a les aigües de drenatge i alhora estudiar l'efecte en organismes aquàtics. Aquest lixiviats s'obtenen dels sòls on s'ha addicionat el NP. Aquesta part s'ha realitzat a l'IQS.

2. Mètodes d'anàlisi de nonilfenols

Tot i la toxicitat elevada d'aquests compostos, en la majoria de països no existeix una legislació respecte a les concentracions màximes permises. Únicament el *Working Document on Sludge 3rdDraft of the European Union* aconsella una concentració límit de 50mg/kg de NP i NPEOx en fangs de depuradora per ús agrícola (*Working Document on Sludge, 2000*), com ja s'ha dit anteriorment. Alguns països com Suïssa han seguit aquestes recomanacions i han establert la concentració màxima permesa en fangs agrícoles en 50mg/kg. En altres països com Dinamarca la restricció és major, sent 10mg/kg el màxim permès. És d'esperar que en un futur pròxim les concentracions trobades d'aquests compostos en el medi ambient disminueixin ja que, des de l'any 2003 existeixen restriccions en l'ús de NP i NPEOx (Directiva 2003/53/EC).

Tenint en compte la falta de legislació, i degut a les evidències en quan a la toxicitat, s'han desenvolupat diferents mètodes per a la determinació de nonilfenol i derivats etoxilats en diferents matrius medi ambientals.

A continuació, es descriuen els diferents tractaments de mostra, trobats en bibliografia, que s'han desenvolupat i les diferents tècniques analítiques utilitzades per a la seva determinació.

2.1. Etapa de preparació de mostra

En aquest apartat es descriuen les diferents tècniques de preparació de mostra depenent si la mostra inicial es tracta d'una mostra sòlida, líquida o gasosa.

2.1.1. Mostra líquida

Els primers treballs publicats trobat en bibliografia dedicats a l'anàlisi de NP i derivats etoxilats en mostres aquoses realitzen una destil·lació. Aquesta s'ha aplicat amb èxit a mostres d'aigües residuals i mostres d'aigües de rius (19,20).

Per aconseguir recuperacions quantitatives, diferents autors han fet una variant de la mètrica on es bombolleja nitrogen en la mostra aquosa/dissolvent extractant per afavorir el repartiment dels NPEOx de cadena llarga a la fase orgànica. Aquest procediment s'ha utilitzat amb èxit en aigües residuals (21-23). En aquests últims treballs s'ha utilitzat un volum d'aproximadament 1 litre de mostra i volums d'acetat d'etil entre 60 i 100mL i s'han fet varies extraccions successives.

En un treball posterior, del 2003, els autors realitzen 2 extraccions líquid-líquid successives de 200mL de cada mostra a pH 2 utilitzant una mescla diclorometà/alcohol isopropílic (90/10) (24).

Actualment, l'extracció líquid-líquid per a l'anàlisi de nonilfenols en mostres aquoses és la més utilitzada, i amb la que s'obtenen millors recuperacions. S'utilitza com a dissolvent extractant diclorometà. També s'ha utilitzat acetat d'etil per a la determinació del nonilfenol en mostres aquoses (25).

Tanmateix, l'extracció en fase sòlida apareix com a alternativa a les tècniques descrites anteriorment i presenta com avantatge principal front a l'extracció líquid-líquid l'aparició d'emulsions. En els últims anys s'han utilitzat diferents fases sòlides per a l'extracció del nonilfenol i NPEOx en mostres aquoses. Un dels primers absorbents utilitzats, i que encara s'utilitza per a l'extracció de NPEOx i els isòmers del nonilfenol, és la resina Amberlita XAD. Aquesta resina té una gran capacitat de retenció per analits apolars i moderadament polars en mostres aquoses, obtenint recuperacions superiors al 80% (26). El problema que presenten aquest tipus d'absorbents és la necessitat d'una purificació exhaustiva abans d'utilitzar-lo. Generalment, per eluir després els analits sol ser necessari realitzar un Soxhlet, fet que fa que el temps d'anàlisi sigui llarg. Aquest mateix problema es presenta amb els absorbents de carbó actiu també utilitzats per a l'extracció de NPEOx. Per contra, com avantatge es poden utilitzar grans volums de mostra.

Com alternativa, el carboni grafitat presenta una major eficàcia i aquesta és una de les fases sòlides més utilitzades per a l'extracció de nonilfenol i els seus derivats etoxilats tant de cadena curta com de cadena llarga en mostres d'aigua de riu i aigües residuals. Obtenint recuperacions entre el 80 i el 107% depenent del comportament de la mostra analitzada (27-29).

Possiblement, i degut a la seva capacitat per retenir tant analits polars com moderadament apolars, la fase sòlida més utilitzada per a l'extracció i concentració de NP i NPEOx en mostres aquoses és la C₁₈ (30). Existeixen bastants estudis en aigües de diferents procedència on s'obtenen bones recuperacions tant per el NP com pel NPEOx utilitzant aquest absorbent (30,31). Un altre absorbent pel NP i altres derivats d'aquesta família més apolars és la sílice, obtenint recuperacions fins un 80% (32).

Un altre tipus d'adsorbent que també s'ha utilitzat amb èxit són el cartutxos Waters Oasis HLB, descrits en el capítol IV de la present Tesi Doctoral. Aquests cartutxos s'han utilitzat en l'extracció de nonilfenol en aigües de riu amb recuperacions superiors al 75% (33,34).

2.1.2. Mostra sòlida

Els primers treballs publicats sobre l'anàlisi de NP i derivats en mostres sòlides, igual que en el cas anterior, es basen en processos de destil·lació (35,36), on es suspenen alíquotes de 10 a 50g de mostra en 1,5 litres d'aigua i l'extracció per destil·lació es fa en corrent de vapor d'aigua durant 3 hores, i després es realitza l'extracció líquid-líquid, obtenint bones recuperacions del NP.

La majoria dels mètodes existents per a la determinació de NP i els seus derivats en mostres sòlides utilitzen les tècniques d'extracció sòlid-líquid que s'han descrit en l'apartat 2.1.1. Un

altre procediment utilitzat és l'agitació simple amb diclorometà per a l'anàlisi de NP en sòls sotmesos a diferents tractaments de fertilització (37).

L'extracció Soxhlet s'ha utilitzat per diversos autors per a l'extracció del NP i els derivats etoxilats en fangs i sediments (38,39). Com medis extractants s'han utilitzat diferents dissolvents purs com metanol, diclorometà o mesclades de dissolvents com hexà/acetona o hexà/propanol. Les recuperacions obtingudes han sigut bones per a totes les mostres i compostos d'estudi. Únicament pels derivats etoxilats de cadena llarga amb més de 16 grups etoxi i en algun cas aïllat pel 4-n-nonilfenol (40) s'han obtingut recuperacions inferiors al 65%.

Cal tenir en compte, que l'extracció Soxhlet requereix bastant temps i un consum elevat de dissolvent. Per tant, com alternativa s'han proposat diversos mètodes utilitzant ultrasons i microones per afavorir l'extracció. De fet, aquestes dues alternatives són les més utilitzades per a l'anàlisi de nonilfenol i derivats en mostres sòlides medi ambientals.

L'extracció amb microones s'ha demostrat que és més eficient en alguns casos que l'extracció amb ultrasons. Com a medis extractants s'han utilitzat diclorometà o metanol, o mesclades de dissolvents tipus hexà/acetona o hexà/propanol. En sòls i sediments les recuperacions que s'han obtingut per a l'anàlisi de NP i derivats mono i dietoxilat han sigut quantitatives i de bona reproducibilitat (41,42).

En el cas de les mostres de fangs, les recuperacions obtingudes pel NP i els derivats etoxilats de cadena curta s'han vist incrementades notablement (91% i 62% respectivament), respecte l'extracció realitzada amb ultrasons (38).

2.1.3. Mostra gasosa

L'extracció i determinació del NP, NPEO₁ i NPEO₂ procedents d'aire s'ha realitzat amb resines d'estirè-divinilbenzè en cartutxos entre dues capes d'escuma de poliuretà. L'extracció dels analits de les resines es realitza per agitació simple durant 10 minuts amb tres fraccions de

50mL de diclorometà i les extraccions obtingudes es concentren a 1mL amb nitrogen per la posterior derivatització amb N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) a 60°C durant 60 minuts. La determinació final es realitza per GC-MS (43).

2.2. Mètodes cromatogràfics

2.2.1. Cromatografia líquida (HPLC)

La cromatografia líquida ha sigut la tècnica més utilitzada per a la separació de nonilfenols i els seus derivats etoxilats, i especialment pels derivats de cadena llarga que són poc volàtils. Degut a l'ampli rang de polaritat d'aquests compostos, és freqüent l'ús de diferents tipus de columnes i de fases estacionàries. A continuació es descriuen les diferents fases estacionàries.

- Sílice

Les columnes de sílice són especialment útils per a la separació dels nonilfenols polietoxilats. L'ordre d'elució depèn del número de unitats etoxi que presenten, és a dir, que el temps de retenció s'incrementa a l'augmentar la longitud de la cadena etoxi. També s'utilitzen columnes de sílice modificada amb grups amino i grups ciano com a columnes de fase normal.

Generalment, la fase mòbil utilitzada per a la separació d'aquests compostos són gradients amb hexà, propanol i aigua. La separació del NP i dels derivats etoxilats utilitzant aquest tipus de columna no s'ha aconseguit ja que s'elueix juntament amb el nonilfenol monoetoxilat (44).

- C₁

Tot i que les columnes C₁ són considerades com a fase inversa, les seves propietats en quan hidrofobicitat són més semblants a les columnes de fase normal que a una C₁₈. Aquestes columnes també s'han utilitzat per a la separació de nonilfenols etoxilats de cadena llarga, obtenint una bona resolució (45).

- C₈

Aquesta fase estacionària també es considera com a fase inversa igual que les fases estacionàries de C₁₈. És possible el seu ús per a la separació del NP i els seus derivats etoxilats de cadena llarga. Tot i que pels derivats etoxilats de cadena llarga, encara que presenten una certa separació, no és possible la identificació dels oligòmers, ja que tots s'elueixen en un mateix pic.

- C₁₈

És la fase estacionària reversa per excel·lència. La majoria de les separacions realitzades per HPLC per molts compostos s'utilitzen aquest tipus de columnes. És útil per a la separació del NP i dels derivats etoxilats de cadena curta (38), però els NPEOx de cadena llarga, generalment s'elueixen en un sol pic, sense poder identificar-los per separat. Aquest fet és degut a què en augmentar el número de grups etoxi, las diferents polaritats disminueixen sent impossible la separació dels derivats de cadena llarga utilitzant aquest tipus de columna.

Els detectors més utilitzats per a la determinació d'aquests compostos són fonamentalment els detectors d'ultraviolat i de fluorescència, tot i que, actualment, ho és l'espectròmetre de masses degut a la seva elevada selectivitat.

Entre els detectors de fluorescència i UV o DAD, el primer és el de major selectivitat ja que es tracta de compostos aromàtics, per tant, són els més utilitzats. Les longituds d'ona utilitzades varies segons l'interès en l'anàlisi. En l'ús del detector de fluorescència s'utilitzen λ exc:222nm i λ em: 305nm (38), mentres que per a detectors d'ultraviolat es fixa la λ en 226nm (39-45).

Però com ja s'ha dir anteriorment, l'espectròmetre de masses és l'alternativa més selectiva, per tant la majoria d'articles publicats recentment, utilitzen aquesta tècnica i també HPLC-MS/MS per a la determinació del NP i els seus derivats etoxilats tant per a la cromatografia líquida com en cromatografia de gasos (46-49).

2.2.2. Cromatografia de gasos (GC)

La cromatografia de gasos s'ha utilitzat per a la separació de NP i els seus derivats etoxilats de fins a 6 unitats de grups etoxi. Els derivats etoxilats de cadena més llarga, no presenten la volatilitat adequada per a la identificació per cromatografia de gasos. Al contrari que en la cromatografia líquida on només es detecta un sol pic pel NP, en la cromatografia de gasos i degut a la seva alta resolució, es detecten diversos pics corresponents als diferents isòmers. Normalment, per a la identificació del NP i els seus derivats es realitza per HRGC-MS o HRGC-MS/MS i sense necessitat de realitzar una derivatització. Tot i així, es pot dur a terme la

derivatització utilitzant mescles de MSTFA/TMIS en diferents proporcions, en funció del tipus de matriu a estudiar (50).

Un altre agent derivatitzant utilitzat per a la determinació del NP, NPEO1 i NPEO2 mitjançant HRGC-MS és una mescla de N,Obis(trimetilsilil)trifluoracetamida i piridina utilitzada també per a la determinació de NP en aigües i sediments per GC-MS/MS (49).

En la present Tesis Doctoral s'utilitza per a la identificació i quantificació del nonilfenol HRGC-MS sense realitzar cap tipus de derivatització.

2.2.3. Electroforesi capil·lar

L'electroforesi capil·lar és una tècnica separativa que es basa en les diferents velocitats que adquireixen les molècules amb càrrega elèctrica sota l'acció d'un camp elèctric, és a dir, la seva mobilitat electroforètica dins d'un tub capil·lar. També es pot descriure com una tècnica analítica que combina el poder de separació de l'electroforesi convencional amb la cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) (51). Algunes de les seves principals característiques són:

1. L'elevada rapidesa en l'anàlisi, amb temps de separació inferiors a 30 minuts. Fins i tot és possible obtenir bones separacions en pocs segons, en alguns casos.
2. S'obtenen eficàcies elevades, normalment en l'interval de 10^5 - 10^6 plats teòrics per metre de columna, depenent de l'analit i de las condicions de separació.
3. Utilitza volums de mostra molt petits, solen ser de l'ordre de nanolitres.
4. Té una gran varietat d'aplicacions, que permet l'ús en la separació des de ions fins a cèl·lules i partícules.

Aquesta tècnica és una alternativa a les tècniques descrites anteriorment ja que minimitza el consum de dissolvents i s'aconsegueix una alta eficàcia i selectivitat en les separacions.

Hi ha estudis publicats que aconseguixen una bona separació del NP i els seus derivats etoxilats de cadena curta utilitzant electroforesi capil·lar no aquosa (51).

2.3. Mètodes no cromatogràfics

Anàlisi immunosorbent amb enzim lligat (ELISA)

Existeixen alguns treballs que han utilitzat assajos de immunosorbent, ELISA, per a la determinació de NP, i els resultats són comparables als obtinguts mitjançant HPLC-MS (52). Des de el punt de vista pràctic, l'ús de tècniques ELISA amb anticossos policlonals permet

detectar quantitats totals d'alquilfenols (53) per tant, és més útil a efectes de control medi ambiental que els ELISA amb anticossos monoclonals, que s'utilitzen per a la determinació d'espècies lineals dels alquilfenols (54).

Aquesta tècnica està descrita amb més detall al capítol IV de la present Tesi Doctoral.

2.4. Antecedents en el grup dels mètodes d'anàlisi de nonilfenols

Com ja s'ha comentat en la introducció de la present Tesi Doctoral, un dels objectius és estudiar la degradació dels nonilfenols en sòls, i comparar l'evolució del nonilfenol en dos tipus de substrat; sòl amb compost i sòl amb torba. Per això és necessari desenvolupar una metodologia d'extracció del nonilfenols en mostres de sòl per a la seva posterior identificació. S'ha trobat abundant bibliografia sobre l'anàlisi de nonilfenols, i tenint en compte l'experiència del nostre grup en l'anàlisi de nonilfenols en fangs de depuradora s'ha decidit utilitzar alguna de les metodologies desenvolupades anteriorment en el nostre equip.

A continuació es presenta l'experiència del grup desenvolupada en els últims anys en l'anàlisi de nonilfenols en fangs de depuradora. Els treballs més recents, anteriors a la present Tesi Doctoral, que es van desenvolupar a la secció són del 2005. Aquests mètodes són els que es descriuen a continuació com a mètode A1 i mètode A2:

- **Mètode A1:** Determinació de NP, NPEO1 i NPEO2 en fangs de depuradora i productes derivats (4).

Bagó utilitza la següent metodologia d'extracció dels analits: es pesa 1g de fang sec i es realitza una extracció a reflux amb 50mL de metanol durant 4 hores. A continuació, es separa la fase orgànica i es renta el residu amb dos volums més de 10mL de metanol. El dissolvent orgànic s'elimina mitjançant evaporació a pressió reduïda en un rotavapor fins a un volum de 2-3 mL. La solució obtinguda es porta a sequedat amb una corrent de nitrogen i l'ajut d'un bany d'aigua calenta. L'extracte final es reconstitueix amb 1mL de metanol, s'agita, es passa per un filtre de 0,45µm i s'injecta al cromatògraf.

En aquest treball es va estudiar els resultats d'injectar les mostres en HPLC-MS i HRGC-MS, obtenint millors resultats per HRGC-MS.

- **Mètode A2:** Estudi dels principals contaminants orgànics del fang i residus relacionats (5).

Mejía realitza una extracció diferent a la descrita anteriorment ja que l'extracció Soxhlet requereix un temps llarg. Per això, es planteja realitzar l'extracció per ultrasons. Així doncs, en aquest cas l'extracció es realitza de següent manera: es pesa 1g de mostra seca de fang en un

Erlemmeyer i s'afegeixen 50mL de metanol. Es deixa al ultrasons durant 2 hores, posteriorment, es passa l'extracte amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur a un tub de centrifuga i es centrifuga durant 5 minuts. L'extracte obtingut es passa a un matràs de 100mL on es realitzen 2 rentats del residu amb volums de 10 mL de metanol. Finalment, s'enrasa a 100mL l'extracte amb metanol i s'injecta al HRGC-MS.

Les condicions cromatogràfiques desenvolupades per a la quantificació del NP en mostres de sòls mitjançant HRGC-MS en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*) són les que es mostren a continuació:

- Equip: GC 800 TOP Series Finnigan
- Espectròmetre de masses: Voyager System Finnigan
- Columna: DB-5MS 5% fenil 95% metilpolisiloxano (30m, 0,25mm, 0,25µm)
- Temperatura inicial: 100°C
- Temps inicial: 2 minuts
- Rampa de temperatura: 20°C/min
- Temperatura final: 280°C
- Temps final: 10 minuts
- Temperatura injector: 250°C mode *splitter* 10:1 flux: 10 mL/min
- Volum injecció: 2µL

Condicions de l'espectròmetre de masses:

- Mode adquisició: SIM
- Masses (m/z): 107, 135, 179 i 223
- Mode ionització: E.I.
- Temperatura interfase: 150°C
- Temperatura de la font de ions: 230°C
- Solvent Delay: 5 minuts

Tenint en compte aquests dos mètodes desenvolupats en la secció, en la present Tesi Doctoral s'ha decidit realitzar una extracció per ultrasons i posterior injecció al HRGC-MS utilitzant les condicions cromatogràfiques descrites anteriorment. Tot i això, és realitzarà una validació del nou mètode desenvolupat ja que aquests dos mètodes descrits són per ser aplicats en mostres de fangs i en el present treball es pretén analitzar mostres de sòls.

3. Part experimental

En aquest capítol, s'estudia l'evolució de la degradació del nonilfenol addicionat a un sòl, mescles de sòl amb compost i mescles de sòl amb torba, quantificant el NP després de diferents temps d'incubació d'aquestes mostres.

Les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba (es descriuen en l'apartat 3.3.) es preparen i s'incuben a l'hivernacle del CREA. En canvi, les mostres de sòl i mescles de sòl amb compost (que es descriuen en l'apartat 3.4.) es preparen i s'incuben a l'IQS.

A continuació es descriu el sòl, la torba i el compost utilitzat per fer les mescles de les quals s'estudia l'evolució del NP.

a) Sòl de referència

El sòl utilitzat per a la realització de l'experiment és sòl extret dels camps experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona que correspon a *Typic Calcixercept* (55). Per a l'extracció d'aquest sòl s'han separat els 20 cm superficials i s'ha extret el sòl fins a uns 45 cm de profunditat. A mesura que s'extreu el sòl, s'ha anat passant per un sedàs de 5 mm fins obtenir una pila d'uns 800 kg de sòl humit homogeneïtzat. La pila del sòl s'ha homogeneïtzat amb pala i s'ha deixat reposar 48 hores. Posteriorment, s'ha determinat la humitat del sòl, que és d'un 12%. S'ha analitzat aquest sòl i els nivells de metalls pesats que conté són els que es mostren en la taula 3.1.

Metall	mg/kg
Cr	28
Ni	18
Pb	23
Cu	25
Zn	75
Hg	52
Cd	<0,1

Taula 3.1. Nivell de metalls pesats en el sòl de referència.

Tot i que la concentració dels metalls pesats sigui elevada respecte a la torba (veure taula 3.1. i 3.2), aquest sòl té les característiques adequades en quan a la humitat i tipus de sòl per a realitzar l'experiment.

b) Torba

El que es pretén amb l'ús de la torba, és buscar un material orgànic que sigui semblant a un compost pel que fa al seu contingut de matèria orgànica però que, amb tota seguretat, estigui lliure de contaminants, ja que aquesta mateixa matriu s'utilitza també pels estudis d'ecotoxicitat en el mateix projecte del "Plan Nacional" que inclou la present Tesi Doctoral.

Per això, s'utilitza torba eutròfica, ja que és un material orgànic natural que ha patit una transformació anaeròbica intensa al llarg dels anys i que conté una matriu mineral llimosa que és semblant a la del fang de depuradora. S'ha decidit extreure la torba del Delta de l'Ebre, en concret, d'una torbera coneguda com "Ullals de Baltasar" dins del municipi d'Ampostà (Tarragona). Aquesta torbera eutròfica està classificada com *Hemic Haplosaprist* (58). S'ha analitzat aquesta torba i s'ha comprovat que té unes característiques semblants al compost però amb un nivell inferior de metalls pesants respecte al compost, com era d'esperar.

Per a l'extracció de la torba, s'ha retirat la primera capa dels primers 20 cm. A continuació s'ha excavat amb una pala fins a uns 80 cm de profunditat, col·locant-la en caixes per poder-la transportar fins al laboratori del CREAF.

En total s'han extret 80 kg de torba. Aquesta s'ha estès sobre papers de filtre durant 10 dies per reduir l'elevat contingut d'humitat inicial. A mesura que s'ha assecat la torba s'ha passat per un sedàs de 5 mm. Quan la torba s'ha assecat del tot, s'ha passat per un altre sedàs de 2 mm i s'ha posat a l'estufa a 60°C durant 24 hores. La quantitat de torba assecada un cop passada pel sedàs és de 25 kg.

Aquesta torba també s'ha analitzat i té les característiques adequades per a l'experiment. El resultat de la concentració de metalls pesats que conté és el que es mostra en la taula 3.2. Com es pot veure aquests nivells de metalls pesats són més baixos que en cas del sòl.

Metall	mg/kg
Cr	14
Ni	7
Pb	7
Cu	16
Zn	42
Hg	0,02
Cd	0,2

Taula 3.2. Nivell de metalls pesats en la torba.

Les dades sobre l'anàlisi de matèria orgànica i la caracterització de la torba es presenta més endavant en la taula 3.3.

c) Compost

El compost que s'ha utilitzat per a realitzar l'estudi en les mescles de sòl és un compost procedent de la planta depuradora de Blanes. Seguidament es descriu com es produeix aquest compost.

La depuradora de Blanes és de tipus biològica. Una vegada s'ha separat el fang de les aigües depurades, aquest entra en la línia de fangs (el funcionament d'aquesta línia està descrita en el capítol I de la present Tesi Doctoral) on es sotmet primer a un procés aeròbic, i després a un procés anaeròbic. Aquest procés té lloc dins un digestor a una temperatura constant de 35,5°C durant un període mínim de 25 dies. Un cop es té el fang resultant, es centrifuga i s'obté el fang deshidratat. Aquest fang l'aprofiten els pagesos dels voltants de la planta depuradora, utilitzant-lo com adob directament o es sotmet a un procés de compostatge en la pròpia planta depuradora.

En aquesta planta el compost es fa en túnel tancat. Un cop el fang deshidratat s'ha barrejat amb estelles de pi, es diposita en túnels especials. Les estelles de pi s'utilitzen com agent estructurant (1:4,5v/v).

La mescla a dins del túnel s'aireja a través d'orificis a la superfície inferior per on circula aire, fins passats 15 dies. Posteriorment, es separen les estelles entre 20 i 10 mm, de les quals es recuperen al voltant d'un 90% que es reutilitzaran en altres processos de compostatge. Es passa el compost per un sedàs de 1 cm. Finalment, es trasllada el compost a l'àrea de maduració on estarà entre 1 i 3 mesos.

En la present Tesi Doctoral, s'ha treballat amb composts procedents d'aquesta planta depuradora obtinguts l'any 2002 i 2007 que es mostren en les figures 3.1 i 3.2 respectivament.



Figura 3.1. Fotografia del compost de la depuradora de Blanes obtingut l'any 2002



Figura 3.2. Fotografia del compost de la depuradora de Blanes obtingut l'any 2007

Com es pot veure en les figures 3.1. i 3.2., el compost de Blanes obtingut l'any 2002 té més restes d'estelles de pi que el compost obtingut l'any 2007.

d) Comparació entre compost i torba

Com ja s'ha dit, l'objectiu d'aquest capítol és estudiar l'evolució del NP addicionat en sòl, mesclades de sòl amb torba i mesclades de sòl amb compost. A continuació es mostra la taula 3.3.

on es compara la caracterització del compost i la torba i en la taula 3.4. es compara la concentració dels metalls pesants entre compost i torba.

Paràmetre	Unitat	Torba	Compost
pH (aigua, 1:5)		7,8	7,1
Matèria Orgànica	%sms	25	53,6
N total (Kjeldahl)	%sms	0,83	2,68
N-NH ₃	%sms	0,09	1,31
N-NO ₃	mg/kg	230	410
C/N		14,3	10
P	%sms	0,12	3,42
N no hidrolitzable	%sms	0,57	1,73

Taula 3.3. Caracterització del compost i la torba

Metall	Torba (mg/kg)	Compost (mg/kg)
Cr	14	60
Ni	7	21
Pb	7	38
Cu	16	276
Zn	42	492
Hg	0,02	1,08
Cd	0,2	0,9

Taula 3.4. Concentració de metalls del compost i la torba

Com es pot veure en les taules 3.3. i 3.4. la torba seleccionada i el compost són substàncies organominerals, tot i que la torba té una matèria orgànica més humificada.

L'objectiu de barrejar sòl amb compost i sòl amb torba, és per simular l'efecte de matriu orgànica que pot interaccionar amb el NP, incrementant un 1% la matèria orgànica del sòl. En el cas del compost, aquest conté un 53,6% de matèria orgànica i en el cas de la torba, aquesta conté un 25% de matèria orgànica, com es pot veure en la taula 3.3. Això obligarà a afegir quantitats diferents de les dues substàncies per aportar la mateixa quantitat de matèria orgànica.

3.1. Validació del mètode analític per a la determinació de NP en mostres de sòls

En el següent apartat, s'avalua la linealitat, repetibilitat, relació senyal soroll, límit de detecció i quantificació del mètode analític per a la quantificació del NP. Aquesta validació es realitza utilitzant cromatografia de gasos acoblat a l'espectròmetre de masses (HRGC-MS).

3.1.1.- Preparació de patrons

En primer lloc es preparen les solucions mare de NP d'una concentració de 50mg/L i un altre solució mare de patró intern d'una concentració de 25mg/L, totes dues solucions en diclorometà.

S'han decidit preparar aquestes concentracions ja que les mostres en estudi contenen com a màxim 50mg/kg de NP que, donat el procediment d'extracció que s'aplica, correspon a 25mg/L de NP.

En el cas del patró intern, la concentració que es mantindrà constant en totes les dilucions del patrons és de 12,5mg/L, que és la mateixa concentració que s'addiciona en les mostres de sòls.

Així doncs, les solucions patró de treball són de les concentracions següents: 25, 10, 5, 0,5 i 0,05mg/L de NP en DCM. A tots aquests patrons s'han afegit 5mL d'una dissolució de 25mg/L de patró intern en 10mL de DCM.

- Patró de nonilfenol: Aquest patró subministrat per Aldrich, és una barreja de diferents isòmers d'anell i cadena on l'isòmer majoritari és el 4-n-nonilfenol (95%). La figura 3.1.1.1. mostra l'estructura química del 4-n-nonilfenol. Aquesta mescla dels diferents isòmers es veu reflectida en el cromatograma del patró de NP. En la figura 3.1.2.1. es detecta un grup de senyals a un temps de retenció aproximat a 9,5 minuts.

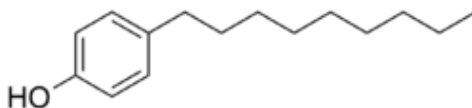


Figura 3.1.1.1. Estructura molecular del 4-n-nonilfenol

- Patró intern: S'ha utilitzat com a patró intern el 4-n-heptilfenol (98%), ja que és el producte comercial més semblant al 4-n-nonilfenol (subministrat per Cymitquímica). La seva estructura es presenta a la figura 3.1.1.2.

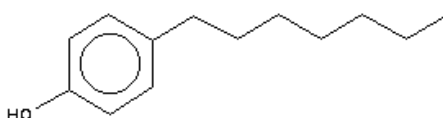


Figura 3.1.1.2. Estructura molecular del 4-n-heptilfenol

3.1.2.- Condicions cromatogràfiques

Les condicions cromatogràfiques desenvolupades per a la quantificació del NP en mostres de sòls mitjançant HRGC-MS en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*) són les que es mostren a continuació:

- Equip: Agilent Technologies 6890 N
- Espectròmetre de masses: Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
- Columna: Agilent Technologies - 5MS 5% fenil 95% metilpolisiloxano (30m, 0,25mm, 0,25µm)
- Temperatura de forn: 100°C (1 minut) rampa a 20°C/min fins 280°C (10 minuts)
- Temps cromatograma: 21 minuts
- Temperatura injector: 250°C mode *splitter* 10:1 flux: 10 mL/min
- Volum injecció: 2µL

Condicions de l'espectròmetre de masses:

- Mode adquisició: SIM
- Masses (m/z): 135 i 192
- Mode ionització: E.I.
- Temperatura interfase: 150°C
- Temperatura de la font de ions: 230°C
- Solvent Delay: 5 minuts

A continuació, en la figura 3.1.2.1 es mostra un cromatograma d'un patró de 0,05mg/L de NP i de 12,5mg/L de patró intern injectat en les condicions descrites anteriorment. En aquest cromatograma s'han extret els ions 135 corresponent al NP i el 192 corresponent al patró intern. Com es pot observar en la figura 3.1.2.1. en l'extracció del ió 135 no s'obté un sol pic sinó que es poden observar els pics corresponents als isòmers del nonilfenols com s'ha comentat anteriorment.

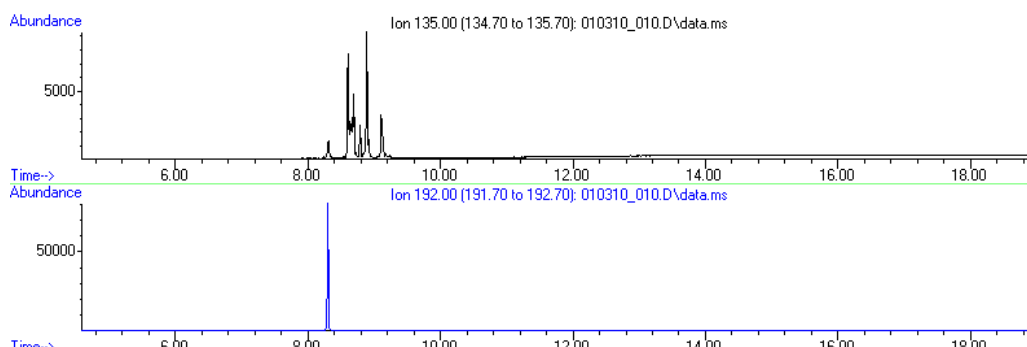
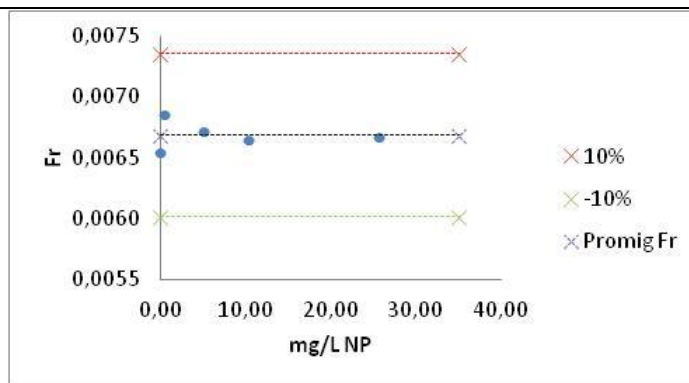


Figura 3.1.2.1. Cromatograma en mode SIM d'un patró de NP i patró intern

3.1.3.- Paràmetres de validació

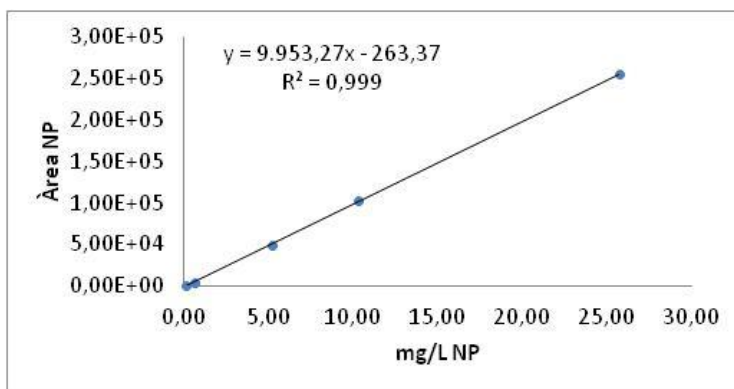
a) Linealitat

El marge de linealitat es defineix com aquell interval en el que la sensibilitat, és a dir, la relació entre el senyal obtingut i la concentració, es manté constant. S'analitzen els patrons descrits anteriorment de diferents concentracions i es representa el factor de resposta vs concentració ($Fr = \text{Conc NP} \cdot \text{Àrea PI} / \text{Conc. PI} \cdot \text{Àrea NP}$). El marge de linealitat s'expressa com el rang de concentració amb una variabilitat del $\pm 10\%$ del factor de resposta. Cal destacar que el valor del factor de resposta més allunyat respecte el promig és d'un 2%. El gràfic 3.1.3.1. mostra els resultats obtinguts en l'estudi de linealitat.



Gràfic 3.1.3.1 Factors de resposta per a les diferents concentracions dels patrons i gràfic dels factors de resposta (Fr) vs la concentració.

Seguidament, el gràfic 3.1.3.2 mostra la linealitat en el rang de concentracions estudiat.



Gràfic 3.1.3.2. Gràfic de concentració de NP vs àrea del NP.

Així doncs, es pot concloure que el comportament del NP és lineal dins del marge estudiat, és a dir entre 25mg/L i 0,05 mg/L que en mostra correspon a 50mg/kg i 0,1mg/kg admetent una variabilitat d'un $\pm 10\%$. Aquest rang de concentració és el marge d'interès, ja que les mostres d'estudi estan dins d'aquest rang de concentració.

b) Límit de quantificació (LQ) i límit de detecció (LD)

El LQ es defineix com la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de determinar en el marge de treball. Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a deu vegades l'alçada del soroll. El LD es defineix com la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de detectar, és a dir, que proporciona un senyal diferenciable del soroll. Es

calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a tres vegades del soroll.

El càlcul del LD i LQ s'ha fet amb el cromatograma d'un patró de 0,05mg/L de NP que és el que es mostra en la figura 3.1.2.1. Tenint en compte que la concentració d'aquest patró està allunyat del LD, s'ha fet una estimació del LD i LQ a partir del càlcul de $S/N=1133$.

En la taula 3.1.3.1. es mostra els resultats estimats pel límit de quantificació i de detecció.

Paràmetre	Valor ($\mu\text{g/L}$)
LQ	0,4
LD	0,1

Taula 3.1.3.1. Valors de LD i LQ pel mètode d'anàlisi de NP mitjançant HRGC-MS

En la taula 3.1.3.2. es mostren el valors de LQ i LD corresponents en mostra.

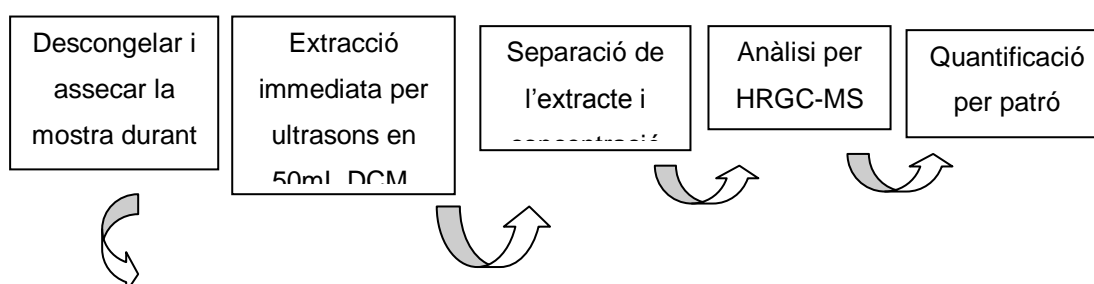
Paràmetre	Valor ($\mu\text{g/kg}$)
LQ	0,8
LD	0,2

Taula 3.1.3.2. Valors de LD i LQ pel mètode d'anàlisi de NP mitjançant HRGC-MS

c) Recuperació

Per el càlcul de la recuperació, s'aplica el mètode d'addicions de patró. Les concentracions addicionades són de 25mg/kg de NP, i el NP s'ha quantificat per patró intern. S'ha decidit addicionar a aquest nivell ja que és la mateixa concentració que tenen les mostres a estudiar de nivell baix (veure apartat 3.2).

Per a l'estudi de la recuperació del NP, s'han preparat quatre mostres de sòl amb torba on s'ha addicionat NP al nivell de baix. Les etapes a seguir per a l'extracció del NP són les que es mostren a l'esquema 3.1.3.1.





Esquema 3.1.3.1: Mètode d'anàlisi de NP en les mostres de sòl amb torba adicionades amb NP.

DCM: diclorometà

La preparació de la mostra de sòl amb torba on s'ha addicionat el NP i posterior extracció és el que es descriu a continuació: un cop descongelades les mostres, es pesen 5g de mostra en un matràs Erlenmeyer de 250 mL de capacitat. S'afegeixen 5 mL d'una dissolució de 25mg/L en DCM de patró intern 4-n-heptilfenol. S'addicionen 5mL d'una dissolució de 25mg/L en DCM del patró de NP. Immediatament després de l'addició es fan 2 extraccions per ultrasons amb 50 mL de diclorometà (DCM) durant 30 minuts. Es deixa decantar i es transvasa l'extracte amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur a un matràs en forma de cor de 100 mL. Es realitzen 2 rentats del residu amb volums de 5 mL de DCM per poder recollir tot l'extracte. Es concentra l'extracte al rotavapor a una temperatura de bany de 40°C fins a un pes

equivalent a 10 mL de DCM. Aquesta dissolució és la que s'injecta al HRGC-MS. Totes les mostres s'han preparat per duplicat i s'han injectat per duplicat.

A continuació en la taula 3.1.3.3. es mostren les recuperacions obtingudes per aquestes mostres.

	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4
Recuperacions (%) NP	101	100	117	116

Taula 3.1.3.3. Recuperacions del NP en les mostres de sòl i torba

Així doncs, tenint en compte tots els punt estudiats en la validació del mètode analític, es pot concloure que les condicions són òptimes per procedir a l'anàlisi de l'evolució del nonilfenol en mostres de sòl i mesclades de sòl amb torba i compost, que com ja s'ha dit anteriorment és un dels objectius del present treball.

3.2. Disseny dels experiments realitzats en dos tipus de substrat: mesclades de sòl amb compost, i mesclades de sòl amb torba

S'han preparat paral·lelament dos experiments per estudiar l'evolució del NP en sòls: un amb grans volums corresponent al sòl de referència i les mesclades d'aquest sòl addicionat amb torba, i l'altre a petita escala, corresponent al sòl de referència i a les mesclades d'aquest sòl addicionat

amb compost. En aquests dos experiments s'ha realitzat l'addició del NP al sòl i a les mesclures de sòl amb torba i sòl amb compost a dos nivells de contaminació; el nivell baix de 25mg/kg i el nivell alt de 50mg/kg.

Així doncs, per a les mostres de sòl i sòl addicionat amb torba s'ha dissenyat l'experiment de la taula 3.2.1.

Substrat	Concentració NP	Temps incubació NP (numerats de 1 a 7)	Número de rèpliques (a, b, c)
Sòl (S)	1 (25mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3
	2 (50mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3
Sòl+Torba (H)	1 (25mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3
	2 (50mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3

Taula 3.2.1. Disseny experimental de l'aplicació del NP per a les mostres de sòl i sòl amb torba.

A continuació, en la taula 3.2.2. es mostra el disseny experimental per a les mostres de sòl i sòl addicionat amb compost.

Substrat	Concentració NP	Temps incubació NP (numerats de 1 a 7)	Número de rèpliques (a, b, c)
Sòl (S)	1 (25mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3
	2 (50mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3
Sòl+Compost (C)	1 (25mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3
	2 (50mg/kg)	0,1,2,4,8,16,32 setmanes	3

Taula 3.2.2. Disseny experimental de l'aplicació del NP per a les mostres de sòl i sòl amb compost.

Cada mostra s'etiqueta amb el seu codi. El codi de cada rèplica és indicatiu de la combinació del tractament i número de mostreig. Així doncs, les mostres s'identifiquen segons:

- **Tipus de substrat:** sòl (S), sòl+torba (H), sòl+compost (C)

-
- **Dosis NP:** 0=control, 1=25mg/kg, 2=50mg/kg
 - **Número de mostreig:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 que indica respectivament la setmana 0, 1, 2, 4, 8,16, 32 d'incubació de les mostres.
 - **Rèpliques:** Les 3 rèpliques de cada mostra s'identifiquen per a, b, c

Per exemple, una mostra etiquetada amb **H1_7a** indica que el substrat és sòl amb torba on s'addiciona el nivell baix del patró de NP, és a dir 25mg/kg, es mostreja a la setmana 32 i és la rèplica a.

3.3. Preparació de les mostres de sòl i mescles de sòl addicionat amb torba

A continuació, es descriu com s'han preparat les mostres que només contenen sòl, és a dir corresponen a les mostres "**S**" de la taula 3.2.1. Aquest sòl s'ha obtingut dels camps experimentals de la Universitat Autònoma, descrit anteriorment a l'inici d'aquest apartat.

S'han homogeneïtzat 364kg de sòl i s'han distribuït en 3 lots; cadascun de 117,6kg de sòl humit. El primer lot són les mostres control, el segon lot són les mostres de sòl per a l'addició del nivell baix de nonilfenol (correspon a la concentració 1 del NP de la taula 3.2.1) i el tercer lot

són les mostres de sòl per a l'addició del nivell alt de nonilfenol (correspon a la concentració 2 del NP de la taula 3.2.1).

Cadascun dels 3 lots s'estenen sobre una taula dins un hivernacle per a la posterior addició del NP. La figura 3.3.1. mostra l'assecat de les mostres abans d'aplicar el NP.



Figura 3.3.1: Mostres de sòl assecant-se a l'hivernacle.

A continuació, es descriu com s'han preparat les mostres de sòl addicionades amb torba, és a dir, les mostres que corresponen a les "H" de la taula 3.2.1. Per a la preparació d'aquesta barreja, es pesen 325 kg del mateix sòl descrit anteriorment, on s'ha addicionat 13,91 kg de torba, que representa un increment d'un 1% de la matèria orgànica del sòl.

Aquesta torba és la que s'ha descrit anteriorment a l'inici d'aquest apartat. S'ha homogeneïtzat tota la mescla i es distribueix en tres lots de 105 kg de la mescla seca; el primer lot són les mostres control, el segon lot són les mostres de sòl amb torba per a l'addició del nivell baix de nonilfenol (correspon a la concentració 1 del NP de la taula 3.2.1) i el tercer lot són les mostres de sòl per a l'addició del nivell alt de nonilfenol (correspon a la concentració 2 del NP de la taula 3.2.1).

El patró de NP utilitzat en l'addició de l'experiment, és una mescla de nonilfenol subministrada per Aldrich on el 4-nonilfenol és l'isòmer majoritari (95%). S'apliquen emulsions del producte amb aigua que conté un 25% (v/v) d'acetona, en concret per cada 500 ml de dissolució, es van barrejar 125 ml d'acetona amb 375 ml d'aigua destil·lada. S'addiciona una dosis alta equivalent a 50 mg/kg i la dosis baixa és de 25 mg/kg, com ja dit anteriorment. Aquesta addició s'ha fet igual per a les mostres que només contenen sòl (corresponent a les "S" de la taula 3.2.1.) que per a les mostres de sòl addicionat amb torba (corresponent a les "H" de la taula 3.2.1.).

L'aplicació del NP per a les mostres de sòl i les mescles de sòl addicionat amb torba, es realitza de forma superficial, mitjançant polvorització sobre la capa de sòl de cada tractament amb una pistola metàl·lica accionada per aire comprimit. Quan els sòls s'han assecat, es barreja la terra de cada lot i es distribueix en recipients metàl·lics (figura 3.3.2) per a l'incubació de les mostres. En aquests recipients hi caben uns 4500 g de sòl aproximadament i tenen un diàmetre interior de 168 mm i una altura de 240 mm.



Figura 3.3.2.: Mostres del sòl assecant-se a l'aire lliure.

Un cop passat el temps d'incubació per a cada mostra, per a realitzar les anàlisis, es procedeix de la següent manera: es buida el contingut de cada recipient metàl·lic dins d'una safata i s'homogeneïtza, es reparteix el contingut en diferents porcions per a cada una de les posteriors determinacions: 800 g per a les propietats físiques, 50 g per a l'anàlisi microbiològic, 100 g per a l'anàlisi químic del NP, 100 g per a la preparació dels elutriats aquosos per a l'anàlisi de NP, 100 g per a l'ecotoxicitat del sòl i finalment 2600 g per a l'ecotoxicitat aquàtica. Exceptuant les anàlisis de NP, la resta de determinacions s'han realitzat a la UAB i formen part d'una altre tesi doctoral.

A continuació en la taula 3.3.1. es mostra el calendari de mostreig per a l'incubació de les mostres.

Data	Activitat realitzada
28/03/08	Aplicació NP, es deixa 48 hores perquè s'evapori l'acetona.
30/03/08	Homogeneïtzació del sòl i mostreig 0 de H2_0, S2_0, S1_0 i H1_0
01/04/08	Addició 15% d'aigua, inici de l'incubació de les mostres.
02/04/08	Mostreig 1, (setmana 0, correspon a 24 hores després de l'inici de l'incubació) H2_1, S2_1, H1_1, S1_1
09/04/08	Mostreig 2, (setmana 1) H2_2, S2_2, H1_2, S1_2
16/04/08	Mostreig 3, (setmana 2) H2_3, S2_3, H1_3, S1_3
30/04/08	Mostreig 4, (setmana 4) H2_3, S2_4, H1_4, S1_4
04/06/08	Mostreig 5, (setmana 8) H2_5, S2_5, H1_5, S1_5
01/08/08	Mostreig 6, (setmana 16) H2_6, S2_6, H1_6, S1_6
14/11/08	Mostreig 7, (setmana 32) H2_7, S2_7, H1_7, S1_7

Taula 3.3.1. Calendari del mostreig utilitzat per les mostres de sòl i mesclades de sòl amb torba

Durant tot el procés d'incubació de les mostres, s'ha mantingut constant la humitat. La temperatura ha variat durant els 8 mesos que ha durat l'experiment. Per controlar la humitat, s'han regat les mostres un cop per setmana mantenint una humitat d'un 15%, que correspon a

la meitat de la capacitat de camp del sòl utilitzat. La capacitat de camp és l'aigua retinguda després d'haver saturat el sòl i d'haver-lo drenat 24 hores.

3.4. Preparació de les mostres de sòl i mescles de sòl addicionat amb compost

A continuació es descriu com s'han preparat les mostres que només contenen sòl, és a dir corresponen a les mostres "S" de la taula 3.2.2. Aquest sòl és el mateix que s'ha utilitzat en l'apartat 3.3.

S'han homogeneïtzat 2 kg de sòl pel tractament i s'han distribuït en 3 lots; cadascun de 700 g de sòl sec per a la posterior incubació del NP. El primer bloc són les mostres control, el segon són les mostres de sòl per a l'addició del nivell baix de nonilfenol (correspon a la concentració 1 del NP de la taula 3.2.2) i el tercer són les mostres de sòl per a l'addició del nivell alt de nonilfenol (correspon a la concentració 2 del NP de la taula 3.2.2).

Posteriorment, es preparen les mostres de sòl addicionades amb compost. Aquestes mostres són les que corresponen a les mostres "C" de la taula 3.2.2. Per a la preparació d'aquesta mescla, es pesen 2,131 kg de sòl, on s'addicionen 40,75 g del compost procedent de la planta depuradora de Blanes, que representa un augment d'un 1% de la matèria orgànica en el sòl, aquest compost és el descrit a l'inici d'aquest apartat.

La mescla de sòl amb compost es distribueix en 3 lots de 724 g cadascun; el primer lot són les mostres control, el segon són les mostres de sòl amb compost per a l'addició del nivell baix de nonilfenol (correspon a la concentració 1 del NP de la taula 3.2.2) i el tercer són les mostres de sòl amb compost per a l'addició del nivell alt de nonilfenol (correspon a la concentració 2 del NP de la taula 3.2.2). Com ja s'ha dit abans, l'addició i la incubació d'aquestes mostres s'ha realitzat al laboratori de l'IQS.

Per a l'addició del patró de NP s'ha utilitzat la mateixa mescla de NP distribuïda per Aldrich, descrita en l'apartat 3.3. El NP s'ha addicionat a les mostres de sòl i mescla de sòl amb compost de manera diferent al cas anterior. En aquest cas, l'addició del NP s'ha fet de la següent manera: es pesen 2,5100 g de NP i es dissolen en 250 mL d'acetona (DN 1). Per a l'addició del nivell alt s'ha addicionat al sòl 5 mL d'aquesta dissolució inicial (DN 1) que s'ha diluït amb 10 mL d'acetona i 20 mL d'aigua per tenir una quantitat suficient per addicionar a tota la mostra. Per a l'addició del nivell baix s'ha addicionat al sòl 2,5 mL de la dissolució inicial (DN 1) diluïda amb 10 mL d'acetona i 20 mL d'aigua. Els 20 mL d'aigua són el màxim que es pot afegir amb l'acetona abans de que es formi una emulsió, així l'addició es fa amb la mínima

quantitat d'acetona possible per no eliminar els microorganismes existents en el sòl perquè aquests puguin actuar en la degradació del NP.

Per afegir de forma còmoda la solució de NP, s'ha utilitzat una microxeringa de vidre, de manera que s'ha deixat caure gota a gota la dissolució de NP sobre la meitat del sòl. Un cop afegit tot el NP, s'ha deixat evaporar l'acetona durant 24 hores i després s'ha afegit la resta sòl homogeneïtzant bé la mescla.

A continuació en la taula 3.4.1. es mostra el calendari de mostreig per a la incubació de les mostres.

Data	Activitat realitzada
28/04/10	Aplicació NP a la meitat del sòl, es deixa 24 hores perquè s'evapori l'acetona.
29/04/10	S'ha barrejat la resta de sòl i homogeneïtzat. Es deixa 24 hores.
30/04/10	48 hores després aplicació NP, mostreig de H2_0, S2_0, S1_0 i H1_0 i després addició del 15% d'aigua inici de la incubació de les mostres.
03/05/10	Mostreig 1, (setmana 0, correspon a 48 hores després de l'inici de l'incubació), H2_1, S2_1, H1_1, S1_1
10/05/10	Mostreig 2, (setmana 1), H2_1, S2_1, H1_1, S1_1
17/05/10	Mostreig 3, (setmana 2) H2_3, S2_3, H1_3, S1_3
31/05/10	Mostreig 4, (setmana 4) H2_3, S2_4, H1_4, S1_4
28/06/10	Mostreig 5, (setmana 8) H2_5, S2_5, H1_5, S1_5
23/08/10	Mostreig 6, (setmana 16) H2_6, S2_6, H1_6, S1_6)
13/12/10	Mostreig 7, (setmana 32) H2_7, S2_7, H1_7, S1_7

Taula 3.4.1. Calendari de mostreig per a les mostres de sòl i sòl amb compost.

