



**Universitat Ramon Llull**

## **TESI DOCTORAL**

Títol: Eliminació de contaminants orgànics persistents d'oli de peix

Realitzada per Xavier Ortiz Almirall

en el Centre Institut Químic de Sarrià

i en el Departament d'Anàlisi

Dirigida per Dr. Jordi Díaz Ferrero



*«Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.  
Has de pregar que el camí sigui llarg,  
que siguin moltes les matinades  
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,  
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben».*

Lluís Llach



*A la meva família*



***AGRAÏMENTS***

---





M'agradaria donar les gràcies a totes les persones que durant aquests anys m'han ajudat a dur a terme la present tesi doctoral. Sense ells, res d'això hagués estat possible.

Al Dr. Jordi Díaz, qui ara fa cinc anys em va acollir al Laboratori Mediambiental i m'ha estat guiant durant tot aquest temps en el meu viatge pel món dels contaminants orgànics persistents. Font inesgotable de coneixements, energia i paciència, sempre ha estat i serà una de les meves principals referències.

A tot el personal del Laboratori Mediambiental, els quals sempre m'han cuidat i ajudat en tot el que han pogut. Chus, Marta, Mònica, Montse, Sandra, Ramon i Raquel: Gràcies per tot el que m'heu ensenyat.

A tots els TFCs/Màsters que han format part d'aquest projecte, així com del meu desenvolupament com a químic i com a persona: Laia, Marc i –amb especial èmfasi degut a tot al temps i les aventures que hem passat junts- Núria. Aquesta tesi també és en part vostra.

Als TFCs del Laboratori Mediambiental, amb qui he passat tant bons moments; Anna, Cristina i Toni.

Al Ministerio de Educación y Ciencia pel suport econòmic donat a través de la concessió del projecte EDYCAP.

A les empreses que han proporcionat materials per a la realització dels estudis de la present tesi: Afamsa, Benesa, Chiemivall, Desotec, Norit, Supelco, Tolsa i Variant.

A la Dra. Ethel Eljarrat i Paula Guerra(IDÆA-CSIC) per la fructífera col·laboració professional.

Al Dr. Carles Colominas (GEMAT-IQS) pel suport en l'apartat fotoquímic del present treball i la cessió del fotorreactor.

Al Dr. Francesc Broto i Eng. Cristina Ribas (Secció de Cromatografia) per tot el que he après amb ells i l'ajuda desinteressada que m'han donat durant aquests anys.

Al Dr. Abellà, tant per la seva tasca com a Cap de Departament així com per l'ajuda amb el microscopi electrònic.

A Ursina Ortoll per l'ajut proporcionat el camp de l'anàlisi d'àcids grassos.

A la Dra. Judith Báguena, per tots els coneixements i bons records acumulats durant el transcurs de les auxiliaries de 3er.

A la Eng. Núria Vallmitjana i Eng. Lourdes Margarit per introduir-me en del món del mostreig.

A tots els meus companys de l'IQS, amb els quals hem compartit tants moments, cafès i congressos: Anna, Ari, Elisenda, Helena, Jordi, Pol i Uri.

To Becky, the person who is travelling by my side during this journey called life. *You are the sunshine of my life.*

I finalment –però no per això menys importants- a la meva família, amb menció especial als meus pares i al meu germà. Tot el que sóc i tot el que tinc us ho dec a vosaltres. Sou el mirall amb que em fixo dia a dia per ser una persona millor.

A l'avia Rosa i l'avi Fernando, que sempre m'heu estat malcriant tant bé. A la tieta Rosa i el Sergi, per estar sempre a prop meu.

**SUMARI**



En la present tesi doctoral s'han estudiat diversos mètodes per a l'eliminació de contaminants orgànics persistents -dibenzo-*p*-dioxines policlorades (PCDDs), dibenzofurans policlorats (PCDFs), bifenils policlorats (PCBs), difenilèters polibromats (PBDEs), dicloro difenil tricloroetà (DDT) i hexaclorobenzè (HCB)- en olis de peix amb finalitat alimentària.

S'han posat al punt les metodologies d'anàlisi necessàries per a la correcta determinació d'aquests compostos en la matriu d'estudi. S'han avaluat amb detall les etapes de purificació de la mostra, fraccionament dels analits i anàlisi instrumental. El mètode ha estat validat amb resultats satisfactoris, i s'ha comprovat el seu bon funcionament a través de la participació en diversos exercicis d'intercalibatge, així com la realització de diversos estudis amb mostres reals d'oli de peix.

S'ha estudiat l'eliminació dels contaminants orgànics persistents a través d'adsorbents sòlids amb base silícica i carbonàcia. Inicialment s'ha avaluat la capacitat de diversos adsorbents comercials (onze amb base silícica i nou amb base carbonàcia) per eliminar els analits d'interès d'oli de peix. Les condicions experimentals han estat estudiades més a fons mitjançant dissenys d'experiències, per acabar optimitzant el mètode d'adsorció amb un disseny d'evolució. Els millors resultats s'han obtingut amb el carbó actiu, que mostra una elevada eficàcia en l'eliminació de PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines i HCB.

S'ha estudiat l'eliminació dels contaminants orgànics persistents mitjançant tècniques de degradació fotoquímiques. Inicialment s'ha fotodegradat cada família de contaminants per separat, per poder estudiar més a fons les condicions necessàries per la seva eliminació, així com els seus mecanismes i productes de degradació. Posteriorment s'ha estudiat la fotodegradació simultània dels analits d'interès en oli de peix. Aquesta tècnica s'ha mostrat efectiva en l'eliminació de DDT, PBDEs, HCB i PCBs similars a dioxines.

Paral·lelament als estudis d'eliminació mitjançant adsorbents sòlids i tècniques fotoquímiques, s'ha comprovat la qualitat dels olis de peix abans i després del tractament amb les metodologies desenvolupades, per tal d'avaluar quin efecte tenen en la matriu d'estudi. Aquesta caracterització dels olis s'ha dut a terme a través de l'anàlisi de la seva composició en àcids grassos, especialment en els omega-3. S'ha observat que el procés d'adsorció en sòlids no afecta significativament a la qualitat de l'oli, mentre que les tècniques fotoquímiques degraden una part dels àcids grassos insaturats.

S'ha estudiat l'eliminació de contaminants orgànics persistents en oli de peix mitjançant la combinació de les dues tècniques estudiades anteriorment, amb una primera etapa de degradació fotoquímica i una segona etapa d'adsorció. S'han comparat els resultats finals d'eliminació que s'obtenen amb cada un dels mètodes desenvolupats (adsorció, fotodegradació i combinat). Tenint en compte aquests resultats, juntament amb l'efecte de cada tècnica en la qualitat de l'oli, s'ha determinat l'adsorció en carbó actiu com al procés més adequat per l'eliminació de COPs en oli de peix.

S'ha realitzat un estudi dels nivells diastereomèrics i enantiomèrics d'un contaminant emergent -l'hexabromociclododecà (HBCD)- en oli de peix. S'ha avaluat la seva eliminació de la matriu d'estudi mitjançant adsorbents amb base carbonàcia i degradació fotoquímica, sent principalment eliminat per aquesta segona via.



## **ABREVIACIONS I ACRÒNIMS**





- AAH: hidroxilasa d'hidrocarburs aromàtics
- ANIMAME: Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles
- ANOVA: anàlisi de variança
- BET: isoterma de Brunauer-Emmet-Teller, que determina superfícies específiques
- BHA: *tert*-butil-*para*-hidroxianol
- BHT: *tert*-butil-*para*-cresol
- COP:contaminant orgànic persistent
- CSIC: Consell Superior d'Investigacions Científiques
- CA: carbó actiu
- CAP: carbó activat en pols
- CAG: carbó activat granular
- CL: carbó laminar
- COT: Comitè de Toxicologia del Regne Unit
- CV: coeficient de variació o desviació estàndard relativa
- DDD: dicloro difenil dicloroetà
- DDE: dicloro difenil dicloroetilè
- DDT: dicloro difenil tricloroetà
- DE: disseny d'experiències
- DFC: disseny factorial complet
- DFF: disseny factorial fraccionat
- DHA: àcid *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic
- DL-PCB: bifenil policlorat similar a dioxina
- DPA: àcid *cis*-7,10,13,16,19-docosapentaenoic
- ECD: detector de captura d'electrons
- EPA: àcid *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic
- EPA: Agència de Protecció del Medi Ambient
- EROD: 7-etoxiresorufin O-deetilasa
- ETA: àcid *cis*-8,11,14,17-eicosapentaenoic
- EUBA: Associació Europea de Productors de Bentonites
- EVOP: disseny d'evolució
- FE: fracció enantiomèrica
- FID: detector d'ionització de flama
- HBCD: hexabromociclododecà
- HCB: hexaclorobenzè
- HCH: hexaclorociclohexà
- HOMO: orbital molecular ocupat més energètic
- HPLC: cromatografia de líquids d'alta eficàcia
- HRGC: cromatografia de gasos d'alta resolució
- HRMS: espectrometria de masses d'alta resolució
- IARC: Agència Internacional per la Investigació del Càncer
- ICES: Consell Internacional per l'Exploració dels Mars
- IDÆA: Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua
- LD: Límit de detecció