Igual que en cas de les mostres de sòl i sòl amb torba, durant tot el procés d'incubació de les mostres, s'ha mantingut constant la humitat al 15%, operant de la mateixa manera.

3.5. Metòdica d'anàlisi del nonilfenol

Un cop s'ha mostrejat, les mostres s'han mantingut congelades a -20°C fins al moment de fer l'anàlisi del NP. Abans de començar l'anàlisi de les mostres, es deixen descongelar i assecar 24 hores a temperatura ambient. Les mostres s'han analitzat seguint l'esquema 3.1.3.1. i totes les mostres s'han analitzat per duplicat i injectat per duplicat.

Les mostres s'analitzen mitjançant HRGC-MS en mode SIM per augmentar la sensibilitat i evitar interferències. Les condicions cromatogràfiques són les que s'han descrit en l'apartat 3.1. corresponent a la validació del mètode.

A continuació en la figura 3.5.1. es mostra un cromatograma d'un patró de concentració 12,5mg/L de NP i del patró intern. En aquest cromatograma s'ha extret el ió 135 corresponent al NP i el 192 corresponent al patró intern.

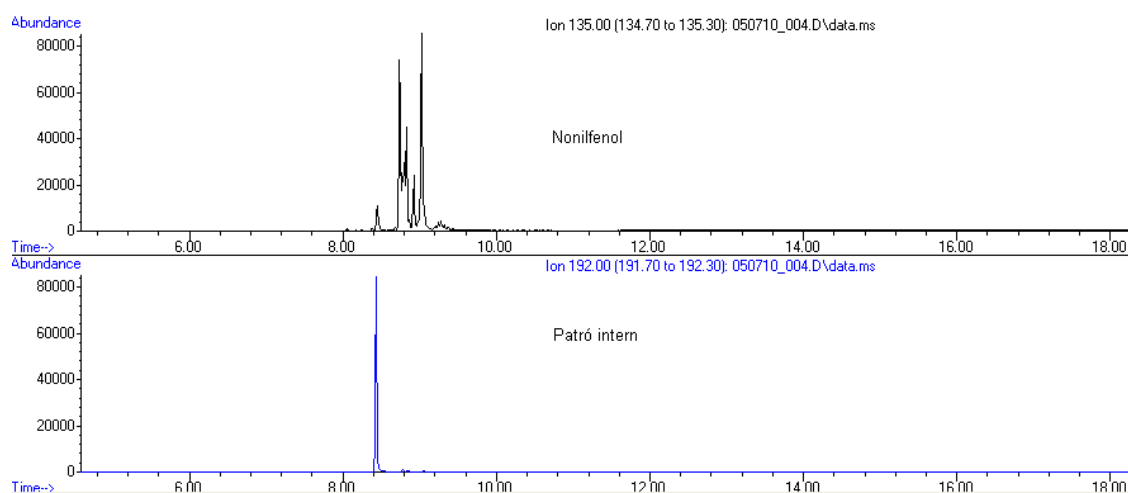


Figura 3.5.1. Cromatograma corresponent a un patró de 12,5mg/L

La integració dels pics s'ha realitzat de la següent manera; en el cas del nonilfenol, que és el cromatograma corresponent a l'extracció del ió 135, s'ha integrat tota la banda de pics

corresponent al NP des del minut 8,5 fins al minut 9,5. En el cas del patró intern corresponent al pic de l'extracció del ió 192, s'ha integrat des del minut 8,4 fins al 8,7. Aquesta integració s'ha realitzat en tots els cromatogrames obtinguts per a totes les mostres.

3.6. Evolució del nonilfenol en les mostres de sòls

Un cop posat a punt el mètode d'anàlisi de NP en mostres sòls i veient que s'obtenen bones recuperacions, s'han analitzat totes les mostres de sòls descrites anteriorment per a realitzar l'estudi de l'evolució del NP en funció del temps d'incubació.

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts per a totes les mostres un cop passat el temps d'incubació corresponent per a cada mostra. Primer es presenten les mostres de sòl i sòl addicionat amb torba i després es presenten les mostres de sòl i sòl addicionat amb compost.

- **Mostres de sòl i sòl addicionat amb torba**

Els resultats obtinguts de les mostres de sòl i de les mesclades de sòl amb torba són els que es mostren en la taula 3.6.1. i 3.6.2. tant per a la dosi alta com per a la dosi baixa de NP. Els resultats que es presenten són la mitjana de les 3 rèpliques per a cada mostra (a,b,c, veure les taules 3.2.1).

Sòl dosi alta i baixa	NP mg/kg	CV(%)
S2_0	36,1	31
S2_1 setmana 0	16,8	31
S2_2 setmana 1	4,6	19
S2_3 setmana 2	2,4	17
S2_4 setmana 4	2,5	27
S2_5 setmana 8	1,1	28
S2_7 setmana 32	0,7	8
S1_0	12,2	2
S1_1 setmana 0	6,0	20
S1_2 setmana 1	3,3	29
S1_3 setmana 2	1,1	25
S1_4 setmana 4	1,1	7
S1_5 setmana 8	0,9	30

S1_7 setmana 32	0,5	5
-----------------	-----	---

Taula 3.6.1: Concentració de nonilfenol en les mostres de sòl considerant la dosi inicial 1 (1_0): 25 mg/kg i la dosi inicial 2 (2_0): 50mg/kg.

Sòl amb torba dosi alta i baixa	NP mg/kg	CV(%)
H2_0	28,7	18
H2_1 setmana 0	18,7	20
H2_2 setmana 1	7,9	8
H2_3 setmana 2	5,5	9
H2_4 setmana 4	3,4	8
H2_5 setmana 8	1,5	9
H2_7 setmana 32	0,6	6
H1_0	10,4	19
H1_1 setmana 0	6,0	16
H1_2 setmana 1	4,3	29
H1_3 setmana 2	2,3	9
H1_4 setmana 4	1,8	7
H1_5 setmana 8	0,8	2
H1_7 setmana 32	0,4	15

Taula 3.6.2: Concentració de nonilfenol en les mostres de sòl amb torba considerant la dosi inicial 1 (1_0): 25 mg/kg i la dosi inicial 2 (2_0): 50mg/kg.

A títol d'exemple, en la figura 3.6.1.es mostra un cromatograma per una mostra corresponent a una mescla de sòl amb torba amb una addició de NP a nivell alt i mostrejada la setmana 4, és a

dir, la mostra H2_4, on l'extracció del ió 135 correspon al NP i el ió 192 correspon al patró intern.

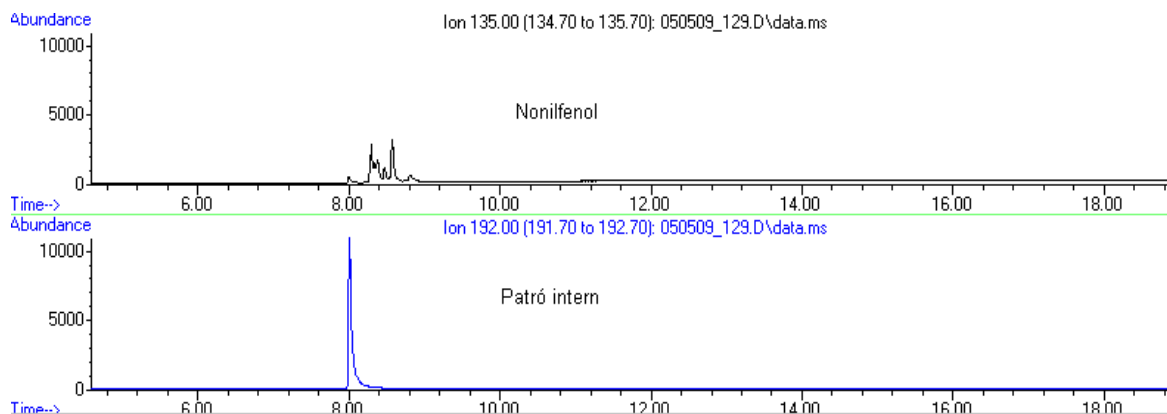
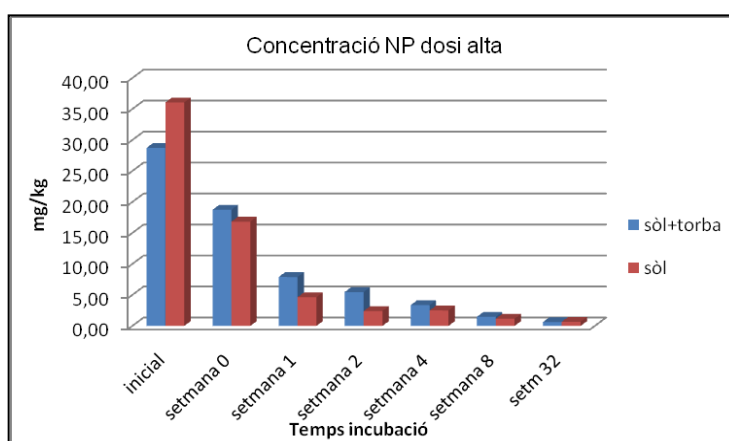


Figura 3.6.1. Cromatograma de la mostra H2_4 obtingut en mode SIM

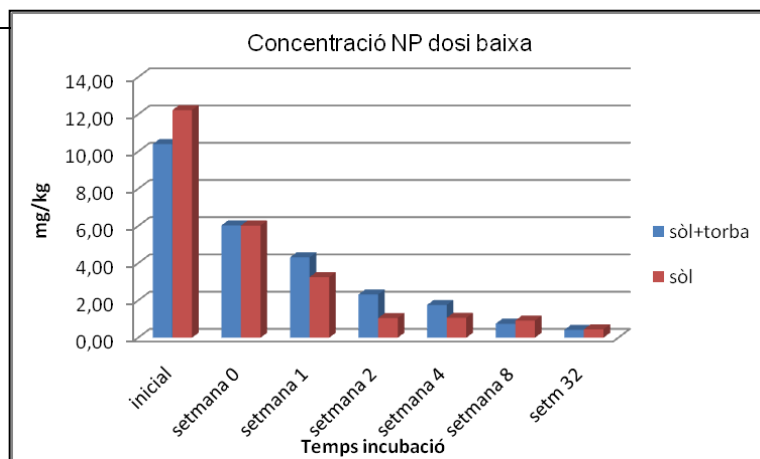
Dels resultats obtinguts, es pot observar que:

- La concentració de NP detectada en el mostreig a temps 0 és inferior al valor esperat, tenint en compte que hauria de ser 25mg/kg per a les mostres S1_0 i H1_0 i 50 mg/kg per a les mostres S2_0 i H2_0. Cal destacar que l'única diferència entre l'extracció del NP en aquestes mostres i les mostres preparades en l'apartat 3.1 (validació del mètode), és que l'extracció del NP no s'ha fet immediatament després de l'addició del NP (veure esquema 3.1.3.1.). Aquest fet s'estudia en profunditat en l'apartat 4 del present capítol.
- Tenint en compte la concentració inicial en les mesclures, s'observa una marcada disminució al llarg del temps. Així, passades 48 hores la concentració de NP és de l'ordre del 50% de l'inicial i passades 5 setmanes el valor de NP és inferior al 10%.
- A la setmana 8, la degradació representa un 95% en les mostres de sòl amb torba de dosi alta i en el cas de la dosi baixa representa un 93%.

Els gràfics 3.6.1. i 3.6.2. mostren la degradació del NP en les mostres de sòl i en les mesclures de sòl amb torba de dosi alta i dosi baixa respectivament.



Gràfic 3.6.1: Degradació del NP corresponent a la **dosi alta** de les mostres de sòl i mesclures de sòl amb torba.



Gràfic 3.6.2: Degradació del NP corresponent a la **dosi baixa** de les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba.

Com es pot veure en els gràfics 3.6.1 i 3.6.2 la degradació del nonilfenol és més ràpida en les mostres de sòl que en les mescles de sòl amb torba.

- **Mostres de sòl i sòl addicionat amb compost**

Els resultats obtinguts de les mostres de sòl i de les mescles de sòl amb torba són els que es mostren en la taula 3.6.2. tant per a la dosi alta com per a la dosi baixa de NP. Els resultats que es presenten són la mitjana de les 3 rèpliques per a cada mostra (a,b,c, veure taula 3.2.2).

Sòl dosi alta i baixa	NP mg/kg	CV(%)
S2_0	20,9	2
S2_1 setmana 0	10,9	5
S2_2 setmana 1	4,7	7
S2_3 setmana 2	3,4	14
S2_4 setmana 4	1,2	8
S2_5 setmana 8	0,9	13
S1_6 setmana 16	0,7	19
S2_7 setmana 32	0,6	7
S1_0	7,5	26
S1_1 setmana 0	4,3	16
S1_2 setmana 1	1,4	22
S1_3 setmana 2	0,9	8
S1_4 setmana 4	0,6	3

S1_5 setmana 8	0,6	11
S1_6 setmana 16	0,6	3
S1_7 setmana 32	0,5	5

Taula 3.6.4: Concentració de nonilfenol en les mostres de sòl considerant la dosi inicial 1 (1_0): 25 mg/kg i la dosi inicial 2 (2_0): 50mg/kg.

Sòl dosi alta i baixa	NP mg/kg	CV(%)
C2_0	22,8	8
C2_1 setmana 0	22,5	11
C2_2 setmana 1	11,5	9
C2_3 setmana 2	8,4	2
C2_4 setmana 4	4,4	17
C2_5 setmana 8	1,3	5
C2_6 setmana 16	1,0	14
C2_7 setmana 32	0,6	10
C1_0	10,2	2
C1_1 setmana 0	9,2	11
C1_2 setmana 1	4,8	15
C1_3 setmana 2	3,6	7
C1_4 setmana 4	2,3	14
C1_5 setmana 8	1,1	23
C1_6 setmana 16	0,7	8
C1_7 setmana 32	0,6	3

Taula 3.6.5: Concentració de nonilfenol en les mescles de sòl amb compost considerant la dosi inicial 1 (1_0): 25 mg/kg i la dosi inicial 2 (2_0): 50mg/kg.

A títol d'exemple, en la figura 3.6.3 es mostra un cromatograma per una mostra corresponent a una mescla de sòl amb compost amb una addició de NP a nivell alt i mostrejada la setmana 4, és a dir, la mostra C2_4, on l'extracció del ió 135 correspon al NP i el ió 192 correspon al patró intern.

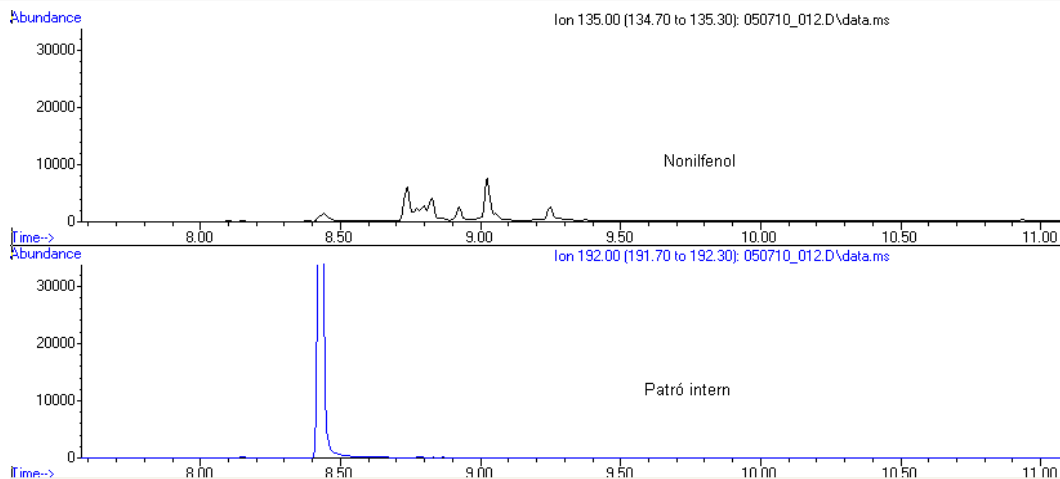
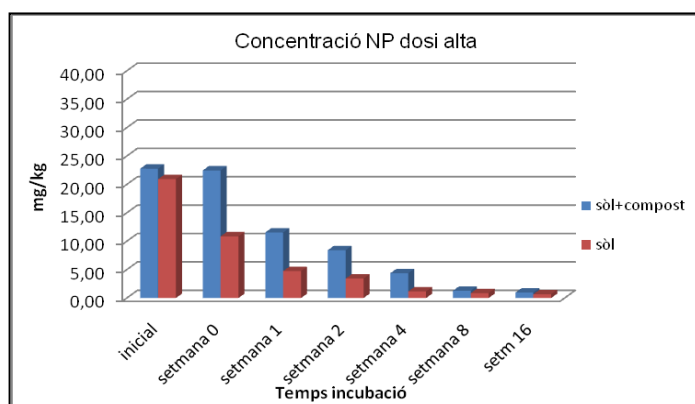


Figura 3.6.3. Cromatograma de la mostra C2_4 obtingut en mode SIM

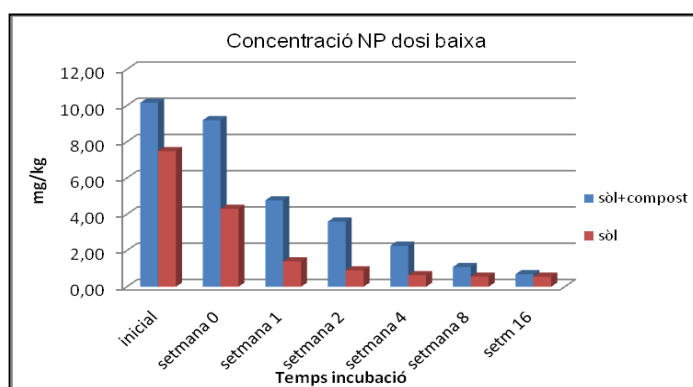
Dels resultats obtinguts, es pot observar que:

- La concentració de NP detectada en el mostreig a temps 0 és inferior al valor esperat igual que passa en el cas del sòl amb torba, tenint en compte que hauria de ser 25mg/kg per a les mostres C1_0 i S1_0 i 50 mg/kg per a les mostres C2_0 i S2_0. Igual que en cas de les mescles de sòl amb torba, l'extracció del NP no s'ha fet immediatament després de seva l'addició, és la diferència que hi ha entre el mètode validat i l'anàlisi de les mostres estudiades.
- En les mostres de sòl i sòl addicionat en compost hi ha un mostreig més que en cas de les mostres de sòl i sòl addicionat amb torba. Aquest mostreig correspon a la setmana 16 i com es pot observar segueix la degradació del NP tal i com s'esperava.
- Tenint en compte la concentració inicial en les mescles, s'observa una marcada degradació al llarg del temps. Així, passades 48 hores després de l'inici de la incubació, la concentració de NP és de l'ordre del 50% respecte l'inicial, excepte la mostra C2_1 que només és d'un 1%, però la resta de mostres segueixen la tendència de la resta.
- A la setmana 8, la degradació representa un 95% en les mostres de sòl amb compost de dosi alta i en el cas de la dosi baixa representa un 93%. Aquests resultats són equivalents pels dos tipus d'experiències amb torba i compost.
- En el cas de les mostres que només contenen sòl en la dosi alta, passades 4 setmanes el percentatge de NP que encara queda en les mostres és del 5%, dada que coincideix amb altres estudis publicats sobre la degradació del NP en sòls (16).

Els gràfics 3.6.3. i 3.6.4. mostren la degradació del NP en les mostres de sòl i en les mescles de sòl amb torba de dosi alta i dosi baixa respectivament.



Gràfic 3.6.3. Degradació del NP corresponent a la **dosi alta** de les mostres de sòl i mescles de sòl amb compost



Gràfic 3.6.4: Degradació del NP corresponent a la **dosi baixa** de les mostres de sòl i mescles de sòl amb compost.

Comparant la degradació del NP en l'experiment de sòl i mescles de sòl amb torba i l'experiment de sòl i mescles de sòl amb compost, es pot veure com el NP es comporta de la mateixa manera i la seva degradació evoluciona igual en presència de torba que de compost.

Cal destacar que els resultats obtinguts, es contradiuen amb altres estudis publicats (16,17), on l'addició de compost al sòl provoca una degradació més ràpida del NP. Però, en aquests articles publicats, afegeixen diferents quantitats de compost al sòl amb la finalitat d'aportar un

augment de matèria orgànica del sòl des d'un 4,9% fins a un 25%. En la present Tesi Doctoral només s'aporta un 1% de matèria orgànica al sòl.

Segons la bibliografia, els microorganismes del sòl són els responsables de la degradació del NP (16,17). Quan s'afegeix compost o torba també s'aporten més microorganismes al medi, augmentant la seva activitat microbiana i alhora, també s'aporta més matèria orgànica. Per tant, en les mostres que contenen compost o torba, la degradació del NP hauria de ser més ràpida (16,17), ja que l'activitat microbiana és major que en les mostres no tenen compost o torba. En canvi, en la present Tesi Doctoral s'ha vist que la degradació del NP és més ràpida en les mostres de sòl sense torba ni compost. Aquest fet es podria explicar donat que quan hi ha presència de torba o compost, els microorganismes disposen d'altres nutrients que són més fàcils d'utilitzar abans que el NP.

4. Estudi de la disminució inicial de NP

Observant els resultats obtinguts de l'evolució del NP, tant per a les mostres de sòl amb torba com per a les mostres de sòl amb compost (veure taules 3.6.1 i 3.6.2), la concentració de NP trobada a l'inici no coincideix amb la quantitat adicionada. És a dir, cap mostra corresponent a passades 48 hores de l'aplicació del NP s'ha trobat una concentració de 50mg/kg ni de 25mg/kg que és el que s'ha afegit, sinó que les concentracions de NP detectades a l'inici (48 hores) gairebé corresponen a la meitat de la quantitat de NP adicionada.

A continuació es mostren les concentracions del NP en el cas de l'experiment de les mostres de sòl i sòl addicionat amb compost. En les taules següents 4.1 i 4.2 es recullen els resultats de les mostres corresponents als següents codis: S2_0, S2_1, S1_0, S1_1, C2_0, C2_1, C1_0, C1_1. El que es pretén és comparar entre la quantitat que s'ha adicionat i la quantitat detectada en cada cas. Cal destacar que es considera l'inici de la incubació del NP en el moment en què es realitza el primer reg per mantenir la humitat del 15% com ja s'ha comentat anteriorment.

	Dosi (mg/kg)	NP (mg/kg)
--	--------------	------------

Mostres de sòl	addicionada	detectats
S2_0 (passades 48 hores de l'aplicació del NP)	50	20,9
S2_1 (passades 48 hores de l'inici de la incubació de les mostres)	50	10,9
S1_0 (passades 48 hores de l'aplicació del NP)	25	7,5
S1_1 (passades 48 hores de l'inici de la incubació de les mostres)	25	4,3

Taula 4.1. Resultats dels mg/kg de NP per a les mostres de sòl.

Mostres de sòl amb compost	Dosi (mg/kg) adicionada	NP (mg/kg) detectats
C2_0 (passades 48 hores de l'aplicació del NP)	50	22,8
C2_1 (passades 48 hores de l'inici de la incubació de les mostres)	50	22,5
C1_0 (passades 48 hores de l'aplicació del NP)	25	10,2
C1_1 (passades 48 hores de l'inici de la incubació de les mostres)	25	9,2

Taula 4.2. Resultats dels mg/kg de NP per a les mostres de sòl amb compost.

En les taules 4.1 i 4.2, es pot observar que passa el mateix tant per les mostres de sòl com per a les mostres de sòl amb compost. És a dir, que en cap de les mostres recollides passades 48 hores de l'aplicació del NP es troba la concentració que es pretenia afegir, tant pel nivell alt com pel nivell baix. També es corrobora que la concentració de NP passades 48 hores de l'aplicació del NP, és aproximadament la meitat. Aquest fet es repeteix també per a l'experiment de sòl i mostres de sòl amb torba.

Per trobar una explicació sobre la disminució de la concentració del NP a la meitat passades les 48 hores, s'han pensat diferents raons. Aquestes són les que s'exposen a continuació:

a) Possible pèrdua per evaporació del nonilfenol, en el moment de l'aplicació amb la mescla aigua:acetona, ja que el nonilfenol es pot evaporar durant les primeres 48 hores després de l'aplicació, mentre s'evapora l'acetona.

Cal tenir en compte que el punt d'ebullició de la mescla d'isòmers utilitzada com a patró de NP és de 295°C i que la pressió de vapor a 20°C és inferior a 7,5mmHg. Per tant, es tracta d'un producte relativament volàtil i en aplicar-lo en forma de microgota augmenta la tensió superficial i afavoreix l'evaporació.

b) Possibilitat que el nonilfenol es quedi retingut en el sòl amb algun catió com podria ser el Ca^{2+} del sòl i per tant falla la metodologia d'extracció. Tot i que les recuperacions obtingudes en l'apartat 3.1 de la validació són del 100% (veure estudi de la recuperació apartat 3.1). Es creu en aquesta possibilitat ja que el pH de les mostres de sòl amb compost és de 8,7, les de mostres sòl tenen un pH de 9 i les mostres de sòl amb torba tenen un pH de 7,8 (taula 4.3.); per tant podria donar-se aquesta retenció.

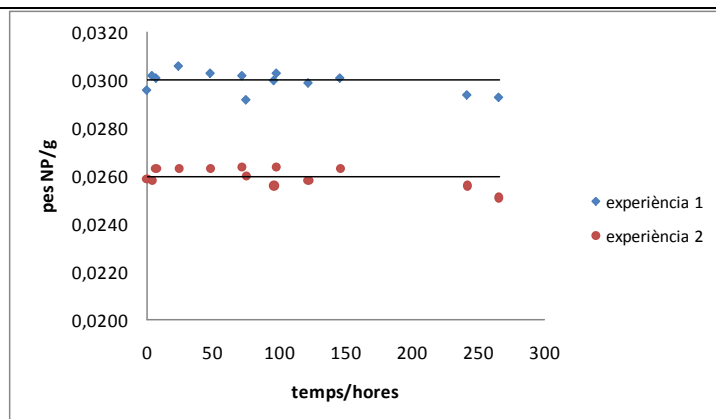
Mostres	pH
Sòl	9
Sòl amb compost	8,7
Sòl amb torba	7,8

Taula 4.3. pH's de les mostres de sòls

Per trobar una resposta a les dues opcions plantejades anteriorment, es realitzen els següents experiments:

1. Per comprovar la possible pèrdua per evaporació s'han realitzat dos experiments; el primer consisteix en pesar 20mg del patró de NP, que es deixa caure en forma de microgota, en una càpsula de porcellana i es deixa 240 hores. Es va controlant el pes del NP per comprovar si és possible l'evaporació. L'altre experiència és pesar 20mg del patró de NP dissolt en una mescla aigua:acetona (66:33) que és com s'ha addicionat el NP en les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba i sòl amb compost, també es deixa durant 240 hores i es controla el pes del NP. En el segon cas l'experiment s'ha realitzat en una placa de Petri.

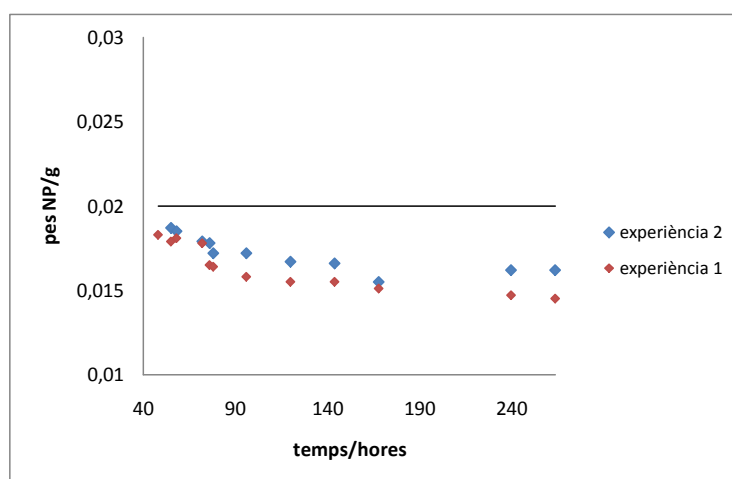
A continuació en el gràfic 4.1. es mostra l'evolució del NP pesat directament en la càpsula de porcellana. S'han realitzat dues experiències que són les que es mostren en el gràfic.



Gràfic 4.1. Evolució del pes del NP (g) en les dues experiències durant 11 dies.

En el gràfic 4.1. queda demostrat que no hi ha evaporació del NP en cap dels dos experiments realitzats. Les dues rectes dibuixades en el gràfic representen la quantitat de NP pesada a l'inici de l'experiment. Com es pot veure el pes del NP es manté constant durant els onze dies que ha durat l'experiment.

A continuació es mostra el gràfic 4.2. que correspon a l'evolució del pes del NP dissolt en aigua:acetona amb el pas de les hores. En el gràfic es pot observar que s'ha modificat a partir de les 40 hores que és quan hi ha una disminució del pes més important. També s'han preparat dues experiències que són les que es mostren en el gràfic 4.2.



Gràfic 4.2. Evolució del pes del NP (g) en les dos experiències durant 11 dies.

La recta del gràfic 4.2. representa la quantitat de NP pesada a l'inici (0,02g), que s'hauria de mantenir constant. Tenint en compte la quantitat de NP pesat, queda demostrat que passades 48 hores s'ha evaporat un 10% del NP i passades 240 hores s'ha evaporat un 16%. Un fet que podria explicar aquesta evaporació, és que en aquest experiment la superfície d'evaporació és més gran comparada amb l'experiència anterior on s'ha utilitzat una càpsula de porcellana.

Tot i això, en aquesta evaporació s'ha de tenir en compte que la superfície d'evaporació és molt diferent a la utilitzada en els experiments dels sòls, on encara ha sigut una superfície més gran. Per tant, un fet que podria explicar la disminució de la concentració del NP és que com més gran és la superfície on s'estén la mostra més es podria evaporar el NP.

2. Per comprovar la hipòtesi de si el NP es queda retingut al sòl, s'ha realitzat l'extracció del NP amb una mostra amb sòl i una sense sòl. En aquesta experiència es pretén comprovar com influeix el sòl en la recuperació del NP tot i que la validació del mètode a resultat ser satisfactòria (veure apartat 3.1).

Per realitzar aquesta experiència, es procedeix de la següent manera: es treballa en paral·lel amb dos erlenmeyers, en un es pesen 5g de sòl on s'ha afegit 0,3mg de NP, i en un altre erlenmeyer només s'ha afegit 0,3mg de NP sense afegir sòl. En els dos casos s'ha realitzat l'extracció del NP escrita en l'esquema 3.1.3.1, és a dir immediatament després de l'addició del NP. En aquesta experiència les mostres no s'han congelat (les mostres de sòls han estat congelades fins el moment de l'extracció del NP) ja que l'extracció de l'analit d'interès s'ha fet al moment.

A la taula 4.4. es mostren els resultats d'aquesta experiència per a l'extracció del NP realitzada immediatament després de fer l'addició.

Inici addició NP	Dosi NP(mg) addicionat	NP(mg) detectats
Erlenmeyer + 5g de sòl	0,300	0,300
Erlenmeyer sense sòl	0,300	0,316

Taula 4.4. Resultats de l'extracció del NP feta immediatament després de l'addició

Aquest experiment s'ha repetit fent l'extracció del NP passades 24 hores de l'addició d'aquest. Les mostres s'han deixat durant les 24 hores a temperatura ambient.

A la taula 4.5. es mostren els resultats per a les mostres on s'ha dut a terme l'extracció del NP passades 24 hores després de l'addició.

Passades 24 hores	Dosi NP(mg) addicionat	NP(mg) detectats
Erlenmeyer + 5g de sòl	0,300	0,179
Erlenmeyer sense sòl	0,300	0,289

Taula 4.5. Resultats de l'extracció del NP passades 24 hores de l'addició

Com es pot veure en els resultats de la taula 4.4. que correspon a les mostres analitzades immediatament després de l'addició del NP, les recuperacions són del 100% tant si hi ha sòl com si no n'hi ha, per tant el mètode d'extracció funciona correctament. Aquest fet ja era d'esperar perquè l'extracció del NP s'ha realitzat igual que quan s'ha validat el mètode.

Però en canvi, en la taula 4.5. que correspon a les mostres analitzades 24 hores després de l'addició es pot veure com la quantitat de NP disminueix a la meitat en el cas de l'extracció amb sòl. Per tant, passades 24 hores s'està perdent NP o aquest no s'extreu completament. Per saber a què és deguda aquesta pèrdua i saber si aquest fet és el que influeix en la hipòtesi de què el NP es queda retingut al sòl, es decideix provar l'experiència que es descriu en el punt 2.1.

2.1 S'ha acidulat el sòl amb 4mL de HCl (1M) abans de fer l'extracció de NP. El que es pretén amb aquesta experiència és disminuir el pH de la mostra de tal manera que si el NP es queda retingut formant alguna sal s'afavorirà l'extracció. En aquest experiment, l'extracció del NP s'ha realitzat immediatament després de l'addició del NP i passades 24 hores de l'addició per comprovar si influeix el temps que es posa en contacte. Només es dur a terme en presència de sòl que és quan disminueix la recuperació del NP (com es pot veure en taula 4.5).

Es procedeix seguint l'esquema 3.1.3.1. Cal dir que en aquesta experiència les mostres tampoc s'han congelat ja que l'extracció de l'analit d'interès s'ha fet immediatament després de l'addició del NP.

En les taules 4.6 es recullen els resultats obtinguts per a les mostres acidulades on s'ha realitzat l'extracció del NP immediatament després de l'addició del NP.

Inici addició NP	Dosi (mg) addicionat	NP(mg) detectats
Mostra acidulada	0,300	0,204

Taula 4.6. Resultats per a la mostra acidulada analitzada a l'inici de l'addició

Aquest experiment també s'ha repetit fent l'extracció del NP passades 24 hores de l'addició d'aquest. Les mostres s'han deixat durant les 24 hores a temperatura ambient.

En la taula 4.7. es mostren els resultats per a les mostres acidulades i analitzades passades 24 hores després de l'addició del NP.

Passades 24 hores	Dosi NP(mg) addicionat	NP(mg) detectats
Mostra acidulada	0,300	0,101

Taula 4.7. Resultats per a la mostra acidulada analitzada passades 24 hores de l'addició

Observant els resultats anteriors, es pot veure que el fet d'acidular la mostra no soluciona la reducció de la concentració a la meitat passades 24 hores de l'addició del nonilfenol. La quantitat de NP detectada a les 24 hores de l'addició continuen sent la meitat, igual que passa en les mostres sense acidular. Per tant es descarta la formació de sals però no es descarta un altre causa d'interacció del NP amb el sòl.

Així doncs, com s'ha pogut comprovar en totes les experiències fetes fins ara, passades les 24 hores de l'addició del nonilfenol la concentració d'aquest disminueix a la meitat. En canvi, en les mostres que s'ha realitzat l'extracció del NP immediatament després de la seva addició s'obtenen recuperacions superiors del 100% excepte en el cas on s'ha acidulat la mostra que s'obté una recuperació del 70%.

5.Resum del capítol

- 1) S'ha desenvolupat un mètode analític per la determinació de nonilfenols en mostres de sòls mitjançant una extracció per ultrasons i posterior anàlisi per cromatografia de gasos acoblat a l'espectròmetre de masses.
- 2) El mètode ha estat validat obtenint els resultats que es presenten a continuació:
 - a) El marge de linealitat és entre 25mg/L i 0,05mg/L que en mostra correspon a 50mg/kg i 0,1mg/kg admetent una variabilitat d'un $\pm 10\%$.
 - b) El límit de detecció assolit és de 0,2 μ g/kg i el límit de quantificació de 0,8 μ g/kg.
 - c) L'exactitud del mètode expressada en percentatge de recuperació és d'un 100%.
- 3) Els resultats obtinguts de les diferents mostres analitzades tant per les mostres de sòl amb compost com per a les mostres de sòl amb torba, demostren que es produeix una degradació del NP amb el pas del temps d'incubació (veure apartat 3.6).
- 4) En totes les mostres s'ha detectat una disminució d'aproximadament del 50% del NP passades 48 hores de l'aplicació del NP.

- 5) S'ha demostrat que passades 48 hores és un punt important en l'evaporació del NP, tenint en compte que en una superfície gran es perd un 10% del NP i passades 240 hores l'evaporació é d'un 16% (veure apartat 4).

- 6) Sembla poder descarta l'extracció incompleta del NP durant el procés d'extracció i purificació de les mostres com a raó de l'alta disminució de la concentració del nonilfenol al temps 0 d'anàlisi.

1.Introducció

Un dels objectius de la present Tesi Doctoral, com ja s'ha dit anteriorment, és investigar les possibles pèrdues del nonilfenol per lixiviació dels sòls esmenats amb matèria orgànica addicionada. El lixiviats estudiats són els procedents de les mescles de sòl i sòl amb torba preparades en el capítol II (veure apartat 3.3 del capítol II). Aquests lixiviats també s'han utilitzat per avaluar la seva toxicitat pels organismes aquàtics. A les mostres de sòls s'afegeix torba en lloc de compost per garantir que els efectes tòxics que es puguin observar siguin conseqüència només del nonilfenol lixiviat. L'objectiu d'addicionar torba al sòl és aportar-hi un 1% addicional de matèria orgànica. La torba és un material que, donat que ha sofert una intensa lixiviació natural, es considera que no aportarà cap toxicitat (veure apartat 5 del present capítol).

Per aquest motiu, és necessària la coordinació tant d'un equip d'analistes de contaminants orgànics com d'un equip especialista en ecotoxicologia. L'ecotoxicologia, és la ciència que estudia els efectes tòxics de les substàncies químiques sobre els organismes vius, especialment sobre poblacions i comunitats dins d'ecosistemes definits.

Malgrat que per a l'anàlisi de NP en lixiviats, s'ha trobat en bibliografia moltes tècniques que realitzen les extraccions en fase sòlida utilitzant cartutxos SPE (1-3), en la present Tesi Doctoral. S'ha posat a punt una metodologia d'anàlisi d'extracció del NP en lixiviats realitzant una extracció líquid-líquid, amb resultats satisfactoris.

Així doncs, els objectius d'aquest capítol són:

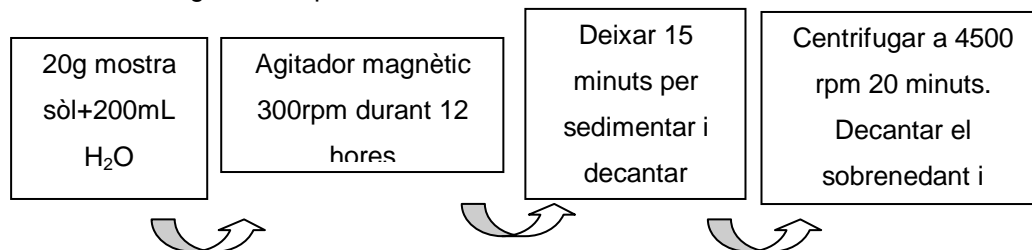
- Posar a punt una metodologia d'anàlisi de NP en els lixiviats dels sòls i de les mescles de sòl amb torba preparades en el capítol II (veure apartat 3.4 del capítol II).
- Determinar el TOC de les mateixes mostres de lixiviats provinents dels sòls i mescles de sòl amb torba preparades també en el capítol II (veure apartat 3.4 del capítol II).
- Realitzar l'assaig de Microtox dels mateixos lixiviats dels sòls i mescles de sòl amb torba analitzats en els punts anteriors, per a comprovar la seva capacitat tòxica.

A continuació, es descriu com s'han obtingut els lixiviats provinents dels sòls i de les mescles de sòl amb torba d'on es realitza l'anàlisi de NP, la determinació del TOC i l'avaluació del Microtox.

1.1.Obtenció dels lixiviats

A continuació es procedeix a fer un breu recordatori de la preparació les mostres d'on es realitzen els lixiviats. Es preparen dos tipus de mescles: 1) mostres de sòl, 2) mostres de sòl amb torba (veure apartat 3.3 del capítol II). A totes les mostres s'addiciona nonilfenol a una concentració equivalent de 25mg/kg i de 50mg/kg. Totes aquestes mostres s'han incubat

durant 32 setmanes com es mostra en la taula 3.2.1 del capítol II de la present Tesi Doctoral. Aquestes mostres han estat incubades al CREAM i el lixiviat també s'ha realitzat al CREAM. Els lixiviats de les mescules, s'han preparat seguint la metodologia estandarditzada al CREAM que consta de les següents etapes:



Esquema 1.1.1. Etapes de la preparació del lixiviat.

Es pesen 20g de mostra humida (aquestes mostres són les mescules de sòls descrites en el capítol II apartat 3.4 de la present Tesi Doctoral) i es col·loquen en una ampolla de vidre d'un litre juntament amb 200 mL d'aigua. Es col·loca a l'agitador magnètic a 300rpm i es deixa durant 12 hores en agitació. Passades les 12 hores es deixa sedimentar 15 minuts i es decanta el sobrenedant en tubs de centrífuga. A continuació, es centrifuga a 4500 rpm durant 20 minuts. Es decanta el sobrenedant i es guarda al congelador fins el moment de la seva anàlisi a l'IQS.

1.2.Determinació de l'ecotoxicitat aquàtica

S'han trobat diferents estudis sobre la toxicitat del NP en organismes terrestres (4-6) i sobre organismes aquàtics (7-9). Un dels objectius de la present Tesi Doctoral, com ja s'ha dit anteriorment, es realitzar l'assaig de Microtox de les mostres de lixiviats.

A més a més, un altre dels assajos realitzats en els lixiviats ha estat determinar l'ecotoxicitat aquàtica del nonilfenol amb diferents grups ecològics. Aquesta ecotoxicitat l'han determinar l'equip especialista en ecotoxicologia de la Universitat de Coimbra. Els resultats obtinguts han sigut útils per tenir una previsió sobre el resultat esperable del Microtox (veure apartat 5) i seguidament, es realitza una breu explicació dels mateixos.

Un cop obtingut el lixiviat es realitzen tests estandarditzats amb espècies representatives de quatre grups ecològics diferents: el descomponedor *Vibrio fischeri* (Microtox Basic Test), el productor primari *Pseudokirchneriella subcapitata* (test OECD 201), el consumidor primari *Daphnia magna* (test OECD 211) i el detritívor bentònic *Chironomus riparius* (test ASTM E 1706-00e2, OECD 218). Els tests es realitzen amb els lixiviats de les incubacions dels sòls a diferents dosis de nonilfenol i a diferents temps, començant per la primera setmana d'incubació del NP, i acabant quan no s'enregistrava toxicitat sobre els organismes en dos mostres consecutius.

El resultat és que no es detecten efectes significatius en cap dels lixiviats per *V. fischeri*, *P. subcapitata*, *C. riparius* o *D. magna* en les dos primeres setmanes d'incubació. Per tant no es realitzen més tests en els lixiviats de les incubacions posteriors a les dues primeres setmanes.

És per aquest motiu que només s'han preparat i analitzat les mostres de lixiviats provinents dels sòls incubats les setmanes 0,1 i 2 (veure taula 3.2.1 del capítol II). Aquestes incubacions corresponen a 24 hores després de l'inici de la incubació del NP, una setmana i dues setmanes d'incubació. D'aquests lixiviats s'ha realitzat l'anàlisi del NP, la determinació del TOC i l'assaig de Microtox (veure apartat 3, 4 i 5 respectivament del present capítol).

2.Desenvolupament d'un mètode d'anàlisi de nonilfenols en lixiviats

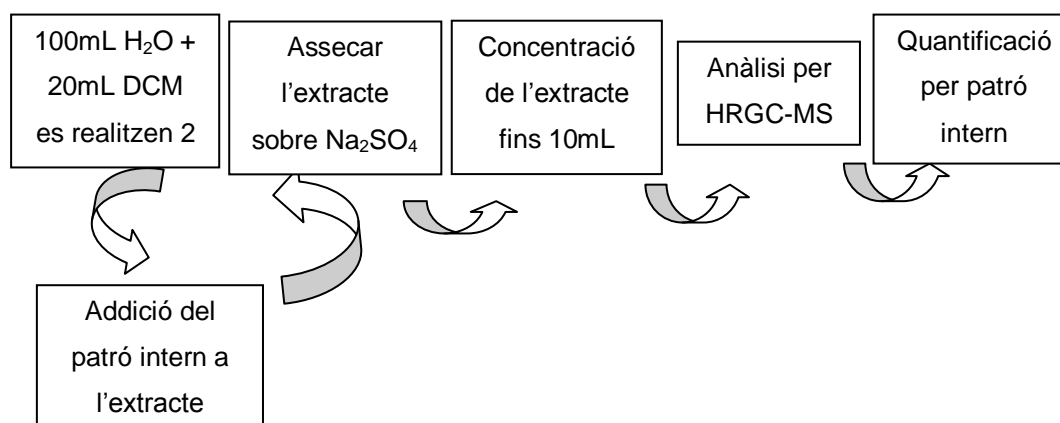
En aquest apartat es presenta la posada a punt de la metòdica d'anàlisi de NP en les mostres de lixiviats provinents del sòl.

Per això, s'ha tingut en compte el següent aspecte; com que prèviament no es coneixia quina seria la concentració de NP que es podria trobar en el lixiviat, s'ha realitzat la següent aproximació. Tenint en compte que en les mostres de sòls analitzades en el capítol II, el màxim de NP trobat és de 40mg/kg en el sòl (veure taula 3.6.1 del capítol II) i el mínim és de 0,5mg/kg en el sòl (veure taula 3.6.1 del capítol II) i suposant que tot el NP passi al lixiviat, significa que la concentració màxima de NP en el lixiviat podria ser de 4mg/L i la mínima de 0,05mg/L.

Així doncs, per a desenvolupar el mètode d'anàlisi de NP s'han preparat dos mostres d'aigua on s'ha addicionat el NP. La primera mostra d'aigua conté una concentració de NP de 4mg/L, que correspon al nivell alt. La segona mostra d'aigua conté una concentració de NP de 0,4mg/L, que correspon al nivell baix. Aquesta segona mostra d'aigua és més concentrada de la calculada a l'inici per comoditat en la posada a punt del mètode.

A més a més, també s'ha preparat una mostra d'aigua on no s'ha afegit NP. El patró intern que s'ha utilitzat és el 4-n-heptilfenol, el mateix que s'ha utilitzat per a la metòdica d'anàlisi de NP en sòls del capítol II de la present Tesi Doctoral.

Amb la finalitat de posar a punt el mètode d'extracció de NP en mostres de lixiviat i per tal de veure les extraccions que són necessàries per extreure tot el NP, s'ha desenvolupat una metòdica d'extracció del NP en l'aigua. Per tant, els passos a seguir per a les mostres d'aigua on s'ha afegit NP són els que es mostren en l'esquema 2.1:



Esquema 2.1. Mètode d'anàlisi de nonilfenol en les mostres d'aigua. DCM: diclorometà

L'extracció líquid-líquid del NP s'ha fet de la següent manera:

En un embut de decantació s'han afegit 100mL d'aigua on s'ha addicionat 5mL d'un patró de NP d'una dissolució de 80mg/L en DCM (mostra corresponent al nivell alt). Paral·lelament en un altre embut de decantació, també s'ha afegit 100mL d'aigua on s'ha addicionat 5mL d'un patró de NP d'una dissolució de 8mg/L en DCM (mostra corresponent al nivell baix).

A continuació, tant per la mostra de nivell alt com per la de nivell baix, s'han fet dues extraccions amb 20mL de DCM. Un cop juntes les dues extraccions s'ha afegit 1mL de patró intern d'una concentració de 40mg/L en DCM. Seguidament, s'ha assecat sobre Na_2SO_4 i s'ha filtrat. L'extracte s'ha evaporat fins a 10mL al rotavapor i s'injecta al HRGC-MS. A més a més, s'ha realitzat una tercera extracció per comprovar si s'ha extret tot el NP de l'aigua.

Com es pot veure en l'esquema 2.1, la metòdica consisteix en realitzar un extracció, purificació i concentració de la mostra on s'acaba concentrant 10 vegades l'extracte.

Les condicions cromatogràfiques desenvolupades per a la quantificació del NP en les mostres dels lixiviats mitjançant HRGC-MS en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*) són les que es mostren a continuació:

- Equip: Agilent Technologies 6890 N
- Espectròmetre de masses: Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
- Columna: Agilent Technologies - 5MS 5% fenil 95% metilpolisiloxano (30m, 0,25mm, 0,25 μm)
- Temperatura inicial: 100°C
- Temps inicial: 2 minuts
- Rampa de temperatura: 20°C/min
- Temperatura final: 280°C
- Temps final: 10 minuts
- Injector: 250°C mode *splitter* 10:1 flux: 10 mL/min
- Volum injecció: 2 μL

Condicions de l'espectròmetre de masses:

- Mode adquisició: SIM
- Masses (m/z): 135 i 192
- Mode ionització: E.I.
- Temperatura interfase: 150°C
- Temperatura de la font de ions: 230°C
- Solvent Delay: 5 minuts

A continuació, la figura 2.1 correspon a un cromatograma de la mostra d'aigua addicionada a nivell baix (0,4mg/L) i del patró intern de la mateixa concentració. Aquest mostra s'ha injectat en les condicions descrites anteriorment, on s'han extret els ions 135 que correspon al NP i el 192 que correspon al patró intern.

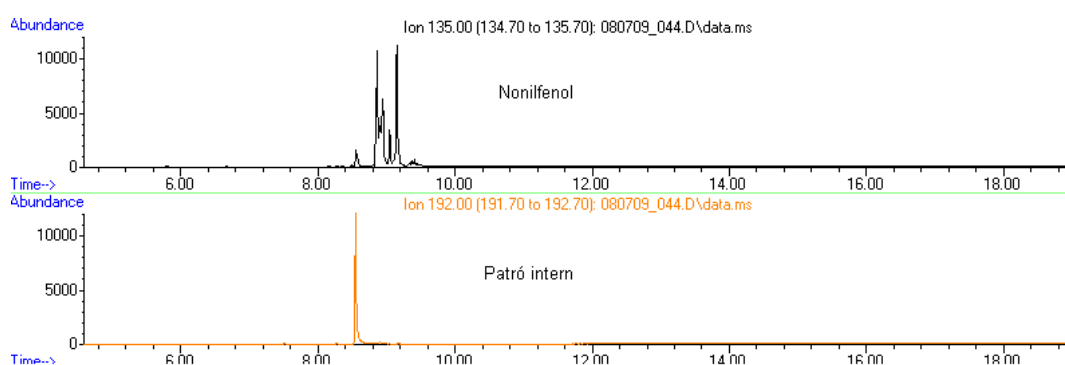


Figura 2.1. Cromatograma en mode SIM de la mostra d'aigua addicionada amb NP extraient els ions 135 i 192 corresponents al NP i al patró intern, respectivament.

A continuació, en la taula 2.1 es presenten les recuperacions del NP obtingudes de la primera i segona extracció tant per a la mostra d'aigua addicionada a nivell alt com per la mostra d'aigua addicionada a nivell baix, i de la tercera extracció també pels dos nivells. S'han fet dues repeticions de cada mostra i dos injeccions per a cada repetició.

Mostres d'aigua preparades	Recuperació (%) nivell alt	Recuperació (%) nivell baix
Primera i segona extracció líquid-líquid	107	100
Tercera extracció líquid-líquid	0,5	1,5

Taula 2.1. Recuperacions (%) del NP per a les tres extraccions líquid-líquid

Com es pot veure en la taula 2.1, les recuperacions del NP són completes tant per les mostres d'aigua addicionades a nivell alt com per les de nivell baix en les dos primeres extraccions. En canvi en la tercera extracció les concentracions són molt baixes, fet que demostra que el NP ja s'ha extret anteriorment. És per aquest motiu que es decideix suprimir la tercera extracció. Així doncs, aquest serà el mètode que s'aplicarà a les mostres de lixiviats, realitzant només dos extraccions líquid-líquid.

A continuació es procedeix a la validació del mètode analític per a l'extracció de NP en els lixiviats del sòls.