- LUMO: orbital molecular desocupat de menor energia
- MS: espectrometria de masses
- OE: ordre d'enllaç
- PAH: hidrocarbur poliaromàtic
- PBDE: difenil èter polibromat
- PBB: bifenil polibromat
- PCB: bifenil policlorat
- PCDD: dibenzo-*p*-dioxina policlorada
- PCDF: dibenzofurà policlorat
- PI: patró intern
- PYE: columna cromatogràfica basada en sílica modificada amb grups 2-(1-pirenil)etil
- SEM: Microscopi electrònic d'escombrat
- SD: desviació estàndard
- SPE: extracció en fase sòlida
- T<sub>4</sub>: tiroxina
- TBBA: tetrabromo bisfenol A
- TCN: 1,2,3,4-tetracloronaftalè
- THF: tetrahidrofurà
- TR: temps de retenció
- U: incertesa
- UE: Unió Europea
- UNEP: Programa de les Nacions Unides pel Medi Ambient
- UV: ultraviolat
- WHO: Organització Internacional de la Salut
- WHO-TEF: factors d'equivalència tòxica proposats per l'Organització Mundial de la Salut
- WHO-TEQ: equivalents tòxics calculats a partir dels WHO-TEF





1. ASPECTES GENERALS I OBJECTIUS.....	1
1.1. Introducció .....	3
1.2. Els olis de peix.....	5
1.2.1. Processos d'obtenció i refinament dels olis de peix.....	6
1.2.2. Composició dels olis de peix.....	7
1.2.3. Beneficis dels àcids grassos omega-3 per la salut.....	10
1.2.4. Oxidació dels olis de peix.....	11
1.3. Els Contaminants Orgànics Persistents.....	12
1.3.1. PCDD/Fs.....	13
1.3.2. PCBs.....	17
1.3.3. PBDEs.....	21
1.3.4. Plaguicides organoclorats (DDTs i HCB).....	23
1.3.5. HBCD.....	26
1.3.6. Legislació.....	29
1.4. Objectius.....	32
1.5. Bibliografia.....	33
2. DESENVOLUPAMENT ANALÍTIC.....	39
2.1. Introducció.....	41
2.2. Metodologia analítica per a l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs.....	42
2.2.1. Extracció de la fracció lipídica de la matriu.....	42
2.2.2. Purificació de l'extracte.....	43
2.2.3. Fraccionament dels analits.....	44
2.2.4. Determinació instrumental dels COPs.....	45
2.2.5. Mètodes d'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs del Laboratori Mediambiental de l'IQS.....	46
2.3. Determinació instrumental dels COPs.....	48
2.3.1. Determinació instrumental de PBDEs.....	48
2.3.2. Determinació instrumental de plaguicides organoclorats.....	57
2.3.3. Determinació instrumental simultània de PBDEs, PCBs, PCDD/Fs i plaguicides organoclorats.....	59
2.4. Purificació dels COPs en columna de sílica multicapa.....	63
2.4.1. Purificació de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides organoclorats.....	64
2.4.2. Purificació de PBDEs en columna de sílica multicapa.....	65
2.5. Fraccionament dels COPs.....	69
2.5.1. Fraccionament de PBDEs mitjançant tubs d'extracció en fase sòlida preempaquetats amb Carbopack B.....	69
2.5.2. Fraccionament de PBDEs mitjançant HPLC-PYE.....	71
2.5.3. Fraccionament de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides organoclorats per HPLC-PYE.....	74
2.6. Validació del mètode analític i estudis d'intercalibratge.....	79
2.6.1. Validació del mètode.....	79
2.6.2. Estudis d'intercalibratge de PBDEs.....	82
2.7. Anàlisi de mostres reals d'oli de peix.....	86
2.7.1. Nivells de COPs en olis de peix amb diferent finalitat i origen.....	86