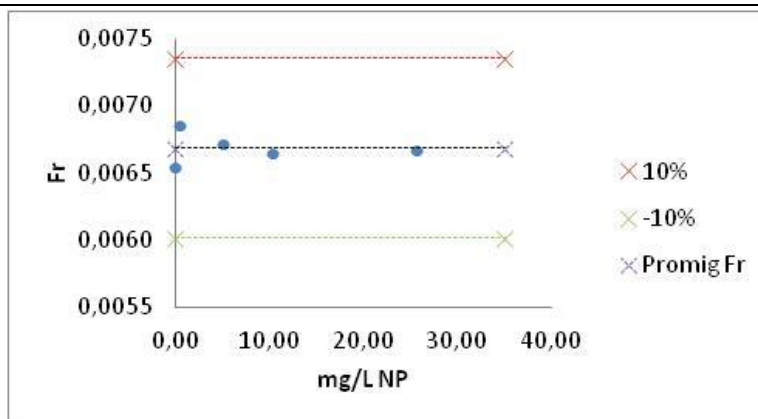
2.1. Validació del mètode analític

Els paràmetres de validació estudiats pel mètode analític són: a)linealitat, b)límit de detecció i quantificació i c)recuperació. La linealitat i límit de detecció i quantificació s'han realitzat amb patrons de NP, en canvi l'estudi de la recuperació del NP s'ha realitzat a partir d'aigua sobre la que s'ha addicionat el NP.

En primer lloc, es preparen les solucions mare de NP d'una concentració de 50mg/L i un altre solució mare de patró intern d'una concentració de 25mg/L totes dues solucions en diclormetà. S'han preparat solucions patrons de treball de les concentracions següents: 25, 10, 5, 0,5 i 0,05mg/L a partir de dilucions de la mare de NP. A tots aquests patrons s'ha afegit el patró intern a una concentració de 12,5mg/L en dissolució. S'ha decidit preparar aquestes concentracions perquè es situen dins del rang de concentracions esperables en mostres de lixiviats tenint en compte les condicions explicades en l'apartat anterior.

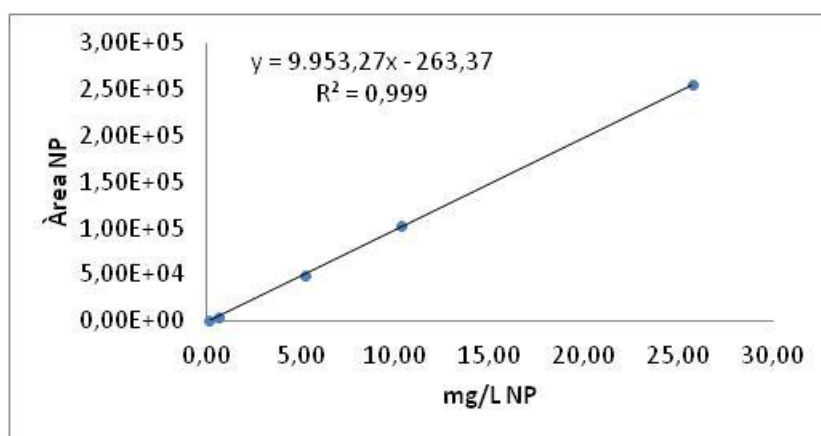
a) Linealitat

El marge de linealitat es defineix com aquell interval en el que la sensibilitat, és a dir, la relació entre el senyal obtingut i la concentració, es manté constant. S'analitzen els patrons descrits anteriorment de diferents concentracions i es representa el factor de resposta vs concentració ($Fr = \text{Conc NP} \cdot \text{Àrea PI} / \text{Conc. PI} \cdot \text{Àrea NP}$). El marge de linealitat s'expressa com el rang de concentració amb una variabilitat del $\pm 10\%$ del factor de resposta. Cal destacar que el valor del factor de resposta més allunyat respecte el promig és d'un 2%. El gràfic 2.1.1. mostra els resultats obtinguts en l'estudi de linealitat.



Gràfic 2.1.1. Factors de resposta per a les diferents concentracions dels patrons i gràfic dels factors de resposta (Fr) vs la concentració.

En el gràfic 2.1.2. es pot veure la linealitat dins del rang de concentracions estudiat.



Gràfic 2.1.2. Gràfic de concentració de NP vs àrea del NP.

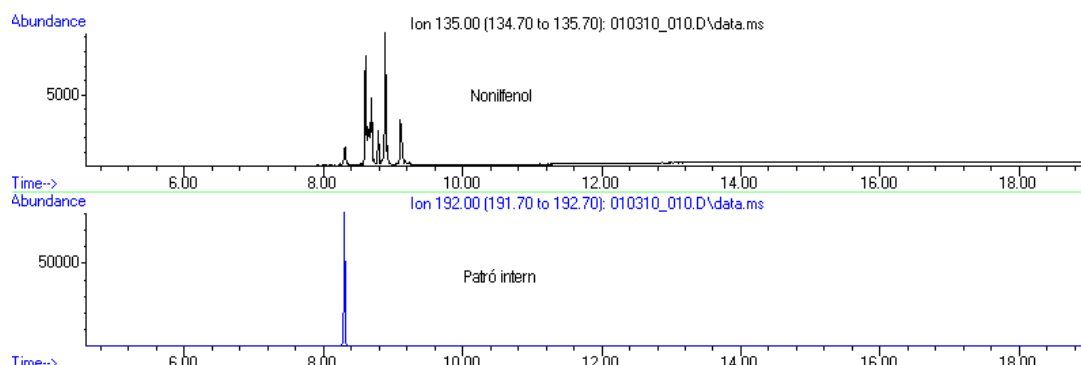
Així doncs, es pot concloure que el comportament del NP és lineal dins el marge estudiat, és a dir entre 25mg/L i 0,05 mg/L, admetent una variabilitat d'un $\pm 10\%$.

b) Límit de quantificació (LQ) i límit de detecció (LD)

Com ja s'ha dit, el LQ es defineix com la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de determinar en el marge de treball. Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a deu vegades l'alçada del soroll. El LD es defineix com la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de detectar, és a dir, que proporciona un senyal diferenciable del soroll. Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a tres vegades del soroll.

El càlcul del LD i LQ s'ha fet amb el cromatograma d'un patró de 0,05mg/L de NP, que és el que es mostra en la figura 2.1.3. En aquest cromatograma s'han extret els ions 135 i 192 corresponents al NP i al patró intern respectivament. La integració dels pics s'ha realitzat de la

següent manera; en el cas del nonilfenol, que és el cromatograma corresponent a l'extracció del ió 135, s'ha integrat tota la banda de pics corresponent al NP des del minut 8,5 fins al minut 9,5. En el cas del patró intern corresponent al pic de l'extracció del ió 192, s'ha integrat des del minut 8,4 fins al 8,7. Aquesta integració s'ha realitzat en tots els cromatogrames obtinguts per a totes les mostres del lixiviats.



Gràfic 2.1.3. Cromatograma corresponent al patró de 0,05mg/L

En la taula 2.1.1. es mostra els resultats obtinguts en l'estudi del límit de quantificació i de detecció. Malgrat que aquest patró està allunyat del LD s'ha fet una estimació del LD i LQ per extrapolació.

Paràmetre	Valor ($\mu\text{g/L}$)
LQ	0,4
LD	0,1

Taula 2.1.1. Valors de LD i LQ pel mètode d'anàlisi de NP mitjançant HRGC-MS

c) Recuperació

Amb la finalitat de complementar la posada a punt del mètode, tenint en compte que ja s'ha demostrat que només són necessàries dos extraccions líquid-líquid, s'aplica el mètode d'addicions de patró a dos concentracions diferents. Les concentracions adicionades són de les corresponents al nivell alt i nivell baix de NP en mostres d'aigua. És a dir, d'una concentració de 4mg/L i 0,4mg/L en aigua. Com ja s'ha dit anteriorment, el NP s'ha quantificat per patró intern fent dos repeticions de cada nivell de concentració i cada mostra d'aigua s'ha injectat dues vegades.

La preparació d'aquests dos mostres d'aigua per a l'estudi de les recuperacions mitjançant una extracció líquid-líquid, és la que es descriu en l'esquema 2.1.

Cal dir que cada mostra s'ha injectat per duplicat al HRGC-MS. A continuació en la taula 2.1.3. es mostren les recuperacions obtingudes per aquests mostres d'aigua adicionades amb NP:

	Mostra d'aigua 1 Nivell alt	Mostra d'aigua 2 Nivell alt	Mostra d'aigua 3 Nivell baix	Mostra d'aigua 4 Nivell baix
Recuperacions (%) NP	107	100	102	101

Taula 2.1.3. Recuperacions (%) del NP en les mostres d'aigua preparades tant pel nivell alt com pel nivell baix

Com es pot veure en la taula 2.1.3. les recuperacions obtingudes són satisfactòries. Per tant, tenint en compte tots els punt estudiats en la validació del mètode analític, es pot concloure que les condicions són adequades per poder procedir a l'anàlisi de nonilfenol en les mostres dels lixiviats provinents de les mostres de sòls analitzades prèviament en el capítol II de la present Tesi Doctoral.

Un aspecte a destacar d'aquesta metòdica d'anàlisi posada a punt en la present Tesi Doctoral és que s'ha utilitzat en el "Circuit d'exercicis d'intercomparació dels establiments tècnics auxiliars de l'agència catalana de l'aigua" l'Octubre del 2009 on s'ha analitzat el 4-nonilfenol en lixiviats, obtenint un bon resultat, ja que de 33 laboratoris que han donat resultat l'IQS ha obtingut una $Z=-0,4$, el que confirma la validesa del mètode posat a punt.

3.Anàlisi de la concentració de nonilfenol en els lixiviats obtinguts a partir de les mescles de sòl amb torba.

Un cop validat el mètode d'anàlisi de NP en aigua, es procedeix a realitzar l'extracció del NP en les mostres dels lixiviats dels sòls. A continuació es realitza un recordatori de quines mostres s'han fet els lixiviats. Com ja s'ha explicat en el capítol II de la present Tesi Doctoral, s'han preparat mostres addicionades amb NP a una concentració de 50mg/kg i unes altres addicionades a una concentració de NP de 25mg/kg. Aquesta addició s'ha fet en mostres de sòl i mescles de sòl amb torba, per tant s'obtenen els lixiviats d'aquestes mostres que corresponent a les setmanes d'incubació 0,1 i 2. Aquests lixiviats s'han etiquetat igual que les mostres de sòls (capítol II apartat 3.2) i són les que descriuen a continuació en la taula 3.1 i 3.2.

Lixiviats de les mescles de sòl amb torba (Dosi baixa)	Lixiviats de les mescles de sòl amb torba (Dosi alta)
H1_1 setmana 0	H2_1 setmana 0
H1_2 setmana 1	H2_2 setmana 1
H1_3 setmana 2	H2_3 setmana 2

Taula 3.1. Etiquetatge de les mostres dels lixiviats provinents de les mescles de sòl amb torba

Lixiviats del sòl (Dosi baixa)	Lixiviats del sòl (Dosi alta)
S1_1 setmana 0	S2_1 setmana 0
S1_2 setmana 1	S2_2 setmana 1
S1_3 setmana 2	S2_3 setmana 2

Taula 3.2. Etiquetatge de les mostres dels lixiviats provinents del sòl

Aquestes són les dotze mostres dels lixiviats on s'ha fet l'extracció del NP. El lixiviat s'ha preparat seguint l'esquema 1.1.1. Un cop obtingudes les mostres dels lixiviats, es disposa de 200mL de mostra, és per això que s'ha decidit realitzar l'extracció líquid-líquid del NP (esquema 2.1) aprofitant els 200mL de mostra de lixiviat.

Així doncs, utilitzant els 200mL de mostra de lixiviat, i fent l'aproximació explicada en l'apartat 2 del màxim i mínim de NP que es pot trobar en els lixiviats, s'arriba a la suposició que el màxim de NP que pot passar al lixiviat és de 8mg/L (nivell alt). En canvi, la concentració de NP mínima que pot passa al lixiviat és de 0,1mg/L (nivell baix).

A continuació es descriu la preparació dels patrons i els resultats de les mostres de lixiviat analitzades amb el mètode validat anteriorment.

- **Preparació dels patrons**

Un cop fetes les suposicions anteriors, s'ha decidit preparar dos patrons de NP. El primer corresponent al nivell alt calculat anteriorment i l'altre al nivell baix.

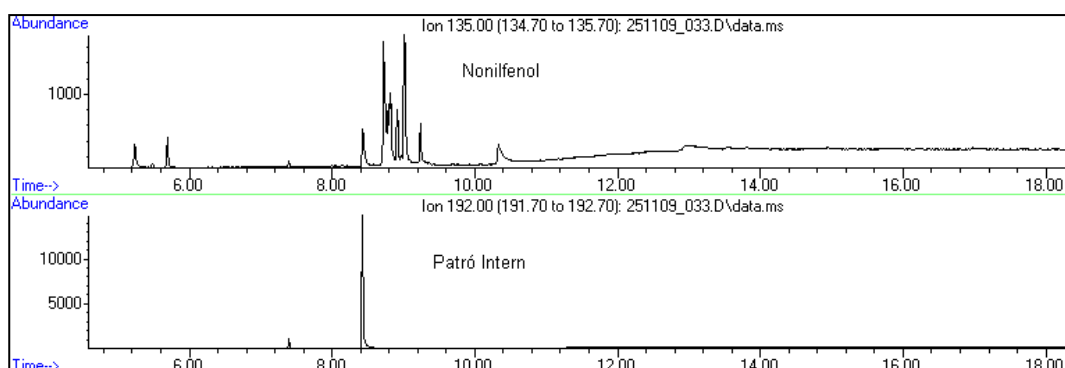
Així doncs, els patrons que es preparen són un de nivell alt d'una concentració de 80mg/L en DCM i l'altre patró de nivell baix de 8mg/L en DCM. El patró intern és d'una concentració de 8mg/L també en DCM.

- **Resultats de NP en les mostres de lixiviats**

Les mostres de lixiviats i patrons s'han analitzat mitjançant HRGC-MS en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*) per augmentar la sensibilitat i evitar interferències (veure apartat 2).

A continuació, a mode d'exemple d'un cromatograma obtingut per a les mostres de lixiviat, es mostra el gràfic 3.1.3 corresponent a la mostra de lixiviat S2_2, és a dir, és el lixiviat d'una mostra de sòl addicionat amb 50mg/kg de NP i incubada fins a la setmana 1.

Gràfic 3.1.3. Cromatograma del lixiviati S2_2.



Als lixiviats corresponents de les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba addicionades amb 50mg/kg de NP, és a dir les mostres: S2 i H2, s'ha realitzat la quantificació del NP utilitzant les àrees del patró de nivell alt de NP descrit anteriorment, que equival a una concentració de 40mg/L en l'extracte final.

En canvi, a les mostres de lixiviats corresponents a les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba addicionades amb 25mg/kg de NP, és a dir les mostres: S1 i H1 s'ha realitzat la quantificació del NP utilitzant les àrees del patró de nivell baix de NP descrit també anteriorment, que equival a una concentració de 4mg/L en l'extracte final.

En les taules 3.3, 3.4, 3.5 i 3.6 es mostren els resultats de la concentració de NP en les mostres de lixiviats

Lixiviati de les mescles de sòl amb torba (Dosi baixa)	mg/L NP en el lixiviati
H1_1 setmana 0	0,023
H1_2 setmana 1	0,016
H1_3 setmana 2	0,012

Taula 3.3. Concentració de NP en els lixiviats de les mescles sòl amb torba per a la dosi baixa

Lixiviati de les mescles de sòl amb torba (Dosi alta)	mg/L NP en el lixiviati
H2_1 setmana 0	0,063
H2_2 setmana 1	0,035
H2_3 setmana 2	0,026

Taula.3. 4. Concentració de NP en els lixiviats de les mescles sòl amb torba per a la dosi alta

Lixiviats de les mostres de sòl (Dosi baixa)	mg/L NP en el lixiviats
S1_1 setmana 0	0,048
S1_2 setmana 1	0,016
S1_3 setmana 2	0,010

Taula 3.5. Concentració de NP en els lixiviats de les mostres de sòl per a la dosi baixa

Lixiviats de les mostres de sòl (Dosi alta)	mg/L NP en el lixiviats
S2_1 setmana 0	0,111
S2_2 setmana 1	0,052
S2_3 setmana 2	0,013

Taula 3.6. Concentració de NP en els lixiviats de les mostres de sòl per a la dosi alta

Observant els resultats presentats en les taules anteriors (de la 3.3 a 3.6), es pot veure que la concentració de nonilfenol que es lixivava del sòl i de la mescla de sòl amb torba no suposa un problema d'aportació de contaminació significativa, ja que la concentració de NP és baixa, entre un 0,01mg/L - 0,1mg/L. Aquests lixiviats, per tant, complirien la Norma UNE per a lixiviats de sòls, que estableix un màxim de 1mg/L de NP en els lixiviats (Norma UNE UNE_EN 12457-4).

A continuació, s'ha calculat el percentatge de nonilfenol que s'ha lixiviat respecte la quantitat de NP trobat en les mostres de sòl i mesclades de sòl amb torba (veure taula 3.6.1 del capítol II). Aquests percentatges són els que es mostren en les taules 3.7, 3.8, 3.9 i 3.10.

Lixiviats de les mesclades de sòl amb torba (Dosi baixa)	% NP lixiviat
H1_1 setmana 0	3,7
H1_2 setmana 1	3,7
H1_3 setmana 2	5,1

Taula 3.7. Percentatge de nonilfenol recuperat en les mostres de lixiviats de les mesclades de sòl amb torba per a la dosi baixa.

Lixiviat de les mescles de sòl amb torba (Dosi alta)	% NP lixiviat
H2_1 setmana 0	3,2
H2_2 setmana 1	4,1
H2_3 setmana 2	4,5

Taula 3.8. Percentatge de nonilfenol recuperat en les mostres de lixiviats de les mescles de sòl amb torba per a la dosi alta.

Com es pot veure en les dues taules anteriors, la quantitat de NP extreta per l'aigua en el lixiviat és entre un 3-5%.

A continuació es mostren dos taules més corresponents a les mostres de sòl tant per a la dosi alta com per a la dosi baixa.

Lixiviat de les mostres de sòl (Dosi baixa)	% NP lixiviat
S1_1 setmana 0	7,5
S1_2 setmana 1	4,7
S1_3 setmana 2	9,4

Taula 3.9. Percentatge de nonilfenol recuperat en les mostres de lixiviats del sòl per a la dosi baixa

Lixiviat de les mostres de sòl (Dosi alta)	% NP lixiviat
S2_1 setmana 0	6,8
S2_2 setmana 1	10,6
S2_3 setmana 2	8,5

Taula 3.10. Percentatge de nonilfenol recuperat en les mostres de lixiviats del sòl per a la dosi alta

En el cas del sòl sense torba, en el lixiviat s'extreu una quantitat major que en les mescles de sòl amb torba, concretament entre un 5-10%.

Un fet a destacar és que, comparant la taula 3.7 amb la taula 3.9, la quantitat de NP extret en el lixiviat és major per les mostres de la taula 3.9. Entre aquestes dues taules, l'única diferència és que les mostres de la taula 3.7 tenen torba. Aquest fet es repeteix comparant la taula 3.8 amb la taula 3.10. Per tant, es pot concloure que la torba té un efecte important sobre l'extracció del NP en el lixiviat, ja que la quantitat de NP extreta és menor en presència de torba.

Un cop vistos els resultats anteriors, es poden concloure dos aspectes importants:

- Com es pot observar en les taules 3.7, 3.8, 3.9 i 3.10, la quantitat de NP extret en els lixiviats són baixos.

Tot i que el NP té una solubilitat baixa, concretament de 4,9mg/L, és suficient per poder dissoldre's en l'aigua. Per tant, s'hauria de lixiviar més NP en les mostres d'aigua. Així doncs, la solubilitat no és l'únic factor a tenir en compte en els baixos percentatges de recuperació del NP.

- Un altre factor a tenir present, és que el NP com tot tensioactiu, té una part hidròfoba i una altre part hidròfila. Així doncs, la part hidròfoba del NP té la capacitat de poder interaccionar amb la matèria orgànica i la part hidròfila del NP interacciona amb fracció mineral del sòl. Per tant, aquesta característica del NP fa que aquest es quedi més retingut en el sòl i no passi al lixiviat malgrat que la quantitat d'aigua que s'aporta és suficient per dissoldre el producte. El fet de què quan hi ha torba l'extracció sigui més baixa, fa pensar que l'interacció més significativa és la del tensioactiu amb la matèria orgànica del sòl.

Com s'ha explicat l'extracció de NP en els lixiviats de les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba, s'associa a una combinació dels dos aspectes comentats anteriorment.

Un cop quantificat el NP del les mostres de lixiviats es procedeix a realitzar l'anàlisi del TOC.

4.Anàlisi del TOC en els lixiviats de les mescles de sòl i torba.

El carboni orgànic total (TOC) és un paràmetre que expressa directament el contingut de matèria orgànica total en una mostra d'aigua i és molt important per a poder determinar el grau de contaminació orgànica existent en l'aigua. Per exemple, tota legislació mediambiental estableix que la indústria ha de controlar la càrrega de matèria orgànica de les seves aigües residuals abans de descarregar-les a les xarxes de distribució pública.

El carboni orgànic de les aigües netes i residuals corresponen a una diversitat de compostos orgànics en diferents estats d'oxidació. L'anàlisi del TOC es realitza amb l'aparell TOC-V_{CSH}/TOC-V_{CSN} (TOC-V) SHIMADZU que és un instrument que mesura la quantitat total de carboni (TC), carboni inorgànic (IC) i carboni orgànic total (TOC) en aigua.

Es defineix com a carboni total (TC) al carboni contingut en l'aigua en forma de carboni orgànic, inorgànic i partícules de carbó. S'entén per carboni inorgànic (IC) al carboni present en l'aigua en forma de carbonat, bicarbonat i diòxid de carboni. El carboni orgànic total (TOC) és el contingut en l'aigua en forma de carboni orgànic.

L'equip TOC-V disposa de tres mètodes per a realitzar l'anàlisi del TOC:

- Mètode TOC=TC-IC
- Mètode NPOC
- Mètode NPOC+POC=TOC

El mètode utilitzat en la present Tesi Doctoral per l'anàlisi del TOC en els lixiviats és el $\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$, per tant és el que es descriu a continuació.

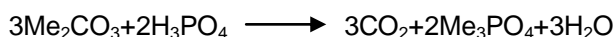
$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

Equació 4.1. Obtenció del TOC a partir de la diferència del TC i l'IC

El TC es converteix en CO_2 per combustió i acidificació. La mostra es crema en el tub de combustió per formar CO_2 . El gas portador, que arrossega el CO_2 i altres productes de combustió, flueix des del tub de combustió al deshumidificador on és escalfat i deshidratat. Passa a través d'un depurador d'halògens i quan arriba a la cel·la d'analitzador de gas infraroig no dispersiu (NDIR), es detecta el CO_2 . El resultat de la detecció del CO_2 pel NDIR és un pic. L'àrea d'aquest pic es mesura amb el processador de dades i és proporcional a la concentració de TC que hi ha a la mostra.

A les mesures de TC d'una sèrie de solucions estàndard s'ajusta l'equació d'una recta que expressi la relació entre concentració de TC i l'àrea del pic, d'aquesta manera es pot calcular la concentració de TC d'una mostra a partir de l'àrea mesurada.

L'IC es converteix en CO_2 per acidificació. Acidificant la mostra amb una petita quantitat d'àcid fosfòric s'obté un pH inferior a 3, en aquest pH tot el carbonat es transforma en diòxid de carboni segons les reaccions 4.1 i 4.2:



Reaccions 4.1 i 4.2. Reaccions d'acidificació per a l'obtenció de CO_2

El CO_2 format i el CO_2 dissolt a la mostra s'arrossegueu per bombeig de gas (oxigen 5.0) a través de la mostra. Es detecta el CO_2 de la mostra amb el NDIR.

L'objectiu d'aquest apartat és determinar el TOC de les mostres de lixiviats provinents de les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba corresponents a les setmanes 0, 1 i 2. Les mostres de lixiviats analitzades són les mateixes que en l'apartat anterior s'ha quantificat el NP. Amb aquest anàlisi es pot comprovar l'evolució de la matèria orgànica en les diferents setmanes.

Es preveu que les mostres de lixiviats provinents de les mescles de sòl amb torba han de donar un TOC superior a les mostres de lixiviats provinents del sòl, ja que l'objectiu de barrejar sòl amb torba és per aportar més matèria orgànica al sòl, concretament un 1% més.

Per a la determinació del TOC, primer s'ha analitzat una mostra de lixiviat provinent d'una mescla de sòl amb torba sense addicionar NP i el mateix pel cas de la mostra de lixiviat provinent del sòl. Les anàlisi del TOC de les mostres de lixiviats s'han fet per duplicat i s'han filtrat a través d'un filtre de nylon de 0,45 μm abans de processar-les pel TOC.

A continuació es mostren els resultats de la determinació del TOC per a les mostres de lixiviats provinents del sòl i mescles de sòl amb torba addicionats a nivell alt, corresponent a la dosi de 50mg/kg. També es mostren els resultats de les addicions a nivell baix, corresponents a la dosi

de 25mg/kg. A més a més, també s'ha realitzat l'anàlisi del TOC de les mostres de lixiviats provinents del sòl i la mescla de sòl amb torba sense addicionar NP.

Lixiviats mescles sòl amb torba		TOC mg/L		
Mostres control (sense NP)		30,50		
Dosi alta	Setmana 0	24,92	Promig	21,59
	Setmana 1	23,09		
	Setmana 2	16,78		
Dosi baixa	Setmana 0	24,65	Promig	21,85
	Setmana 1	23,23		
	Setmana 2	17,69		

Taula 4.1. Lixiviats del sòl i torba de dosi alta (corresponents a H2_1, H2_2 i H2_3, setmana 0, setmana 1 i setmana 2, respectivament) i dosi baixa (corresponents a H1_1, H1_2 i H1_3, setmana 0, setmana 1 i setmana 2, respectivament).

Lixiviats del sòl		TOC mg/L		
Mostres control (sense NP)		30,90		
Dosi alta	Setmana 0	18,83	Promig	13,97
	Setmana 1	10,83		
	Setmana 2	12,26		
Dosi baixa	Setmana 0	21,17	Promig	17,60
	Setmana 1	21,14		
	Setmana 2	10,49		

Taula 4.2. Lixiviats del sòl de dosi alta (corresponents a S2_1, S2_2 i S2_3, setmana 0, setmana 1 i setmana 2, respectivament) i dosi baixa (corresponents a S1_1, S1_2 i S1_3, setmana 0, setmana 1 i setmana 2, respectivament).

Observant els resultats de les taula 4.1 i 4.2 per a les mostres de lixiviats del sòl i de les mescles de sòl amb torba, es pot destacar el següent aspecte:

- Com ja es preveia des d'un inici, en les mostres de lixiviats de les mostres de sòl que no tenen torba (taula 4.2), és a dir, les S2_1, S2_2, S2_3, S1_1, S1_2 i S1_3, tenen un menor valor de TOC respectes a les que tenen torba (taula 4.1). Aquest fet s'explica perquè la torba aporta una part de matèria orgànica al sòl que es reflexa en el TOC.

Així doncs, els resultat de la determinació de TOC són baixes i comparant els resultats obtinguts de TOC amb el límits màxims que permet la legislació és conclou que aquestes mostres de lixiviats es podrien descarregar per la xarxes de distribució pública, ja que el màxim permès és de 450mg C/L (10) i cap de les mostres analitzades superen aquests límits.

A continuació es procedeix a descriure l'assaig de Microtox per avaluar si la matèria orgànica dels lixiviats és tòxica.

5. Assaig de toxicitat per bioluminescència: Microtox

El microtox és un dels bioassaig més utilitzats per avaluar la toxicitat. El MicrotoxTM va ser patentat per AZUR Environmental (basat en Normas: ASTM D 5660-95, AFNOR T90-320 i DIN

38412). Aquest assaig s'utilitza per avaluar l'efecte toxicològic en lixiviats aquosos obtinguts a partir de residus.

En el present treball s'ha avaluat la possible toxicitat de les mostres de lixiviats provinents de les mostres de sòl i de les mescles sòl amb torba. És a dir de les mateixes mostres que s'ha realitzat la quantificació del NP en el lixiviats (veure apartat 3) i que també han sigut les mateixes mostres de lixiviats on s'ha determinat el TOC (veure apartat 4). En la taula 5.1 i 5.2, es mostra l'etiquetatge (veure apartat 3.2 del capítol II) dels lixiviats de mostres de sòls i de les mescles de sòl amb torba.

Lixiviats de les mescles de sòl amb torba (Dosi baixa)	Lixiviats de les mescles de sòl amb torba (Dosi alta)
H1_1 setmana 0	H2_1 setmana 0
H1_2 setmana 1	H2_2 setmana 1
H1_3 setmana 2	H2_3 setmana 2

Taula 5.1. Etiquetatge de les mostres de lixiviats provinents de les mescles de sòl amb torba

Lixiviats del sòl (Dosi baixa)	Lixiviats del sòl (Dosi alta)
S1_1 setmana 0	S2_1 setmana 0
S1_2 setmana 1	S2_2 setmana 1
S1_3 setmana 2	S2_3 setmana 2

Taula 5.2. Etiquetatge de les mostres de lixiviats provinents del sòl

A més a més de les dotze mostres de lixiviats provinents dels sòls, també s'ha avaluat la toxicitat d'una mostra de lixiviats provinents de sòl sense afegir NP i d'una altra mostra de lixiviats provinents d'una mescla de sòl amb torba.

L'assaig de toxicitat Microtox utilitza soques liofilitzades del bacteri marí luminescent, *Photobacterium phosphoreum* NRRL-B-11177, com a organisme de prova per a determinar la toxicitat d'una mostra aquosa. Aquests bacteris emeten llum en condicions normals, com a conseqüència d'una sèrie de reaccions metabòliques que alliberen energia en forma de llum visible. El contacte amb substàncies tòxiques presents en la mostra provoca danys en els bacteris que es tradueix en una reducció de llum emesa que és proporcional a la toxicitat de la mostra (11).

Aquest assaig s'ha dut a terme en un Analitzador Microtox Model 500, que manté el bacteri luminescent i les mostres a una temperatura adequada, 5 i 15°C respectivament. L'objectiu és mesurar la reducció d'emissió de llum dels microorganismes en resposta a un temps d'exposició de 15 minuts. El processament i anàlisi dels resultats es realitza a través del software MicrotoxOmni™.

Els assajos de toxicitat dels lixiviats s'han realitzat per duplicat. Prèviament a la realització d'aquest assaig, s'han filtrat totes les mostres a través d'un filtre de nylon de 0,45µm.

La toxicitat de la mostra generalment s'expressa com a concentració efectiva 50% (EC₅₀), és a dir, la concentració de la mostra que en contacte amb el bacteri redueix l'emissió de llum al 50%. A partir dels valors de EC₅₀, es calculen els índex d'impacte de la toxicitat (TII₅₀) de la manera exposada en l'equació 5.1.

$$TII_{50} = (EC_{50})^{-1} * 100$$

Equació 5.1. Càlcul de la TII₅₀

La TII₅₀ permetrà comparar l'impacte tòxic de les mostres dels lixiviats sense coneixement previ dels seus compostos. Com més tòxic és el lixiviat, major inhibició de la luminescència i del valor de TII₅₀.

Cal tenir en compte que els extractes aquosos només contenen els contaminants solubles en aigua i per tant, els seus efectes sobre la *Photobacterium phosphoreum* només proporciona una estimació de la toxicitat dels contaminants solubles en aigua.

5.1 Assaig de toxicitat de les mostres de lixiviats

Aquesta avaluació de la toxicitat de les mostres de lixiviats s'ha realitzat de la següent manera:

- Les primeres mostres de lixiviat on s'ha avaluat la toxicitat són les mostres dels lixiviats provinents del sòl i de les mescles de sòl amb torba on no s'ha addicionat NP.
- A continuació, s'ha avaluat la toxicitat de les mostres dels lixiviats provinents del sòl i de les mescles de sòl amb torba on s'ha addicionat NP a dos nivells de concentració, 50mg/kg (dosi alta) i 25mg/kg (dosi baixa).
- Finalment, amb l'objectiu d'utilitzar el mètode per determinar la toxicitat del NP en aigua, s'han preparat dos mostres de diferents concentracions de NP, on també s'ha avaluat la toxicitat.

Cal recordar que des d'un inici s'ha decidit fer les mescles de sòl amb torba perquè s'ha suposat que la torba no aporta toxicitat, a diferència del compost del que no es pot descartar. És per això que en aquest assaig de toxicitat, el NP potser amb combinació amb la matèria orgànica, el que podrà previsiblement aportar tota la toxicitat a la mostra de lixiviat.

Així doncs, un cop realitzats els Microtox de les mostres dels lixiviats s'han obtinguts els següents resultats:

- De les mostres de lixiviats provinents del sòl i de les mescles de sòl amb torba on no s'ha addicionat NP, es pot concloure que, cap d'elles és tòxica. És a dir, els productes lixiviat procedents de la torba no aporten toxicitat.

- De les mostres de lixiviats provinents del sòl i de les mescles de sòl amb torba on s'ha addicionat NP a dos nivells, es pot concloure que, cap d'elles és tòxica. Per tant, la quantitat de NP que es lixivia juntament amb els productes lixiviat procedents de la torba tampoc aporta toxicitat.

A continuació, s'ha realitzat un estudi per a determinar la toxicitat del NP en aigua. Així doncs, s'han preparat mostres de diferents concentracions de NP en aigua, amb la finalitat d'estudiar a partir de quina concentració el NP no és tòxic. Aprofitant aquest estudi, es podrà aplicar a les mostres dels lixiviats anteriors, per donar un valor de concentració a partir del qual el NP ja no és tòxic.

Per a la preparació d'aquestes mostres, s'ha procedit de la següent manera; com que la concentració de NP trobada en les mostres de sòls des de la setmana 0 fins a la setmana 3 més elevada és de 18mg/kg (veure taula 3.6.1 del capítol II), s'ha suposat el pitjor cas, que tot el NP passés al lixiviat. Com per a la preparació del lixiviat s'ha fet amb 20g de sòl (veure esquema 1.1.1), en el lixiviat com a màxim poden haver-hi 3,6mg/L de NP. S'ha decidit preparar una mostra 10 vegades més concentrada i un altre aproximadament 10 vegades més diluïda. Així doncs, s'ha preparat una mostra de NP de 36mg/L, un altre de 0,5mg/L i un entremig de 10mg/L totes tres en aigua. Sabent que les mostres de lixiviat estan per sota aquests valors (veure taules de la 3.3 a la 3.6).

A més a més, a part d'aquestes mostres de NP també s'ha preparat un patró de control de 100mg/mL de fenol.

A continuació s'ha fet l'anàlisi de toxicitat de les mostres mencionades anteriorment, el resultat és el que es mostra en la taula 5.1.1.

Mostres de NP(mg/L)	EC ₅₀ (%)
36	17,2
10	40
0,5	>40 No tòxica

Taula 5.1.1. Resultats de les mostres de NP

Com es pot veure en la taula 5.1.1. totes les mostres de NP preparats presenten toxicitat menys la de 0,5mg/L. Per tant, aprofitant l'estudi de toxicitat, es pot concloure que totes les mostres de lixiviats analitzades anteriorment, tenen una toxicitat inferior a la que aportaria una mostra de concentració de 10mg/L.

6.Resum del capítol

Seguint els objectius d'aquest apartat, es poden destacar els següents aspectes:

- 1) S'ha desenvolupat una metòdica d'extracció del NP en mostres de lixiviats, a través d'una extracció líquid-líquid amb DCM i una concentració final, on s'han obtingut resultats satisfactoris.
- 2) Les concentracions de NP trobades en els lixiviats són d'entre 0,01mg/L i 0,1mg/L. Aquestes concentracions són suficientment baixes com perquè no siguin significativa la seva contribució en la contaminació de les aigües superficials.
- 3) Els valors de TOC analitzats, són inferiors al màxim permès per la legislació sobre l'abocament d'aigües residuals. Per tant aquests lixiviats fins i tot podrien ser abocats a la xarxa pública de clavegueram, ja que compleixen els màxims permessos.
- 4) Un cop realitzat l'assaig de toxicitat, es pot concloure que el NP lixiviat en les mostres de sòl i mescles de sòl amb torba no aporten toxicitat.
- 5) Els lixiviats analitzats per Microtox no aporten toxicitat. Aquesta toxicitat, és inferior a la que aportaria una mostra de concentració de 10mg/L de NP.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

1. Introducció

1.1. Origen de les aflatoxines i l'ocratoxina A

Els efectes nocius de les micotoxines sobre la salut humana són coneguts des de fa temps. La malaltia de "La feria de San Antonio" que afectava als pagesos durant la collita de cereals està documentada des de l'edat mitjana. Molt més tard, l'any 1960 arran de la intoxicació aguda anomenada "Turkey X", van morir a Anglaterra més de cent mil galls dindi després d'haver menjat pinso contaminat amb els fongs *Aspergillus flavus* (1). En aquest cas, per tal de conèixer quina era la causa de la malaltia, a partir del pinso que havien ingerit els animals es va obtenir un residu a partir de l'extracte amb cloroform. A l'administrar part d'aquest residu a animals sans, es va comprovar que aquest induïa la mateixa malaltia en els animals que se'ls hi administrava (2). D'altra banda, en sembrar el residu en una placa de cromatografia en capa fina, es va observar que es produïa una taca fluorescent blava en ser observada sota la llum UV (3). Posteriorment, es va veure que la taca blava al ser cromatografiada en una placa de sílica gel i observada sota llum UV es dividia en quatre subtaques, dues de les quals presentaven una fluorescència verda (**green**) que es van designar com aflatoxines G₁ i G₂, i les altres dues es van anomenar aflatoxines B₁ i B₂ ja que mostraven una fluorescència blava (**blue**) (4). Aquest fet, va significar el descobriment de les aflatoxines i va ser al inici d'una de les investigacions més extenses que s'han fet sobre toxines d'origen natural. Des de llavors, s'han publicat diferents estudis sobre la toxicologia de les micotoxines, que acostumen a afectar, a part d'òrgans concrets, els òrgans del sistema immune, nerviós i presentar caràcter carcinogènic.

Pel que fa a les ocratoxines, aquestes venen ser aïllades per primera vegada d'*Aspergillus ochraceus* el 1965, no com a resultat de toxicosi sinó en un estudi de laboratori de fongs toxigènics aïllats en cereals i llegums de Sud Àfrica (5). Es van detectar tres toxines, la més tòxica i més abundant era l'ocratoxina A i menys abundant i de baixa toxicitat les ocratoxines B i C (6).

Anys després, l'ocratoxina A es va relacionar amb l'aparició d'una greu nefropatia endèmica que havia afectat a milers de persones a la regió dels Balcans (Bulgària, Romania i d'altres països balcànics). Aquest fet es va atribuir al consum de carns fumades que estaven contaminades amb ocratoxina A. La major font de contaminació va ser les males condicions d'emmagatzematge de les carns (7).

1.2. Naturalesa de les aflatoxines i l'ocratoxina A

1.2.1. Aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁

Les aflatoxines són produïdes especialment per soques de l'*Aspergillus flavus* i formen una família de compostos derivats de la difuranocumarina. Actualment, es coneixen 16 tipus d'aflatoxines de les quals les més tòxiques i més freqüents en aliments són l'aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) i l'aflatoxina G₂ (AFG₂). Les estructures químiques d'aquestes són les que es mostren en la figura 1.2.1.1.

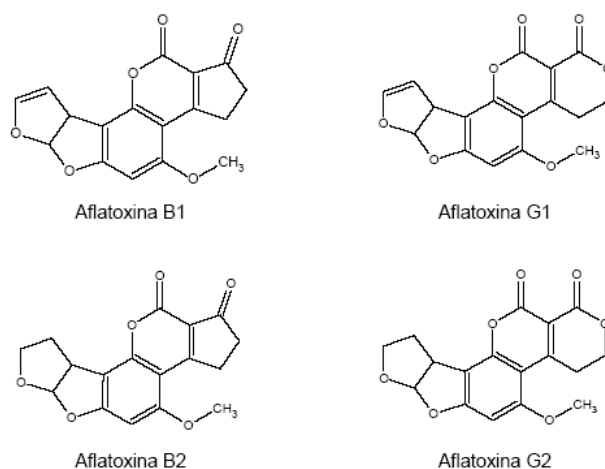


Figura 1.2.1.1. Estructures químiques de les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂

Quan les aflatoxines B₁ i B₂ són ingerides per animals productors de llet, aquestes són metabolitzades per l'organisme mitjançant enzims hepàtics que provoquen una hidroxilació per produir les respectives aflatoxines M₁ (AFM₁) i M₂ (AFM₂) (Figura 1.2.1.2). Quan són eliminades a través de la llet, persisteixen en els productes làctics derivats (8), en aquest cas, la quantitat d'aflatoxina M₁ biosintetitzada és proporcional a la quantitat d'aflatoxina B₁ ingerida, així com la M₂ es proporcional al contingut de B₂.

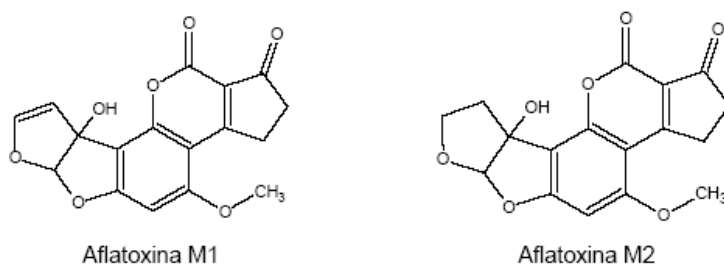


Figura 1.2.1.2. Estructures químiques de les aflatoxines M₁ i M₂

1.2.2. Ocratoxines

Les ocratoxines formen una família de compostos més reduïda en quan a número que la de les aflatoxines. Està formada per l'ocratoxina A, B i C. La més tòxica és l'ocratoxina A (OTA), d'aquí l'interès que ha despertat la seva determinació en els darrers anys. Les ocratoxines van ser descrites per primera vegada com a substàncies produïdes per l'*Aspergillus ochraceus* i d'aquí van rebre el seu nom.

La molècula d'OTA està formada per una isocumarina clorada lligada a través d'un grup carboxílic a l'L-fenilalanina mitjançant un enllaç amino (Figura 1.2.2.1).

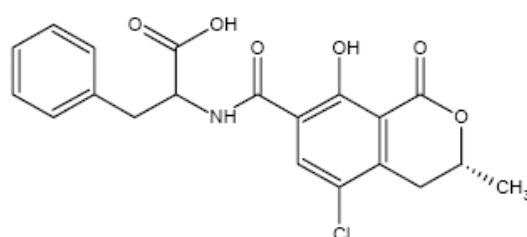


Figura 1.2.2.1. Estructura química de l'ocratoxina A

Les ocratoxines B i C són l'anàleg sense el clor i amb un èster metílic, respectivament. Els principals productes d'hidròlisi de les ocratoxines són l'àcid carboxílic d'isocumarí (ocratoxina α) i el seu anàleg sense el clor (ocratoxina β), els quals no són tòxics (9). Aquestes ocratoxines són les que es mostren en la figura 1.2.2.2.

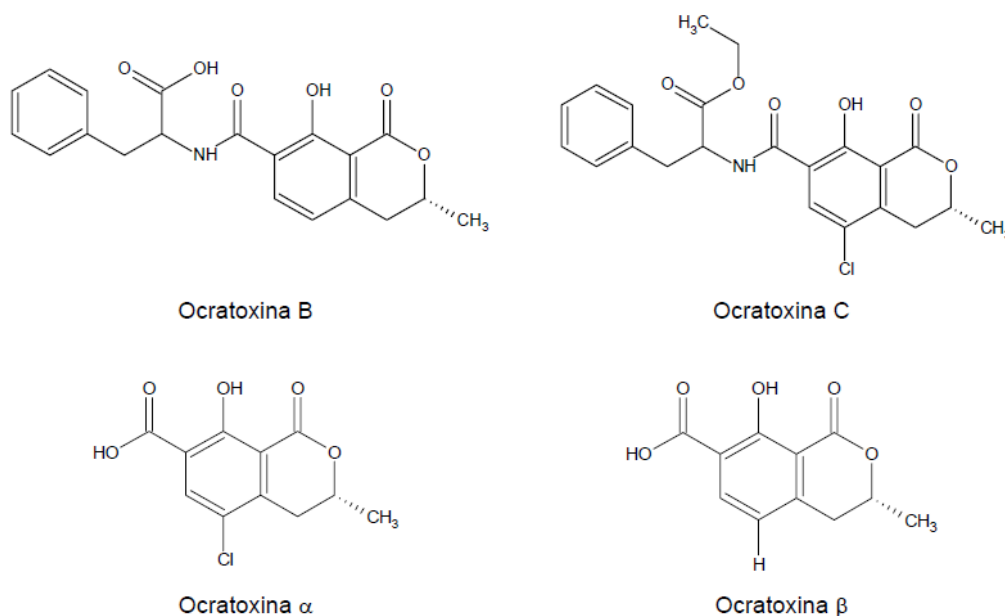


Figura 1.2.2.2. Estructura química les ocratoxines B, C, α i β

2. Anàlisi de micotoxines

Al llarg del temps, s'han desenvolupat diversos mètodes analítics sensibles i sofisticats per a la determinació de micotoxines en una gran varietat de matrius alimentàries (10). L'etapa de detecció d'aquestes toxines va sempre precedida per etapes prèvies de preparació de mostra, extracció, purificació i concentració, ja que, les concentracions d'interès a les que es troben aquestes toxines són de l'ordre de poques desenes de µg/kg i es troben en matrius complexes. Habitualment, en els productes en els que es detecta presència de toxina, es realitza una confirmació d'aquesta utilitzant tècniques de derivatització o detectors més selectius com l'espectròmetre de masses. A l'*Official methods of analysis of AOAC international* es descriuen detalladament els mètodes oficials establerts per a l'anàlisi de micotoxines (11).

Sovint, es presenten juntes diferents tipus de toxines en el mateix substrat, de manera que disposar d'un mètode analític per la seva detecció simultània és important. S'ha de tenir en compte que la detecció combinada de diverses micotoxines només és possible en aquells casos que les toxines tenen estructures similars per tal de poder ser extretes, purificades i detectades en un sol procés. Fins al moment, el nombre d'articles publicats per a mètodes simultanis d'aflatoxines i d'OTA és reduït (12-17), sent aquesta última l'experiència més recent de la secció de cromatografia de l'IQS.

En els següents apartats es fa un breu resum de cada una de les etapes que intervenen en una anàlisi de micotoxines.

2.1. Etapa de mostreig

El mostreig és l'etapa bàsica de l'anàlisi, ja que la distribució de micotoxines és molt heterogènia, a causa del creixement localitzat dels fongs i la subsegüent formació de la toxina. Cada vegada que la mostra s'homogeneïtza, els focus de contaminació es distribueixen i tendeixen a una distribució més uniforme. Però, mesclar no resulta suficient i per tant és essencial agafar una mostra que sigui representativa del lot per tal d'assegurar la validesa dels resultats. Per totes les raons anteriors, les administracions han establert les directius a seguir per a realitzar un correcte pla de mostreig (Comissió Europea Directiva 98/5/53 CE).

2.1.2. Etapa de preparació de mostra

L'etapa de preparació de mostra es basa en eliminar, amb la màxima eficàcia possible, tots els compostos que mostren un comportament similar al de l'analit i que poden interferir en l'anàlisi. Els extractes resultants contindran l'analit d'interès més concentrat respecte la mostra. Les tècniques convencionals utilitzades per aquesta etapa de preparació de mostra són les columnes cromatogràfiques i extraccions en fase líquida que requereixen la utilització d'un nombre elevat de solvents, generalment clorats. Són llargues i dificultoses d'aplicar i és

necessari tenir experiència prèvia. Per aquestes raons, en els darrers anys, s'han buscat alternatives a les etapes d'extracció i purificació com les columnes de immunoafinitat i l'extracció en fase sòlida. Aquestes alternatives es basen en diferents principis, però tenen en comú que són fàcilment aplicables i requereixen la utilització de menys solvent d'extracció.

És important destacar que l'etapa de preparació de mostra és el pas que utilitza al voltant de dos terços del temps total d'anàlisi i és la primera font d'errors i diferències en els resultats obtinguts per diferents laboratoris, per tant, cal que siguin senzilles d'aplicar i fàcilment reproduïbles.

En els següents apartats es fa una descripció dels diversos procediments emprats per a la preparació de mostra i es presenten els principals avantatges i inconvenients que ofereixen cada una d'elles.

2.1.2.1. Extracció en fase líquida

El solvent a utilitzar dependrà de la naturalesa de la matriu i analit a analitzar i de les subsegüents etapes de purificació. Els solvents d'extracció més emprats en l'anàlisi d'aflatoxines en aliments són: cloroform, metanol, acetona, acetonitril, benzè i hexà. Existeixen taules en bibliografia (11) les quals mostren els diferents solvents d'extracció emprats en diferents matrius alimentàries, el número del mètode oficial de l'AOAC i les micotoxines que s'estudien en cada cas.

En els casos que s'usa cloroform com a solvent d'extracció, és habitual purificar la mostra en una columna de gel de sílice. En el cas d'utilitzar tècniques de immunoassaig a l'etapa de purificació, s'empen mescles de metanol amb aigua o acetonitril com a solvent d'extracció, seguit d'una dilució de la mostra amb aigua o un tampó aquós, per tal de minimitzar la desnaturalització o unions incompletes amb l'anticòs degut als efectes del solvent.

Els principals problemes relacionats amb l'extracció d'aflatoxines és la formació d'emulsions, extraccions incompletes d'algunes matrius i la coextracció de compostos que interfereixen a la quantificació. En algunes ocasions, s'addicionen sals per tal de millorar la recuperació, especialment en l'anàlisi en teixits animals.

En el cas de l'OTA, la presència del grup funcional de l'àcid carboxílic s'aprofita en les etapes d'extracció i neteja. També existeix en bibliografia (11) taules on mostren el solvent d'extracció en diferents matrius alimentàries i el número del mètode de l'AOAC i la tècnica analítica emprada en cada cas.

Com mostren els estudis consultats, el cloroform és, sens dubte, el dissolvent més usat. El desplaçament cap a la utilització de solvents orgànics no clorats, degut a la consciència de respecte al medi ambient, ha fet aparèixer mètodes alternatius com els que utilitzen el terc-butil metil èter per a l'extracció d'OTA en aliments infantils (18).

El principal avantatge que presenta l'extracció líquida front a altres tècniques és que els laboratoris no requereixen d'instrumentació específica per a la seva aplicació, però per contra no són automatitzables. La utilització de solvents orgànics s'ha d'evitar ja que per una banda,

són perjudicials pel medi ambient i per l'altre, la utilització de grans quantitats de solvents orgànics d'elevada puresa contribueix a uns costos elevats de les analítiques. Cada dia més, aquests mètodes es veuen desplaçats per la utilització de mètodes alternatius més respectuosos amb el medi ambient i més senzills d'aplicar.

2.1.2.2. Purificació i concentració en fase sòlida

El principi bàsic de l'extracció en fase sòlida (SPE) es pot considerar equivalent a un procés cromatogràfic, on el sorbent és la fase estacionària. És principalment indicat per a mostres líquides ja que alhora es realitza una extracció i concentració.

La seqüència típica d'una SPE comença amb un condicionat del cartutx activant-lo amb un solvent i/o aigua. A continuació, s'aplica la mostra i els analits d'interès queden retinguts en el sorbent d'extracció. Posteriorment, hi ha una etapa de rentat amb l'objectiu d'eliminar els compostos interferents i, finalment, la toxina s'elueix del cartutx amb el solvent orgànic adequat. Si és necessari es concentra la mostra per evaporació, per exemple, sota corrent de N₂. A la figura 2.1.2.2.1 es mostra un esquema del procés.

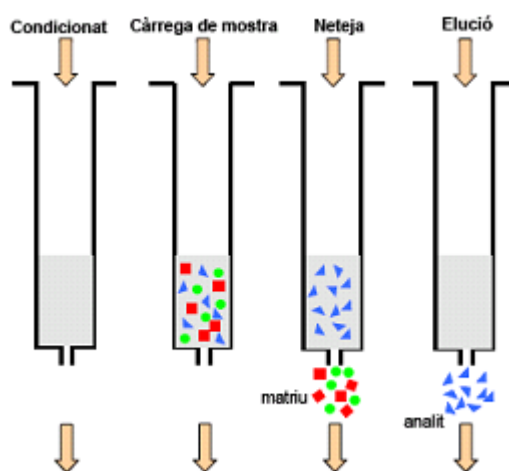


Figura 2.1.2.2.1. Esquema del principi de funcionament de la SPE.

Les fases estacionàries més utilitzades en SPE per a l'anàlisi d'aflatoxines i OTA són la sílica, C₈, C₁₈ i florisil. Generalment, s'aplica la SPE posterior a una etapa d'extracció amb un solvent orgànic.

Des de l'any 2000, es comercialitza un reblert d'extracció en fase sòlida anomenat OASIS (Waters), que facilita la neteja de la mostra. Al mercat hi ha diferents tipus de reblert OASIS (HLB, MAX, MCX i WAX) per poder optimitzar l'extracció en funció de l'analit a analitzar. Tots aquests reblerts estan disponibles en forma de cartutx, discs i columnes. Es disposa de dos mides de partícula del reblert, de 30 i 60 µm, que es selecciona en base a la turbidesa i viscositat de la mostra. Per a mostres viscoses, s'aconsella utilitzar un reblert amb mida de partícula més gran.

A continuació es descriu el cartutx OASIS HLB ja que és el que s'ha utilitzat en la present Tesi Doctoral.

Cartutx OASIS HLB

Aquest cartutx conté un reblert polimèric en fase inversa, el qual presenta propietats hidrofíliques i lipofíliques a causa del copolímer de divinilbenzè-N-vinilpirrolidina (esquema en la figura 2.1.2.2). HLB és un acrònim de balanç hidrofílic lipofílic (**H**ydrophilic **L**iphophilic **B**alance) el qual descriu les dues característiques més importants del reblert:

1. El reblert manté la humitat
2. Reté un ampli marge de compostos tant polars com apolars

Els cartutxos d'extracció en fase sòlida OASIS HLB permeten aconseguir recuperacions reproduïbles i elevades per un ampli marge d'analits utilitzant protocols d'extracció ràpids i senzills. A més, per aconseguir bons resultats no és necessària molta cura ja que el sorbent es pot assecar durant l'extracció. Aquesta és una principal avantatge respecte un cartutx C₁₈.

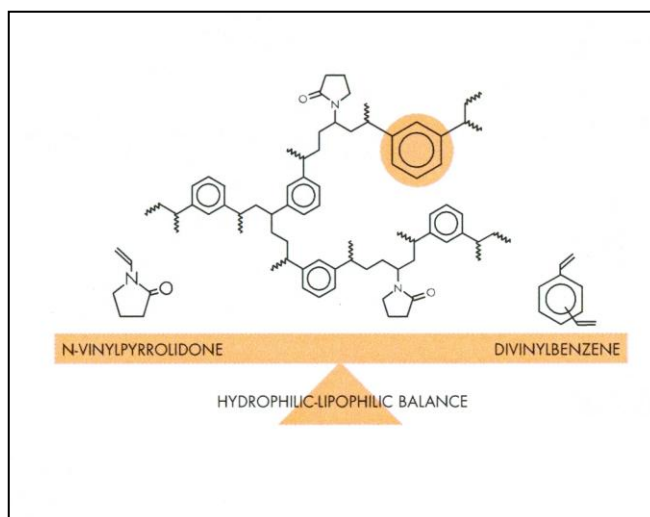


Figura 2.1.2.2. Esquema del solvent d'extracció en fase sòlida OASIS HLB (Waters TM)

2.1.2.3. Columnes de immunoafinitat

En els darrers anys s'ha incrementat molt l'ús de les columnes de immunoafinitat (IAC), emprades en l'etapa d'extracció i/o purificació, degut a l'elevada selectivitat que presenten i facilitat d'ús (19). S'ha començat a estudiar l'aplicació de les IAC a mostres contaminades per diferents tipus de toxines (16).

Les IAC es preparen adsorbint els anticossos en gels continguts en petits cartutxos de plàstic. El principi de funcionament d'aquestes columnes es basa en la unió selectiva de les molècules d'analit, en aquest cas micotoxines, a anticossos monoclonals específics de la toxina realitzant una etapa prèvia de condicionat de la columna. Després d'eliminar les impureses que no s'han

unit amb una etapa de rentat, les toxines s'alliberen fent passar a través del cartutx un solvent, generalment acetonitril o metanol o una mescla hidroorgànica, provocant la desnaturalització dels anticossos. Les substàncies interferents presents a la mostra no interaccionen amb la columna i no són retingudes per aquesta. A la figura 2.1.2.3.1. es mostra un esquema del principi de funcionament de les IAC.

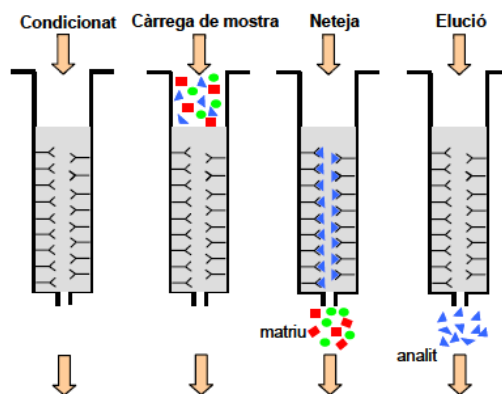


Figura 2.1.2.3.1. Esquema del principi de funcionament de les columnes de immunoafinitat (IAC).

Les avantatges que presenten les IAC, com s'ha comentat anteriorment, és l'elevada selectivitat, la qual cosa condueix a l'obtenció de recuperacions elevades i bons límits de detecció. Les principals limitacions d'ús són l'elevat cost d'aquestes columnes ja que no es poden reutilitzar perquè els anticossos són desnaturalitzats a l'etapa de neteja en un procés no reversible i són matriu dependents.

La mesura posterior es realitza amb un dels mètodes cromatogràfics que es descriuen a continuació.

2.1.3. Mètodes cromatogràfics

Quan es van descobrir les aflatoxines, la separació i detecció d'aquestes es realitzava mitjançant cromatografia de capa fina (TLC) en plaques de sílica gel sense indicador de fluorescència, utilitzant una gran varietat de solvents d'elució i observant les plaques sota la llum UV. Posteriorment, amb el desenvolupament de la cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC), la utilització de la TLC ha quedat desplaçada en un segon terme, per aquesta altre aplicació.

L'HPLC ofereix major precisió, un poder de resolució més elevat, és fàcil d'automatitzar i s'obtenen límits de detecció més baixos que la TLC. Per contra, la TLC és simple, robusta i és relativament barata d'implementar en un laboratori d'anàlisi. De totes maneres, en alguns treballs publicats els darrers anys s'apliquen tècniques modernes a l'etapa de neteja prèvia a la detecció per TLC, per tal de fer front a aquesta manca de capacitat separativa de la TLC, la qual permet descartar la possibilitat d'interferències en la detecció (20-23).

2.1.3.1. Cromatografia de capa fina (TLC)

Actualment, la TLC s'usa en alguns mètodes oficials i per a la determinació de micotoxines a mode de *screening*, és a dir, absència o presència degut a què:

- Minimitza les etapes de preparació de mostra
- Permet l'anàlisi en paral·lel d'un gran nombre de mostres
- Possibilita la recuperació de l'analit per anàlisis posteriors
- Es poden portar a terme simultàniament diversos protocols de *screening*

S'han desenvolupat un gran nombre de mètodes tant per a la determinació d'aflatoxines i ocratoxines per TLC tant en fase normal com en fase inversa (11). Les aflatoxines i ocratoxines presenten una intensa fluorescència natural de manera que es poden observar sota llum UV a 365nm sense necessitat d'aplicar a les plaques cromatogràfiques etapes posteriors de revelat.

Al sotmetre les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ sota llum UV de 365nm es distingeixen dues taques de color blau i dues taques de color verd corresponent a les aflatoxines B i G, respectivament. La taca d'OTA s'observa de color verd al ser irradiada amb llum a 365nm i després del tractament amb NaHCO₃ o NaOH el color de la taca canvia a color púrpura, resultat de la desprotonació del grup àcid de l'OTA.

2.1.3.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

El que s'observa en la majoria d'estudis publicats, és que en l'anàlisi d'aflatoxines realitzats per HPLC s'aprofiten les propietats fluorescents d'aquestes toxines. La separació d'aflatoxines per HPLC en fase normal s'ha vist desplaçada per la utilització de la fase inversa. En el cas de voler detectar nivells baixos es pot realitzar una pre o postderivatització per tal d'augmentar la fluorescència de les aflatoxines G₁ i B₁ (20). A continuació es descriuen breument en què consisteixen aquests dos processos i els avantatges i inconvenients que suposa la utilització de cadascun d'ells.

Derivatització precolumna: Les aflatoxines B₁ i G₁ són capaces de substituir un H per un OH, originant les aflatoxines B_{2a} i G_{2a}. Les aflatoxines són transformades mitjançant derivatització precolumna emprant àcid trifluoroacètic (TFA) en els seus hemiacetals B_{2a} i G_{2a} respectivament (figura 2.1.3.2.1), augmentant la fluorescència d'aquestes i com a conseqüència la sensibilitat. L'elevada fluorescència de les aflatoxines B₂ i G₂ no es veu afectada.

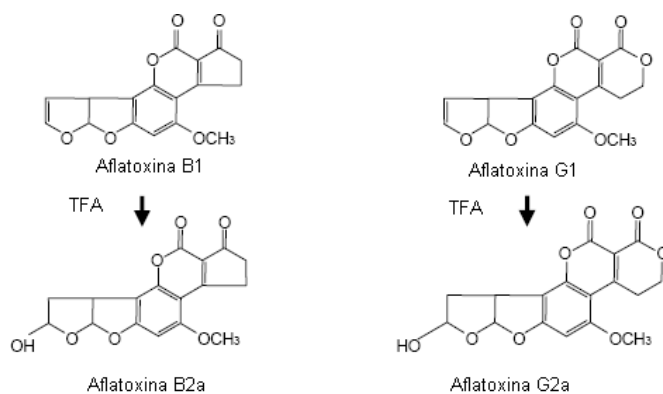


Figura 2.1.3.2.1. Estructura química de les aflatoxines B_{2a} i G_{2a}

Derivatització postcolumna: La transformació química postcolumna de les aflatoxines B₁ i G₁ es realitza amb iode o brom. La reacció que té lloc es la que es mostra a la figura 2.1.3.2.2.

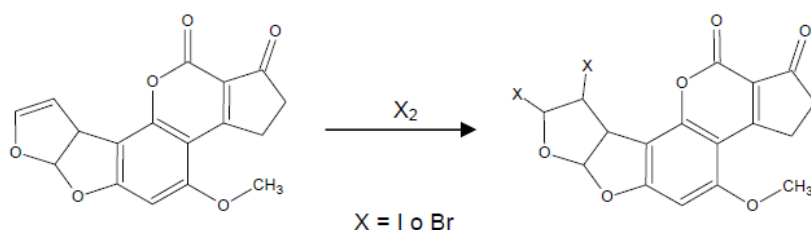


Figura 2.1.3.2.2. Reacció de derivatització postcolumna de les aflatoxines B₁ i G₁.

El sistema de derivatització postcolumna es basa en la utilització d'una segona bomba, una peça de volum mort en forma de T, tub capil·lar i bany d'escalfament o reactor postcolumna per a la reacció. Es connecten la sortida de la columna cromatogràfica i la sortida de la segona bomba que impulsa el reactiu derivatitzant a la peça de volum mort en forma de T. L'extrem que queda lliure es connecta a l'entrada del detector. El tub capil·lar s'ha de mantenir a la temperatura de reacció de 70°C, utilitzant un forn o un bany d'aigua.

S'han descrit diferents mètodes per a la derivatització postcolumna. El mètode més recent és el proposat l'AOAC per a la determinació d'aflatoxina B₁ en aliments per a nadons que usa derivatització postcolumna amb generació electroquímica de brom (11).

La derivatització postcolumna amb iode o brom presenta dos inconvenients respecte a la derivatització precolumna. El primer d'ells, és que requereix l'ús de dues bombes cromatogràfiques i, en segon lloc, la inestabilitat de la solució de iode pot ser un problema, però per altra banda minimitza l'etapa de preparació de mostra.

En el cas de l'OTA, la majoria dels treballs publicats usen l'HPLC de fase inversa acoblada a un detector de fluorescència. Per a les mostres positives presumptament, generalment s'acostuma a realitzar una etapa de confirmació de la toxina. Aquesta es porta a terme mitjançant una metilació del grup carboxílic amb CH₃OH/HCl o BF₃/CH₃OH (24). La identificació es considera positiva només si es detecta el pic de l'OTA i apareix un nou pic a un temps de retenció diferent, corresponent a l'OTA metilada.

2.1.3.3. Cromatografia líquida d'ultra resolució (UHPLC)

La tècnica d'UHPLC és una altre de les tècniques utilitzades en la present Tesi Doctoral, és per això que es descriu a continuació. Aquesta cromatografia és un tipus de cromatografia líquida desenvolupada per Jerkovich *et al.* (2003) (25). El fonament d'aquesta tècnica de treball es basa en la utilització de columnes cromatogràfiques reblerts amb partícules de mida menor als utilitzats fins ara per HPLC.

L'equació empírica més completa que permet avaluar l'eficàcia d'una columna cromatogràfica és l'equació de van Deemter, que descriu la relació entre velocitat lineal i l'eficàcia de la columna cromatogràfica (26). A la figura 2.1.3.3.1 es mostra el perfil que presenta l'equació de van Deemter al utilitzar columnes cromatogràfiques de diferents mides de partícula. S'observa que l'ús de columnes cromatogràfiques amb mides de partícules inferiors a 2,5 µm, no només proporcionen un augment de l'eficàcia sinó que també s'obté una regió molt més àmplia de fluxos en la que es manté la màxima eficàcia.

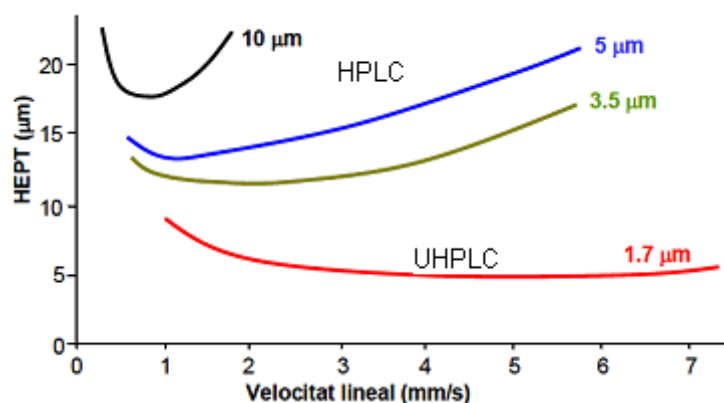


Figura 2.1.3.3.1. Representació de l'equació de van Deemter per columnes cromatogràfiques de diferents mides de partícules.

HEPT: Alçada equivalent de plat teòric, **HPLC:** Cromatografia líquida d'elevada resolució, **UHPLC:** Cromatografia líquida d'ultra resolució

La utilització de columnes cromatogràfiques amb mides de partícula menors, requereix treballar a uns marges de pressió superiors als que es pot treballar en un equip d'instrumentació d'HPLC. Per exemple, utilitzant el flux òptim de treball, per a una columna de 10 cm de llarg empaquetada amb partícules d'1.7 µm, es tenen pressions d'aproximadament 15000 psi, per tant, cal redissenyar la columna i sistema cromatogràfics per tal de poder disposar d'instrumentació que permeti treballar a aquestes noves condicions, ja que la pressió màxima a la que pot treballar un equip d'HPLC són 3000 psi.

Pel que fa a la columna cromatogràfica, ha calgut desenvolupar un reblert que suporti aquestes elevades pressions mantenint la capacitat de càrrega i retenció de les columnes d' UHPLC. Les partícules de base sílica presenten bona resistència mecànica, però no permeten treballar en

tot el marge de pHs. Per altre banda, les columnes de base polimèrica no tenen limitacions de pH, però tenen capacitats de càrregues i resistències molt menors. Per aquests motius, s'ha desenvolupat un reblert de base sílica en la que aquestes molècules s'uneixen mitjançant enllaços metílics i així oferir una major resistència mecànica (figura 2.1.3.3.2). L'empaquetament uniforme de les columnes amb mides de partícula tant petites no resulta senzill ja que la paret interior de la columna cal que sigui molt més fina. Els fritats s'han redissenyat, ja que cal que retenguin partícules molt petites sense que es taponin.

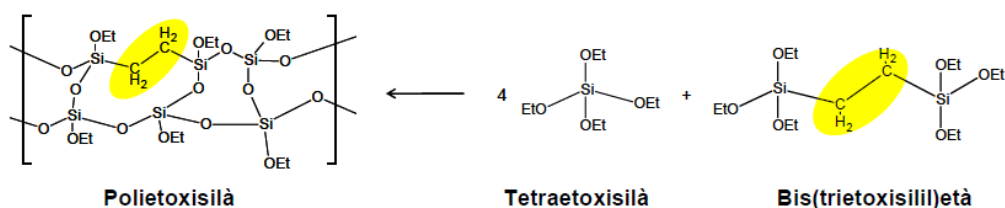


Figura 2.1.3.3.2. Estructura del reblert de les columnes d'UHPLC.

Un altre paràmetre important a considerar és el sistema cromatogràfic, el qual ha de poder operar a les elevades pressions de treball. La bomba ha de ser capaç de subministrar, d'una forma reproduïble i sense variacions de pressió, el flux de treball, ja sigui en mode isocràtic o gradient, tenint en compte que a aquestes condicions la compressibilitat dels solvents no és de menys preable. La introducció de mostra resulta també crítica ja que cal protegir la columna de les possibles variacions de pressió i ha de ser un cicle ràpid d'injecció per tal de fer front a la rapidesa de la cromatografia. Com a conseqüència d'aquesta rapidesa, els pics cromatogràfics que es generen són pics de menys d'un segon. Això significa que la velocitat d'adquisició de dades ha de ser elevada per tal de capturar els suficients punts i executar integracions reproduïbles. A més, tot el sistema cromatogràfic i sobretot les cel·les dels detectors cal que tinguin el mínim volum per tal de continuar tenint mantenint l'eficàcia del sistema.

En resum, els avantatges que ofereix l'UHPLC respecte l'HPLC és major rapidesa en les anàlisis, major resolució i sensibilitat.

2.1.3.4. Espectrometria de masses (MS)

Aquesta tècnica és una de les tècniques utilitzades en la present Tesi Doctoral, per això es descriu a continuació. La cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a l'espectrometria de masses (HPLC-MS o HPLC-MS/MS) és una tècnica analítica àmpliament utilitzada ja que combina l'elevat poder de separació de la cromatografia amb l'especificitat de l'espectròmetre de masses. L'espectrometria de masses permet detectar els compostos i proporcionar informació del pes molecular i estructura de l'analit en funció de la relació massa/càrrega dels ions produïts a partir dels analits. La connexió entre la cromatografia líquida i l'espectrometria de masses no és senzilla degut a què la primera opera en fase líquida i en canvi

l'espectrometria de masses treballa a pressions molt baixes. Perquè els components separats d'una mescla puguin passar seqüencialment del cromatògraf a l'espectròmetre de masses és necessària una interfase. Un cop superat aquest problema, la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses es converteix en una tècnica analítica molt potent que permet obtenir una valuosa informació que no podria ser extreta de les dues tècniques per separat.

El flux líquid de fase mòbil que arrossega els components d'una mescla a través d'una columna cromatogràfica surt de la mateixa a un cabal entre 0,5-3,0mL/min. Aquest flux ha de ser transferit a l'espectròmetre de masses que es troba a un elevat buit. La gran diferència de pressió entre el final de la columna cromatogràfica i l'interior de l'espectròmetre podria causar enormes problemes pel sistema de buit de l'espectròmetre si no hi hagués una interfase, ja que el flux líquid entre 0,5-3,0mL/min es convertiria en un flux gasós de centsL/min en l'espectròmetre. A més, en aquesta expansió els components estarien tan diluïts que la sensibilitat de la detecció disminuiria dràsticament. Per tant és necessari trobar medis per eliminar la major part del líquid que surt de la columna sense perdre els analits dissolts.

La ionització a pressió atmosfèrica és una tècnica que permet connectar el flux que prové de la columna d'un cromatògraf líquid amb l'espectròmetre de masses. Aquest tipus d'interfase té varies funcions: separar els analits d'interès del dissolvent que els arrossega, ionitzar les molècules de l'analit i mantenir el buit en l'espectròmetre de masses. Existeixen dos tipus d'interfase a pressió atmosfèrica: ionització per electrospray (ESI) i ionització química a pressió atmosfèrica (APCI).

S'ha descrit la utilització de la ionització química (27,28), introducció directe (29) i termospray (30) en l'anàlisi de toxines, però no han resultat ser tècniques robustes. L'aparició d'una nova tècnica d'ionització, la ionització a pressió atmosfèrica, més fiable, ha fet que el nombre d'articles publicats emprant aquesta tècnica de ionització amb analitzadors de quadrupol simple i triple quadrupol, hagi experimentat un notable increment (31,32).

A continuació es presenta una descripció del funcionament d'un espectròmetre de masses.

Un sistema de masses està format pels següents components: font d'ionització, analitzador, detector i sistema de buit.

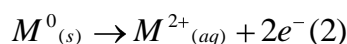
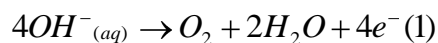
1-Font d'ionització: La font d'ionització ha de produir ions a partir dels analits de la mostra. Un tipus d'ionització a pressió atmosfèrica és l'electrospray.

El flux de l'HPLC entra a través de la sonda d'electrospray. S'apliquen elevats voltatges (2-4 kV) a través d'un tub capil·lar metàl·lic rodejat per un flux coaxial de nitrogen (gas de nebulització) els quals converteixen l'eluent en un aerosol carregat. Un flux de nitrogen escalfat (gas de dessolvatació) ajuda a la evaporació del solvent a través de la font. Una petita quantitat de l'aerosol es divideix cap a l'orifici del con de mostra i l'altre part va cap al con d'extracció on posteriorment es dirigeixen cap a l'analitzador. L'esquema de la font d'ionització és el que es presenta en la figura 2.1.3.4.1.

La ionització per electrospray es pot dividir en tres fases:

1.Formació de les gotes carregades: Quan s'aplica un voltatge positiu al capil·lar d'electrospray, les gotes emeses pel capil·lar porten un excés de càrrega positiva. L'excés de

càrrega generat electroquímicament, bé per eliminació dels ions negatius per oxidació d'algun component de la solució (1 de l'equació 2.1.3.4.1) o bé, per l'addició de ions positius per l'oxidació del mateix capil·lar (2 de l'equació 2.1.3.4.1). Quan s'aplica un voltatge negatiu al capil·lar d'electrospray, les gotes emeses pel capil·lar porten excés de càrrega negativa.



Equació 2.1.3.4.1. Formació de gotes carregades

2.Evaporació del dissolvent i fissió de les gotes: Les gotes emeses pel capil·lar d'electrospray disminueixen el seu tamany com a conseqüència de l'evaporació del dissolvent mentre que la càrrega a les gotes es manté constant. La disminució del radi de la gota mantenint la càrrega constant suposa un augment de repulsió entre càrregues a la superfície de la gota. A un radi determinat la repulsió de càrregues supera la tensió superficial que manté la gota unida i es produeix la fissió de la gota.

Aquesta seqüència es va repetint moltes vegades fins a formar gotes molt petites.

3.Formació dels ions en fase gasosa: Existeixen dos models per explicar la formació dels ions a partir de gotes molt petites i altament carregades, el model d'evaporació iònica i el model de càrrega residual. El model d'evaporació iònica és basa en què a partir de gotes amb radi ≤ 10 nm degut a la repulsió entre càrregues prima l'evaporació iònica a la superfície de la gota respecte a la fissió de la gota, els ions passen de solució a fase gasosa. D'altra banda, el model de càrrega residual afirma que la fissió de la gota produeix gotes filles extremadament petites que contenen un sol ió. L'evaporació del solvent d'aquestes gotes produeix ions en fase gasosa. Sigui quin sigui el model correcte, el resultat en ambdós és el mateix, la formació de ions d'analit sense solvent.

La condició indispensable per a treballar amb electrospray és que l'analit d'interès es pugui ionitzar en solució aquosa. La figura 2.1.3.4.1 mostra un esquema de la ionització per electrospray.

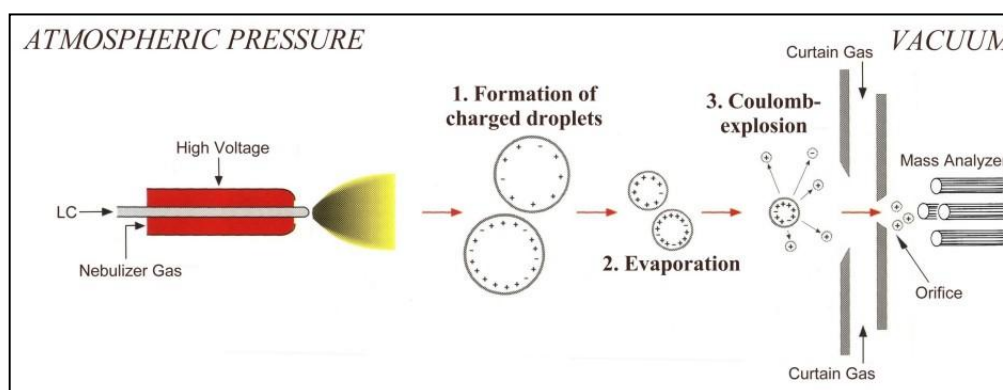


Figura 2.1.3.4.1. Esquema d'ionització per electrospray (Waters™)

La principal característica de l'electrospray és que la ionització es produeix en fase líquida. És una ionització suau, és a dir, produeix molt poca fragmentació del ió molecular, per tant, en els espectres s'observa majoritàriament el pes molecular o bé l'adducte.

El mode de detecció és pot realitzar en mode positiu o negatiu o ambdós simultàniament. Normalment, els compostos bàsics, com poden ser amines, formen la molècula protonada $[M+H]^+$ i són analitzats en mode de detecció electrospray positiu. Els compostos àcids poden formar la molècula desprotonada $[M-H]^-$ i ser analitzades per electrospray negatiu. Però en tots els casos és recomanable fer la prova experimental en els dos modes de treball perquè no sempre es compleix estrictament. Altres ions típics produïts per ionització per electrospray quan es treballa en mode positiu és la formació d'adductes amb sodi $[M+Na]^+$, potassi $[M+K]^+$ i solvents de la fase mòbil $[M+MeOH+H]^+$. En mode negatiu es poden observar adductes del tipus $[M+HCOO]^-$.

Com ja s'ha descrit anteriorment, es tracta d'una tècnica que produeix molt poca fragmentació i per tant la informació que s'obté dels espectres és bàsicament el pes molecular del compost d'interès. Aquesta informació pot ser molt valuosa quan es posseeix a priori d'alguna altra informació de l'estructura de la molècula, però en canvi té un valor escàs quan no es coneix absolutament res al seu respecte. Incrementant el potencial al bloc de la font, al que es coneix com a voltatge de con (normalment s'utilitza 20V, 40V o 60V), és possible induir fragmentació entre la sortida del con i les lents RF de l'hexapol, obtenint d'aquesta manera un altre tipus d'informació útil. A mesura que els ions passen a través del con de sortida, la pressió disminueix dramàticament, el que de fet incrementa el camí de lliure recorregut entre col·lisions amb molècules de gas neutre. Els ions guanyen energia entre col·lisions sota la influència del camp elèctric entre la sortida del con i les lents RF. Normalment, només els enllaços dèbils es trenquen, tal com C-N i C-O, degut a la seva menor energia d'enllaç.

Degut a què els ions es formen en fase vapor sense necessitat d'escalfar de forma significativa, molts compostos tèrmicament làbils i normalment no volàtils poden ser examinats mitjançant aquest mètode de ionització.

2-Analitzador: L'analitzador és la part fonamental de l'espectròmetre de masses ja que separa els diferents ions en funció de la seva relació m/z. Existeixen diferents tipus d'analitzadors però els més emprats són els quadrupols a causa de la seva facilitat d'ús, rang de masses de treball, bona linealitat per a treballs quantitius, resolució i qualitat de l'espectre de masses.

Els analitzadors de quadrupol simple estan formats per dos parells de barres metàl·liques (electrodes) paral·leles equidistants a un eix central (Figura 2.7.3.2). Un parell de barres està a un potencial elèctric positiu i l'altre parell a un potencial elèctric negatiu. Una combinació de voltatges de dc (continua) i rf (radiofreqüència) s'apliquen a aquest grup de barres. El flux de ions entra cap al grup de barres i aquests es filtren segons la seva relació m/z. Els ions d'una determinada relació m/z seran filtrats depenent de la relació dels voltatges de dc i rf. Per una amplitud de voltatges de dc i rf donats, només els ions d'una determinada relació m/z ressonaran, descriuran una trajectòria estable a través del quadrupol i podran ser detectats. Els altres ions seran desestabilitzats i impactaran contra les barres de metall. La resolució (capacitat de distingir entre dues masses adjacents) depèn de la geometria del quadrupol, electrònica, voltatges que s'apliquen i la qualitat en la fabricació.

La relació m/z que passa a través de les barres és proporcional al voltatge aplicat a les barres. A voltatges més elevats permet el pas de masses més elevades.



Figura 2.1.3.4.2. Esquema de l'anàlitzador de simple quadrupol (Waters™)

El quadrupol es pot utilitzar en mode SIM (single ion monitoring) o SCAN. En el mode SIM, els paràmetres anteriorment mencionats (amplitud de dc i voltatges de rf) s'estableixen per a observar una massa específica o una selecció de masses específiques. Aquest mode proporciona la màxima sensibilitat per aquesta relació m/z . En el mode SCAN, es fa una rampa de l'amplitud de dc i voltatges de rf (mantenint constant la relació rf/dc), per obtenir l'espectre de masses en el rang de masses establert. La sensibilitat és funció del rang de masses escanejat, velocitat de scan i resolució.

Un altre tipus d'anàlitzador és el triple quadrupol (QQQ), el qual està constituït per dos quadrupols separats per una cel·la de col·lisió.

En un espectròmetre de masses de triple quadrupol, els ions passen des de Q1 a Q2 a alta velocitat (cel·la de col·lisió). Aquests ions realitzen col·lisions amb un gas de fons (Ar, N₂, ...). Aquestes col·lisions de baixa energia transfereixen l'energia cinètica del ió que entra en energia interna. L'augment d'energia interna resulta en una descomposició unimolecular dels ions de l'analit. Els ions fragmentats s'analitzen en el Q3. Els espectres de masses de triple quadrupol mostren típicament un ió majoritari amb els ions percussors en menor abundància.

L'energia de la col·lisió amb el gas es pot variar per tal d'obtenir diferents graus de fragmentació. Els fragments resultants són analitzats en el segon quadrupol, utilitzats també en mode SIM o SCAN.

Un instrument de triple quadrupol pot ser utilitzat de diferents maneres, les quals s'expliquen a continuació:

- **Constant Neutral Loss:** El primer i tercer quadrupol s'utilitzen en mode SCAN. Els dos quadrupols operen de forma sincronitzada visualitzant fragments.
- **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** Els dos quadrupols operen en mode SIR, és molt útil per treballar amb matrius molt brutes.

- **Daughter Ion:** El primer quadrupol opera en mode SIR i s'utilitza per seleccionar el primer ió (ió pare), el qual és fragmentat a la cel·la de col·lisió generant els ions precursors (ió fill) i detectats en mode SCAN.
- **Parent Ion:** El primer analitzador, utilitzat en mode SCAN, selecciona els ions pare. El segon analitzador, utilitzat en mode SIM, monitoritza un fragment específic.

Tenir dos analitzadors incrementa la selectivitat. El senyal del ió disminueix durant la transmissió, però el soroll químic, el qual és la major limitació en mostres complexes, també disminueix força, millorant la relació senyal/soroll. És possible realitzar anàlisis quantitatives en mostres complexes amb separacions cromatogràfiques molt curtes, encara que els components no es separin del tot.

De totes maneres, cal tenir en compte que quan es realitza una quantificació, l'etapa d'ionització, que té lloc a la font, és la més important. La presència de compostos interferents a la font poden causar efectes inesperats tal com "supressió iònica", és a dir, la ionització dels analits d'interès es veu disminuïda o anul·lada per la presència d'aquests interferents.

3-Detector: El detector és el dispositiu que detecta els ions separats a l'analitzador. El detector més usat és el dínode de conversió, que converteix els ions existents a l'analitzador en electrons. Aquests electrons impacten en un plat de fòsfor el qual, quan és excitat, emet fotons. El fotons impacten a un fotocàtode davant del fotomultiplicador per produir electrons i el senyal és amplificat mitjançant el fotomultiplicador. El fotomultiplicador està tapat amb vidre al buit. Això preveu de la contaminació i permet mantenir el bon funcionament del detector per un llarg període de temps respecte els multiplicadors electrònics.

2.1.4.Mètodes no cromatogràfics

Anàlisi immunosorbent amb enzim lligat (ELISA)

Altres tipus d'anàlisi també usades en la determinació de micotoxines són els assaigs immunosorbents amb enzim lligat (ELISA) (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) que s'usen generalment per a detectar presència o absència de toxina en una mostra en un nivell de concentració determinat o en un marge de concentracions. Les avantatges de la utilització dels mètodes ELISA és que no requereixen la utilització d'instrumentació d'HPLC i l'etapa de neteja no ha de ser tant estricte com en el cas d'altres tècniques analítiques. És possible detectar la presència d'una determinada toxina a partir de la mostra homogeneïtzada, depenent del tipus d'ELISA que s'utilitzi. La principal desavantatge és que les mostres que donen resultats positius, posteriorment s'han de confirmar per tècniques analítiques convencionals (33).

Els mètodes ELISA més emprats en l'anàlisi de micotoxines són assaigs competitiu, els quals es basen en les següents etapes (Figura 2.1.4.1.):

1. S'uneix un anticòs específic a un antígen (en aquest cas, una micotoxina d'interès) a una superfície inert, per exemple, el fons d'un orifici d'una microplaca de poliestirè.
2. L'enzim conjugat marcat amb la toxina i la mostra s'afegeixen simultàniament a la placa.
3. La toxina que prové de la mostra i l'enzim marcat competeixen per a la unió a l'anticòs que està immobilitzat a la placa.
4. En una etapa posterior, l'enzim conjugat i toxina no enllaçats són eliminats en l'etapa de neteja.
5. Posteriorment, s'afegeix el substrat a la placa, el qual provoca que l'enzim conjugat enllaçat promogui un canvi de color del peu. El canvi de color es mesura espectrofotomètricament. L'absorció és inversament proporcional a la concentració de la toxina present a la mostra, ja que a més toxina present a la mostra menys enzim conjugat s'unirà a l'anticòs de la placa i produirà menys canvi de color.

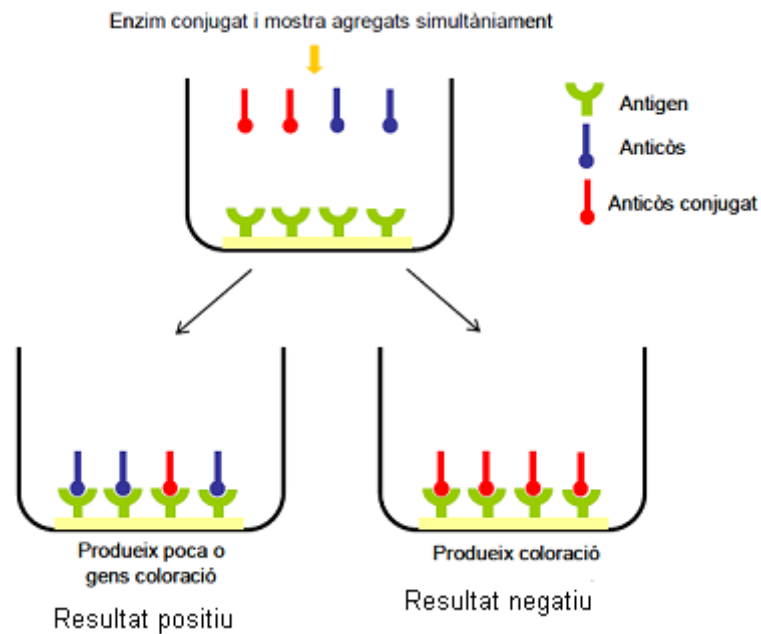


Figura 2.1.4.1. Anàlisi immunosorbent amb enzim lligat

A la figura 2.1.4.2. es mostra un exemple d'un tipus de kit en el qual s'utilitza una microplaca els forats de la qual estan recoberts amb l'anticòs específic de la micotoxina d'interès.

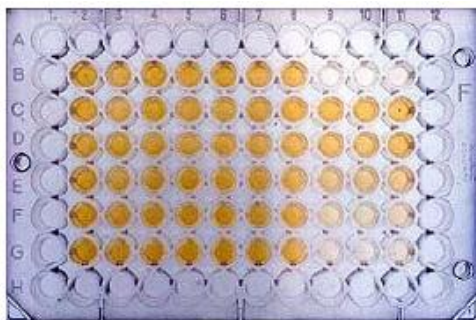


Figura 2.1.4.2. Placa per a assaig ELISA

2.1.5. Comparació dels mètodes d'anàlisi de micotoxines

Com s'ha comentat al llarg del present treball existeixen una àmplia varietat de mètodes per a l'anàlisi d'aflatoxines i ocratoxines. A la taula 2.1.5.1. es mostra un resum dels principals avantatges i inconvenients que presenten les diferents tècniques alternatives a l'etapa de preparació de mostra en l'anàlisi de micotoxines i a la taula 2.1.5.2. les tècniques analítiques aplicables.

Preparació de mostra	Avantatges	Inconvenients
Extracció líquida	No requereix d'instrumentació	<ul style="list-style-type: none"> No automatitzable Elevat cost dels solvents d'elevada puresa Ús de solvents orgànics perjudicials pel medi ambient
SPE	<ul style="list-style-type: none"> Facilitat d'ús Automatitzable Baix cost Adaptable a una gran varietat de matrius 	Moderada selectivitat
IAC	<ul style="list-style-type: none"> Facilitat d'ús Elevada selectivitat Automatitzable 	<ul style="list-style-type: none"> Elevat cost No reutilitzable Matriu dependent

Taula 2.1.5.1. Avantatges i inconvenients de les principals alternatives a l'etapa de preparació de mostra en l'anàlisi de micotoxines.

IAC: Columnes d'immunoafinitat, SPE: Extracció en fase sòlida

Tècnica analítica	Avantatges	Inconvenients
HPLC-Fluorescència	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada sensibilitat • Elevada selectivitat 	<ul style="list-style-type: none"> • Requereix instrumentació • Pot requerir derivatització en el cas de les aflatoxines
HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada selectivitat • Àmplia aplicabilitat • Etapa de purificació de mostra poc estricte 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparació de l'analista
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Facilitat d'ús • Anàlisi simultània de mostres • Etapa de purificació de mostra poc estricte 	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmació de mostres positives • Matriu dependent

Taula 2.1.5.2. Avantatges i inconvenients de les principals tècniques analítiques emprades en l'anàlisi de micotoxines.

HPLC: Cromatografia líquida, **MS:** Espectrometria de masses, **ELISA:** Assaig immunosorbent emb enzim lligat.

2.2. Antecedents en el nostre grup dels mètodes desenvolupats per a l'anàlisi d'aflatoxines i ocratoxina A

Com ja s'ha comentat en la introducció de la present Tesi Doctoral, un dels objectius és desenvolupar un mètode d'anàlisi simultània d'aflatoxines G₂, B₂, G₁, B₁ i OTA en compost. S'ha trobat poca bibliografia sobre el tema, per tant, s'ha decidit partir de mètodes d'anàlisi realitzades anteriorment en la nostra secció per a desenvolupar un nou mètode d'extracció simultània de les aflatoxines i l'ocratoxina A en una matriu diferent de les analitzades fins el moment.

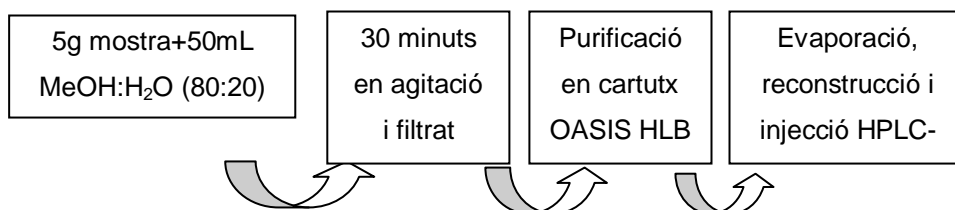
A continuació es presenta l'experiència del grup desenvolupada en els últims anys en l'anàlisi de micotoxines sobre matrius alimentàries. Les matrius més recents on s'han analitzat aquestes micotoxines són en mostres de cervesa i en plantes medicinals.

2.2.1. Anàlisi de les aflatoxines B₁, G₁, B₂ i G₂ en plantes medicinals (Mètode A1)

En aquest apartat es presenta una de les mètodes desenvolupades a la secció sobre l'anàlisi d'aquestes toxines en plantes medicinals. Aquest mètode s'ha publicat a la revista *J. Chromatography A* amb el títol: "Analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in medicinal herbs by liquid

chromatography tandem mass spectrometry" (17). Cal tenir en compte, que en aquest mètode només s'analitzen les aflatoxines i no s'estudia la ocratoxina A.

L'anàlisi de les aflatoxines en mostres de plantes medicinals consta de les etapes representades a l'esquema 2.2.1.1:



Esquema 2.2.1.1. Mètode d'anàlisi de les aflatoxines en plantes medicinals.

El tractament de la mostra per a l'anàlisi de les aflatoxines en les plantes medicinals és el que es descriu a continuació: es pesen 5g de mostra i es realitza una extracció amb 50mL de la mescla metanol:aigua (80:20). Es deixa 30 minuts en agitació magnètica i es filtra per gravetat. A una alíquota de 4mL de la mescla, s'afegeixen 2,6mL d'aigua per tal de tenir un contingut del 50% en metanol (aquest percentatge és el òptim pels cartutxos HLB) i posteriorment es purifica amb un cartutx d'extracció OASIS HLB (3cc/60mg).

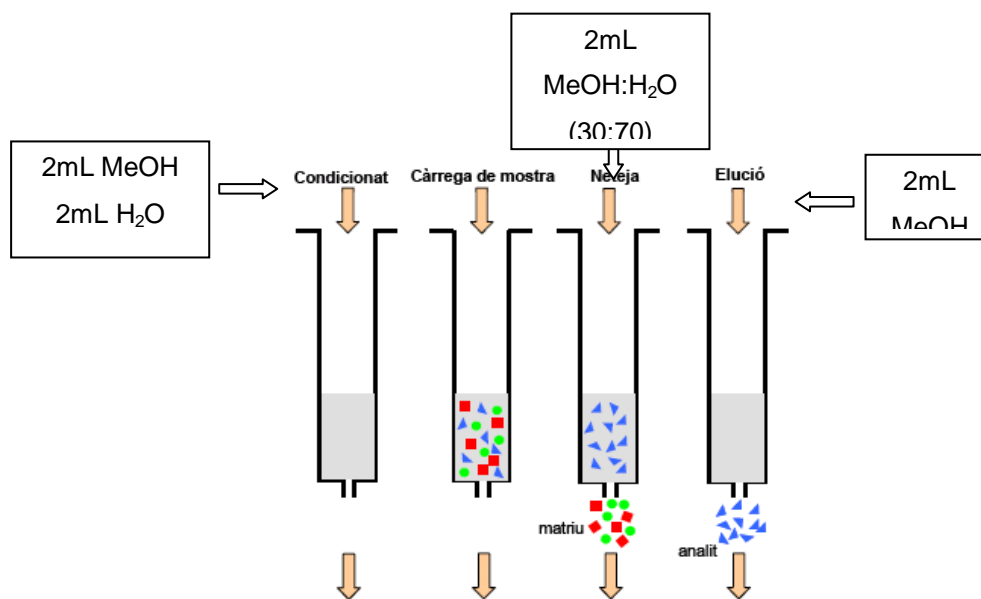
A la figura 2.2.1.1. es mostra el dispositiu del col·lector de buit on s'adapten els cartutxos d'extracció en fase sòlida.



Figura 2.2.1.1. Imatge del col·lector de buit

El cartutx es condiciona prèviament amb 2mL de metanol i s'equilibra amb 2mL d'aigua. Després es carrega la mostra i es renta el cartutx amb 2mL d'una mescla metanol:aigua (30:70). Les toxines s'elueixen amb 2mL de metanol. A continuació, s'evapora fins a sequedat sota corrent de nitrogen i es reconstitueix amb 1mL de fase mòbil. Seguidament, es filtra a través d'un filtre de nylon de 0,22µm i s'injecta a l'HPLC-MS.

A continuació en el esquema 2.2.1.2. es mostra com es purifica la mostra amb els cartutxos OASIS HLB (3cc/60mg).



Esquema 2.2.1.2. Purificació de la mostra.

A continuació es procedeix a presentar les condicions cromatogràfiques amb què s'han injectat les mostres analitzades de plantes medicinals.

Condicions cromatogràfiques

- Cromatògraf: Waters 2690
- Columna: Merck Lichrocart C₁₈(4 x 30mm, 3µm)
- Fase mòbil: CH₃OH:H₂O (30:70)
- Flux: 1ml/min
- Temperatura columna: 30°C
- Volum injecció: 10µl
- Detector DAD: 200 a 400 nm ($\lambda=360\text{nm}$)

Espectrometria de masses:

Un cop optimitzades les condicions de separació, el sistema d'HPLC s'acobra a un espectròmetre de masses de quadrupol simple amb ionització per electrospray (Waters ZMD).

Paràmetres del Tune:

- Voltatge del capil·lar: 3 kV (mode positiu), 2,5 kV (mode negatiu).
- Voltatge d'extracció: 7 V
- Voltatge de con: de 5 a 120 V
- Lents de radio freqüència: 0,5 V
- Temperatura de la font: 100°C

- Temperatura de dessolvatació: 350°C

Paràmetres de l'espectròmetre de masses:

- Energia del ió: 0,5 V
- Resolució a masses altes:12,5
- Resolució a masses baixes:12,5
- Flux de gas de dessolvatació: 500 l/h
- Flux de gas de con: 30 l/h
- Fotomultiplicador: 650

La injecció es realitza en mode SIR aplicant ESI positiu de 0 a 9,5 minuts on es detecten les aflatoxines G₁, B₁, G₂, B₂. Les masses que es segueixen en cada toxina són les que es descriuen a continuació en la taula 2.2.1.1. on el ió primari correspon a la massa de la molècula protonada i el ió secundari és l'adducte amb sodi per a cadascuna de les quatre aflatoxines.

Toxina	ESI	ió primari (m/z)	Voltatge de con ió primari (V)	ió secundari (m/z)	Voltatge de con ió secundari (V)	tr (min)
AFB ₁	Positiu	313.1	20	335.0	40	2.9
AFG ₁	Positiu	329.1	20	351.0	40	4.0
AFB ₂	Positiu	315.1	40	337.0	40	5.3
AFG ₂	Positiu	331.0	40	353.0	40	7.4

Taula 2.2.1.1. Ions primaris i secundaris(m/z) de cada toxina, voltatges de con(V) i temps de retenció(tr) per a cada toxina.

El mètode ha estat validat amb l'espectròmetre de masses, obtenint els resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses són els es presenten a continuació:

- L'exactitud del mètode, expressada en percentatge de recuperació, és del 110%, 81%, 90% i 77% per a les aflatoxines B₁, G₁, B₂ i G₂ respectivament. L'addició de cada toxina addicionada a la mostra de plantes medicinals ha sigut de 500ng que en mostra equival a 100µg/kg.
- Aquest mètode té un comportament lineal de 1 a 500µg/l per a cada una de les toxines en estudi.
- El límit de detecció i quantificació s'han determinat en mostres de plantes medicinals addicionades amb una quantitat coneguda de toxines. El límit de detecció en mostra trobat és de 3µg/kg per a les aflatoxines B₁, G₁, B₂ i G₂. El límit de quantificació es situa a 10µg/kg per a les aflatoxines B₁, G₁, B₂ i G₂.

A continuació es mostra una taula resum del mètode utilitzat per a les mostres de plantes medicinals (**Mètode A1**).

Mètode	Columna	F.M.	Detector/s	LD i LQ Patrons	LD i LQ Mostra
A1	Merk Lichrocart C ₁₈ (4x30mmx3µm)	CH ₃ OH:H ₂ O (30:70) Isocràtic durant 9 minuts Flux=1mL/min	DAD-MS (waters 2690-ZMD) 1)DAD: 200-400nm, λ=360nm 2)MS: SIR + io primari, secundari(segons taula 2.2.1.1.)	MS LD=1,2µg/L LQ=4µg/L	MS LD=3µg/kg LQ=10µg/kg

Taula 2.2.1.2. Taula resum del mètode utilitzat per a l'anàlisi d'aflatoxines en plantes medicinals

A partir d'aquest punt de la Tesi Doctoral, sempre que es parli del **mètode A1** es refereix a aquest mètode descrit anteriorment.

Un cop presentat un dels mètodes desenvolupats en la secció, es presenta el mètode que s'ha desenvolupat en l'anàlisi de micotoxines en compost. Les micotoxines que s'analitzen en compost, són les aflatoxines G₂, G₁, B₂ i B₁, a més a més s'afegeix una altra micotoxina, l'ocratoxina A (OTA) que no s'ha tingut en compte en el mètode descrit anteriorment, però que es considera d'interès pels motius comentats en l'introducció del present capítol.

3.Part experimental

Com s'ha assenyalat, l'objectiu d'aquest apartat és desenvolupar una metodologia d'extracció simultània de les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ i l'ocratoxina A en mostres de compost per a realitzar una anàlisi qualitativa i quantitativa d'aquestes micotoxines.

S'han buscat antecedents bibliogràfics sobre l'anàlisi d'aquestes toxines en compost, però degut a què aquesta és pràcticament inexistent s'ha optat per adaptar el **mètode A1** a les mostres de compost, és a dir, s'ha fet una adaptació del mètode validat per a plantes medicinals utilitzat anteriorment per investigadors de l'IQS.

S'ha de tenir en compte que el nou mètode s'haurà d'aplicar sobre mostres de compost, matriu molt més complexa que la de les plantes i que, a més a més de les quatre aflatoxines, també s'analitzarà l'ocratoxina A. L'incorporació de la ocratoxina A obliga a realitzar una modificació en la fase mòbil respecte el **mètode A1**: utilitzar un gradient dels components de la fase mòbil per afavorir l'elució de les cinc toxines i també, afegir àcid fòrmic a la fase mòbil. L'àcid fòrmic és compatible amb l'espectròmetre de masses, perquè és volàtil i facilita la ionització de les toxines, especialment de l'ocratoxina A.

Un dels pocs articles publicats sobre l'anàlisi simultània de les toxines d'interès és el mètode proposat per Göbel i Lusky (16),el qual usa com fase mòbil una mescla de metanol: acetonitril:

aigua (1% àcid fòrmic). D'altra banda, el publicat per Tuomi (34) utilitza una mescla de metanol: acetat amònic aquós (10 mM).

En el present treball, es proposa utilitzar una mescla de metanol i aigua amb un 0,1% d'àcid fòrmic, coincidint amb l'utilitzat per Ventura (35), en un altre mètode desenvolupat a l'IQS.

A continuació, es descriuen diferents mètodes que s'han assajat a dissolucions dels analits d'interès.

3.1. Mètodes cromatogràfics posats a punt amb patrons

Partint del **Mètode A1** (veure apartat 2.2.1), i en funció de les disponibilitats instrumentals dins la secció de cromatografia i dels resultats obtinguts en l'aplicació dels mètodes a les mostres s'han realitzat diferents mètodes cromatogràfics que s'han aplicat a dissolucions dels analits. Com es pot veure en aquest apartat s'intenta la validació de dos mètodes descrits com a **mètode A2** i **mètode A3**. Aquests es descriuen a continuació:

a) Mètode A2:

- Columna: XTerra MS C₁₈(2,1x100mmx3,5µm)
- Flux: 0,2mL/min
- Fase mòbil: A: CH₃OH B:H₂O(0,1%HCOOH)

Gradient

t/min	A%	B%
0	40	60
6	85	15
9	85	15
10	40	60
16	40	60

- Detector/s: DAD-MS Waters 2690-ZMD.
 Detector 1: Amb el detector DAD s'ha treballat entre 200-400nm per enregistrar tot l'espectre, però la λ d'interès és de 360nm.
 Detector 2: S'ha injectat en mode SIR en el detector de masses seguint els ions que es mostren en la taula 3.1.1.

Els ions primaris i secundaris seguits per a les quatre aflatoxines són, com ja s'ha dit anteriorment, la molècula protonada i l'adducte amb sodi respectivament. En el cas de l'ocratoxina A, es realitza un ESI negatiu entre 9,5 i 14 minuts on el ió primari és la molècula desprotonada i el ió secundari correspon a la pèrdua del grup àcid.

Toxina	ESI	ió primari (m/z)	Voltatge de con ió primari (V)	ió secundari (m/z)	Voltatge de con ió secundari (V)	tr (min)
AFB ₁	Positiu	313.1	20	335.0	40	7.09
AFG ₁	Positiu	329.1	20	351.0	40	5.54
AFB ₂	Positiu	315.1	40	337.0	40	6.35
AFG ₂	Positiu	331.0	40	353.0	40	4.46
OTA	Negatiu	402.3	20	358.1	40	10.82

Taula 3.1.1. Ions primaris i secundaris (m/z) de cada toxina, voltatges de con (V) i temps de retenció (tr) per a cada toxina.

Comparant aquest **mètode A2** amb el **mètode A1**, es veu que es diferencien en:

- El **mètode A2** inclou un altre analit que es l'ocratoxina A, és per aquest motiu que en aquest nou mètode s'utilitza un gradient en la fase mòbil. L'ocratoxina A s'elueix a temps més elevats que les aflatoxines ja que és l'analit més apolar de les cinc toxines d'interès.
- Una altra diferència és l'ús de HCOOH en l'aigua de la fase mòbil, com ja s'ha explicat anteriorment.
- S'utilitza una columna cromatogràfica de diàmetre més petit amb la finalitat de poder realitzar l'acoblament a l'espectròmetre de masses sense necessitat de fer un "splitter".

Un cop comparats els dos mètodes anteriors, s'ha decidit validar el **mètode A2** amb patrons per després poder-lo aplicar a mostres de compost perseguint així assolir l'objectiu d'aquest capítol.

3.1.1. Validació del mètode analític

Per a la validació del mètode analític es determinen els següents paràmetres: linealitat i límit de detecció i quantificació. Aquests paràmetres s'han calculat tant amb el detector DAD com amb l'espectròmetre de masses.

a) Linealitat detector DAD

Es preparen diferents patrons d'una mescla de les aflatoxines B₁, G₁, G₂, B₂ i ocratoxina A de 200µg/L, 300µg/L, 500µg/L i 1mg/L diluint la dissolució mare de 100mg/L de cadascuna de les toxines en fase mòbil (corresponent a un rang de 2,5mg/kg a 12,5mg/kg segons preparació de mostra veure apartat 3.4 d'aquest apartat). S'ha decidit estudiar aquest rang de linealitat

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

perquè el treball es centra en mostres de compost, és a dir, es creu que el mètode ha de ser lineal en un rang més elevat que si es tractés d'una matriu alimentària.

De la figura 3.1.1.1 fins a la 3.1.1.10. es mostren les rectes de calibrat per a cada una de les toxines obtingudes amb el detector DAD i els factors de resposta. Cada un dels patrons s'han injectat 6 vegades.

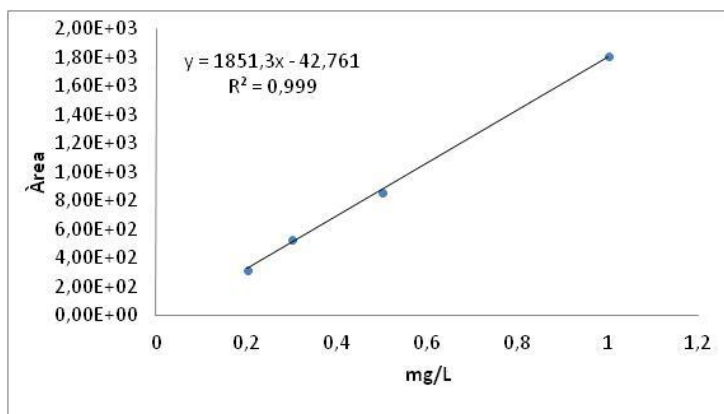


Figura 3.1.1.1 Recta de calibrat per l'aflatoxina G₂.

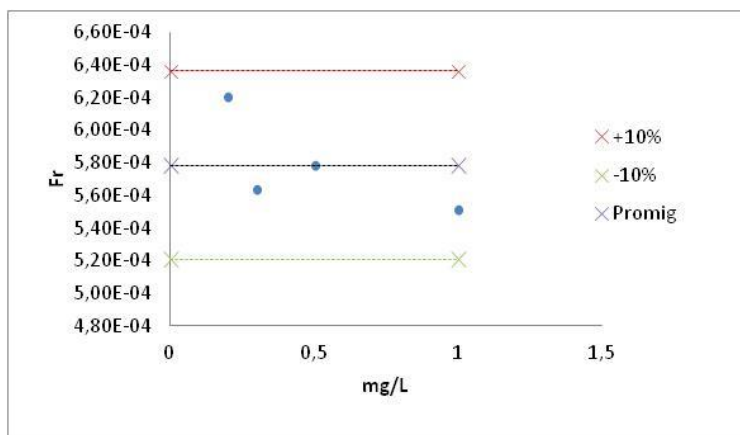


Figura 3.1.1.2. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina G₂.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

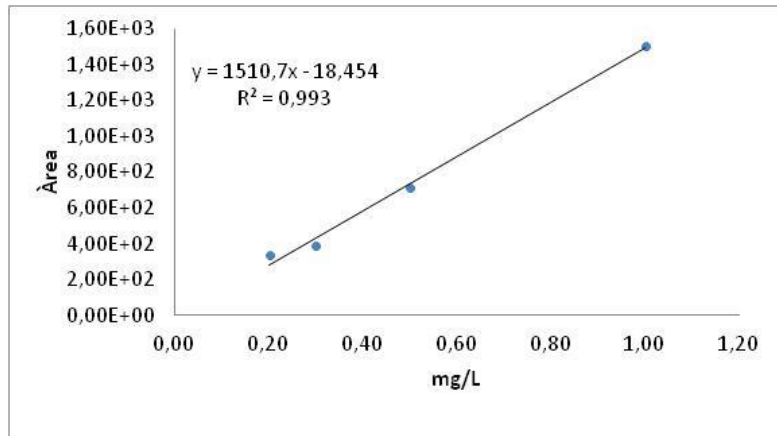


Figura 3.1.1.3. Recta de calibrat per l'aflatoxina G₁.

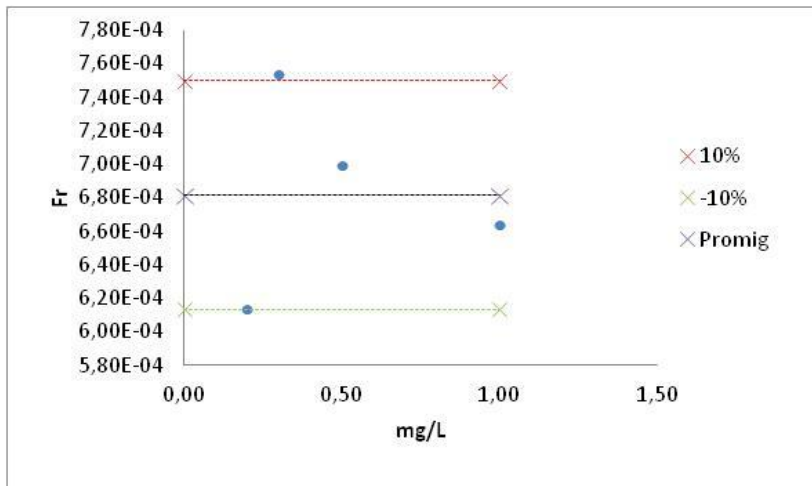


Figura 3.1.1.4. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina G₁.

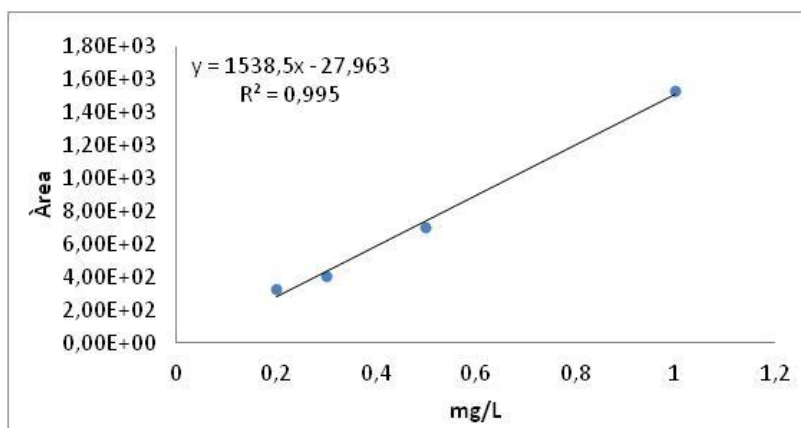


Figura 3.1.1.5. Recta de calibrat per l'aflatoxina B₂.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

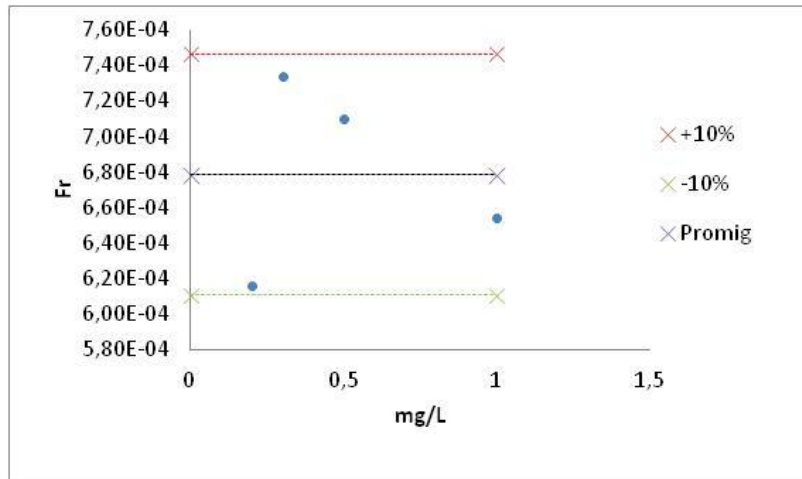


Figura 3.1.1.6. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina B₂.

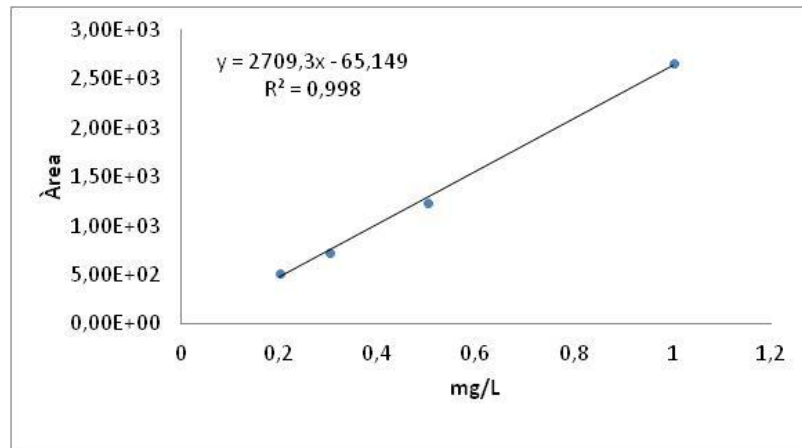


Figura 3.1.1.7. Recta de calibrat per l'aflatoxina B₁.

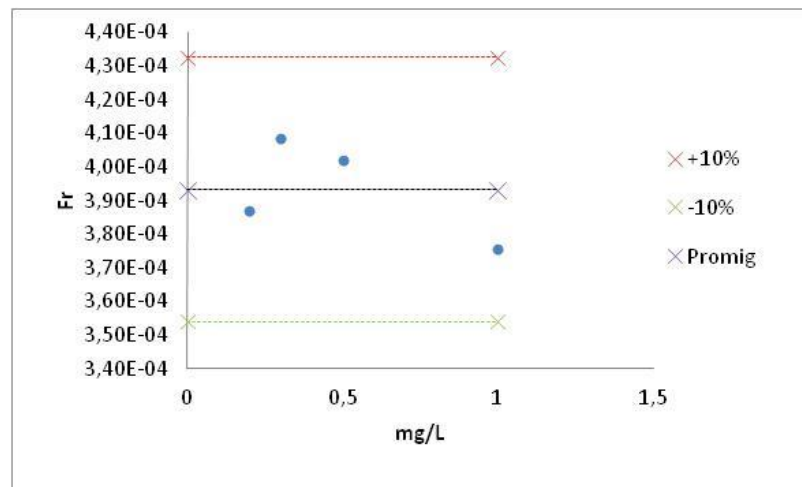


Figura 3.1.1.8. Factor de resposta vs concentració per a per l'aflatoxina B₁.

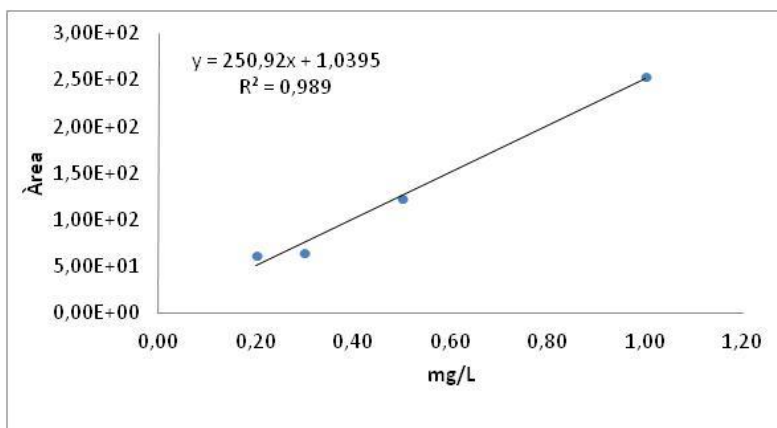


Figura 3.1.1.9. Recta de calibrat per l'ocratoxina A.

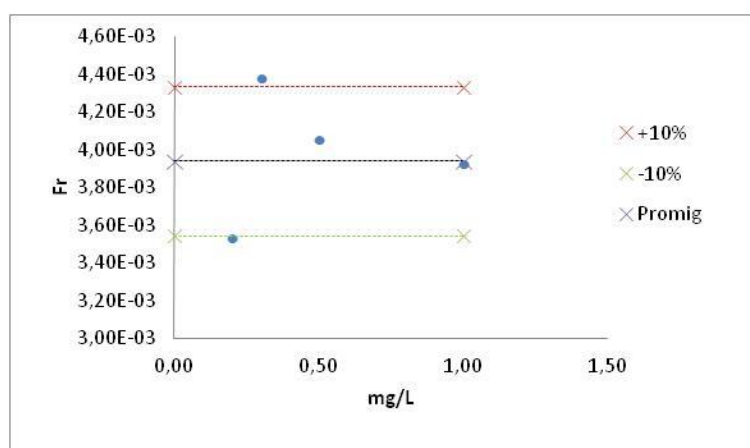


Figura 3.1.1.10. Factor de resposta vs concentració per a l'ocratoxina A.

Admetent una variació del $\pm 10\%$ respecte el valor promig del factor de resposta i observant els R^2 obtinguts en les rectes de calibrat, es pot considerar un comportament lineal de 0,2mg/L i 1mg/L per a cada una de les toxines.

b) Linealitat de l'espectròmetre de masses

Es preparen diferents patrons d'una mescla de les aflatoxines B₁, G₁, G₂, B₂ i ocratoxina A de 100µg/L, 200µg/L, 300µg/L, 500µg/L i 1mg/L diluint la dissolució mare de 100mg/L en fase mòbil. En mostra correspon a un rang de concentració entre 1,25mg/kg i 12,5mg/kg (segons preparació de mostra veure apartat 3.4). Aquest rang de linealitat és inferior al utilitzat en la linealitat del detector DAD perquè l'espectròmetre de masses és més sensible.

De la figura 3.1.1.11. fins a la 3.1.1.20. es mostren les rectes de calibrat per a cada una de les toxines obtingudes amb l'espectròmetre de masses i els factors de resposta. Igual que el detector DAD, cada un dels patrons s'han injectat 6 vegades.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

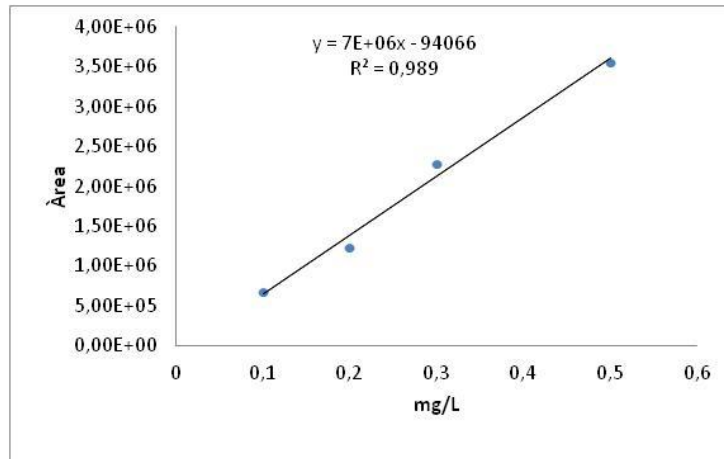


Figura 3.1.1.11. Recta de calibrat per l'aflatoxina G₂.

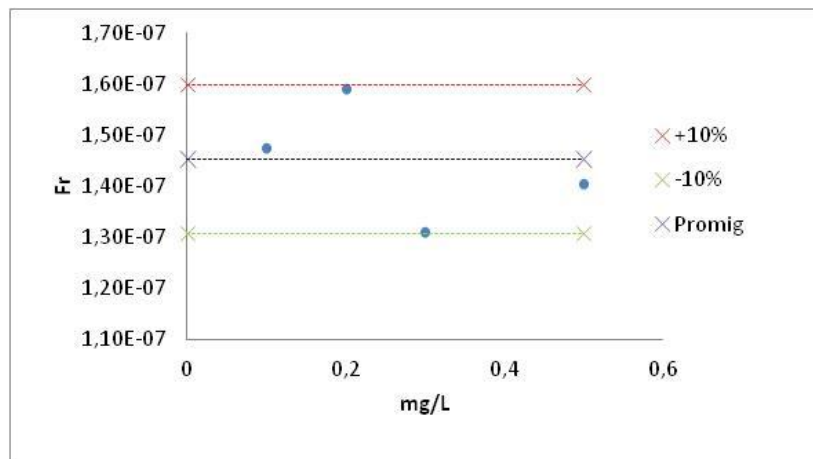


Figura 3.1.1.12. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina G₂.

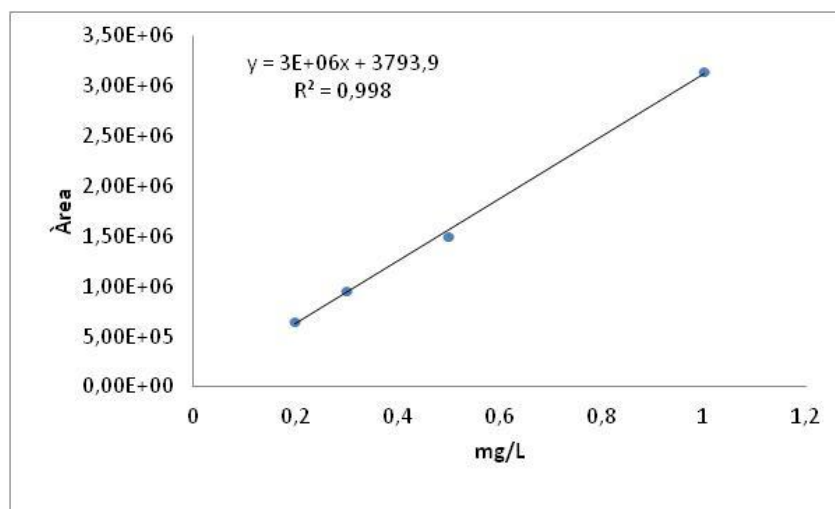


Figura 3.1.1.13. Recta de calibrat per l'aflatoxina G₁.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

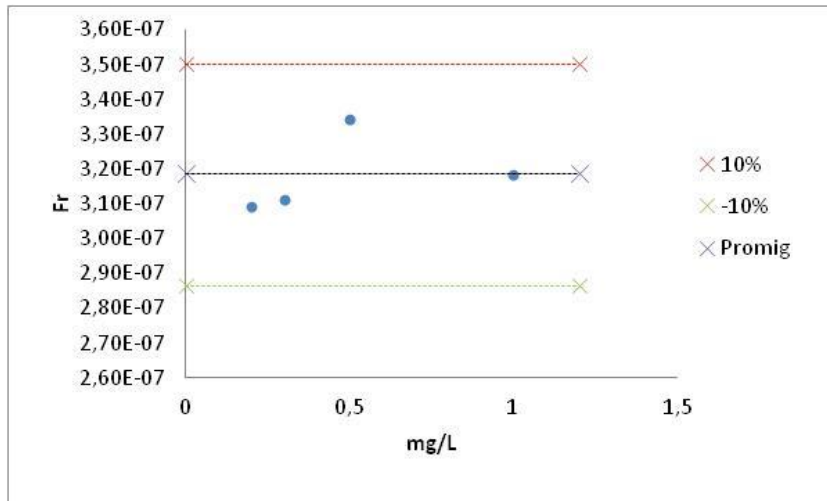


Figura 3.1.1.14. Factor de resposta vs concentració per a per l'aflatoxina G₁.

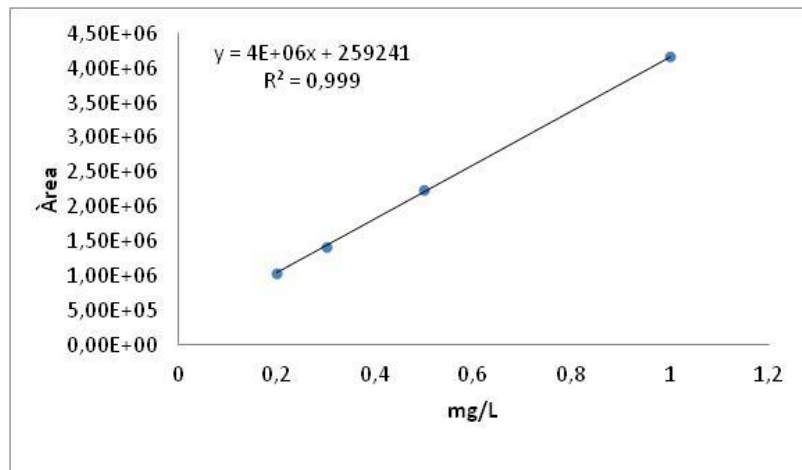


Figura 3.1.1.15. Recta de calibrat per l'aflatoxina B₂.

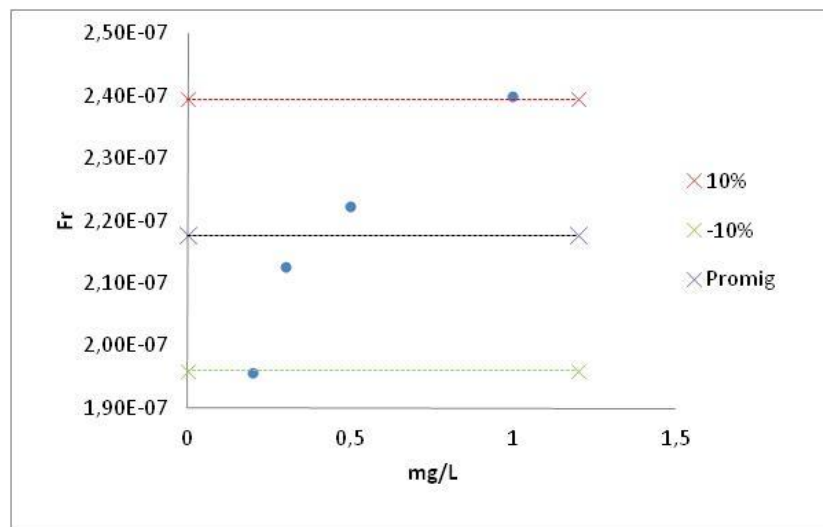


Figura 3.1.1.16. Factor de resposta vs concentració per a per l'aflatoxina B₂.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

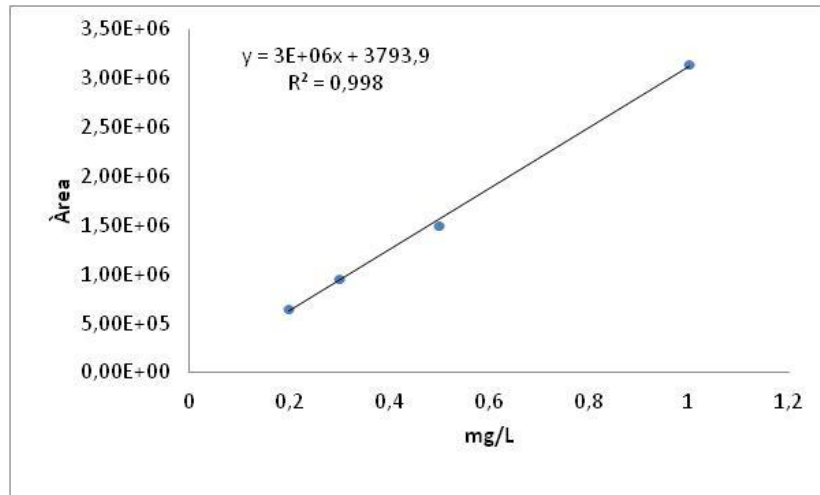


Figura 3.1.1.17. Recta de calibrat per l'aflatoxina B₁

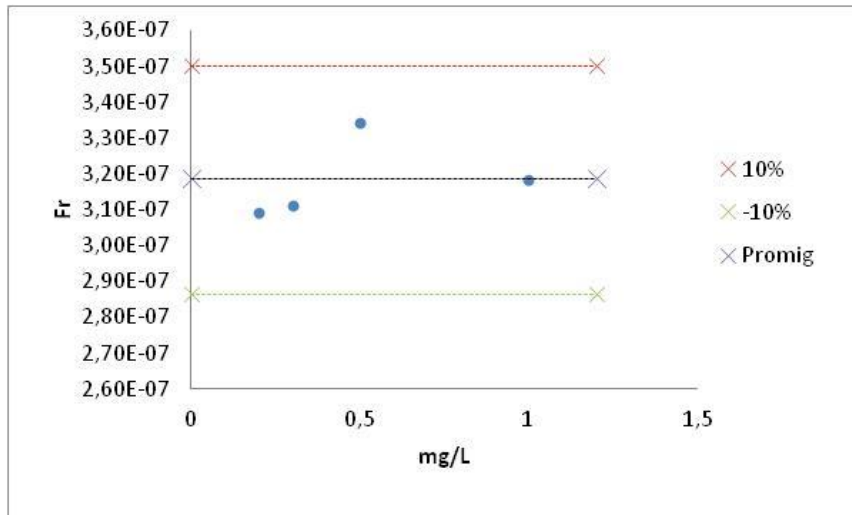


Figura 3.1.1.18. Factor de resposta vs concentració per a per l'aflatoxina B₁.

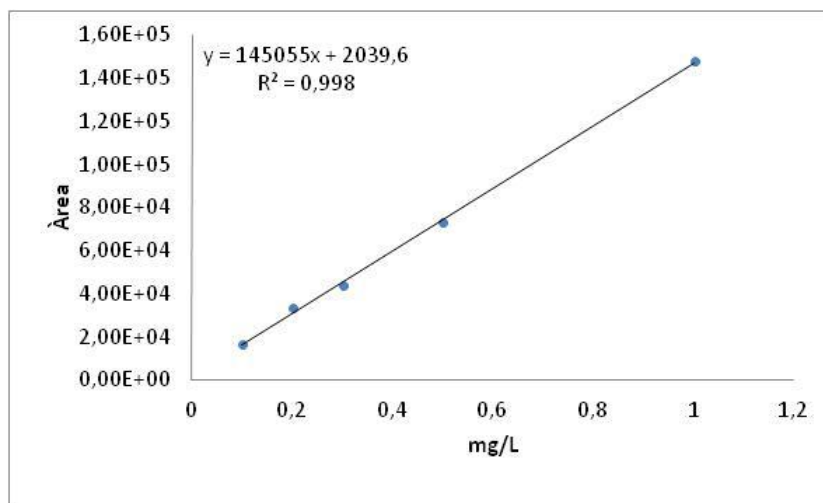


Figura 3.1.1.19. Recta de calibrat per l'ocratoxina A.

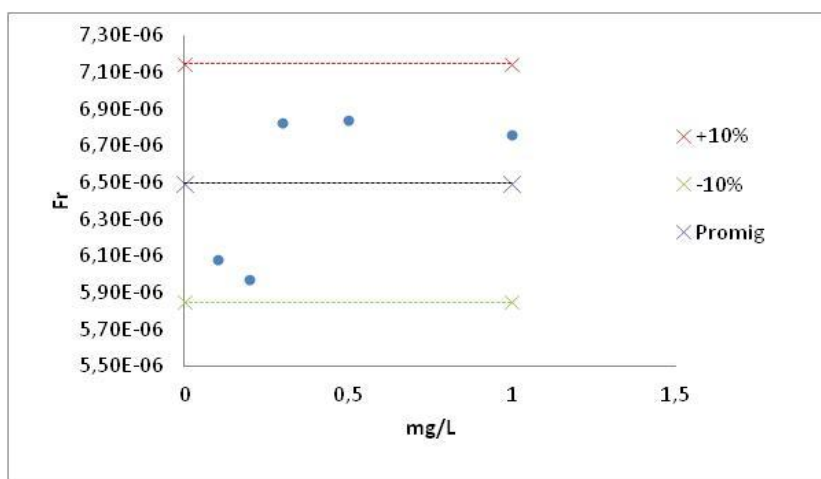


Figura 3.1.1.20. Factor de resposta vs concentració per a per l'ocratoxina A.

Admetent una variació del $\pm 10\%$ respecte el valor promig del factor de resposta i observant els R^2 obtinguts en les rectes de calibrat, es pot considerar un comportament lineal de 0,2mg/L i 1mg/L per a les aflatoxines G₂ i B₁ i entre 0,1mg/L i 1 mg/L per a les aflatoxines G₁, B₂ i OTA.

c) Límit de detecció i quantificació mitjançant el detector DAD.

El límit de detecció (LD) i el límit de quantificació (LQ) s'ha calculat amb una dissolució de 100µg/L per a les aflatoxines i amb una dissolució de 200µg/L per a l'ocratoxina A.

La taula 3.1.1.1. mostra la relació senyal soroll calculada per a cadascuna de les toxines. El LD i LQ calculat pel detector UV són els que es mostren en la taula 3.1.1.2.

	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
S/N	3,75	3,5	3,75	6,25	6

Taula 3.1.1.1. Relació S/N calculat per a cadascuna de les toxines

Detector UV	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
LD(µg/L)	80	85	80	48	50
LQ(µg/L)	266	285	266	160	166

Taula 3.1.1.2. Límits de detecció i quantificació per el detector DAD

En la figura 3.1.1.21. es mostra el cromatograma amb el que s'ha calculat el LD i LQ per a les toxines d'interès amb el detector DAD.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

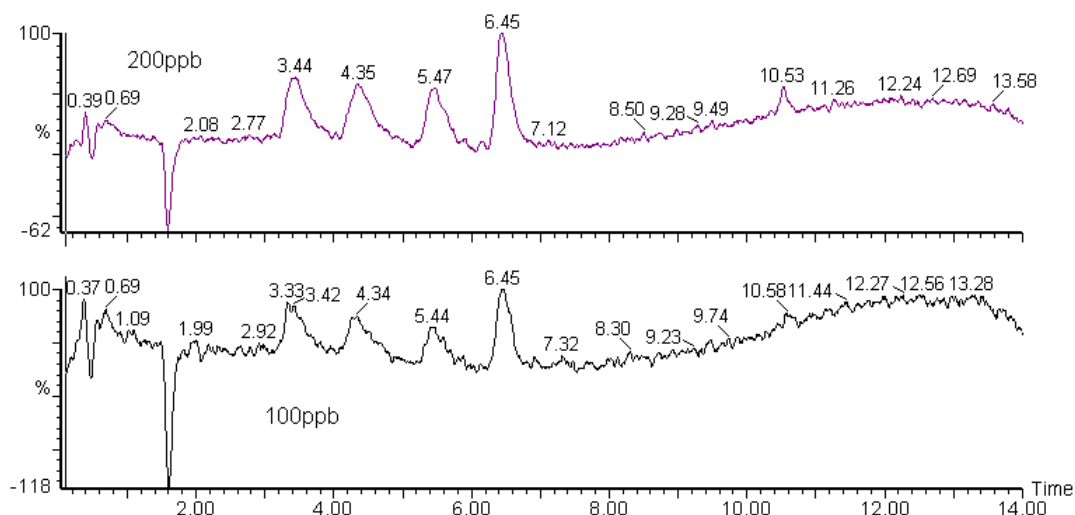


Figura 3.1.1.21. Cromatograma amb 350nm per les aflatoxines i l'ocratoxina A utilitzat per la detecció del límit de detecció de 100µg/L i de 200µg/L

d) Límit de detecció i quantificació utilitzant l'espectròmetre de masses.

En aquest cas, a diferència del detector DAD, el límit de detecció (LD) i el límit de quantificació (LQ) s'ha calculat amb una dissolució de 10µg/L per els analits d'interès. A continuació en la taula es mostren els límits de detecció i quantificació calculats per l'espectròmetre de masses.

A continuació, en la taula 3.1.1.3 es mostra la relació senyal soroll calculada per a cadascuna de les toxines amb l'espectròmetre de masses. En la taula 3.1.1.4 es mostren els LD i LQ per cada toxina.

	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
S/N	25	15	17	32	18,3

Taula 3.1.1.3 Relació S/N per a cadascuna de les toxines.

Detector MS	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
LD(µg/L)	1,2	2	2	1	1,6
LQ(µg/L)	4	7	6	3	5,5

Taula 3.1.1.4 Límits de detecció i quantificació per el detector de masses

En la figura 3.1.1.22. es mostra el cromatograma amb el que s'ha calculat el LD i LQ per a les toxines d'interès amb el detector de masses.

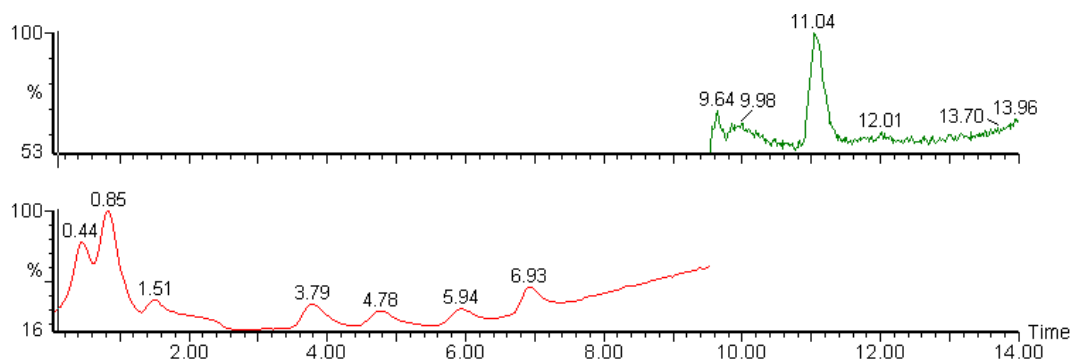


Figura 3.1.1.22. Cromatograma en mode SIR positiu per les aflatoxines i l'ocratoxina A utilitzat per la detecció del límit de detecció de 10µg/L

Un cop validat el **mètode A2** es procedeix a la descripció d'un altre mètode per a la detecció de les toxines d'interès. Degut a disponibilitat d'un equip d'UHPLC-UV-Fluo es veu convenient fer la transferència del mètode d'HPLC-MS a UHPLC, amb la finalitat d'augmentar la sensibilitat i disminuir el temps d'anàlisi.

Així doncs, a partir d'aquest moment, quan es parli de **mètode A2** es refereix aquest mètode descrit anteriorment.

Seguidament es presenta i es valida un nou **mètode A3** utilitzant l'UHPLC-UV-Fluo.

b) Mètode A3:

El següent mètode que es presenta, posat a punt amb patrons, és el **mètode A3** on s'ha realitzat la transferència del mètode per HPLC-MS a UHPLC-UV-Fluo. Les condicions cromatogràfiques són les que es presenten a continuació.

- Columna: Acquity (2,1x50mmx1,7µm)
- Flux: 0,4mL/min
- Fase mòbil: A: CH₃OH B:H₂O

Gradient

t/min	A%	B%
0	40	60
2,3	85	15
2,5	85	15
2,6	40	60
3,2	40	60

- Detector/s: UV-Fluo Acquity ultraperformance LC
 Detector 1: Detector de UV on s'ha treballat a un $\lambda=350\text{nm}$.
 Detector 2: Detector de fluorescència on s'ha treballat a diferents longituds d'ona d'excitació i d'emissió depenen de l'analit. Aquestes longituds d'ona són les que es mostren en la taula 3.1.1.5.

Fluorescència	λ excitació(nm)	λ emissió(nm)
Aflatoxines	363	450
OTA	333	460

Taula 3.1.1.5 Longituds d'ona (nm) d'excitació i emissió

Comparant aquest **mètode A3** amb els **mètodes A2** i **A1**, s'observen les següents diferències:

- S'utilitzen diferents detector, en cas del **mètode A1** s'utilitza l'espectròmetre de masses igual que en **mètode A2**. En canvi en el **mètode A3**, s'utilitza un detector de fluorescència amb la finalitat de disminuir el límit de detecció i de quantificació.
- Degut al canvi de detector, en aquest **mètode A3** no s'utilitza àcid fòrmic en la fase mòbil, ja que no és necessària la ionització dels analits.
- En el **mètode A3** s'utilitza una columna especial per aquest tipus de cromatografia d'UHPLC on s'arriben a pressions molt elevades. Aquestes columnes tenen una mida de partícula més petita que les usades amb HPLC, amb la finalitat d'obtenir millor eficàcia, això origina treballar a pressions més elevades.

En la present Tesi Doctoral, s'ha validat el **mètode A3** conclouent que el mètode és lineal entre 5mg/L i 0,02mg/L per a les quatre aflatoxines amb el detector UV, i és lineal entre 10mg/L i 0,4mg/L per a l'ocratoxina A amb el detector UV.

En canvi, pel detector de fluorescència el mètode és lineal entre 50µg/L i 2µg/L per a les aflatoxines i és lineal entre 10mg/L i 0,05mg/L i per a l'ocratoxina A.

En quant el límit de detecció (LD) i el límit de quantificació (LQ) s'ha calculat pels dos detectors UV i fluorescència, utilitzant pel detector UV una dissolució de 20µg/L per a les aflatoxines i una dissolució de 0,4mg/L per a l'ocratoxina A. En canvi per el detector de fluorescència s'ha utilitzat una dissolució de 10µg/L per a les aflatoxines i una de 20µg/L per a l'ocratoxina A.

La taula 3.1.1.6 mostra la relació senyal soroll calculada per a cadascuna de les toxines amb el detector UV i la taula 3.1.1.7 mostra els LD i LQ amb aquest detector.

	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
S/N	1918	1644	2960	2960	109

Taula 3.1.1.6 Càlcul del S/N per cada toxina.

Detector UV	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
LD(µg/L)	0,6	0,7	0,4	0,4	10
LQ(µg/L)	2	2,4	1,5	1,5	36

Taula 3.1.1.7 Límits de detecció i quantificació per el detector UV

En la figura 3.1.1.23. es mostra el cromatograma de 0,4mg/L utilitzat per el càlcul del LD i LQ per a l'ocratoxina A.

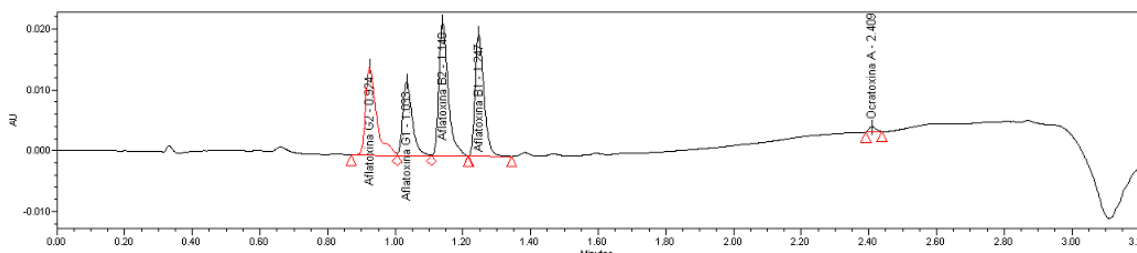


Figura 3.1.1.23. Cromatograma d'una dissolució de 0,4mg/L dels analits d'interès obtingut amb el detector UV a una $\lambda=350\text{nm}$

En la figura 3.1.1.24. es mostra el cromatograma de 20 $\mu\text{g/L}$ utilitzat per el càlcul del LD i LQ per a les aflatoxines amb el detector UV.

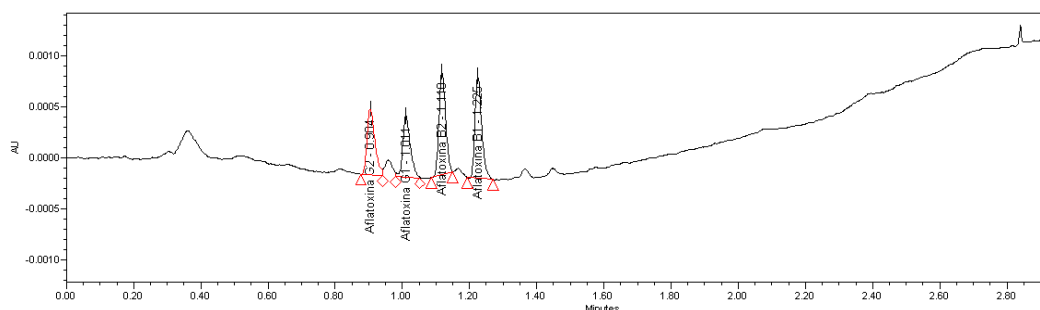


Figura 3.1.1.24. Cromatograma d'una dissolució de 20 $\mu\text{g/L}$ dels analits d'interès obtingut amb el detector UV a una $\lambda=350\text{nm}$

La taula 3.1.1.8 mostra la relació senyal soroll per cadascuna de les toxines calculada amb el detector de fluorescència, i la taula 3.1.1.9 mostra els LD i LQ per a cadascuna de les toxines

	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
S/N	866	67	1600	135	30

Taula 3.1.1.8 Relació S/N per a cada toxina

Detector Fluorescència	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
LD($\mu\text{g/L}$)	0,05	0,4	0,02	0,2	2
LQ($\mu\text{g/L}$)	0,2	1,5	0,06	1	7

Taula 3.1.1.9 Límits de detecció i quantificació per el detector de fluorescència

En la figura 3.1.1.25. es mostra el cromatograma de 10 $\mu\text{g/L}$ utilitzat pel càlcul del LD i LQ per a les quatre aflatoxines obtingut amb el detector de fluorescència.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

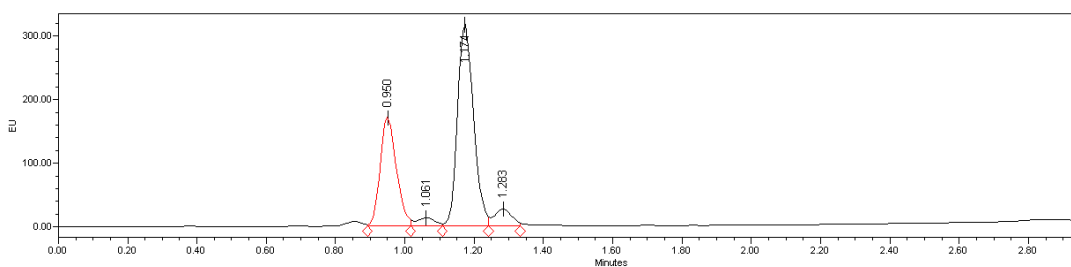


Figura 3.1.1.25. Cromatograma d'una dissolució de 10µg/L dels analits d'interès obtingut amb el detector de fluorescència.

En la figura 3.1.1.26. es mostra el cromatograma de 20µg/L utilitzat per el càlcul del LD i LQ per a l'ocratoxina A obtingut amb el detector de fluorescència.

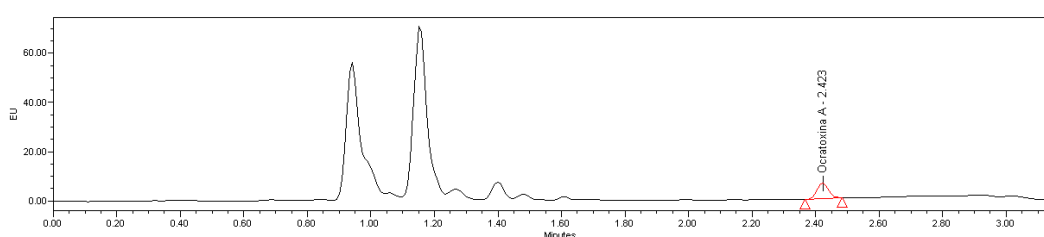


Figura 3.1.1.26. Cromatograma d'una dissolució de 20µg/L dels analits d'interès obtingut amb el detector de fluorescència.

Així doncs, a partir d'aquest moment quan es parli del **mètode A3** es refereix a aquest mètode descrit anteriorment.

3.2.Comparació del mètode A1 (HPLC-DAD-MS), mètode A2 (HPLC-DAD-MS) i mètode A3 (UHPLC-UV-Fluo)

A continuació en la taula 3.2.1. es mostra una taula resum de les principals diferències entre els tres mètodes exposats anteriorment. Les taules 3.2.2. i 3.2.3. mostren una comparació entre els límits de detecció i quantificació respectivament.

	Mètode A1	Mètode A2	Mètode A3
Flux FM	1mL/min	0,2mL/min	0,4mL/min
Columna	Merk Lichrocart C ₁₈ (4x30mmx3µm)	XTerra MS C ₁₈ (2,1x100mmx3,5µm)	Acquity (2,1x50mmx1,7µm)
Temps cromatograma	9 minuts	18 minuts	3,2 minuts
Detector/s	HPLC-DAD i MS	HPLC-DAD i MS	UHPLC-UV i Fluo

Taula 3.2.1. Diferències entre els tres mètodes d'anàlisi

LD(µg/L)	AflatoxinaG ₂	AflatoxinaG ₁	AflatoxinaB ₂	AflatoxinaB ₁	OTA
Mètode A1(MS)	1,2	1,2	1,2	1,2	---
Mètode A2(MS)	1,2	2	2	1	1,6
Mètode A2(DAD)	80	85	80	48	50
Mètode A3(Fluorescència)	0,05	0,4	0,02	0,2	2
Mètode A3(UV)	0,6	0,7	0,4	0,4	10

Taula 3.2.2. Comparació dels límits de detecció per a cada mètode i per a cada detector.

LQ(µg/L)	AflatoxinaG ₂	AflatoxinaG ₁	AflatoxinaB ₂	AflatoxinaB ₁	OTA
Mètode A1(MS)	4	4	4	4	---
Mètode A2(MS)	4	7	6	3	5,5
Mètode A2(DAD)	266	285	266	160	166
Mètode A3(Fluorescència)	0,2	1,5	0,06	1	7
Mètode A3(UV)	2	2	1,5	1,5	36

Taula 3.2.3. Comparació dels límits de quantificació per a cada mètode i per a cada detector.

- La principal diferència entre els tres mètodes és el temps de durada del cromatograma. En el cas del **mètode A1** el cromatograma per a les quatre aflatoxines és de 9 minuts, sense detectar l'OTA, en canvi en el **mètode A2** és de 18 minuts per a les cinc toxines d'interès. A diferència de l'UHPLC-UV-Flu utilitzant el **mètode A3** el temps de cromatograma és de només 3,2 minuts per a les cinc toxines d'interès. A continuació es mostra la taula 3.2.4. on es mostren els temps de retenció per a les toxines injectades amb els tres mètodes.

Mètode	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
A1(min)	2,92	4,07	5,31	7,44	----
A2(min)	4,46	5,54	6,35	7,09	10,82
A3(min)	0,90	1,03	1,13	1,24	2,39

Taula 3.2.4. Temps de retenció per a la cada toxina depenent del mètode utilitzat

Com es pot veure en la taula 3.2.4. les toxines s'elueixen abans amb el **mètode A3** mantenint una bona resolució dels pics cromatogràfics. Com a conseqüència de la millora en els temps de retenció, el consum de fase mòbil també disminueix en el cas del **mètode A3**.

- En el cas del **mètode A1** i **A2**, com que es disposa d'un detector DAD, es poden obtenir els espectres d'UV per a cadascuna de les toxines d'interès. Així en el moment

de fer l'anàlisi d'una mostra es poden comparar els espectres d'UV de les mostres i patrons i comprovar si coincideixen. El segon detector que disposa aquest **mètode A1** i **A2**, l'espectròmetre de masses, resulta ser molt més sensible que el detector DAD, ja que es pot injectar en mode SIR on es segueixen els ions característics de cada toxina. La informació que s'obté amb aquest tipus d'injecció SIR és comprovar l'abundància relativa entre els ions primaris i secundaris per a cada analit, aquesta abundància s'hauria de mantenir constant tant en les mostres com en els patrons.

A continuació, en les figures 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 i 3.2.5 es mostren les abundàncies relatives entre els ions primaris i secundaris de cadascuna de les toxines.

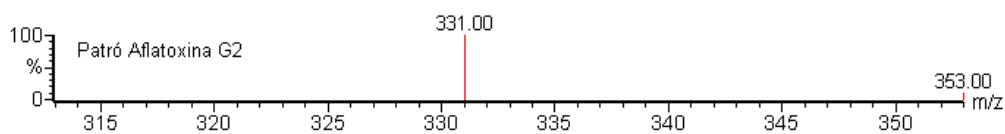


Figura 3.2.1. Espectre de masses en mode SIR positiu per l'aflatoxina G₂

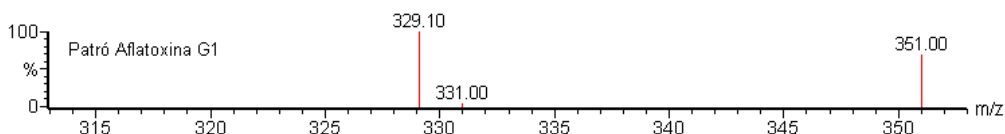


Figura 3.2.2. Espectre de masses en mode SIR positiu per l'aflatoxina G₁

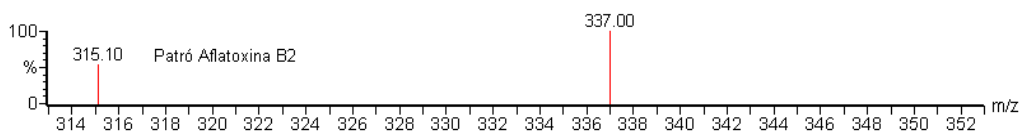


Figura 3.2.3. Espectre de masses en mode SIR positiu per l'aflatoxina B₂

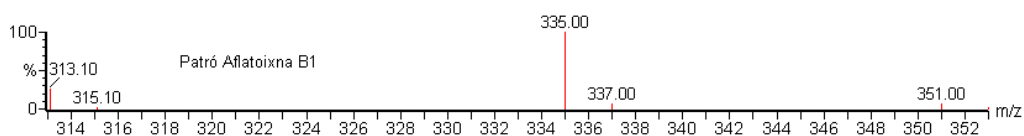


Figura 3.2.4. Espectre de masses en mode SIR positiu per l'aflatoxina B₁

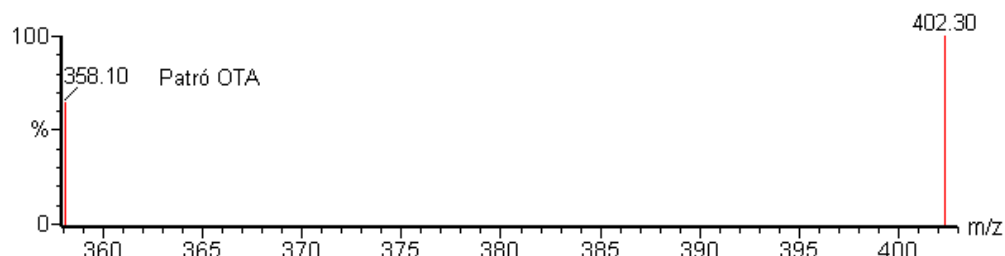


Figura 3.2.5. Espectre de masses en mode SIR negatiu per a l'ocratoxina A

- En el cas de les taules 3.2.2. i 3.2.3. (on es mostren els LD i LQ, pels **mètodes A1**, **A2** i **A3**), s'observa com amb el **mètode A3**, utilitzant el detector de fluorescència, s'arriba a límits de detecció i quantificació més baixos per a les aflatoxines G₂, G₁, B₂ i B₁. En

canvi en el cas de l'ocratoxina A el **mètode A2** resulta millor. A més a més un altre fet a destacar, és que el **mètode A3**, utilitzant un detector de UV permet arribar a límits inferiors que el detector DAD del **mètode A2**. Aquest fet s'explica perquè en el **mètode A3** s'utilitza un UHPLC on s'obtenen pics més estrets que amb l'HPLC.

- Un altre punt important a comparar és la pressió de treball. Amb l'UHPLC s'usa una pressió de treball molt més elevada (aproximadament unes 1000 atm) en comparació amb l'HPLC (aproximadament unes 400 atm). Això és degut a què les columnes utilitzades són diferents. Les columnes d'UHPLC tenen una mida de partícula i longitud menor que en les columnes utilitzades en HPLC, permetent una millor resolució.

3.3. Presentació de les mostres i proposta del límit de detecció a determinar en mostres de compost

Les mostres analitzades són mostres de compost de la depuradora de Blanes obtingut l'any 2002 i el 2007 i un altre compost de la depuradora de Manresa obtingut l'any 2007. Les dos mostres de Blanes s'han descrit en el capítol II apartat 3 de la present Tesi Doctoral. A continuació es procedeix a fer una breu descripció del compost de Manresa de l'any 2007.

El compost procedent de la depuradora de Manresa té un procés de compostatge diferent que el compost de la depuradora de Blanes. A la depuradora de Manresa el compostatge es fa en un túnel obert a diferència de Blanes que es fa en túnel tancat (veure apartat 3 del capítol II). En aquest cas el material que aporta porositat són estelles de pi i residus de cafè (1:2v/v). Un cop s'obté la mescla al túnel de compostatge i es va remonent i airejant fins que als 15 dies arriba al final del túnel. Aquest túnel de compostatge és continu, ja que contínuament va entrant mescla nova al túnel obert. En aquest cas també s'ha fet un tamisat del compost a 1cm. Finalment, després de la sortida del túnel, el compost entra en un procés de maduració que dura de 1 a 3 mesos.

Les mostres de compost analitzades procedents de Manresa són compost final mostrejades l'any 2007 i es poden observar en la figura 3.3.1.



Figura 3.3.1. Mostra de compost de la depuradora de Manresa

Aquest compost a diferència del compost de Blanes, té una mida més gran i no hi ha tantes estelles ni restes de pi com el compost procedent de Blanes.

Un cop presentades les mostres que s'analitzaran en el treball, es fa una proposta de límit de detecció dels analits pel mètode a desenvolupar. Com ja s'ha dit anteriorment, un dels objectius de la present Tesi Doctoral, és la posta a punt d'un nou mètode per a l'anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i ocratoxina A que permeti detectar fins a 1mg/kg en mostra.

El motiu d'aquest límit de detecció, que comparat amb el **mètode A1** és bastant elevat, és degut a què el compost no s'ingereix directament (com és el cas de les plantes medicinals), sinó que és destinat per a ser utilitzat a jardineria o per adob en agricultura.

Així doncs, s'ha estimat com a suficient, un límit de detecció per aquest mètode d'anàlisi de 0,2mg/kg utilitzant el detector d'UV.

3.4. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en les mostres de compost

En aquest apartat, es descriu la metodologia d'extracció i purificació que s'aplicarà a les mostres de compost a estudiar. S'ha optat per aplicar el mètode d'extracció i purificació de la mostra desenvolupat anteriorment en la secció (veure apartat 2.2.1.), realitzant alguns canvis que es descriuen més endavant.

Com ja s'ha dit anteriorment, l'anàlisi d'aquestes toxines és molt comú en mostres d'aliments, utilitzant com a solvent d'extracció cloroform ja que els mètodes establerts per a l'anàlisi d'aquestes toxines (2) utilitzen aquest dissolvent. Una de les novetats destacables de la present Tesi Doctoral sobre l'extracció de micotoxines és no utilitzar cloroform. En el mètode descrit anteriorment per a les plantes medicinals (apartat 2.2.1.), ja s'ha substituït el cloroform per una mescla MeOH:H₂O, i en la nova metodologia que es desenvolupa es manté aquest nou solvent per a l'extracció de micotoxines en compost.

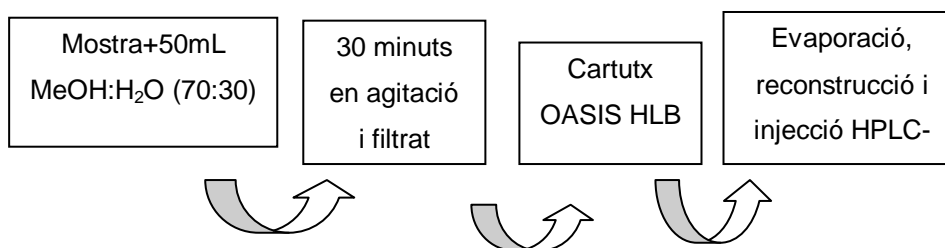
Abans de realitzar l'extracció de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA s'han assecat totes les mostres de compost. Per això, s'ha deixat el compost a l'estufa a 105°C fins que s'ha obtingut

un pes constant. Així s'ha determinat que les mostres de compost tenen una humitat d'entre 23 i 34%.

En tots els casos s'han analitzat tant les mostres de compost, com una part de les mateixes a les que s'hi ha addicionat una quantitat coneguda de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA, amb la finalitat de realitzar tant un estudi qualitatiu com quantitatiu.

La preparació de la mostra es realitza de la següent manera: es pesa la quantitat de mostra que corresponen segons l'addició (l'addició de la mostra potser l'**addició A** o **B** que es descriuen posteriorment) i es realitza una extracció amb 50mL de mescla metanol:aigua (70:30). Es deixa 30 minuts en agitació magnètica i es filtra per gravetat amb paper de filtre. A una alíquota de 4mL del filtrat, s'afegeixen 1,6mL d'aigua per tal de tenir un contingut del 50% en metanol, i posteriorment es purifica amb un cartutx d'extracció OASIS HLB (3cc/60mg) descrits anteriorment (veure apartat 2.1.2.2). El cartutx es condiciona prèviament amb 2mL d'acetonitril i s'equilibra amb 2mL d'aigua. Després es carrega la mostra i es renta el cartutx amb 2mL d'aigua-5% acetonitril. Les toxines s'elueixen amb 2mL d'acetonitril. A continuació, s'evapora fins a sequedat sota corrent de nitrogen i es reconstitueix amb 1mL de fase mòbil. Seguidament, es filtra a través d'un filtre de nylon de 0,22µm i s'injecta a l'HPLC-MS amb la finalitat de fer una anàlisi qualitativa i quantitativa.

S'ha comprovat que el filtre de 0,22µm no reté cap de les toxines d'interès, així doncs, l'esquema a seguir per a l'extracció de les toxines d'interès és el que es mostra en l'esquema 3.4.1.



Esquema 3.4.1. Mètode d'anàlisi de les aflatoxines i ocratoxina A per mostres de compost.

Per tal d'estudiar tant les recuperacions com per a la determinació qualitativa i quantitativa, s'han realitzat les addicions a la mostra que es descriuen a continuació:

- **Addició A:** S'afegeix a 1, 3 i 5g de mostra 5µg de cadascuna de les toxines d'interès i es realitza l'extracció i purificació seguint l'esquema 3.4.1. Aquesta addició correspon a una concentració en mostra de 5mg/kg, 1,6mg/kg i 1mg/kg. L'addició de les toxines es realitza a partir d'una dissolució mare de 100mg/L en MeOH, i s'addicionen un cop afegida la mescla MeOH:H₂O (70:30).
- **Addició B:** S'afegeix a 1g de mostra 10µg de cadascuna de les toxines d'interès i es realitza l'extracció i purificació seguint l'esquema 3.4.1. Aquesta addició en mostra correspon a una concentració de 10mg/kg. L'addició de les toxines es realitza a partir d'una dissolució mare de 100mg/L en MeOH, i s'addicionen un cop afegida la mescla MeOH:H₂O (70:30).

En totes les anàlisis, que es descriuran posteriorment, les condicions de l'HPLC-MS són les descrites en l'apartat 3.1 pel **mètode A2**. Cal destacar que pel mateix extracte s'obtenen dos resultats, un obtingut amb el detector DAD i un altre obtingut amb l'espectròmetre de masses ja

que els dos detectors estan acoblats en sèrie. Per tant, cada mostra de compost analitzada té dos apartats de resultats: un del detector DAD i un altre de l'espectròmetre de masses.

Seguidament, es descriuen les diferents mostres de compost analitzades.

3.4.1 Anàlisi del compost de Blanes del 2007

La primera mostra analitzada és el compost de Blanes del 2007. En aquesta mostra, s'ha aplicat el mètode descrit en l'apartat 3.4. i s'ha realitzat l'**addició A** i l'**addició B** en mostra. A continuació, es mostren els resultats obtinguts per a la mostra i per a les dues addicions.

a) Addició A

Com ja s'ha dit anteriorment, en aquesta addició la preparació de mostra es realitza amb 1, 3 i 5g de compost i paral·lelament s'addicionen 5µg a 1, 3 i 5g de mostra per a l'estudi de la recuperació de les toxines. Per a l'extracció i purificació de mostra es segueix l'esquema 3.4.1.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

S'han preparat 4 mostres de cada concentració i s'han calculat les recuperacions de cadascuna de les toxines. En la taula 3.4.1.1 es mostra el promig de les recuperacions obtingudes per a cada concentració.

Pes mostra (g)	Toxina addicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	5	5	69	34	90	58	73
3	5	1,6	41	37	83	89	49
5	5	1	30	31	46	48	32

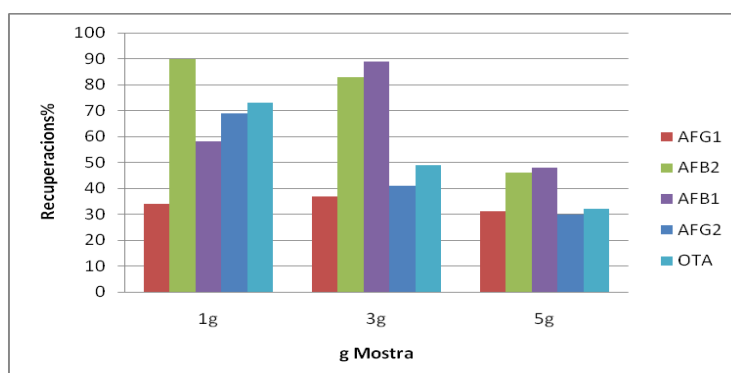
Taula 3.4.1.1. Recuperacions obtingudes amb el detector DAD

En la taula 3.4.1.2 es mostren els coeficients de variació dels resultats obtinguts per a cada mostra (n=4).

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	AFG ₂ CV (%)	AFG ₁ CV (%)	AFB ₂ CV (%)	AFB ₁ CV (%)	OTA CV (%)
1	5	5	2,5	37	2	29	13
3	5	1,6	4,5	24	5,5	16	30
5	5	1	27	11	11	26	35

Taula 3.4.1.2. Coeficients de variació obtinguts de les recuperacions amb el detector DAD

Com es pot observar en les taules 3.4.1.1 i 3.4.1.2, el pes de mostra influeix en les recuperacions de les toxines ja que les recuperacions varien en funció del pes de mostra. En el gràfic 3.4.1.1. es mostra aquesta variabilitat en les recuperacions. Com es pot observar, es tracta d'una mètrica matriu dependent.



Gràfic 3.4.1.1. Recuperacions obtingudes mitjançant el detector DAD en funció del pes de mostra

Un cop vistos els resultats de les recuperacions de les toxines, s'han realitzat les anàlisis del mateix compost sense adicionar les toxines d'interès i es pot afirmar que, en el compost de Blanes obtingut l'any 2007 **no hi ha presència de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA a una concentració superior a 0,2mg/kg.**

A continuació, es realitzen els mateixos càlculs amb l'espectròmetre de masses per comprovar si les recuperacions també depenen del pes de mostra quan s'utilitza aquest altre detector.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

S'han preparat 4 mostres adicionades a cada concentració i s'han calculat les recuperacions de cadascuna de les toxines. A continuació en la taula 3.4.1.3. es mostra el promig de les recuperacions obtingudes per a cada concentració de les diferents micotoxines adicionades.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	5	5	57	27	94	42	55
3	5	1,6	54	29	65	45	48
5	5	1	17	40	44	60	2

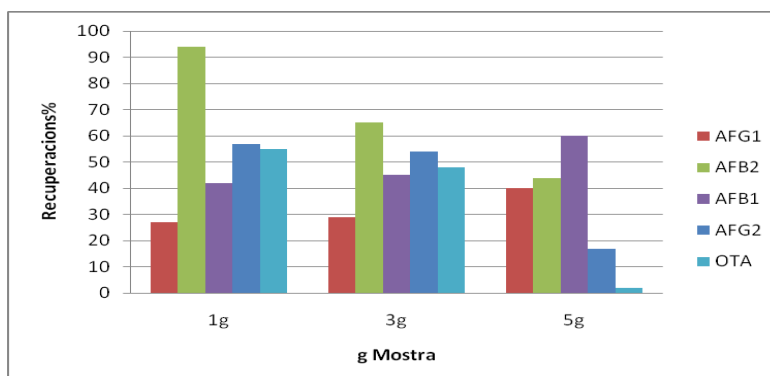
Taula 3.4.1.3. Recuperacions de les toxines calculades amb l'espectròmetre de masses

En la taula 3.4.1.4. es mostren els coeficients de variació dels resultats obtinguts per a cada mostra, tenint en compte que n=4.

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	AFG ₂ CV (%)	AFG ₁ CV (%)	AFB ₂ CV (%)	AFB ₁ CV (%)	OTA CV (%)
1	5	5	46	58	7	39	16
3	5	1,6	35	66	4	47	18
5	5	1	24	37	16	24	41

Taula 3.4.1.4. Coeficients de variació obtinguts de les recuperacions amb l'espectròmetre de masses (n=4)

En el gràfic 3.4.1.2 es mostra com influeix la quantitat de mostra en les recuperacions dels analits. Igual que el cas del detector DAD, aquesta metodologia és matriu dependent quan s'utilitza l'espectròmetre de masses.



Gràfic 3.4.1.2. Recuperacions obtingudes amb l'espectròmetre de masses en funció del pes de mostra

En la taula 3.4.1.5, es compararen els resultats de les recuperacions obtingudes amb els dos detectors utilitzats: el detector DAD i l'espectròmetre de masses.

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Recup(%) AFG ₂		Recup(%) AFG ₁		Recup (%) AFB ₂		Recup (%) AFB ₁		Recup (%) OTA	
		DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS
1	5	69	57	34	27	90	94	58	42	73	55
3	5	41	54	37	29	83	65	89	45	49	48
5	5	30	17	31	40	46	44	48	60	32	2

Taula 3.4.1.5. Taula comparativa de les recuperacions(%) obtingudes amb els dos detectors utilitzats.

Cal recordar, que l'extracte injectat ha sigut el mateix pels dos detector. Els patrons injectats també han sigut els mateixos, per tant observant la taula 3.4.1.5. es pot destacar que:

- Es veu clarament que les recuperacions de cadascuna de les toxines depenen solament del pes de mostra, ja que en totes les mostres s'ha afegit la mateixa quantitat de toxina.
- Les recuperacions a més a més de dependre del pes de mostra també depenen de cada toxina, sent les més baixes per a les aflatoxines G₁ i B₁.
- Les recuperacions obtingudes amb el detector DAD són més elevades que les obtingudes amb l'espectròmetre de masses. Per tant, hi ha un problema afegit amb aquest últim detector per aquest tipus de mostra.
- Hi ha un comportament diferent dels detectors en front la mateixa mostra, ja que la recuperació obtinguda amb un detector o amb un altre varia molt. Com per exemple, és el cas de la AFG₂ que es passa d'obtenir una recuperació d'un 30% amb el detector DAD a un 17% amb l'espectròmetre de masses per a 5g de mostra.
- Un cas a destacar, és la disminució en la recuperació de l'OTA on s'obté una diferència significativa ja que es passa d'obtenir una recuperació d'un 32% amb el detector DAD a una recuperació d'un 2% amb l'espectròmetre de MS per a 5g de mostra.

A continuació es comparen les recuperacions obtingudes amb l'espectròmetre de masses utilitzant el **mètode A1** aplicat a plantes medicinals quan s'ha adaptat a les mostres de compost (taula 3.4.1.6). Les diferències en les recuperacions són significatives, perquè amb el **mètode A1** s'obtenen recuperacions per a les quatre aflatoxines entre un 77-110%.

Recup(%)	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
Mètode A1 5gmostra+500ng	77	81	90	110	---
Mètode A2 5gmostra+5µg	17	40	44	60	2

Taula 3.4.1.6. Recuperacions(%) pels mètodes A1 i A2.

Un altre diferència a destacar entre els dos mètodes és el solvent d'extracció. Com es pot veure en l'esquema 2.2.1.1 de l'apartat 2.2.1, el solvent d'extracció del **mètode A1** en les plantes medicinal és MeOH:H₂O (80:20) en canvi, pel compost s'ha utilitzat com a solvent MeOH:H₂O (70:30). Cal dir que s'han estudiat diferents proporcions del solvent d'extracció obtenint els millors resultats amb MeOH:H₂O (70:30). Aquest fet era d'esperar, ja que l'extracció amb MeOH:H₂O (80:20) realitzada en compost, s'extreu més fracció lipídica del compost, obtenint un extracte més difícil de purificar.

Per tant, com que el **mètode A1** ja s'ha validat anteriorment i s'han obtinguts resultats satisfactoris, es pensar que el motiu pel qual aquestes recuperacions són baixes i variables, és degut a una pèrdua de les toxines en els diferents passos de la metodologia d'extracció en el compost i com ja s'ha dit anteriorment a l'efecte matriu.

A continuació es presenta el límits de detecció i quantificació en mostra calculat amb els dos detector utilitzats. Primer es presenten aquests límits amb el detector DAD seguidament de l'espectròmetre de masses.

Límit de detecció i quantificació calculat amb el detector DAD

Com s'ha comentat, el límit de quantificació és la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de determinar en el marge de treball. Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a deu vegades l'alçada del soroll. El límit de detecció es defineix com la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de detectar, és a dir, que proporciona una senyal diferenciable del soroll. Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a tres vegades l'alçada del soroll.

En la taula, 3.1.1.2. es mostren les relacions senyals soroll calculades en aquest cas a partir d'un cromatograma obtingut a partir d'un patró de 100µg/L per a les quatre aflatoxines i amb un de 200µg/L per a l'ocratoxina A. Aquesta relació senyal soroll permet calcular el límit de detecció i quantificació en mostra. En la taula 3.4.1.7. es mostren aquests límits calculats en mostra per a cada una de les toxines.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

Toxina	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	Ocratoxina A
L.D. (mg/kg)	1,00	1,06	1,00	0,60	0,63
L.Q. (mg/kg)	3,33	3,56	3,33	2,00	2,08

Taula 3.4.1.7. Límits de detecció i quantificació per a cada una de les toxines en mostra

Límit de detecció i quantificació calculat amb l'espectròmetre de masses

En aquest cas, els càlculs del límit de detecció i quantificació s'han realitzat amb un patró de 10µg/L de totes les toxines d'interès. Es la taula 3.1.1.6 de l'apartat 3.1.1. es mostra la relació senyal soroll calculada amb l'espectròmetre de masses per aquest patró. Aquesta relació senyal soroll permet calcular el límit de detecció i quantificació en mostra, que es detalla en la taula 3.4.1.8. per a cada una de les toxines.

Toxina	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	Ocratoxina A
L.D. (mg/kg)	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02
L.Q. (mg/kg)	0,05	0,09	0,08	0,04	0,07

Taula 3.4.1.8. Límits de detecció i quantificació per a cada una de les toxines en mostra

Comparant els paràmetres de validació calculats pel detector DAD i per l'espectròmetre de masses, es pot destacar que els límits de detecció i quantificació calculats per l'espectròmetre de masses són inferiors que els calculats amb el detector DAD, és a dir, l'espectròmetre de masses és més sensible que el detector DAD.

Tot i les dificultats que presenta el mètode en quan a les recuperacions, s'ha decidit analitzar aquesta mateixa mostra de compost realitzant l'**addició B**.

b) **Addició B**

Com ja s'ha dit anteriorment, en aquesta addició la preparació de mostra es realitza amb 1g de compost i paral·lelament s'addicionen 10µg a 1g de mostra. Per a l'extracció i purificació de mostra es segueix l'esquema 3.4.1.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

La figura 3.4.1.1. i la figura 3.4.1.2. mostren els cromatogrames, d'un patró i d'una mostra analitzada del compost de Blanes del 2007 addicionada amb les cinc toxines, obtinguts amb detector d'ultravioleta a 350nm.

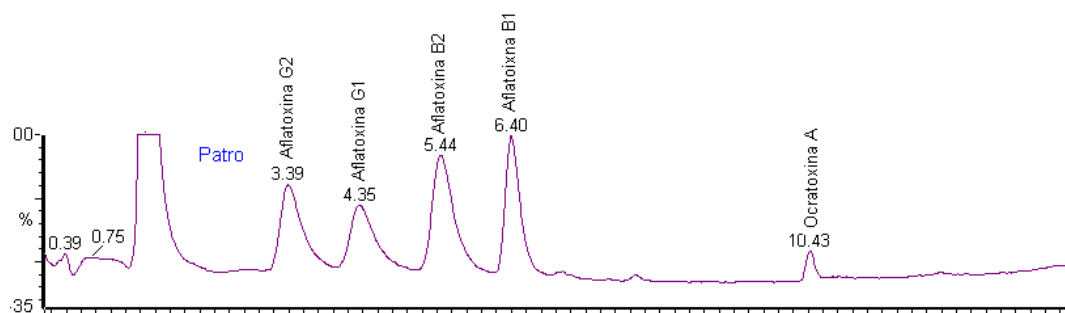


Figura 3.4.1.1. Cromatograma amb detector d'ultravioleta a 350nm d'un patró de 0,8mg/L en dissolució.

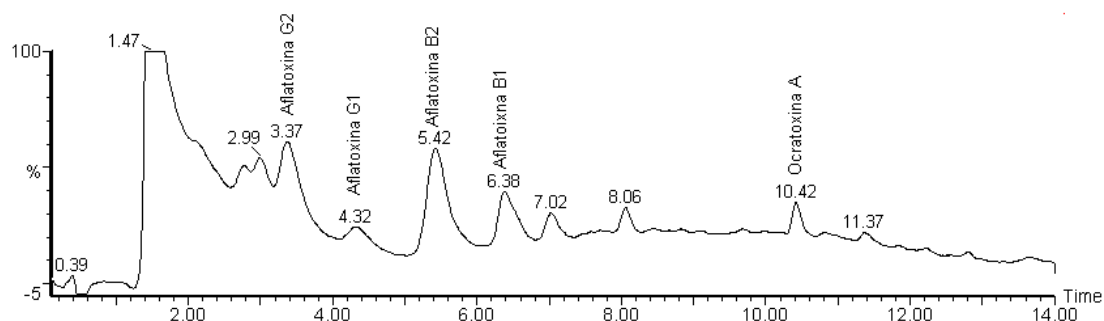


Figura 3.4.1.2. Cromatograma amb detector d'ultravioleta a 350nm de l'addició de toxines al compost de Blanes corresponent a una concentració de 10mg/kg en mostra

El cromatograma 3.4.1.3. correspon a una mostra de compost de Blanes del 2007 sense addicionar obtingut també amb el detector DAD i a la mateixa intensitat que la figura 3.4.1.1.

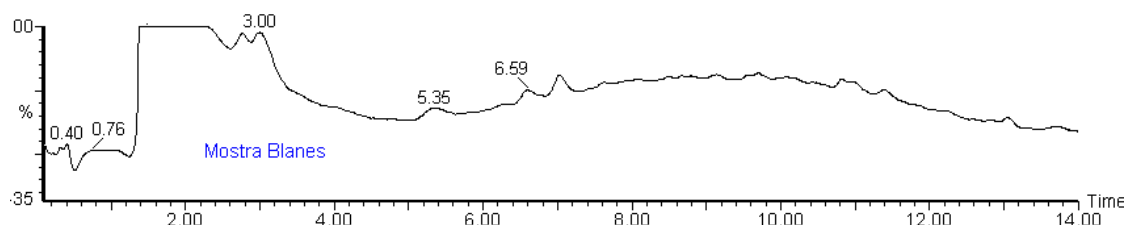


Figura 3.4.1.3. Cromatograma d'una mostra de compost de Blanes del 2007 sense addicionar.

Comparant els cromatogrames anteriors, per la mostra de compost de Blanes mostrejada l'any 2007, es pot afirmar que **no hi ha presència de les toxines d'estudi a concentracions superiors a 0,2mg/kg**, que com ja s'ha dit anteriorment, aquest és el límit de detecció per aquest mètode d'anàlisi.

Com es pot veure en els cromatogrames anteriors, les toxines addicionades es detecten als temps de retenció que coincideixen amb el patró. En la taula 3.4.1.9. es mostren les recuperacions de cada toxina calculades amb el detector DAD.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

En aquesta taula s'observa com les recuperacions més baixes són per a les aflatoxines G₁ i B₁ igual que passa amb l'**addició A**. Tot i això, es pot veure clarament que quan s'addicionen les cinc toxines d'interès a una mostra de compost, aquestes es detecten i es recuperen.

A continuació s'ha calculat les recuperacions d'aquestes toxines a partir dels cromatogrames obtinguts amb l'espectròmetre de masses.

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració den mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	10	10	58	24	88	44	95

Taula 3.4.1.9. Recuperacions(%) de les toxines d'interès.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

Les condicions cromatogràfiques per aquest detector són les descrites en el **mètode A2**, i la figura 3.4.1.4 i 3.4.1.5 mostra el cromatograma d'un patró i d'una mostra analitzada del compost de Blanes del 2007 adicionada. Els cromatogrames s'han obtingut en mode SIR negatiu i positiu respectivament.

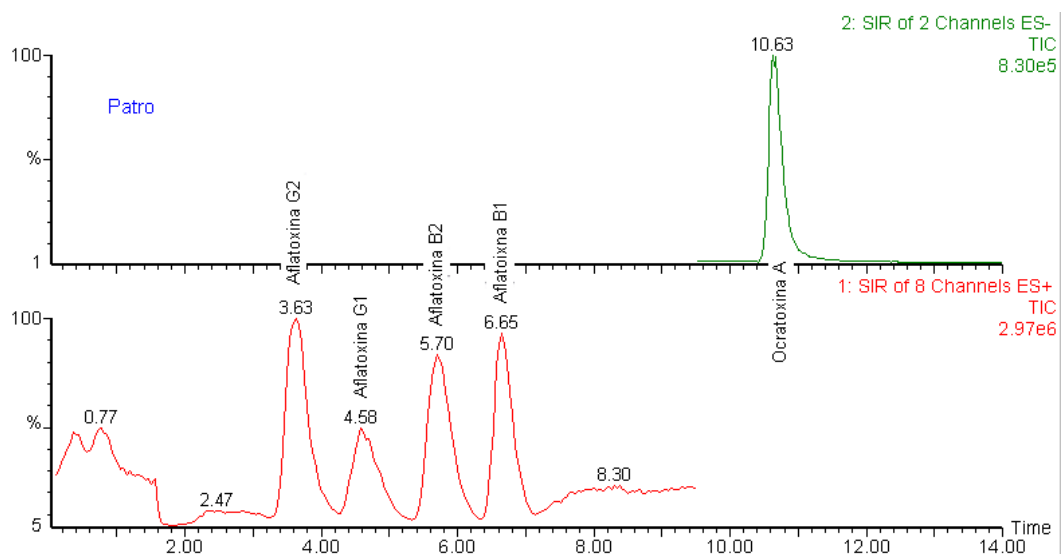


Figura 3.4.1.4. Cromatograma en mode SIR negatiu i positiu del patró de les cinc toxines d'interès d'una concentració de 0,8mg/L

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

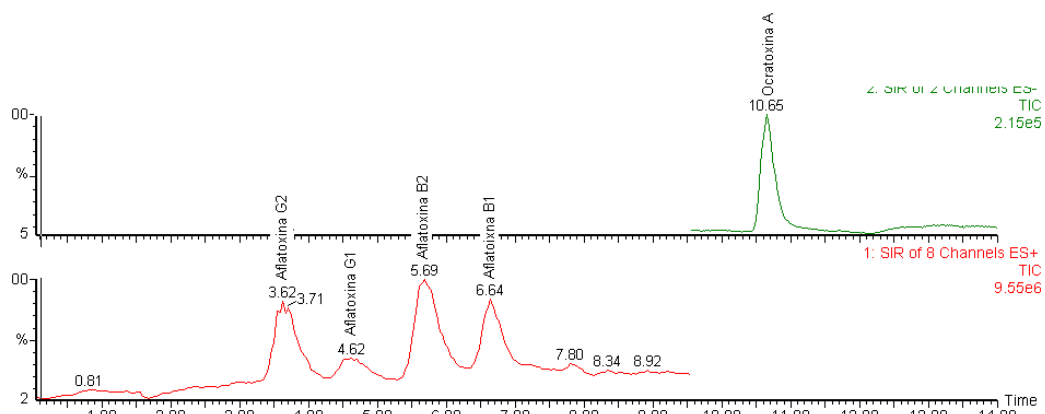


Figura 3.4.1.5. Cromatograma mode SIR negatiu i positiu de compost de Blanes addicionat obtingut l'any 2007

La figura 3.4.1.6. correspon a un cromatograma obtingut de l'injecció en mode SIR positiu per un patró i el compost de Blanes sense addicionar, utilitzant l'espectròmetre de masses i ampliat a la mateixa intensitat.

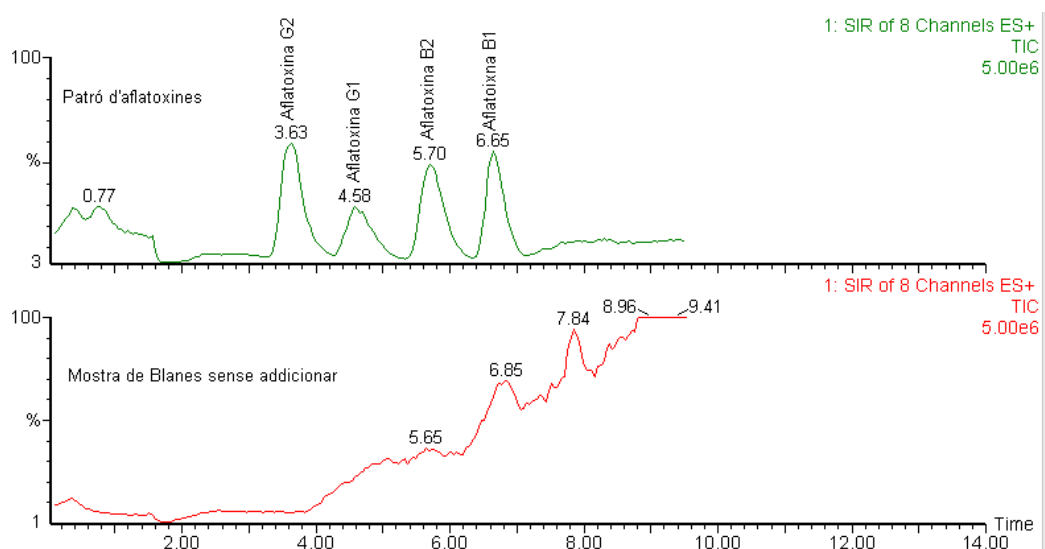


Figura 3.4.1.6. Cromatograma amb detector en mode SIR positiu per l'addició a 1g del compost de Blanes d'una concentració de 10mg/kg en mostra, comparat amb un patró corresponent a 0,8mg/L.

En la figura 3.4.1.7. es mostra el cromatograma obtingut de l'injecció en mode SIR negatiu per un patró i el compost de Blanes sense addicionar obtinguts amb l'espectròmetre de masses, on la mostra té el fons d'escala més petita que el patró.

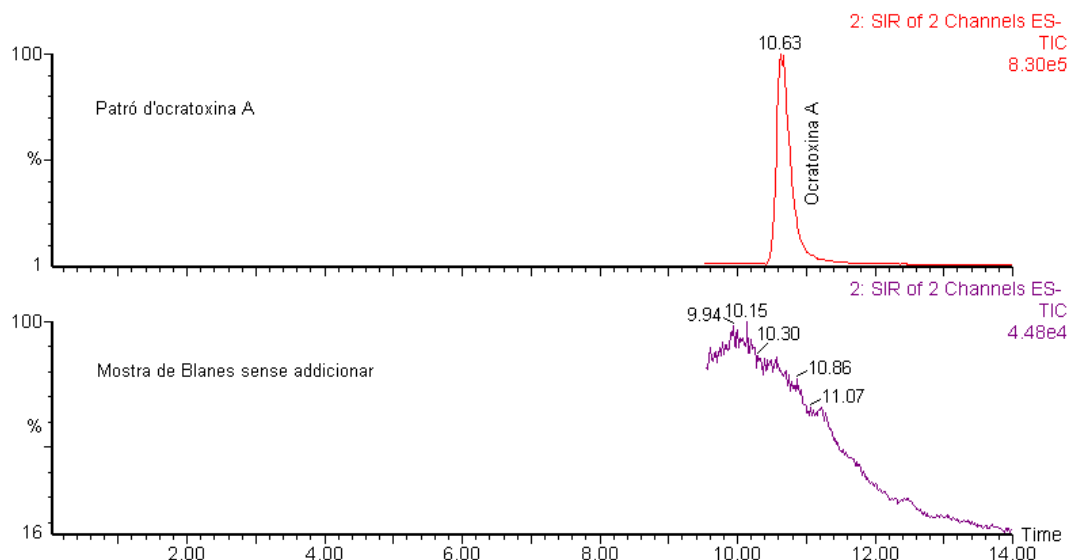


Figura 3.4.1.7. Cromatograma amb detector en mode SIR negatiu per l'addició a 1g del compost de Blanes d'una concentració de 10mg/kg en mostra, comparat amb un patró corresponent a 0,8mg/L.

A la taula 3.4.1.10. es mostren les recuperacions de cada toxina calculades amb l'espectròmetre de masses.

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	10	10	71	472	83	352	93

Taula 3.4.1.10. Recuperacions (%) de les toxines d'interès

Com es pot observar pels resultats aportats a la taula 3.4.1.10, hi ha una substància interferent procedent de la mostra per a la detecció de les aflatoxines G₁ i B₁, ja que les recuperacions que s'obtenen són superiors al 100%. Per a la resta de toxines les recuperacions obtingudes són superiors al 70% millorant la recuperació per a l'aflatoxina G₂ en comparació amb el detector DAD.

Com ja s'ha demostrat en aquest apartat, la mètdica d'extracció i purificació de la mostra és matriu dependent, com ja s'ha dit anteriorment per a l'**addició A**. Per tant, s'ha decidit realitzar un estudi de la influència que té el pes de mostra en les recuperacions de les toxines d'interès.

3.4.2. Anàlisi del compost de Blanes del 2002 per a realitzar l'estudi de la influència del pes de mostra en les recuperacions de les aflatoxines G₁, G₂, B₁, B₂ i OTA.

En aquest cas, s'ha decidit realitzar l'**addició A** (veure apartat 3.4) per estudiar la influència del pes de mostra en l'extracció de les toxines. Així doncs, es segueix l'esquema 3.4.1. per a l'extracció i purificació de la mostra i les condicions de l'HPLC-MS també són les descrites en l'aparat 3.1. pel **mètode A2**.

A continuació, es mostren els cromatogrames obtinguts amb els dos detectors utilitzats en el mètode d'HPLC-MS. Primer es mostren els resultats obtinguts el detector DAD i després els resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

La figura 3.4.2.1. mostra el cromatograma d'un patró obtingut a $\lambda=350$ nm.

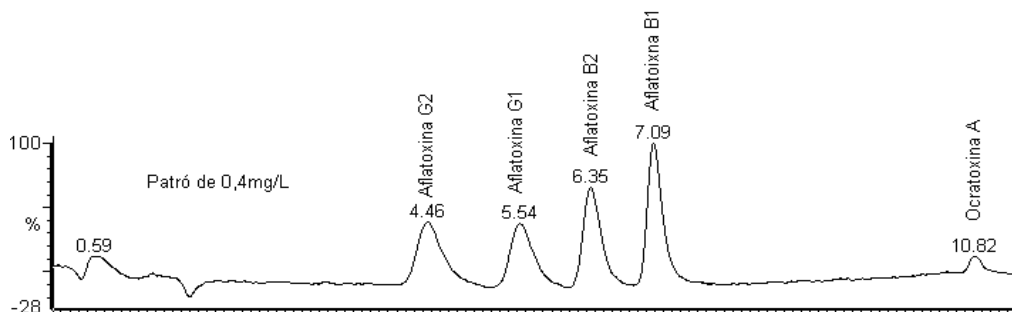


Figura 3.4.2.1. Cromatograma amb detector d'ultravioleta d'un patró d'aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ i OTA d'una concentració de 0,4mg/L.

Seguidament, en les figures 3.4.2.2, 3.4.2.3 i 3.4.2.4 es presenten els cromatogrames obtinguts amb el detector d'ultravioleta a 350nm de l'addició de les cinc toxines a 1g, 3g i 5g de compost de Blanes. Aquestes addicions corresponen a les concentracions de 5mg/kg, 1,6mg/kg i 1mg/kg respectivament en mostra.

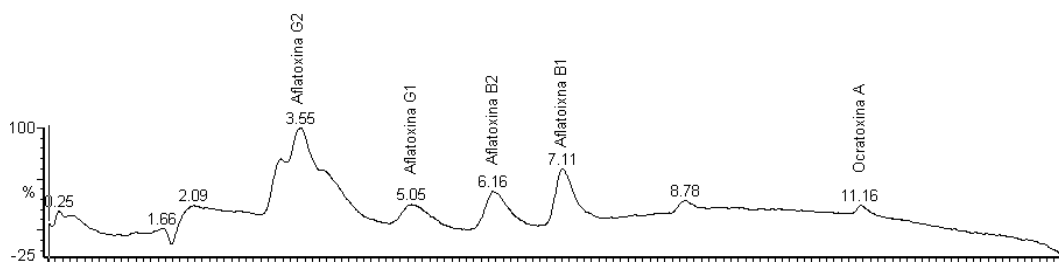


Figura 3.4.2.2 Cromatograma amb detector d'ultravioleta de l'addició de les toxines d'una concentració de 5mg/kg. Corresponent a 1g de mostra.

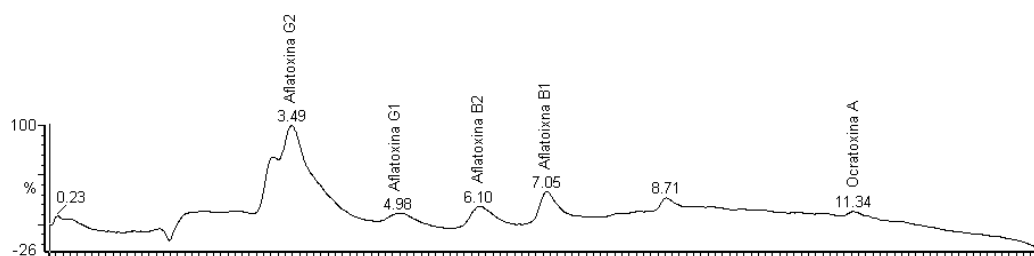


Figura 3.4.2.3. Cromatograma amb detector d'ultravioleta de l'addició de les toxines d'una concentració de 1,6mg/kg. Corresponents a 3g de mostra.

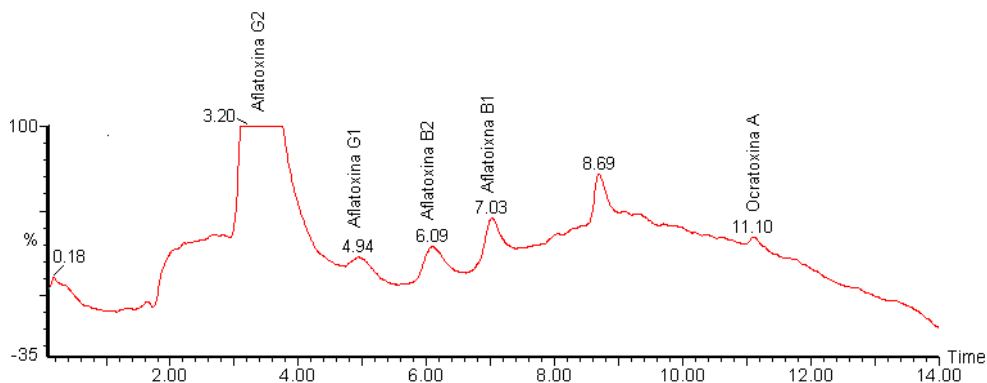


Figura 3.4.2.4. Cromatograma amb detector d'ultravioleta de l'addició de les toxines d'una concentració de 1mg/kg. Corresponent a 5g de mostra.

A continuació, en la figura 3.4.2.5. es mostren els cromatogrames corresponents a 1g, 3g i 5g de compost de Blanes del 2002 sense addicionar obtinguts amb el detector DAD, comparat amb un patró. Tots els cromatogrames s'han obtingut a les mateixes intensitats.

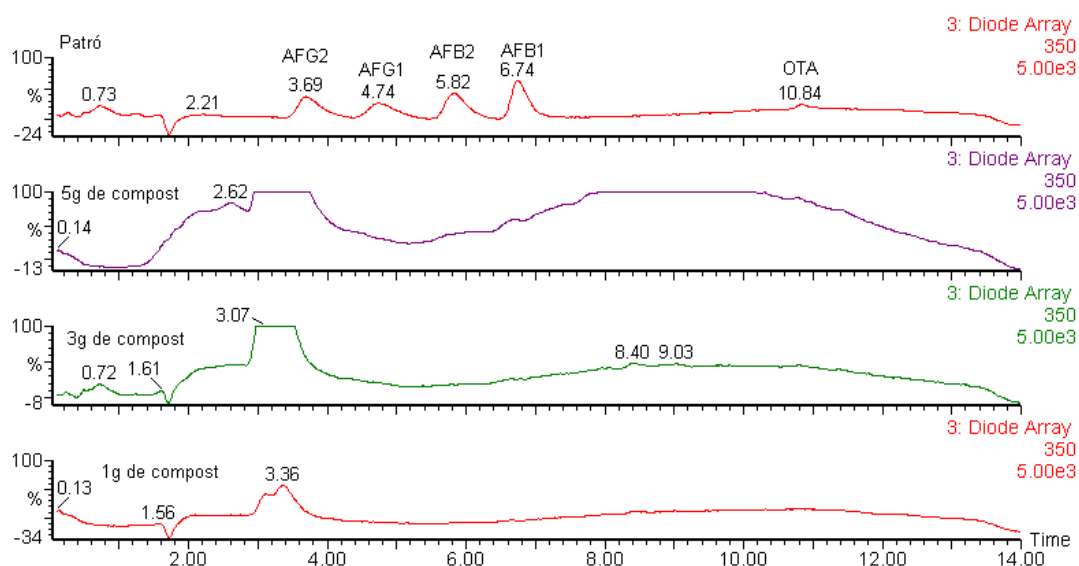


Figura 3.4.2.5. Comparació dels cromatogrames del patró amb les mostres de compost de Blanes del 2002 sense addicionar les toxines d'interès.

Comparant els cromatogrames anteriors, per a la mostra de compost de Blanes mostrejada l'any 2002, es pot afirmar que **no hi ha presència de les toxines d'estudi a concentracions superiors a 0,2mg/kg.**

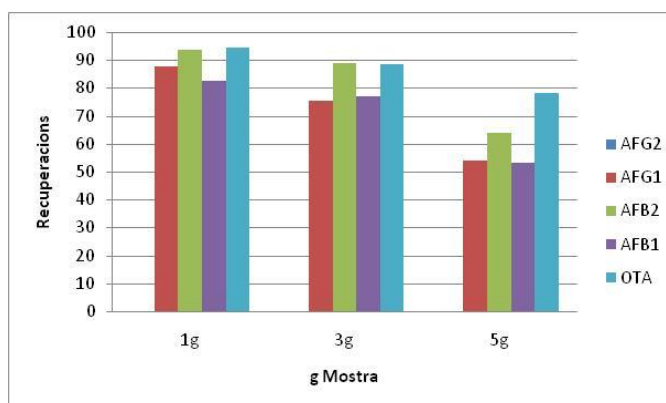
En la taula 3.4.2.1. es fa un recull de les recuperacions obtingudes amb el detector DAD per a cada toxina depenent del pes de mostra.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	5	5	---	87	93	82	94
3	5	1,6	---	75	89	77	88
5	5	1	---	54	64	53	78

Taula 3.4.2.1. Recuperacions de les toxines per a 1mg/kg, 1,6mg/kg i 5mg/kg

A continuació, al gràfic 3.4.2.1. es representen aquestes recuperacions en funció del pes de mostra.



Gràfic 3.4.2.1. Recuperacions en funció del pes de mostra

Com es pot veure en els cromatogrames anteriors, les toxines adicionades es detecten els temps de retenció corresponents i en el gràfic 3.4.2.1. es mostren les recuperacions de cada toxina calculades amb el detector DAD, per a cada pes de mostra.

Cal destacar, com es pot veure en els cromatogrames de les mostres adicionades, que l'aflatoxina G₂ no s'ha pogut separar del blanc de mostra utilitzant el detector DAD. Per tant, no s'han pogut calcular les recuperacions per aquesta aflatoxina. És per això, que s'ha decidit utilitzar els cromatogrames de l'espectròmetre de masses per poder calcular la recuperació d'aquesta toxina juntament amb les altres toxines d'interès, ja que aquest és l'objectiu del mètode d'extracció simultània.

En el cas de l'ocratoxina A, és la toxina que s'obtenen millors recuperacions. És a dir, és la toxina que menys li influeix l'efecte matriu. Tot i això, també disminueix la recuperació a mesura que s'incrementa el pes de mostra.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

Les condicions cromatogràfiques que s'han utilitzat per injectar les mostres són les descrites pel **mètode A2**, i la figura 3.4.2.6 mostra el cromatograma d'un patró obtingut en mode SIR negatiu i positiu. Les figures 3.4.2.7, 3.4.2.8 i 3.4.2.9 mostren els cromatogrames corresponents a 1g, 3, i 5g de compost de Blanes del 2002 addicionat amb les toxines d'interès obtinguts en mode SIR negatiu i positiu.

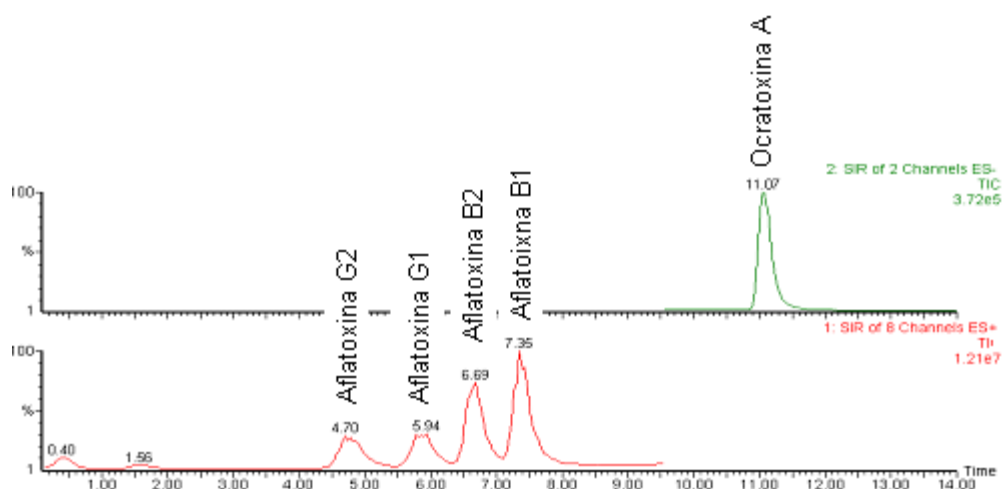


Figura 3.4.2.6. Cromatograma en mode SIR negatiu i positiu per un patró d'aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ i OTA d'una concentració de 0,4mg/L en dissolució

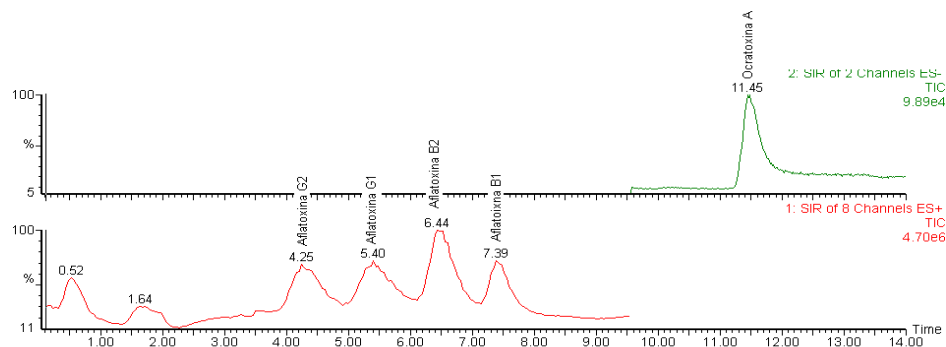


Figura 3.4.2.7. Cromatograma en mode SIR negatiu i positiu per 1g de compost on s'han addicionat les toxines d'estudi a una concentració de 5mg/kg.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

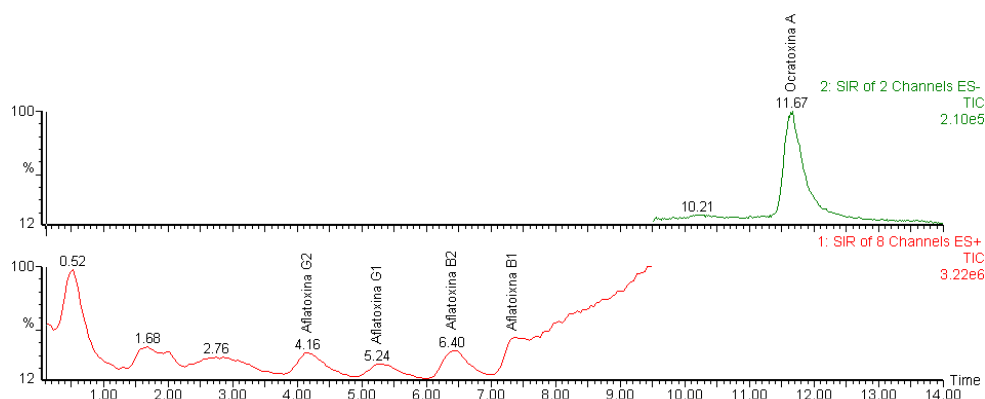


Figura 3.4.2.8. Cromatograma en mode SIR negatiu i positiu per 3g de compost on s'han addicionat les toxines d'estudi a una concentració de 1,6mg/kg.

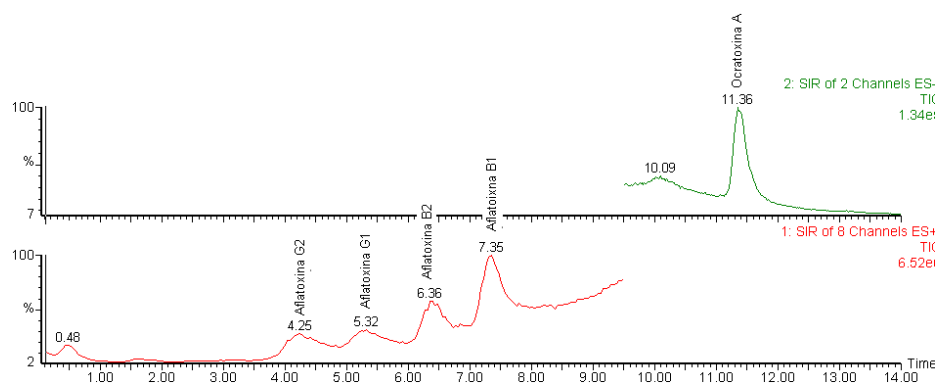


Figura 3.4.2.9. Cromatograma en mode SIR negatiu i positiu per 5g de compost on s'han addicionat les toxines d'estudi a una concentració de 1mg/kg.

A continuació, en la figura 3.4.2.10 es mostren els cromatogrames obtinguts amb l'espectròmetre de masses en mode SIR positiu de 1g, 3g i 5g de compost de Blanes del 2002 on no s'han addicionat les toxines d'interès, comparat amb un patró. Tots els cromatogrames s'han obtingut a la mateixa intensitat.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

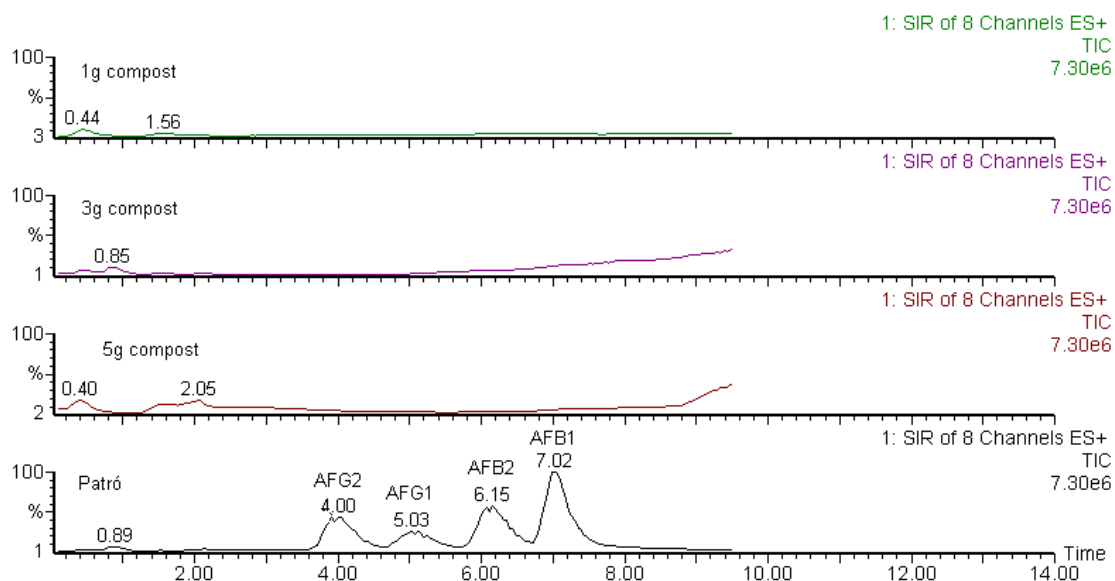


Figura 3.4.2.10. Cromatogrames de patró i mostres sense addicionar toxines obtinguts en mode SIR positiu.

La figura 3.4.2.11 correspon els cromatogrames obtinguts amb l'espectròmetre de masses en mode SIR negatiu de 1g, 3g i 5g de compost de Blanes del 2002 on no s'han addicionat les toxines d'interès, comparat amb un patró i obtinguts tots els cromatogrames a la mateixa intensitat.

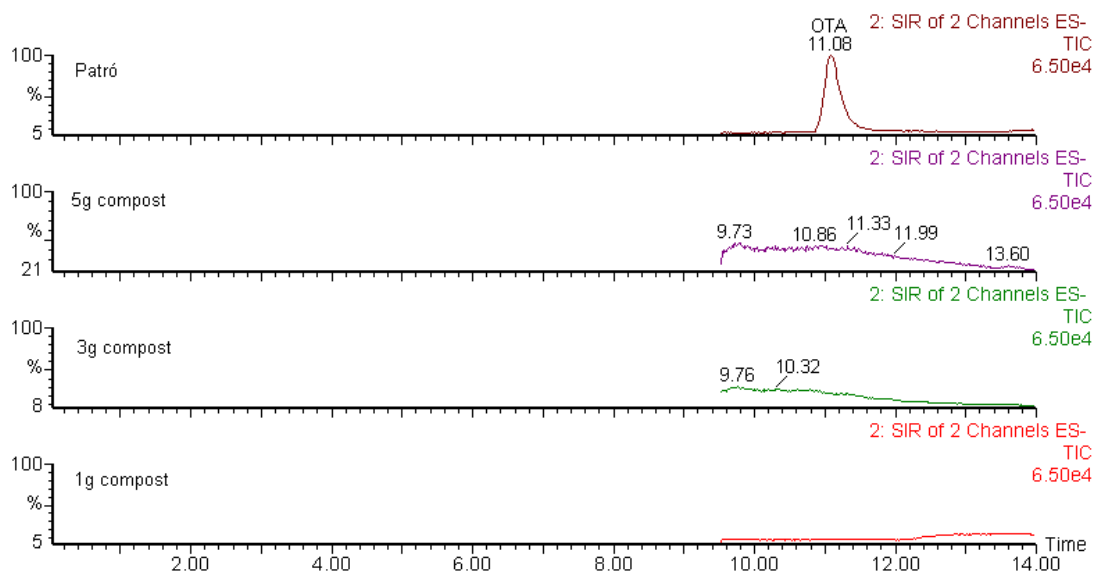


Figura 3.4.2.11. Cromatogrames de patró i mostres sense addicionar toxines obtinguts en mode SIR negatiu.

Un fet que cal destacar per aquesta mostra de compost de Blanes del 2002, és que és necessari l'ús de l'espectròmetre de masses per a la detecció de l'aflatoxina G₂, ja que només amb l'ús del detector DAD no s'aconsegueix separar del blanc de mostra. En canvi, amb l'espectròmetre de masses es pot separar del blanc de mostra. A continuació en la taula 3.4.2.2

es mostren les recuperacions obtingudes amb l'espectròmetre de masses per a cadascuna de les toxines.

Pes mostra (g)	Toxina addicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	5	5	441	456	260	50	11
3	5	1,6	190	219	260	90	15
5	5	1	73	58	64	15	26

Taula 3.4.2.2. Recuperacions de les toxines per a 1mg/kg, 1,6mg/kg i 5mg/kg

Les recuperacions de la taula 3.4.2.2, són les calculades a partir dels cromatogrames obtinguts en mode SIR positiu seguint els ions primaris i secundaris per a les aflatoxines i en mode SIR negatiu per a l'ocratoxina A. Les recuperacions obtingudes tenen molta variabilitat i hi ha algunes que són molt superiors al 100%. És sabut que això pot ser degut a què en la mostra hi hagi alguna substància interferent que en la seva fragmentació s'obtingui un o més ions que coincideixin amb el ió primari o secundari de les toxines.

En conseqüència, es pot pensar que hi ha una potenciació de la ionització degut a la matriu. És per aquest motiu que s'ha decidit tornar a calcular aquestes recuperacions extraient només el ió primari per a cadascuna de les toxines, ja que el mètode cromatogràfic està programat seguint tots els ions durant tot el cromatograma (veure taula 3.1.1).

A continuació, s'aporta la taula 3.4.2.3 on es mostren els valors obtinguts d'aquestes noves recuperacions calculades només amb el ió primari de cada toxina (veure taula 3.1.1).

Pes mostra (g)	Toxina addicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	5	5	405	590	253	63	9
3	5	1,6	156	306	222	94	13
5	5	1	68	73	58	19	25

Taula 3.4.2.3. Recuperacions de les toxines extraient el ió primari per a cada addició.

Tot i extraient només el ió primari per a cadascuna de les toxines, les recuperacions continuen sent en alguns casos superiors al 100%.

Així doncs, com es pot observar amb aquesta mostra de Blanes de l'any 2002, es presenten diversos problemes en la metodica d'extracció, purificació i posterior detecció de les cinc toxines d'interès.

A continuació, igual que en la mostra de compost de Blanes de l'any 2007, es procedeix a comparar els resultats de les recuperacions obtingudes amb el detector DAD i amb l'espectròmetre de masses. Les recuperacions de l'espectròmetre de masses són les obtingudes del seguiment simultani del ió primari i secundari.

En la taula 3.4.2.3. es pot veure com hi ha una selectivitat diferent en la detecció per part dels dos detectors utilitzats, igual que passa amb la mostra de compost Blanes del 2007 (veure taula 3.4.1.5).

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Recup (%) AFG ₂		Recup (%) AFG ₁		Recup (%) AFB ₂		Recup (%) AFB ₁		Recup (%) OTA	
		DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS
1	5	---	441	87	456	93	260	82	50	94	11
3	5	---	190	75	219	89	260	77	90	88	15
5	5	---	73	54	58	64	64	53	15	78	26

Taula 3.4.2.3. Taula comparativa de les recuperacions obtingudes per a cada mostra amb els dos detectors utilitzats.

La conclusió que es pot treure en l'ús de la metodica en aquest tipus de mostra és que per a la detecció de l'aflatoxina G₂ és necessari l'espectròmetre de masses tot i que proporciona unes recuperacions excessives per influència de la mostra. En canvi, per a la resta d'aflatoxines, amb el detector DAD és el més adequat.

3.4.3. Anàlisi del compost de Manresa del 2007

Un cop vista la influència del pes de mostra en l'extracció de les toxines, tant amb el detector DAD com amb l'espectròmetre de masses, s'ha decidit analitzar una altre mostra de compost. En aquest cas es tracta d'una mostra de compost de Manresa de l'any 2007 on s'ha realitzat l'**addició B** (veure apartat 3.4.). Per a l'extracció i purificació de mostra es segueix l'esquema 3.4.1 i les condicions cromatogràfiques són les descrites en l'apartat 3.1. pel **mètode A2**.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

Un cop realitzada l'extracció i purificació de la mostra, en la figura 3.4.3.1 es mostra el cromatograma obtingut a una $\lambda=350\text{nm}$ d'un patró de 0,8mg/L.

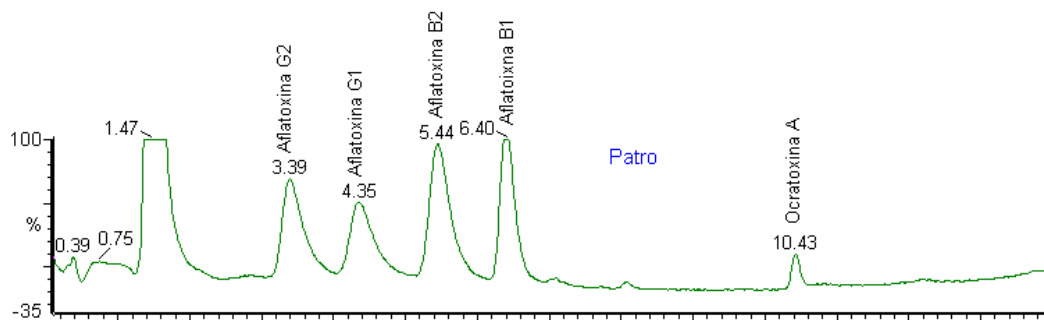


Figura 3.4.3.1. Cromatogrames amb detector DAD a 350nm per un patró de 0,8mg/L.

La figura 3.4.3.2. correspon a un cromatograma obtingut amb el detector DAD d'una mostra de compost addicionada amb les toxines d'interès, corresponent a una concentració de 10mg/kg.

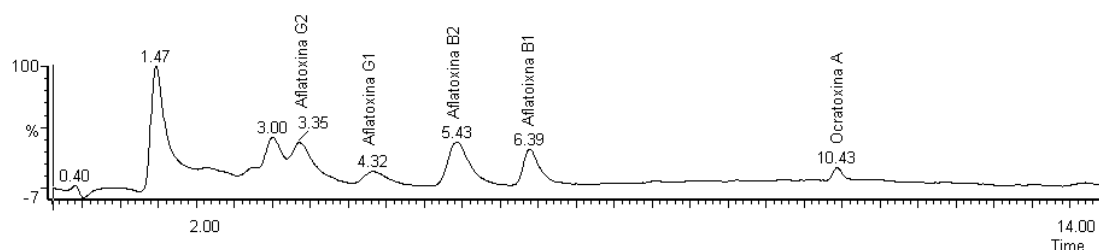


Figura 3.4.3.2. Cromatograma amb detector DAD d'una mostra de compost de Manresa addicionada d'una concentració de 10mg/kg

La figura 3.4.3.3. presenta el cromatograma d'una mostra de compost de Manresa del 2007 sense addicionar les toxines d'interès obtingut amb el detector DAD i a la mateixa intensitat que la figura 3.4.3.1.

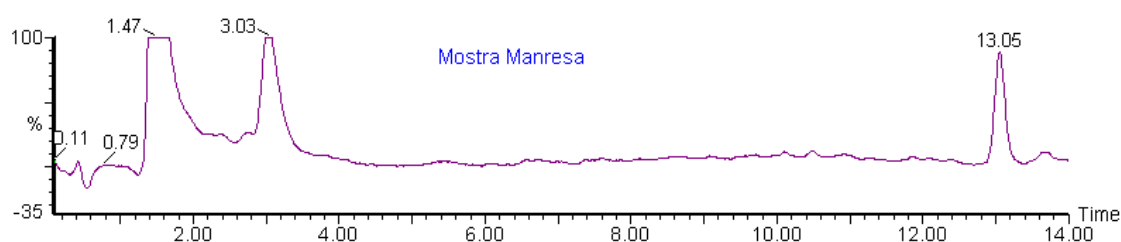


Figura 3.4.3.3. Cromatograma de la mostra de compost de Manresa del 2007 sense addicionar les toxines d'interès.

Així doncs, es pot concloure que el compost de Manresa obtingut l'any 2007 **no s'han detectat toxines a una concentració superior a 0,2mg/kg.**

Com es pot veure en els cromatogrames anteriors, les toxines addicionades es detecten als temps de retenció corresponents i en la taula 3.4.3.1. es mostren les recuperacions de cada toxina calculades amb el detector DAD.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

Pes mostra (g)	Toxina adicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	10	10	53	49	95	69	93

Taula 3.4.3.1. Recuperacions de les toxines d'interès.

En aquest cas s'observa que la recuperació més baixa és per l'aflatoxina G₁ fet que ja passava amb la mostra de compost de Blanes del 2007 i del 2002.

S'ha decidit calcular les recuperacions amb l'espectròmetre de masses igual que en les mostres anteriors.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

A continuació, en la figura 3.4.3.4. es mostren els cromatogrames corresponents a un patró de 0,8mg/L injectats en mode SIR negatiu i positiu.

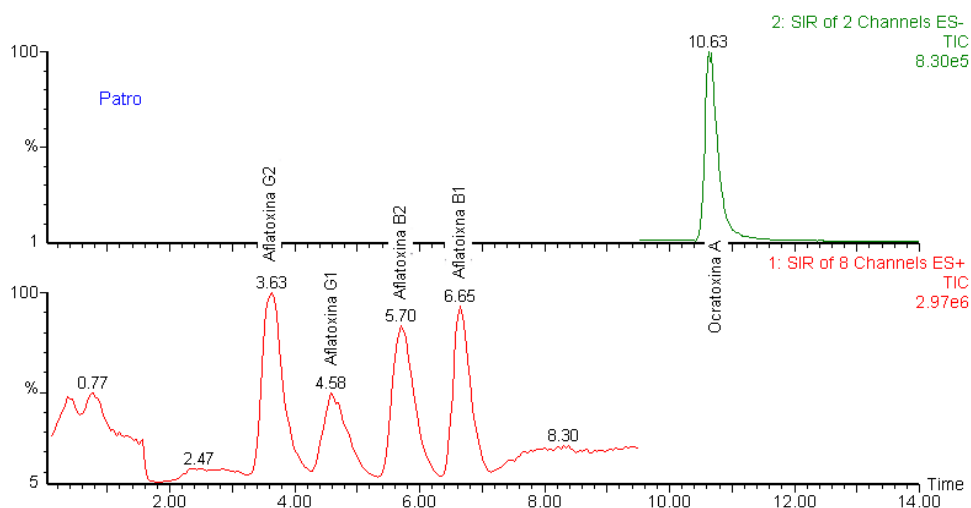


Figura 3.4.3.4. Cromatograma d'un patró en mode SIR negatiu i positiu de les toxines d'interès de 0,8 mg/L.

En la figura 3.4.3.5. es mostra un cromatograma d'una mostra de compost de Manresa del 2007 adicionada amb les toxines d'interès a un nivell de 10mg/kg. Aquest cromatograma està injectat en mode SIR negatiu i positiu.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

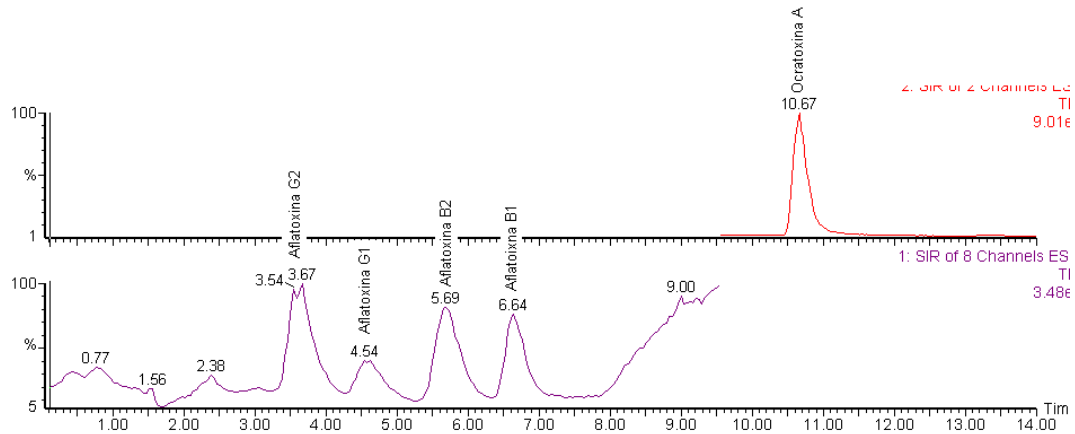


Figura 3.4.3.5. Cromatograma en mode SIR negatiu i positiu d'una mostra de compost de Manresa addicionada d'una concentració de 10mg/kg

Finalment, en la figura 3.4.3.6. es mostra el cromatograma en mode SIR positiu d'una mostra de compost de Manresa del 2007 sense addicionar comparada amb un patró. Els dos cromatogrames s'han obtingut a la mateixa intensitat.

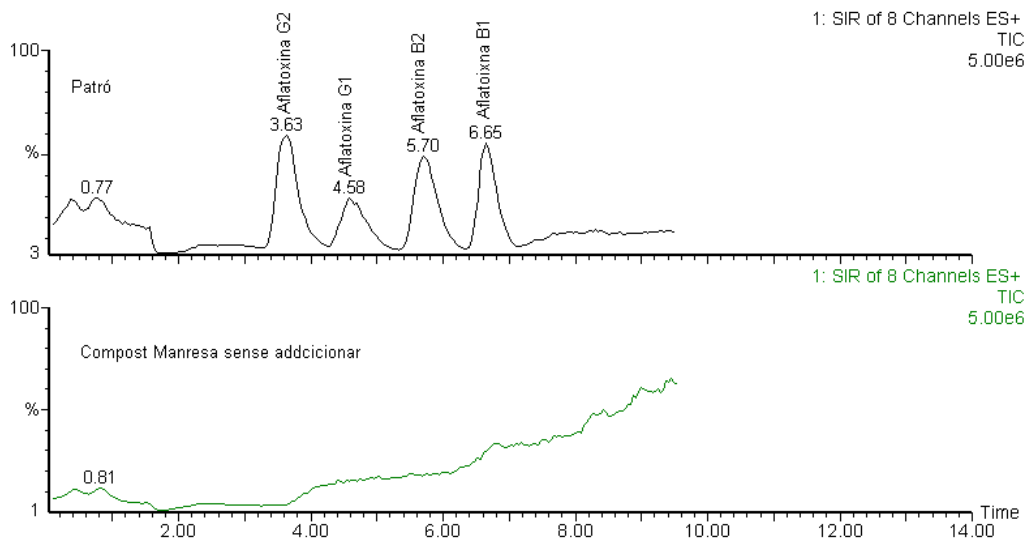


Figura 3.4.3.6. Cromatograma de compost de Manresa comparat amb un patró en mode SIR positiu.

En la figura 3.4.3.7. es mostra el cromatograma en mode SIR negatiu d'una mostra de compost de Manresa del 2007 sense addicionar comparada amb un patró. El cromatograma de la mostra està a una intensitat més ampliada que la del patró

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

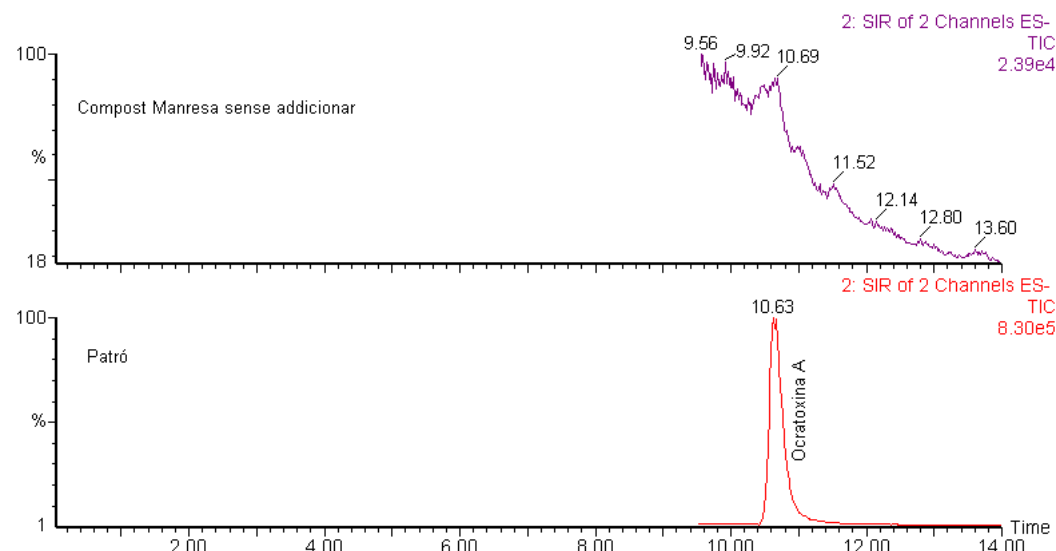


Figura 3.4.3.7. Cromatograma de compost de Manresa comparat amb un patró en mode SIR negatiu.

Així doncs, es pot confirmar que les toxines es recuperen i es detecten amb els dos detectors utilitzats i que la mostra de compost de Manresa del 2007 **no hi ha presència de les toxines d'interès a una concentració superior a 0,2mg/kg.**

A continuació en la taula 3.4.3.2. es mostren les recuperacions calculades amb l'espectròmetre de masses.

Pes mostra (g)	Toxina addicionada (µg)	Concentració en mostra (mg/kg)	Recup (%) AFG ₂		Recup (%) AFG ₁		Recup (%) AFB ₂		Recup (%) AFB ₁		Recup (%) OTA	
1	10	10	101		289		107		180		114	

Taula 3.4.3.2. Recuperacions calculades amb l'espectròmetre de masses

En aquest cas, s'obtenen bones recuperacions per a les aflatoxines G₂ i B₂ però en les altres toxines hi ha una potenciació de la ionització deguda a la matriu.

En la taula següent es fa un recull de les recuperacions calculades amb el detector DAD i amb l'espectròmetre de masses per a cada toxina.

Pes mostra (g)	Toxina addicionada (µg)	Recup (%) AFG ₂		Recup (%) AFG ₁		Recup (%) AFB ₂		Recup (%) AFB ₁		Recup (%) OTA	
		DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS
1	10	53	101	49	289	95	107	69	180	93	114

Taula 3.4.3.3. Comparació recuperacions obtingudes amb els dos detectors utilitzats

Com es pot apreciar a la taula 3.4.3.3, els dos detectors tenen un comportament diferent en front la mateixa mostra, és a dir, la selectivitat dels dos detectors és diferents.

Un cop vistos tots els inconvenients i les dificultats que presenta aquest mètode d'extracció i purificació simultània per a les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost, s'ha optat per realitzar algunes modificacions a la metodologia, que són les que es presentaran més endavant en l'apartat 3.5.

Prèviament, en el següent apartat 3.4.4, es fa un recull de les dificultats trobades amb aquest mètode i per a cada tipus de mostra.

3.4.4. Resum dels resultats obtinguts per a les tres mostres de compost analitzades

A continuació, es realitza un resum de tots els resultats obtinguts anteriorment per a cada tipus de mostra addicionada amb els analits d'interès, on s'analitzen els resultats de les recuperacions obtingudes per a cada mostra de compost addicionada:

- Compost de Blanes obtingut l'any 2007: Tant amb el detector DAD com amb l'espectròmetre de masses es detecten les cinc toxines d'interès, obtenint recuperacions(%) entre 30-90 amb uns CV(%) entre 2-35 amb el detector DAD i amb l'espectròmetre de masses les recuperacions(%) són entre 2-94% amb un CV(%) entre 7-66; en el dos casos amb una n=4. Per aquest tipus de mostra, no és necessari l'ús de l'espectròmetre de masses ja que el detector DAD ja aporta resultats prou satisfactoris. Cal tenir en compte però, que es tracta d'una metodologia matriu dependent (veure taula 3.4.1.5).
- Compost de Blanes obtingut l'any 2002: Per aquest tipus de mostra el fet més rellevant és que l'aflatoxina G₂ no es detecta amb el detector DAD. Les recuperacions per a la resta de toxines són entre 53-94% obtingudes amb el detector DAD. En canvi amb l'espectròmetre de masses es detecten les cinc toxines d'interès, però s'obtenen resultats per excés. Per tant, aquest detector no és útil per a aquest tipus de matriu. Finalment, com en el cas anterior el detector DAD aporta resultats satisfactoris excepte per a l'aflatoxina G₂, i també es tracta d'una metodologia matriu dependent (veure taula 3.4.2.4).
- Compost de Manresa obtingut l'any 2007: Per aquest tipus de mostra, igual que passa amb la mostra de Blanes del 2007, tant amb l'espectròmetre de masses com amb el detector DAD es detecten les cinc toxines d'interès. Però amb l'espectròmetre de masses, igual que passa amb la mostra de Blanes del 2002, els resultats obtinguts per a les aflatoxines G₁, B₁ i l'OTA són per excés. En canvi, les recuperacions obtingudes amb el detector DAD són entre un 50%-93% (veure taula 3.4.3.3). Com en els altres dos casos, es tracta d'una metodologia matriu dependent i el detector DAD aporta resultats satisfactoris.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

Un cop vistos tots els resultats obtinguts amb els dos detectors utilitzats, es creu que els resultats més fiables són els obtinguts amb el detector DAD. Aquest detector ha permès obtenir millors recuperacions de les toxines que amb l'espectròmetre de masses tot i que pel compost de Blanes del 2002 no s'ha pogut separar l'aflatoxina G₂.

Seguidament, es mostra un resum dels resultats obtinguts només per el detector DAD, que com ja s'ha dit és el que ha aportat resultats més fiables. Els resultats estan exposats en dos apartats, primer per a l'**addició A** i posteriorment per a l'**addició B** (veure apartat 3.4) de cada mostra de compost analitzada.

Addició A:

En la taula 3.4.4.1. es presenta un resum de totes les recuperacions de les aflatoxines G₁, B₁, G₂, B₂ i l'ocratoxina A corresponent a l'**addició A** (veure apartat 3.4) per a les mostres de compost de Blanes del 2007 (B 2007) i del 2002 (B 2002).

Pes mostra (g)	Tipus mostra	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	B 2007	69	34	90	58	73
	B 2002	---	87	93	82	94
3	B 2007	41	37	83	89	49
	B 2002	---	75	89	77	88
5	B 2007	30	31	46	48	32
	B 2002	---	54	64	53	78

Taula 3.4.4.1. Resum de les recuperacions(%) de les toxines en les mostres de compost.

Dels resultats obtinguts amb el detector DAD es pot destacar el següent:

- Queda demostrada la dependència de les recuperacions de les toxines d'interès amb el pes de mostra. Com es pot veure les recuperacions disminueixen a mida que s'augmenta el pes de mostra.
- Tot i que es tracta d'una matriu dependent, es pot afirmar que **totes les mostres de compost analitzades no hi ha concentració de toxines superior a 0,2mg/kg.**

Addició B:

En la taula 3.4.4.2. es presenta un resum de totes les recuperacions de les aflatoxines G₁, B₁, G₂, B₂ i l'ocratoxina A corresponent a l'**addició B** (veure apartat 3.4) per a les mostres de compost de Blanes del 2007 (B 2007) i de Manresa del 2007 (M 2007).

Pes mostra (g)	Tipus mostra	Recup (%) AFG ₂	Recup (%) AFG ₁	Recup (%) AFB ₂	Recup (%) AFB ₁	Recup (%) OTA
1	B 2007	58	24	88	44	95
	M 2007	53	49	95	69	93

Taula 3.4.4.2. Resum de les recuperacions de les toxines en les mostres de compost.

Dels resultats obtinguts amb el detector DAD es pot destacar el següent:

- El resultat de les recuperacions que s'obtenen per a les dues mostres són bastant semblants. Les recuperacions obtingudes són superiors al 50%, exceptuant l'aflatoxina G₁ i l'aflatoxina B₁.

Un cop exposat el resum dels resultats anteriors, cal destacar que les recuperacions de les toxines amb l'espectròmetre no són fiables, ja que en alguns casos donen recuperacions per excés i són molt variables. Aquest fet potser degut a dos aspectes: o bé hi ha un problema en la detecció de les toxines, o bé durant la metodologia d'extracció, purificació i concentració de la mostra es perden les toxines.

Amb la finalitat de descartar que el problema sigui de detecció, s'ha preparat una mostra, on s'ha fet tota la metodologia d'extracció, però l'addició de les toxines s'ha fet abans d'injectar a l'HPLC. Els resultats obtinguts amb el detector DAD han sigut recuperacions superiors al 90%. Així doncs, es descarta el problema de la detecció.

S'ha fet un estudi per veure on es poden perdre les toxines durant la purificació de la mostra amb el cartutx HLB, però no es poden treure conclusions definitives.

Degut a què el mètode és poc robust i les dificultats mostrades anteriorment, s'han estudiat varies modificacions en la metodologia d'extracció i purificació amb la finalitat d'obtenir millors resultats.

3.5 Estudi de les variacions en la metodologia d'extracció i purificació

Un cop analitzades les diferents mostres de compost i vistos els problemes comentats anteriorment, s'ha decidit fer algunes variacions a la metodologia en l'etapa de preparació de la mostra, amb la finalitat d'intentar millorar l'extracció simultània de les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ i OTA. S'ha decidit realitzar aquesta modificació amb 5g de mostra ja que es vol millorar la sensibilitat del mètode i alhora s'obté una mostra més homogènia, tot i que és amb el pes que s'han obtingut pitjors recuperacions.

La mostra amb la que es treballarà a partir d'aquest punt és una mostra de compost de la depuradora de Blanes mostrejada l'any 2007, utilitzada i descrita anteriorment.

Les tres variacions que s'estudiaran de la metòdica d'extracció de les toxines són les següents:

- Extracció de les toxines utilitzant només MeOH com a solvent d'extracció i sense purificar la mostra amb cartutx HLB.
- Extracció de les toxines utilitzant només MeOH com a solvent d'extracció i purificant amb cartutx HLB.
- Extracció de les toxines realitzant una etapa de desengreixat previ amb hexà

3.5.1. Anàlisi del compost de Blanes del 2007 sense purificar la mostra i utilitzant MeOH com a solvent d'extracció.

Com ja s'ha comentat, un cop vist que la metòdica utilitzada no ha resultat ser satisfactòria en les recuperacions de les cinc micotoxines, s'ha decidit fer variacions d'aquesta metòdica amb la finalitat d'obtenir i incrementar les recuperacions. Per això, en aquest apartat s'ha decidit no utilitzar el cartutx de purificació i realitzar l'extracció amb 100% de MeOH. En aquest apartat s'estudiarà només una mostra adicionada amb les toxines d'interès.

Així doncs, la metòdica d'extracció és la següent: es pesa 5g de mostra assecada i s'afegeixen 50mL de MeOH on s'addicionen 50µL d'un patró de 100mg/L de les aflatoxines G₁, B₁, G₂, B₂ i l'ocratoxina A. Aquesta addició correspon a una concentració de 1mg/kg en mostra. Es deixa 30 minuts en agitació magnètica i es filtra; després s'agafa una alíquota de 5,6 mL del filtrat que s'evaporen sota una corrent de nitrogen i es reconstitueix amb fase mòbil. En aquest cas, com que la fase mòbil conté aigua, quan s'afegeix apareix un precipitat, que s'ha filtrat amb un filtre de nylon de 0,45µm per poder injectar la mostra a l'HPLC-MS seguint les condicions cromatogràfiques descrites pel **mètode A2**.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

Després de realitzar la nova metòdica d'extracció, s'obté la figura 3.5.1.1 que correspon a un cromatograma obtingut amb el detector DAD a 350nm per un patró de 0,4mg/L en dissolució de cada toxina, comparat amb una mostra de compost que no ha estat purificada amb els cartutxos HLB.

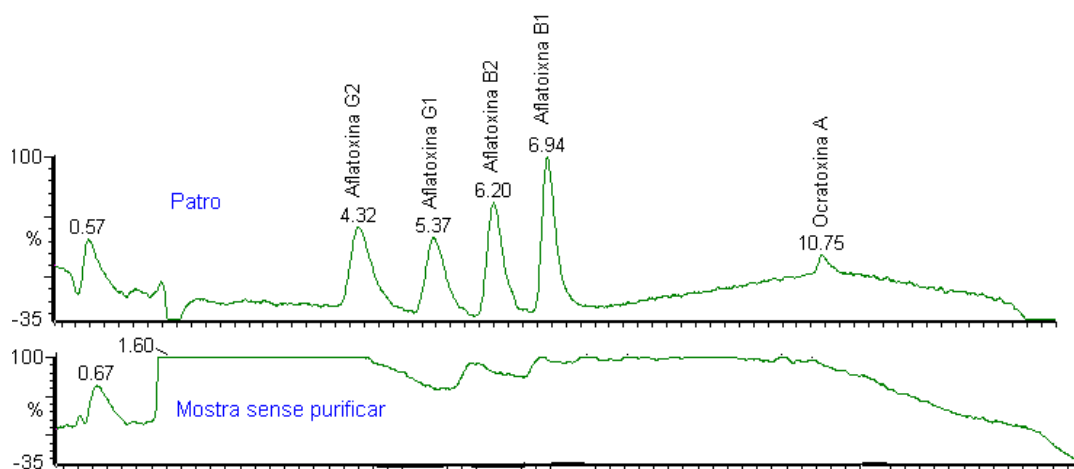


Figura 3.5.1.1. Cromatogrames d'un patró de 0,4mg/L en dissolució i una mostra sense purificar.

Com es pot veure en el cromatograma de la mostra sense purificar, no es detecten cap de les toxines d'interès. A continuació, en la figura 3.5.1.2. amb l'objectiu de presentar una mostra purificada on sí que detecten les toxines d'interès, es presenta una mostra de compost de Blanes del 2007 addicionada amb les toxines seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.4 (purificant la mostra pel cartutx OASIS HLB).

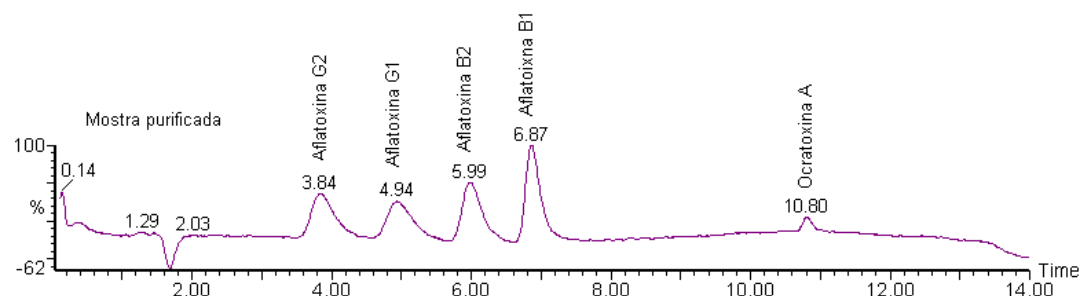


Figura 3.5.1.2. Cromatograma amb detector d'ultravioleta d'una mostra purificada i una sense purificar addicionades amb la mateixa concentració.

Com es pot veure en les figures anteriors, la variació de la metodologia no és útil ja que no es detecten cap de les toxines d'interès, quedant clara la necessitat d'utilitzar el cartutx OASIS HLB (3cc/60mg), que purifica la mostra de compost.

Per tant, aquesta metodologia utilitzada amb el detector DAD no ha resultat ser satisfactòria, s'ha decidit utilitzar l'espectròmetre de masses. A continuació, es presenten els resultats amb aquest altre detector.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

El mateix extracte analitzat amb el detector DAD també s'ha analitzat amb l'espectròmetre de masses amb la finalitat de veure si es detectava alguna de les toxines ja que aquest és més sensible i més selectiu que el detector DAD. Tot i així, no s'ha detectat cap de les toxines afegides.

És a dir que la variació de la metodologia d'extracció no ha resultat ser satisfactòria, per tant s'opta per realitzar una altra variació.

3.5.2. Anàlisi del compost de Blanes del 2007 utilitzant MeOH com a solvent d'extracció i purificant la mostra.

La següent variació que s'ha realitzat de la metodologia d'extracció simultània de les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ i OTA, amb la finalitat d'obtenir millors recuperacions en l'addició a 5g de mostra. La finalitat d'aquesta variació és tornar a utilitzar el cartutx per a purificar la mostra per poder obtenir recuperacions repetitives i superiors a les obtingudes fins ara.

El procediment que s'estudiarà és el següent; es pesa 5g de mostra de compost assecada i s'afegeixen 50mL de MeOH on s'addicionen 50µL d'un patró de 100mg/L de les aflatoxines G₁, B₁, G₂,

B₂ i l'ocratoxina A. Es deixa 30 minuts en agitació magnètica i es filtra per gravetat; s'afegeix la quantitat necessària d'aigua per tenir la proporció MeOH:H₂O (70:30) i al cap d'una estona apareix un precipitat, que es centrifuga a 6.000 revolucions per minut durant 10 minuts i es deixa al congelador amb la finalitat que el precipitat es decanti. Després s'agafa una alíquota de 4mL de la mescla on s'afegeix 1,6mL d'aigua per tal de tenir un contingut del 50% en metanol i posteriorment es purifiquen amb un cartutx d'extracció OASIS HLB (3cc/60mg).

El cartutx ha estat condicionat prèviament amb 2mL d'acetonitril i equilibrat amb 2mL d'aigua. Després es carrega la mostra i es renta el cartutx amb 2mL d'aigua (5% acetonitril). Les toxines s'elueixen amb 2mL d'acetonitril. A continuació, s'evapora fins a sequedat sota una corrent de nitrogen. Finalment es reconstitueix amb 1mL de fase mòbil. Seguidament, s'injecta la mostra a l'HPLC-MS seguint les condicions cromatogràfiques descrites pel **mètode A2**.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

En la figura 3.5.2.1. es presenta el cromatograma obtingut utilitzant el detector DAD a 350nm de la mostra de compost addicionada a una concentració de 1mg/kg, on s'utilitza la mètdica d'extracció descrita anteriorment. La figura 3.5.2.2. mostra a un patró corresponent a 0,4mg/L de les toxines d'interès.

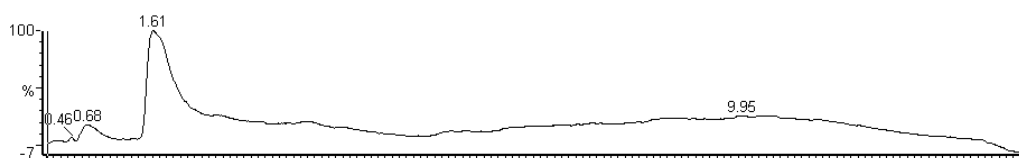


Figura 3.5.2.1. Cromatograma amb detector DAD de 5g de compost addicionat amb toxines, utilitzant el cartutx HLB i fent l'extracció amb 100% de MeOH.

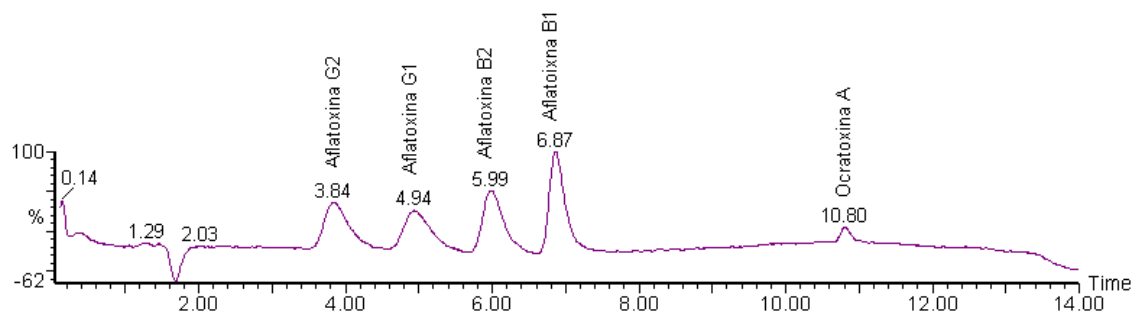


Figura 3.5.2.2. Patró de 0,4mg/L de les cinc toxines d'interès.

Com es pot observar en els dos cromatogrames anteriors, la modificació de la mètdica no és útil ja que si es comparen els dos cromatogrames anteriors, no es detecten cap de les toxines d'interès.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

Igual que en el cas anterior, tot i que l'espectròmetre de masses és més sensible que el detector DAD però tampoc s'han detectat cap de les toxines d'interès.

És a dir, que es pot concloure que les variacions fetes fins ara, no serveixen per millorar les recuperacions de les toxines. Tot i això, s'ha provat una altre variació de la metòdica que consisteix en realitzar una etapa de desengreixat abans de realitzar l'extracció. Aquesta variació és la que es descriu en l'apartat següent.

3.5.3. Extracció de les micotoxines amb una etapa de desengreixat prèvia a l'extracció

A causa de l'elevada variabilitat en les recuperacions de les toxines adicionades en mostres de compost, s'ha decidit fer una etapa de desengreixat del compost abans de passar la mostra pel cartutx OASIS. Aquest desengreixat es fa amb hexà ja que és com es descriu en la FDA (Food and Drug Administration (FDA) 1998) per a mostres alimentàries com farina de blat. Aquesta nova metòdica s'aplica a una mostra de compost de Blanes adicionada amb les toxines d'interès, per veure com aquestes es recuperen.

Aquesta metòdica consisteix en: pesar 5g de compost on s'addicionen 100µL d'un patró de 100mg/L les aflatoxines G₁, B₁, G₂, B₂ i l'ocratoxina A. Aquestes s'extreuen amb 50mL d'una mescla MeOH:H₂O (70:30), es deixa 30 minuts en agitació i es filtra per gravetat. A continuació, 5mL d'aquest extracte es passen a un tub de centrifuga i es fan 2 extraccions amb 3mL d'hexà i s'agita manualment, després es centrifuga a 2000 rpm durant 3 minuts. Seguidament, 2mL de la fase inferior (part desengreixada) s'evaporen sota corrent de nitrogen i es reconstitueix amb 2mL MeOH:H₂O (50:50) per passar l'extracte pel cartutx OASIS HLB. Els cartutxos han estat condicionats i equilibrats com es descriu en l'apartat 3.5. Seguidament, s'ha injectat a l'HPLC-MS seguint les condicions cromatogràfiques del **mètode A2**.

Resultats obtinguts amb el detector DAD

A continuació, en la figura 3.5.3.1. es mostra el cromatograma d'un patró de les toxines i d'una mostra aplicant la metòdica descrita anteriorment.

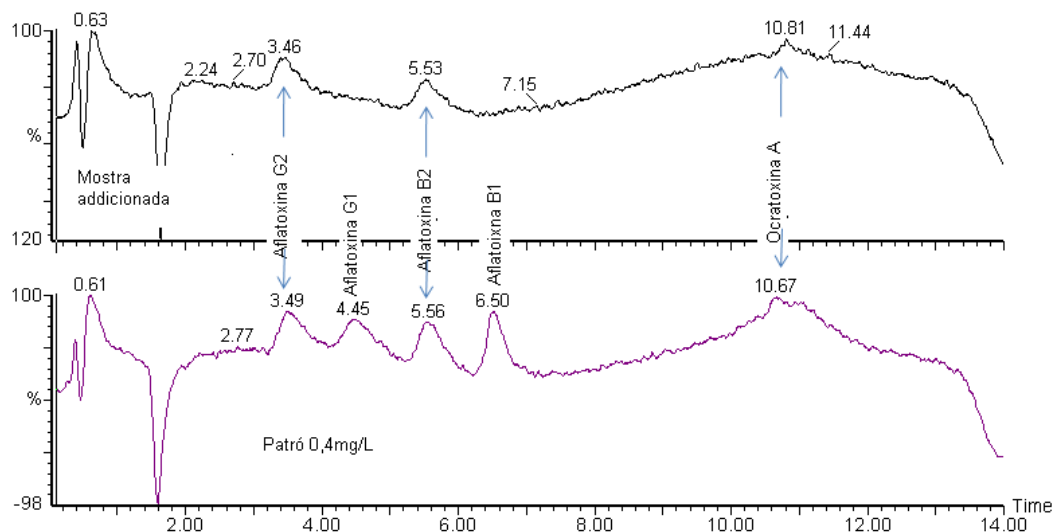


Figura 3.5.3.1. Cromatograma amb detector UV a 350nm per les aflatoxines i l'ocratoxina A, d'un patró de 0,4mg/L i d'una mostra de compost adicionada amb les toxines d'interès.

Com es pot veure en la figura 3.5.3.1. en aquesta metòdica de desengreixat, s'aconsegueixen recuperar només les aflatoxines G₂, B₂ i l'ocratoxina A però no les aflatoxines G₁ i B₁. Més avall,

es mostren els cromatogrames obtinguts amb l'espectròmetre de masses amb la finalitat de detectar les toxines que amb el detector DAD no s'aconsegueix.

En la taula 3.5.3.1. es mostren les recuperacions calculades per a les tres toxines recuperades.

	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina B ₂	OTA
Recuperacions (%) DAD	2	5	1

Taula 3.5.3.1. Recuperacions (%) calculades amb el detector DAD

Com es pot observar en la taula 3.5.3.1. els percentatges de recuperació disminueixen amb el desengreixat de la mostra respecte la metodologia d'extracció descrita en l'apartat 3.4.

Resultats obtinguts amb l'espectròmetre de masses

En la figura 3.5.3.2. es mostra el cromatograma obtingut en mode SIR positiu per a les quatre aflatoxines de la mostra addicionada, comparat amb un patró de les aflatoxines.

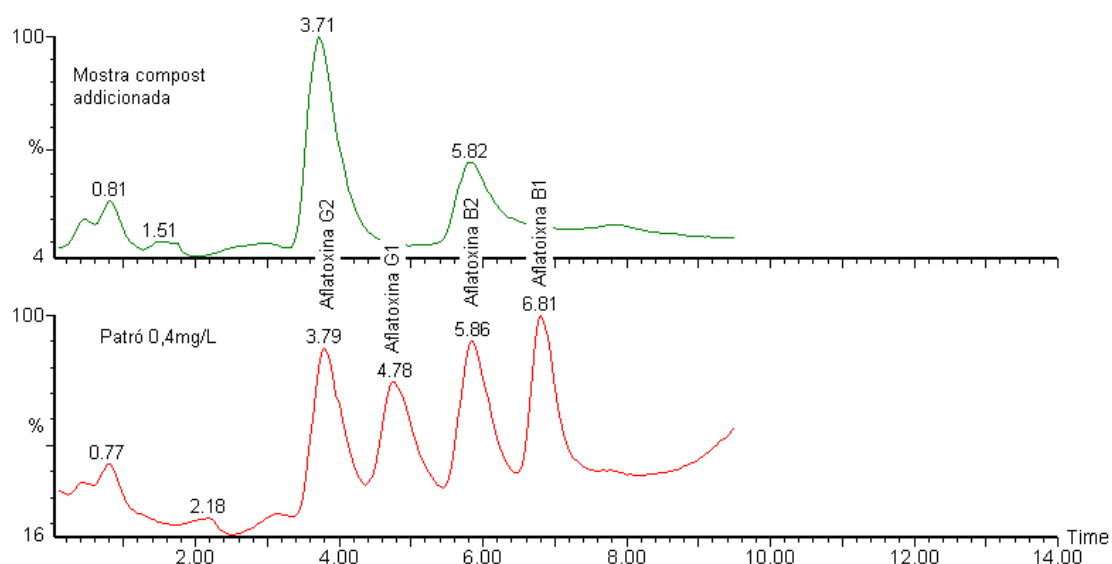


Figura 3.5.3.2. Cromatograma en mode SIR positiu per les aflatoxines G₂, G₁, B₂ i B₁ d'una mostra de compost addicionada amb les aflatoxines i un patró d'aquestes.

La figura 3.5.3.3. és el cromatograma en mode SIR negatiu corresponent a una mostra addicionada i un patró d'OTA.

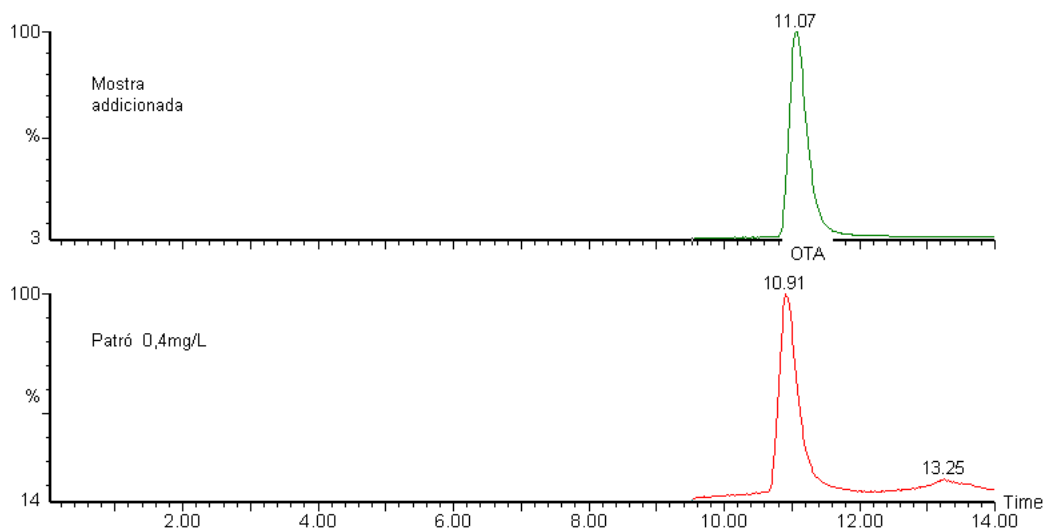


Figura 3.5.3.3. Cromatograma en mode SIR negatiu d'una mostra de compost adicionada i un patró d'OTA.

Com es pot veure, tant si s'utilitza el detector DAD com si s'utilitza l'espectròmetre de masses, només es recuperen tres de les cinc toxines d'interès. Així doncs, el desengreixat de la mostra no dona resultats satisfactoris.

A continuació en la taula 3.5.3.2. es mostren les recuperacions obtingudes per a les tres toxines recuperades amb l'espectròmetre de masses. En aquest cas les recuperacions també disminueixen amb el desengreixat de la mostra.

	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina B ₂	OTA
Recuperacions (%) MS	20	10	30

Taula 3.5.3.2. Recuperacions (%) calculades amb l'espectròmetre de masses

Aquest mètode es descarta degut a les baixes recuperacions obtingudes i perquè només es recuperen tres de les cinc toxines d'interès.

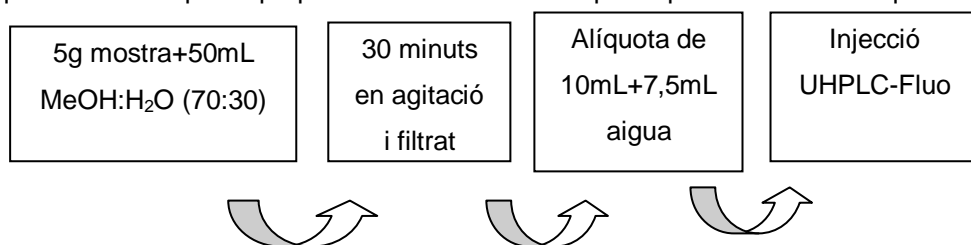
Per tot el que s'ha comentat fins ara ha queda palès que el mètode que s'ha vingut emprant per a la determinació simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA basat en l'extracció amb aigua:metanol, purificació amb fase sòlida (cartutx HLB) i posterior concentració de l'extracte, presenta diversos problemes que fan que el mètode resulti poc robust i molt matriu depenent. És per això que s'ha estudiat un mètode alternatiu, basat en la major sensibilitat i selectivitat que dona la utilització combinada de l'UHPLC amb la detecció per fluorescència per tal de veure si es pot realitzar la determinació simultània de les toxines sobre l'extracte directe sense necessitat de realitzar les etapes de purificació y concentració. Aquest nou desenvolupament del mètode es presenta en l'apartat següent.

4. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost per UHPLC-UV-Fluo

Un cop vistos els problemes anteriors, i tenint en compte que es dubta de l'efectivitat dels cartutxos d'extracció i de l'etapa de preparació de mostra, s'ha decidit aplicar el **mètode A3** a les mostres de compost. Aquest mètode com ja s'ha comentat en l'apartat 3.2. és més sensible que el **mètode A2** ja que utilitza un detector de fluorescència. Per tant es creu que pot ser útil per a l'anàlisi de les micotoxines en compost sense necessitat de purificar la mostra.

L'objectiu, des d'un inici en la posta a punt del nou mètode d'anàlisi per a l'extracció simultània de les micotoxines en compost, és desenvolupar un mètode que permeti arribar fins 1mg/kg (veure apartat 3.3) de les toxines en compost. Per tant, per seguir mantenint aquest límit s'ha de fer una variació de la metodologia d'extracció per la posterior injecció en UHPLC-Fluo.

Aquesta nova etapa de preparació consta de les etapes representades a l'esquema 4.1.



Esquema 4.1. Etapes de la preparació de mostra

Així doncs, la següent etapa de preparació de mostra és la que es descriu a continuació: es pesen 5g de mostra (paral·lelament, es prepara un altre mostra on s'addicionen 50µL de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i ocratoxina A). S'utilitza com a solvent d'extracció 50mL d'una mescla MeOH:H₂O (70:30) i es deixa 30 minuts en agitació magnètica. Un cop passats els 30 minuts, es filtra per gravetat i s'agafa una alíquota de 10mL de la mescla on s'afegeixen 7,5mL d'aigua. L'objectiu de l'addició d'aquesta aigua és tenir la mostra en una dissolució de MeOH:H₂O (40:60), que són les condicions inicials del gradient cromatogràfic del **mètode A3** descrit en l'apartat 3.1.

Cal destacar les novetats incorporades amb aquesta nova preparació de mostra on es continua mantenint el límit de 1mg/kg proposat des d'un inici, que són:

- 1) El primer fet a destacar és la ràpida preparació de mostra.
- 2) Com ja s'ha dit anteriorment, en el **mètode A3** s'aprofita l'elevada sensibilitat del detector de fluorescència respecte la sensibilitat de l'espectròmetre de masses. És per aquest motiu que es decideix treballar amb 5g de mostra. A més a més, realitzar l'anàlisi amb aquesta quantitat de mostra proporciona homogeneïtat a la mostra.
- 3) S'ha pogut desenvolupar un mètode on no ha sigut necessari realitzar una purificació de mostra seguida de l'elució dels analits del cartutx HLB i tampoc ha sigut necessari concentrar la mostra. Així doncs, tot i tenir un extracte final set vegades més diluït que l'extracte obtingut amb el **mètode A2**, s'ha pogut realitzar un anàlisi qualitatiu i quantitatiu de les toxines d'interès.

En els apartats següents, es descriu l'aplicació d'aquesta nova preparació de mostra a dues mostres de compost analitzades anteriorment que són el compost de Blanes del 2007 i el compost de Manresa del mateix any.

4.1. Anàlisi de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i ocratoxina A per UHPLC-UV-Fluo en el compost de Manresa del 2007 i el compost de Blanes del 2007.

S'han preparat quatre mostres en paral·lel; una mostra de compost de Manresa, una mostra de compost de Blanes i dues mostres més de compost de Manresa i Blanes amb toxines addicionades a una concentració de 1mg/kg, seguint així l'objectiu inicial del límit de detecció. L'extracció i anàlisi d'aquestes quatre mostres es realitza seguint l'esquema 4.1 i totes les mostres s'han injectat a l'UHPLC-UV-Fluo en les condicions cromatogràfiques descrites en el **mètode A3** (veure apartat 3.1).

L'UHPLC-UV-Fluo consta de d'un detector d'UV acoblat en sèrie a un detector de fluorescència i tenint en compte que en aquesta nova metodica s'aprofita l'elevada sensibilitat del detector de fluorescència, només s'han estudiat els cromatogrames amb aquest detector.

A continuació, es mostra en la figura 4.1.1. el cromatograma obtingut per un patró de 60µg/L. S'ha preparat un patró d'aquesta concentració ja que en mostra equival a 1mg/kg que correspon el límit de detecció establert des de l'inici de la present Tesi Doctoral.

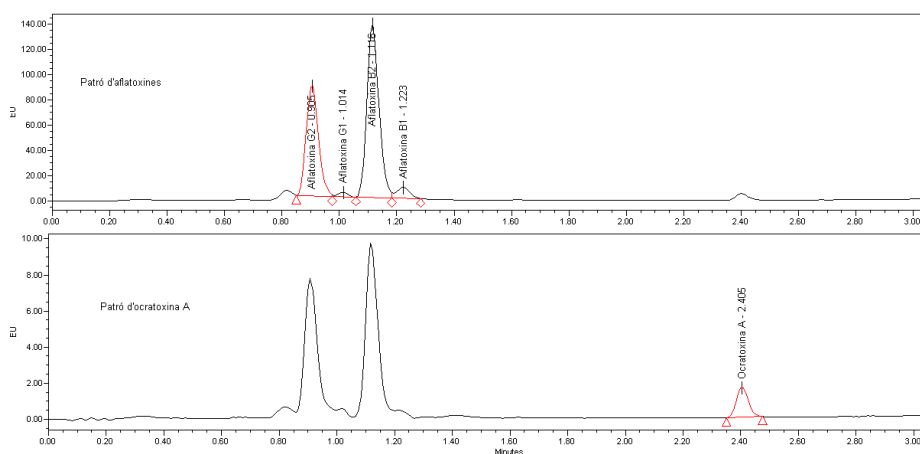


Figura 4.1.1. Cromatograma corresponent a un patró de 60µg/L, per a les aflatoxines a una λ d'emissió de 450nm i per l'ocratoxina A una λ d'emissió de 460nm.

A continuació, en les figures 4.1.2 i 4.1.3 es mostren els cromatogrames corresponents a les mostres de compost de Manresa i Blanes del 2007 addicionades amb les toxines d'interès a una concentració equivalent a 1mg/kg, respectivament.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

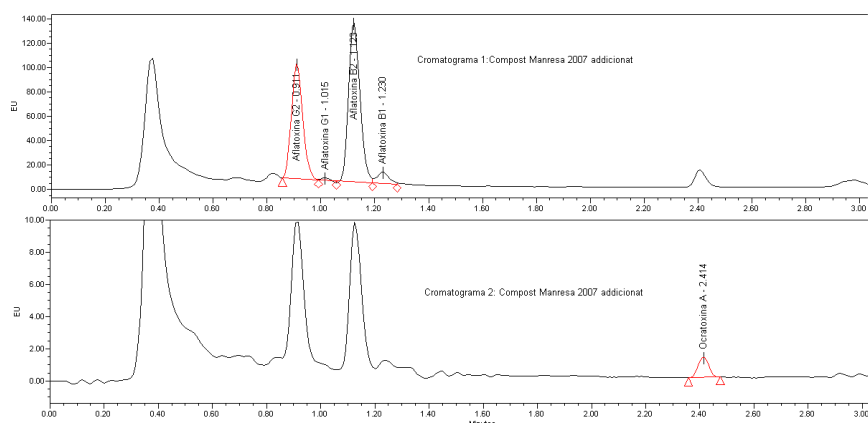


Figura 4.1.2. Cromatograma corresponent a una mostra de compost de Manresa del 2007 addicionada amb les cinc toxines d'interès, per a les aflatoxines a una λ d'emissió de 450nm (cromatograma 1) i per l'ocratoxina A una λ d'emissió de 460nm (cromatograma 2).

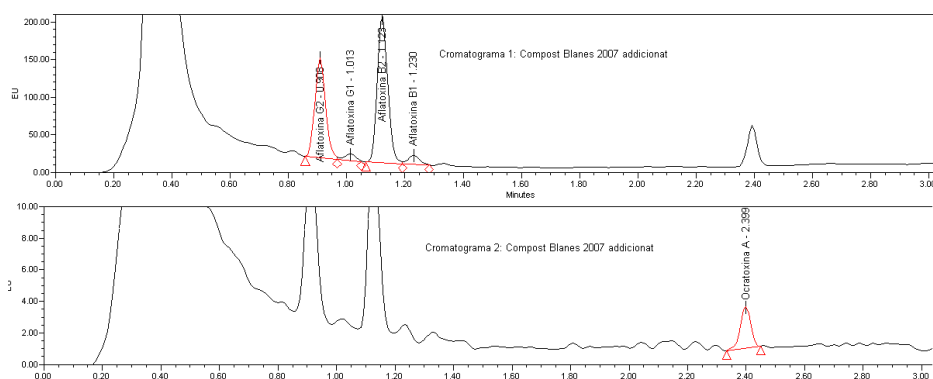


Figura 4.1.3. Cromatograma corresponent a una mostra de compost de Blanes del 2007 addicionada amb les cinc toxines d'interès, per a les aflatoxines a una λ d'emissió de 450nm (cromatograma 1) i per l'ocratoxina A una λ d'emissió de 460nm (cromatograma 2).

Finalment, en les figures 4.1.4 i 4.1.5 es mostren dos cromatogrames corresponents a les dues mostres de compost de Blanes i Manresa del 2007 respectivament, sense addicionar les toxines d'interès.

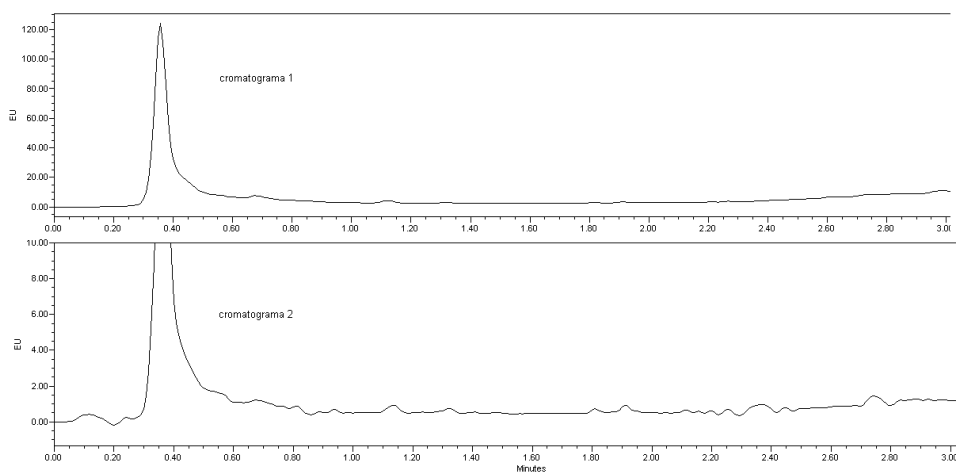


Figura 4.1.4. Cromatograma corresponent a una mostra de compost de Manresa del 2007, per a les aflatoxines a una λ d'emissió de 450nm (cromatograma 1) i per l'ocratoxina A una λ d'emissió de 460nm (cromatograma 2).

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

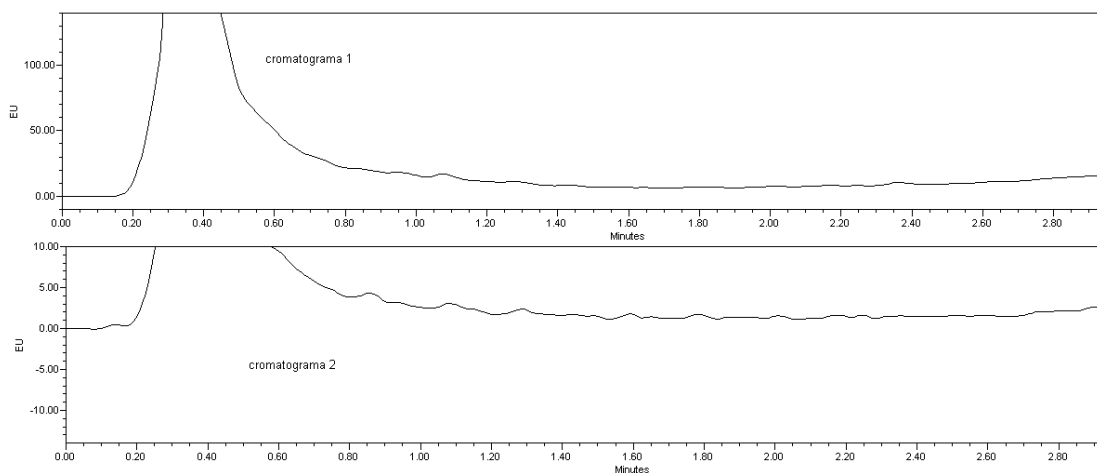


Figura 4.1.5. Cromatograma corresponent a una mostra de compost de Blanes del 2007, per a les aflatoxines a una λ d'emissió de 450nm (cromatograma 1) i per l'ocratoxina A una λ d'emissió de 460nm (cromatograma 2).

Observant les figures 4.1.4 i 4.1.5 es pot concloure que no hi ha presència de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i l'ocratoxina A a concentracions superiors a 1mg/kg (veure l'estudi del LD i LQ a l'apartat 4.2) en les mostres de compost de Blanes i de Manresa del 2007 analitzades.

A continuació es procedeix a realitzar els càlculs de les recuperacions de les toxines d'interès utilitzant la nova mètdica d'extracció simultània de les cinc toxines d'interès.

En la taula 4.1.1. es mostren les recuperacions obtingudes per a cadascuna de les toxines calculades per a les dues mostres de compost adicionades.

Recuperació (%)	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	OTA
Manresa 2007	109	70	97	90	80
Blanes 2007	95	75	96	90	87

Taula 4.1.1. Recuperacions (%) calculades per a cada toxina

Com es pot veure les recuperacions obtingudes amb la nova mètdica d'extracció simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i ocratoxina A són superiors al 70%, per tant s'ha aconseguit millorar la mètdica d'extracció i purificació tant en la rapidesa de l'etapa d'extracció i purificació de la mostra, com en l'efectivitat del mètode.

Per tant, s'ha decidit realitzar la validació d'aquesta nova mètdica d'anàlisi.

4.2. Validació del mètode analític

Per a la validació del mètode analític s'estudien els següents paràmetres: a) linealitat, b) recuperacions i c) límit de detecció i quantificació. Aquests paràmetres s'han calculat pel detector de fluorescència.

a) Linealitat

Es preparen patrons d'una mescla de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i ocratoxina A de 0,3mg/L, 0,2mg/L, 0,06mg/L, 0,03mg/L, 0,02mg/L i 0,013mg/L diluint la dissolució mare de 100mg/L en fase mòbil. S'ha decidit estudiar aquest rang de concentracions perquè el treball es centra en mostres de compost.

A continuació de la figura 4.2.1. a la figura 4.2.5 es mostren els gràfics corresponents als factors de resposta vs la concentració de cada toxina.

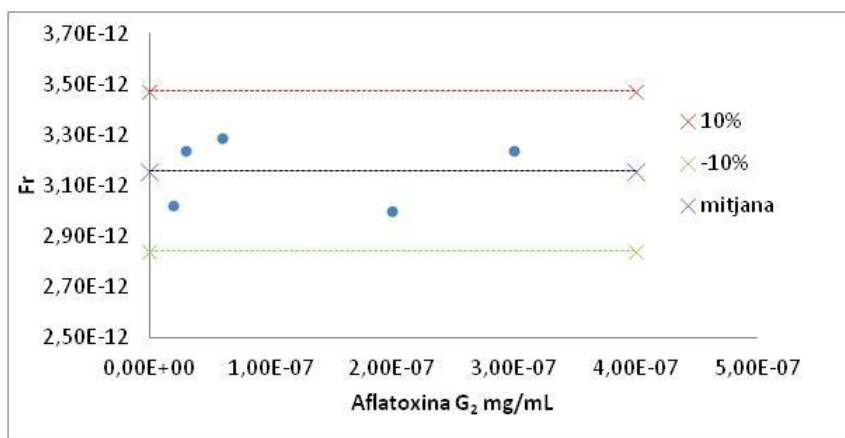


Figura 4.2.1. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina G₂

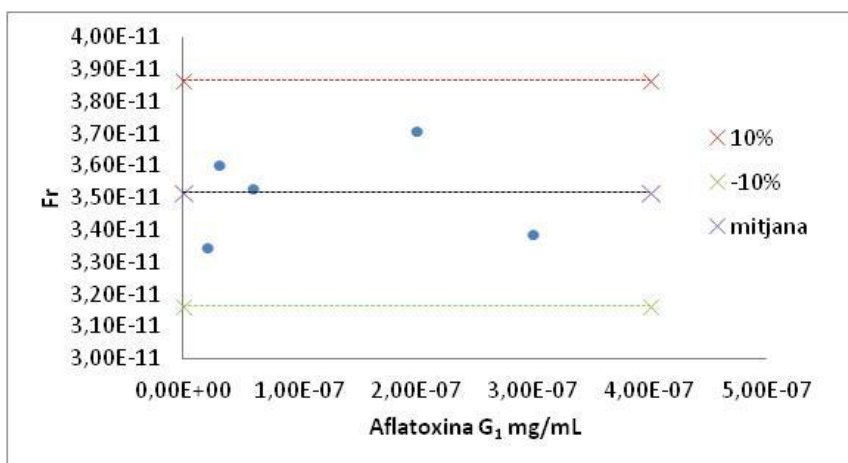


Figura 4.2.2. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina G₁

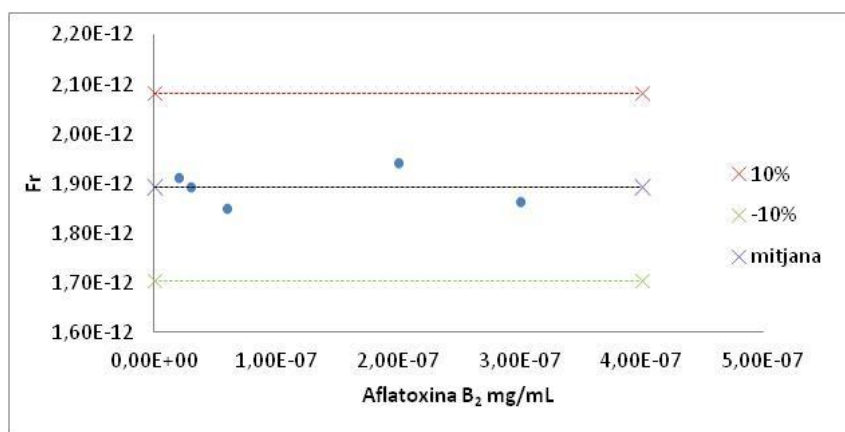


Figura 4.2.3. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina B₂

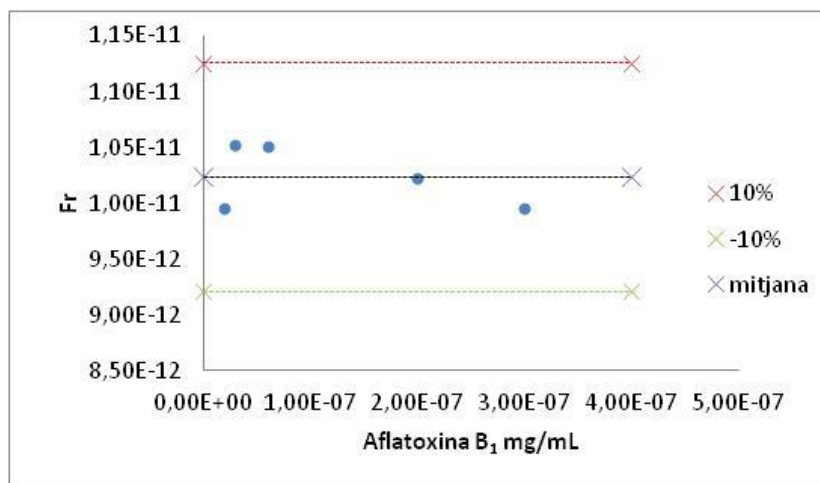


Figura 4.2.4. Factor de resposta vs concentració per a l'aflatoxina B₁

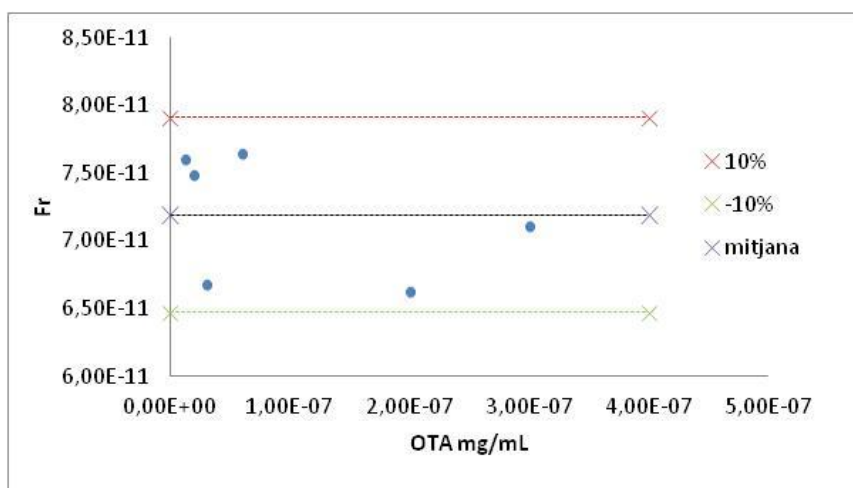


Figura 4.2.5. Factor de resposta vs concentració per a l'ocratoxina A

Admetent una variació del $\pm 10\%$ respecte el valor promig del factor de resposta es pot considerar que les aflatoxines G₂, G₁, B₂ i B₁ tenen un comportament lineal de 0,3mg/L a 0,02mg/L i l'ocratoxina A té un comportament lineal de 0,3mg/L a 0,013mg/L.

b) Recuperacions

S'aplica el mètode d'addicions de patró a 5 mostres de compost de Blanes del 2007 addicionades a diferents nivells; les addicions equivalent a 5mg/kg, 1mg/kg, 0,5mg/kg, 0,3mg/kg i 0,2mg/kg en mostra.

Per realitzar els càlculs de les recuperacions s'ha seguit l'esquema 4.1. i les condicions d'injecció a l'UHPLC-Fluo són les descrites a l'apartat 3.1 pel mètode A3.

A continuació, en la taula 4.2.1. es mostren les recuperacions calculades utilitzant el factor de resposta obtingut pel patró de concentració més propera a l'addició en cada mostra.

IV. Anàlisi simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA en mostres de compost

Toxina	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
Recuperació (%)	83	84	75	62	105
CV (%)	13	10	25	31	20

Taula 4.2.1. Recuperacions i CV calculats per a cada nivell d'addició en mostra de compost de Blanes

En la taula 4.2.2. es mostren les recuperacions calculades utilitzant el factor de promig obtingut amb els patrons.

Toxina	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
Recuperació (%)	83	84	75	62	105
CV (%)	15	8	24	32	18

Taula 4.2.2. Recuperacions i CV calculats per a cada nivell d'addició en mostra de compost de Blanes

Com es pot comprovar, si es comparen les taules 4.2.1 i 4.2.2 els resultats obtinguts són pràcticament iguals. Així les recuperacions obtingudes són satisfactòries tant calculant el factor de resposta promig com calculant el factor de resposta corresponent al patró de concentració proper a cada concentració.

c) Límit de detecció i quantificació

Com en els casos anteriors, el límit de detecció i quantificació es determinen amb una mostra de compost de Blanes addicionada amb una quantitat coneguda de toxines. S'estableix una relació senyal/soroll aproximada de 10:1 pel límit de quantificació i 3:1 pel límit de detecció.

Toxina	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
L.D.(mg/kg)	0,03	0,13	0,02	0,09	0,03
L.Q. (mg/kg)	0,10	0,4	0,07	0,32	0,12

Taula 4.2.3. Límits de detecció i quantificació per a cadascuna de les toxines

Aquests límits, s'han calculat amb el cromatograma obtingut d'una mostra de compost de Blanes del 2007 addicionada a un nivell de 0,2mg/kg. La figura 4.2.6. es mostra aquest cromatograma.

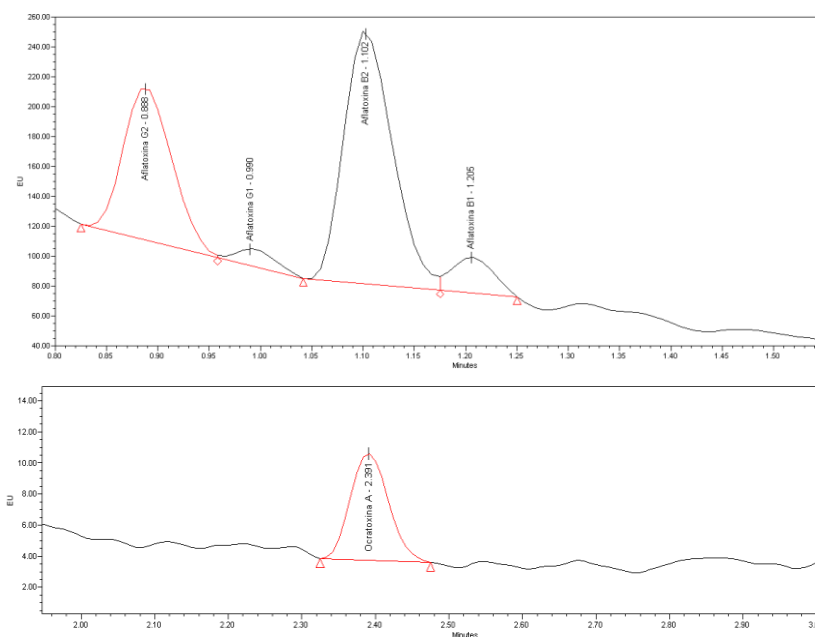


Figura 4.2.6. Cromatograma obtingut per calcular els límits de detecció i quantificació

Amb aquest nou mètode, s'han obtingut recuperacions superiors al 70% i repetitives assolint així l'objectiu d'aquest capítol. A més a més de millorar la metòdica d'extracció, purificació i detecció proposada des d'un inici.

Finalment, es pot concloure que les mostres de compost de Blanes i Manresa de l'any 2007 no tenen concentració d'aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i OTA superior a 0,2 mg/kg.

5. Resum del capítol

- 1) El **mètode A2** s'ha validat amb patrons (veure apartat 3.1.1.) i s'han obtingut resultats satisfactoris. En canvi, un cop s'ha aplicat aquest mètode a diferents mostres de compost, s'ha demostrat que és un mètode matriu dependent, que té diferents comportament dependent del tipus de mostra i pes de mostra.
- 2) El **mètode A3** s'ha validat amb patrons (veure apartat 3.1.1.) i s'han obtingut resultats satisfactoris. Aquest mètode un cop aplicat a les mostres de compost ha resultat ser útil per a qualsevol tipus de mostra obtenint bones recuperacions de les toxines i bona sensibilitat.
- 3) Un cop analitzades les mostres de compost de Blanes del 2007, 2002 i Manresa 2007 es pot afirmar que no hi ha concentració de les toxines d'interès superior a 0,2 mg/kg, arribant a un límit de detecció den inferior al proposat des d'un inici que ha sigut de 1mg/kg.

1.- S'ha desenvolupat una metòdica d'anàlisi per HRGC-MS que permet la identificació i quantificació del nonilfenol en mostres de sòls. La utilització d'aquesta metòdica a les mostres de sòls, mesclades de sòl amb torba i mesclades de sòl amb compost, a les que s'ha addicionat prèviament nonilfenol per estudiar la seva degradació, permet afirmar que al cap de 32 setmanes d'incubació a temperatura ambient, la concentració de nonilfenol ha disminuït en més d'un 90%.

2.- Pel que fa a la metòdica d'anàlisi de nonilfenols en els lixiviats dels sòls, s'ha posat a punt una metòdica d'anàlisi per HRGC-MS, prèvia extracció amb diclometà. Aquesta metòdica permet afirmar que la concentració de nonilfenol que es lixivia és molt baixa respecte a la que hi ha en el sòl, fins i tot quan està en quantitats inicials molt elevades. Així, es pot afirmar que els lixiviats no representen una contaminació apreciable per a les aigües superficials que els puguin rebre.

3.- Els lixiviats estudiats, tant dels sòls que tenen nonilfenol addicionat com en els que no, s'ha demostrat que el nivell de matèria orgànica lixiviada, expressada en els valors del TOC, són nivells que compleixen els màxims permisos per a la legislació sobre l'abocament d'aigües residuals. També s'ha avaluat la toxicitat d'aquests lixiviats amb l'assaig del Microtox i s'ha demostrat que no presenten toxicitat.

4.- S'ha modificat el mètode analític desenvolupat en el nostre equip per a la determinació d'aflatoxines en plantes medicinals per adaptar-lo a la determinació simultània de les 4 aflatoxines més l'ocratoxina A en compost. El mètode, si bé ha permès demostrar l'absència de les micotoxines en els composts estudiats, ha presentat problemes pel que fa a la exactitud i s'ha mostrat matriu dependent.

5.- Mitjançant UHPLC-Fluorescència, s'ha desenvolupat i validat un mètode adequat i sensible per a la determinació simultània de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i l'ocratoxina A de mostres de compost. Cal destacar que aquest procediment no requereix de la purificació de l'extracte i que la determinació cromatogràfica es dur a terme en només 3 minuts.

6.- A les mostres de compost estudiades, produïdes en les EDAR de Blanes i de Manresa, no es detecta la presència de les aflatoxines G₂, G₁, B₂, B₁ i l'ocratoxina A per sobre de 0,2 mg/kg.

7.- Així doncs, per tot el que s'ha exposat en aquest treball i atenent als paràmetres estudiats (nonilfenol i micotoxines), la utilització del compost com adob en agricultura és una pràctica segura. En cap cas s'ha detectat la presència de micotoxines en els composts i, pel que fa al NP, aquest estudi demostra que fins i tot en el cas que la seva concentració estés molt per sobre dels límits marcats en l'esborrany de la Directiva EC, no representarien un problema vista la seva ràpida degradació en el sòl i les poques pèrdues per lixiviació que es produeixen.

[Escribir texto]

I.INTRODUCCIÓ

- (1) Bloom. E.; Bal. K.; Nyman. E.; Must. A.; Larson. L.; Mass Spectrometry-Based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Strachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 4211-4217.
- (2) Bagó. B.; Análisis de diversos contaminantes orgánicos en fangos de depuradora y estudio de su evolución en los procesos de postratamiento. Tesis Doctoral. Universidad Ramon Llull. 2005 [Director de la Tesis: Dr. Lluís Comellas Riera].
- (3) Mejía. G.; Estudio de la evolución de la materia orgánica en procesos de compostaje y secado térmico de fangos de depuradora. Tesis Doctoral. Universidad Ramon Llull. 2005 [Director de la Tesis: Dr. Lluís Comellas Riera].
- (4) Utilització de fangs de depuradora en restauració. Agència Catalana del Aigua. 2008.
- (5) <http://mediambient.gencat.net/aca> (consulta 14/10/2010).
- (6) Programa d'actuacions per a la gestió de fangs de depuració d'aigües residuals urbanes. Agència Catalana del Aigua. 2010.
- (7) Avaluació de les dades de la producció i gestió des fangs. ACA 2010.
- (8) <http://aca-web.gencat.cat/aca> (consulta 21/10/2010).
- (9) Working Document on Sludge, 3rd Draft, Brussels 2000.
- (10) Encyclopedia of Food Mycotoxins. M.Weidenbörner. Ed. Springer 2001.
- (11) Cuadrench. A.; Avaluació de la producció de toxines mitjançant HPLC-MS per microfongs aïllats durant el procés de compostatge. 2009.
- (12) ACGIH, Committee Activities and Reports; *Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment*. 1989, USA.
- (13) Previdi. P.; Casolari. A.; Le aflatoxine, Industria Conserve edn. 1986.
- (14) Smoragiewicz. W.; Cossette. B.; Boutard. A.; Krzystyniak. K.; Trichothecene Mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 1993, 65, 113-117.
- (15) Croft. WA.; Jarvis. BB.; Yatawara. CS.; *Airborne outbreak of trichothecene toxicosis, Atmospheric Environment*, 1986.
- (16) Gregg. M.; Marilyn. L.; Browne. E.G.; Kenneth. M.; William. F.; Ambient air levels of *Aspergillus fumigatus* and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility. *Aerobiologia*, 2001, 17, 99-108.
- (17) Déportes. I.; Krivobok. S.; Seigle-Murandi. F.; Zmirou, D.; Aflatoxins in Municipal Solid Wastes Compost? A First Answer. *J. Agric. Food Chem*, 1997, 45, 2788-2792.

II.NONILFENOLS

- (1) Programa d'actuacions per a la gestió dels fangs residuals generats en els processos de depuració d'aigües residuals urbanes de Catalunya. ACA juny 2010.
- (2) Domene. X.; Chelinho. S.; Paulo Sousa. J.; Effects of nonylphenol on a soil community using microcosms. *J. Soils Sediments*, 2010, 10, 556-567.
- (3) EC European Communities 2000. Working document on sludge. 3rd draft. ENV.E.3/LM. Brussels 27 April, 2000.
- (4) Bagó. B.; Análisis de diversos contaminantes orgánicos en fangos de depuradora y estudio de su evolución en los procesos de postratamiento. Tesis Doctoral 2005. Universidad Ramon Llull. [Director de la Tesis: Dr. Lluís Comellas Riera].
- (5) Mejía. G.; Estudio de la evolución de la materia orgánica en procesos de compostaje y secado térmico de fangos de depuradora. Tesis Doctoral 2005. Universidad Ramon Llull. [Director de la Tesis: Dr. Lluís Comellas Riera].
- (6) <http://profefeliz.blogspot.com/2009/11/adios-nonilfenol.html> (consulta 16/10/2010).
- (7) Soares. A.; Guieysse. B.; Jefferson. B.; Cartmel. E.; Lester. N.J.; Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environmental International*, 2008, 34, 1033-1049.
- (8) Domene. X.; Ramírez. W.; Solà. L.; Soil pollution by nonylphenol and nonylphenol ethoxylates and their effects to plants and invertebrates. *J. Soils Sediments*, 2009, 9, 555-567.
- (9) http://www.sasolos.com/products/pdf/Alcohol20Ethoxilates_ES.pdf (consulta 2/11/2010).
- (10) Ferguson. P. L.; Iden. C. R.; Brownawel J.; Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromagr A*, 2001, 14, 79-91.
- (11) Ferrara. F.; Fabiatti. F.; Delise. M.; Picciolibocca. A.; Funari. E.; Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). *Environmental Science & Technology* 2001, 35, 3109-3112.
- (12) Jonkers. N.; Knepper. T.; Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *T. Environ. Sci. Technol*, 2001, 35, 335-340.
- (13) Field. J. A.; Fiels. T. M.; Poiger. T.; Giger, W.; Determination of secondary alkane sulfonates in sewage wastewaters by solid-phase extraction and injection-port derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol*, 1994, 28, 497-503.
- (14) Di Corcia. A.; Constantino. A.; Crescenzi. C.; Marinoni. E.; Samperi. R.; Characterization of Recalcitrant Intermediates from Biotransformation of the Branched Alkyl Side Chain of Nonylphenol Ethoxylate Surfactants. *Enviro. Sci. Technol*, 1998, 32, 2401-2409.
- (15) Di Corcia. A.; Cavallo. R.; Crescenzi. C.; Nazzari. M.; Occurrence and Abundance of Dicarboxylated Metabolites of Nonylphenol Polyethoxylate Surfactants in Treated Sewages. *Enviro. Sci. Technol*, 2000, 34, 3914-3919.

-
- (16) Chang. B. V.; Chiang. B. W.; Yuan. S. Y.; Biodegradation of nonylphenol in soil. *Chemosphere*, 2007, 66, 1857-1862.
- (17) Chang. B.V.; Chiang. B. W.; Yuan. S. Y.; Anaerobic degradation of nonylphenol in soil. *J. of Environmental Science and Health Part B*, 2007, 42, 387-392.
- (18) Gibson. R.; Wang. M.; Padgett. E.; Beck. A.J.; Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. *Chemosphere*, 2005, 61, 1336-1344.
- (19) Giger, W.; Stephanou, E.; Schaffner, C.; Persistent organic chemicals in sewage effluents: I. Identifications of nonylphenols and nonylphenoethoxylates by glass capillary gas chromatography / mass spectrometry. *Chemosphere*, 1981, 10, 1253-1263.
- (20) Ahel, M.; Giger, W.; Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1985a, 57, 1577-1583.
- (21) Ahel, M.; Giger, W.; Determination of nonionic surfactants of the alkylphenol polyethoxylate type by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1985b, 57, 2584-2590.
- (22) Scarlett. MJ.; Fisher. JA.; Zhang. H.; Ronan. M.; Determination of dissolved nonylphenol ethoxylate surfactants in waste waters by gas stripping and isocratic high performance liquid chromatography. *Water Research*, 1994, 28, 2109-2116.
- (23) Naaim. MA.; Ibrahim and Brian BW.; Determination of alkylphenol ethoxylate non-ionic surfactants in trade effluents by sublation and high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 1996, 121, 239-24.
- (24) Barco. M.; Planas. C.; Palacios. O.; Ventura. F.; Rivera. J.; Caixach. J.; Simultaneous quantitative analysis of anionic, cationic, and nonionic surfactants in water by electrospray ionization mass spectrometry with flow injection analysis. *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 5129-5136.
- (25) Mol. H.G.J.; Sunarto. S.; Steijger. O.M.; Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, 879, 97-112.
- (26) Xie. Z.; Le Clavé. S.; Feigenbrugel. V.; Preub. TG.; Vinken. R.; Ebinghaus. R.; Ruck. W.; Henry's law constants measurements of the nonylphenol isomer 4(3',5'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol, tertiary octylphenol and γ -hexachlorocyclohexane between 278 and 298 K. *Atmos Environmental*, 2004, 38, 4859-4868.

-
- (27) Ahel. M.; Tepic. N.; Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a municipal solid waste landfill and underlying soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000, 65, 236-243.
- (28) Esperanza. M.; Suidan. M.T.; Nishimura. F.; Wang. Z-M.; Sorial. G.A.; Zafiro. A.; McCauley. P.; Brenner. R.; Sayles. G.; Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38, 3028-3035.
- (29) Shao. B.; Hu. JY.; Yang. M.; Determination of nonylphenol ethoxylates in the aquatic environment by normal phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J of Chromatography A*, 2002, 950, 167-174.
- (30) Gatidou. G.; Thomaidis. NS.; Stasinakis. A.; Lekkas. TD.; Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *J of Chromatography A*, 2007, 1138, 32-41.
- (31) Stasinakis. A.; Gatidou. G.; Mamais. D.; Thomaidis NS.; Lekkas. TD.; Occurrence and fate of endocrine disrupters in Greek sewage treatment plants. *Water Research*, 2008, 42, 1796-1804.
- (32) Blanco. E.; Casais. M.C.; Mejuto. MdelC.; Cela, R.; Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 647, 104-111.
- (33) Hibberd. A.; Maskaoui. K.; Zhang. Z.; Zhou. JL.; An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta*, 2009, 77, 1315-1321.
- (34) Nieto. A.; Borrull. F.; Marcé. RM.; Pocurrull. E.; Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J of Chromatography A*, 2009, 1216, 5619-5625.
- (35) Ahel. M.; Giger. W.; Koch M.; Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, 1994a, 28, 1131-1142.
- (36) Ahel. M.; Giger. W.; Schaffner. C.; Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research*, 1994b, 28, 1143-1152.

-
- (37) Vikelsoe. J.; Thomsen. M.; Carlsen. L.; Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. *Scie Total Environ*, 2002, 296, 105116.
- (38) Fountoulakis. M.; Drillia. P.; Pakou. C.; Kampioti. A.; Stamatelatou. K.; Lyberatos. G.; Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge by high performance liquid chromatography following microwave-assisted extraction. *J of Chromatography A*, 2005, 1089, 45-51.
- (39) Gibson. R.; Wang. MJ.; Padgett. E.; Beck. AJ.; Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. *Chemosphere*, 2005, 61, 1336-1344.
- (40) Gadzala-Kopciuch. R.; Filipiak. A.; Berecka. B.; Buszewski. B.; Isolation, purification and determination of 4-n-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous and biological samples. *Talanta*, 2008, 74, 655-660.
- (41) Croce, V.; Paggio. S.; Pagnoni. A.; Polesello. S.; Valscechi. S.; Determination of 4-nonylphenol and 4-nonylphenol ethoxylates in river sediments by microwave assisted solvent extraction. *Ann Chim*, 2003, 93, 297-304.
- (42) Bartolomé. L.; Cortazar. E.; Raposo. JC.; Usobiaga. A.; Zuloaga. O.; Etxebarria. N.; Fernández. LA.; Simultaneous microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalate esters and nonylphenols in sediments. *J Chromatography A*, 2005, 1068, 229-236.
- (43) Rudel. RA.; Camann. DE.; Spengler. JD.; Korn. LR.; Brody. JG.; Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol*, 2003, 37, 4543-4553.
- (44) Willetts. M.; Brown. VA.; Clench. MR.; Influence of surface carbon coverage of C1 (TMS) stationary phases on the separation of nonylphenol ethoxylate ethoxymers. *J Chromatography A*, 2000, 903, 33-40.
- (45) Reid. AM.; Brougham. CA.; Fogarty. AM.; Roche. JJ.; Accelerated solvent-based extraction and enrichment of selected plasticisers and 4-nonylphenol, and extraction of tin from organotin sources in sediments, sludges and leachate soils. *Analytica Chim Acta*, 2009, 634, 197-204.
- (46) La Guardia. MJ.; Hale. RC.; Harvey. E.; Mainor. TM.; Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environ Sci Technol*, 2001, 35, 4798-4804.
- (47) Ballesteros. O.; Zafra. A.; Navalon. A.; Vilchez. JL.; Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *J Chromatography A*, 2006, 1121, 154-162.
- (48) Aparicio. I.; Santos. JL.; Alonso. E.; Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. *Waste Manag*, 2009, 29, 1747-1753.
- (49) Micic. V.; Hofmann. T.; Occurrence and behaviour of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River. *Environ Pollut*, 2009, 157, 2759-2768.
- (50) Hibberd. A.; Maskaoui. K.; Zhang. Z.; Zhou. JL.; An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta*, 2009, 77, 1315-1321.

-
- (51) Babay. PA.; Gestar. RT.; Silva. MF.; Thiele. B.; Batistoni. D.A.; Separation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol by non-aqueous capillary electrophoresis. *J Chromatography A*, 2006, 1116, 277-285.
- (52) Céspedes. R.; Skryjová. K.; Raková. M.; Zeravik. J.; Fránek. M.; Lacorte. S.; Barceló. D.; Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS. *Talanta*, 2006, 70, 745-751.
- (53) Mart'ianov. AA; Dzantiev. BB.; Zherdev. AV.; Aeremin. S.; Céspedes. R.; Petrovic. M.; Barceló. D.; Immunoenzyme assay of nonylphenol: study of selectivity and detection of alkylphenolic non-ionic surfactants in water samples. *Talanta*, 2005, 65, 367-374.
- (54) Fránek. M.; Zeravik. J.; Eremin. SA.; Yakovleva. J.; Badea. M.; Danet. A.; Nistor. C.; Ocio. N.; Emneus. J.; Antibody-based methods for surfactant screening. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 371, 456-466.
- (55) Soil Taxonomy, 1998

III.LIXIVIATS

- (1) Hao. RX.; Liang. P.; Zhao. M.; Wang. JA.; Zhou. YW.; Determination of nonylphenol in wastewater by solid phase extraction gas chromatography mass spectrometry and multi-selective ions. *Huan Jing Ke Xue*, 2006, 27, 2222-2227.
- (2) River. O.; Rice. C.; Schmitz. Al.; Loyo-Rosales. J.; Link. E.; Thoma. R.; Fay. L.; Altfater. D.; Camp. MJ.; Alkylphenol and alkylphenol-Ethoxylates in Carp, Water, and Sediments from the Cuyahoga, *Environ Sci Technol*, 2003, 37, 3747-3754.
- (3) Portolés. T.; Pitarch. E.; López. FJ.; Hernámdez. F.; Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatography A*, 2011, 1218, 303-15.
- (4) Domene. X.; Chelinho. S.; Sousa. JP.; Effects of nonylphenol on a soil community using microcosms. *Journal of Soils Sediments*, 2010, 10, 556-567.
- (5) Domene. X.; Ramírez. W.; Solà. L.; Alcañiz. JM.; Andrés. P.; Soil pollution by nonylphenol and nonylphenol ethoxylates and their effects to plants and invertebrates. *Journal of Soils Sediments*, 2009, 9, 555-567.
- (6) Soares. A.; Guieysse. B.; Jefferson. B.; Cartmell. E.; Lester. JN.; Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 2008, 34, 1033-1049.
- (7) Schüürmann. G.; Acute aquatic toxicity of alkyl phenol ethoxilates. *Ecotoxicity Environ Saf*. 1991, 21, 227-233.
- (8) Smith. E.; Ridgway. I.; Coffey. M.; The determination of alkylphenols in aqueous samples from the Forth Estuary by SPE-HPLC- fluorescence. *Journal of Environ Monit*, 2001, 3, 616-620.
- (9) Smith. MD.; Hill. EM.; Uptake and metabolism of technical nonylphenol and its brominated analogues in the roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat Toxicol*. 2004, 69, 359-369.
- (10) Reglament metropolità d'abocament d'aigües residuals (consulta 19/1/2011).
- (11) Mejía. G.; Estudio de la evolución de la materia orgánica en procesos de compostaje y secado térmico de fangos de depuradora. Tesis Doctoral. Universidad Ramon Llull 2005. [Director de la Tesis: Dr. Lluís Comellas Riera].
- (12) Shimadzu Corporation. User's Manual TOC-V CSH/CS SHIMADZU M393-E187A Total Organic Carbon Analyzer. 2001.

IV.MICOTOXINES

- (1) Lancaster. MD.; Jenkins. FP.; Phillip. JM.; Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 1961, 192, 1095-1096.
- (2) Allcorft. R.; Carnaghan. RB.; Sargeant. K.; O'Kelly. J.; A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet.Rec*, 1961, 73, 128-129.
- (3) Sargeant. K.; Sheridan. A.; O'Kelly. J.; Carnaghan. RB.; Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 1961, 192, 1096-1097.
- (4) Nesbitt. BF.; O'Kelly. L.; Sargeant K.; Sheridan. A.; *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 1962, 195, 1062-1063.
- (5) Van der Merwe. KJ.; Steyn. PS.; Fourie. L.; Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Nature*, 1965a, 205, 7083-7088.
- (6) Van der Merwe. KJ.; Steyn. PS.; Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature*, 1965b, 1112-1113.
- (7) Krogh. P.; Proceeding of the 2nd International Symposium on Endemic Nephropathy. *Ed.Bulgarian Academy of Science*, 1974.
- (8) De longh. H.; Vles. RO.; van Pelt. JG.; (1964) Milk on mammals fed and aflatoxin containing diet. *Nature*, 1964, 202, 466-467.
- (9) Kuiper-Goodman, T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxins, ochratoxin, and zearalenone. *J.Physiology Pharmacol*, 1990, 68, 1017-1024.
- (10) Gilbert. J.; Usleber. E.; Ngatia. T.A.; Martlbauer. E.; Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B1 in chicken liver tissues. *Poultry Science*, 2003, 82, 585-590.
- (11) Association of official analytical chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. Ed. Dr. William Horwitz. Estats Units. 2003.
- (12) Dunne. C.; Meaney. M.; Smyth. M.; Tuinstra. LG.; Multimycotoxins detection and clean-up for aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in animal feed ingredients using high-performance liquid chromatography and gel permeation chromatography. *J. Chromatogr*, 1993, 629, 229-235.
- (13) Jonsyn. H.; Determination of aflatoxins by reversed-phase high performance liquid chromatography with post-column in-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr*, 1993, 654, 247-254.
- (14) Scudamore. KA.; Hetmanski. MT.; Nawaz. S.; Naylor. J.; Rainbird. S.; Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-columns immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam*, 1997, 14, 175-186.
- (15) Croft. WA.; Jarvis. BB.; Yatawara. CS.; Airborne outbreak of tricothecene toxicosis. *Atmos.Enviro*, 1986, 20, 549-552.

-
- (16) Göbel. R.; Lusky. K.; Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zeralenone in grains by immunoaffinity column/liquid chromatography. *J. AOAC Int*, 2004, 87, 411-416.
- (17) Ventura. M.; Vallejos. C.; Anaya. I.; Díaz. J.; Broto-Puig. F.; Agut. M.; Comellas. L.; Analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A*, 2004, 1048, 25-29.
- (18) Legarda. TM.; Burdaspal. PA.: Determinación de ocratoxina A en alimentos infantiles a base de cereales mediante purificación por columnas de inmunoafinidad i cromatografía líquida: estudio de prospección. *Alimentaria*, 2004, 350, 11-18.
- (19) Nakajima. M.; Studies on mycotoxins analysis using immunoaffinity column. *Mycotoxins* 2003, 53, 43-45.
- (20) Stroka. J.; Anklam. E.; Jörissen. U.; Gilbert. J.; Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromation for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *J. AOAC Int*, 2000a, 83, 320-340.
- (21) Stroka. J.; Van Otterdijk. R.; Anklam. E.; Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *J. Chromatogr. A*, 2000b, 904, 251-256.
- (22) Adhav. B.; Naicker. V.; Mycotoxins in south african traditionally brewed beers. *Food Addit. Contam*, 2002, 19, 55-61.
- (23) Santos. EA.; Vargas. EA.; Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. *Food Addit. Contam*, 2002, 19, 447-458.
- (24) Nesheim. S.; Strack. ME.; Trucksess. MW.; Eppley. RM.; Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley, and kidney: collaborative study. *J. AOAC. Int*, 1992, 75, 481-487.
- (25) Jerkovich. A.D.; Scott. JI.; Jorgenson. JW.: The use of micrometer-size particles in ultrahigh pressure liquid chromatography. *LCGC North America*, 2003, 21, 600-610.
- (26) Dabrio. M.V.; y colaboradores.; Cromatografía y electroferesis en columna. Ed. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona, 2000.
- (27) Marquardt. RR.; Frohlich. AA.; Sreemannarayana. O.; Abramson. D.; Bernatsky. A.; Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Western Canada. *Can.J.Vet.Res.*, 1988, 52, 186-190.
- (28) Trucksess. MW.; Strack. ME.; Nesheim. S.; Albert. RH.; Romer. TR.; Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts; collaborative study. *J.AOAC Int*, 1994, 77, 1512-1521.
- (29) Abramson. D.; Measurement of ochratoxin A in barley extracts by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr*, 1987, 391, 315-320.
- (30) Cappiello. A.; Famiglini. G.; Trillini. B.; Determination of aflatoxins in peanuts meal by LC/MS with a particle beam interface. *Chromatographia*, 1995, 40, 411-416.

-
- (31) Jorgensen.K.; Vahl. M.; Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food.Addit.Contam*, 1999, 16, 451-456.
- (32) Tanaka. T.; Yoneda. A.; Sugiura. Y.; An application of liquid chromatography and mass spectrometry for determination of aflatoxins. *Mycotoxins*, 2002, 52, 107-113.
- (33) Nilufer. D.; Boyacioglu. D.; Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini. *J. Agric. Food Chem*, 2002, 50, 3375-3379.
- (34) Tuomi. T.; Johnsson. T.; Hitikka. EL.; Reijula. K.; Detection of aflatoxins (G₁₋₂,B₁₋₂), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes. *Analyst*, 2001, 126, 1545-1550.
- (35) Ventura. M.; Desenvolupament de mètodes cromatogràfics per a l'anàlisi d'aflatoxines B₁, B₂, G₂, G₁ i ocratoxina A en productes d'origen animal. Tesi Doctoral 2005. Universidad Ramon Llull. [Directors de la Tesi: Dra. Montserrat Agut Bonsfills i Dr. Lluís Comellas Riera].