2.7.2. Nivells de COPs en complements nutritius enriquits amb oli de peix.....	91
2.8. Bibliografia.....	102
<b>3. ELIMINACIÓ DE COPs EN OLI DE PEIX MITJANÇANT ADSORBENTS SÒLIDS.....</b>	<b>107</b>
3.1. Introducció.....	109
3.2. Eliminació de COPs amb adsorbents silícics.....	110
3.2.1. Els adsorbents silícics.....	110
3.2.2. Caracterització dels adsorbents silícics emprats.....	114
3.2.3. Eliminació de COPs amb adsorbents silícics.....	115
3.2.4. Estudi del procés d'adsorció mitjançant disseny d'experiències.....	130
3.3. Eliminació de COPs amb adsorbents carbonacis.....	139
3.3.1. Els adsorbents carbonacis.....	139
3.3.2. Caracterització dels adsorbents carbonacis emprats.....	143
3.3.3. Eliminació de COPs amb adsorbents carbonacis.....	151
3.3.4. Estudi del procés d'adsorció mitjançant disseny d'experiències.....	165
3.3.5. Optimització del mètode.....	172
3.3.6. Capacitat del carbó actiu com a adsorbent.....	185
3.4. Efectes del procés d'adsorció en la qualitat de l'oli de peix.....	189
3.5. Bibliografia.....	192
<b>4. ELIMINACIÓ DE COPs EN OLI DE PEIX MITJANÇANT TÈCNiques FOTOQUÍMIQUES.....</b>	<b>197</b>
4.1. Introducció.....	199
4.2. Fotodegradació de compostos orgànics.....	200
4.2.1. Fotocatàlisi heterogènia.....	200
4.2.2. Fotodegradació de molècules orgàniques.....	202
4.2.3. Estudis de fotodegradació previs.....	204
4.3. Proves prèvies.....	207
4.3.1. El reactor fotoquímic.....	207
4.3.2. Absorció del material de quars.....	208
4.3.3. Absorció dels dissolvents.....	210
4.4. Degradació fotocatalítica de COPs a 365 nm.....	211
4.4.1. Fotodegradació de PCBs indicadors en isooctà.....	211
4.4.2. Fotodegradació de PCBs indicadors en diversos dissolvents .....	212
4.5. Fotodegradació de COPs a 254 nm.....	216
4.5.1. Fotodegradació de PCBs indicadors a 254 nm.....	216
4.5.2. Fotodegradació de PCBs similars a dioxines a 254 nm.....	222
4.5.3. Fotodegradació de PBDEs a 254 nm.....	230
4.5.4. Fotodegradació de PCDD/Fs a 254 nm.....	238
4.5.5. Fotodegradació de DDTs i HCB a 254 nm.....	242
4.5.6. Comparació entre les cinètiques de degradació de cada família de COPs.....	245
4.6. Fotodegradació COP en oli de peix a 254 nm.....	247
4.7. Bibliografia.....	252

5. ELIMINACIÓ DE COPs EN OLI DE PEIX MITJANÇANT ADSORCIÓ EN CARBÓ ACTIU I FOTODEGRADACIÓ.....	255
5.1. Introducció.....	257
5.2. Eliminació de COPs en oli de peix combinant adsorció en carbó actiu i Fotodegradació.....	258
5.2.1. Eliminació de COPs.....	259
5.2.2. Efecte del tractament en el contingut d'àcids grassos de l'oli de peix.....	264
5.2.3. Estudi de la degradació fotoquímica d'oli de tonyina refinat.....	267
5.2.4. Estudi de l'ús d'antioxidant per evitar la degradació dels olis.....	269
5.3. Comparació dels tres mètodes d'eliminació estudiats i selecció de les millors condicions per a l'eliminació de COPs en oli de peix .....	272
5.3.1. Eliminació de COPs.....	272
5.3.2. Degradació de l'oli.....	273
5.3.3. Punts forts i febles de cada mètode i selecció de l'òptim.....	274
5.4. Bibliografia.....	275
6. ANÀLISI D'HBCD EN OLI DE PEIX.....	277
6.1. Introducció.....	279
6.2. Mètode per l'anàlisi d'HBCD en oli de peix.....	280
6.2.1. Determinació instrumental de l'HBCD.....	280
6.2.2. Metodologia d'anàlisi d'HBCD en oli de peix segons IDÆA-CSIC.....	281
6.3. Anàlisi enantiomèric i diastereoisomèric d'oli de peix per alimentació humana i animal.....	283
6.3.1. Mostres d'oli de peix.....	283
6.3.2. Nivells diastereoisomèrics d'HBCD en oli de peix.....	285
6.3.3. Fraccions enantiomèriques d'HBCD en oli de peix.....	289
6.3.4. Comparació amb els nivells de PCDD/Fs, PCBs i PBDEs.....	290
6.4. Eliminació d'HBCD per adsorció en carbó actiu i degradació fotoquímica.....	293
6.5. Bibliografia.....	295
7. CONCLUSIONS.....	297





## **1. ASPECTES GENERALS I OBJECTIUS**



## 1.1. Introducció

Durant els últims anys el consum d'oli de peix s'ha vist incrementat per la seva introducció en la dieta humana i animal com a complement nutritiu, pel seu contingut en àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga omega-3. Aquests àcids grassos són altament beneficiosos per a la salut degut al seu efecte vasodilatador, ajudant a prevenir malalties cardiovasculars.

Els àcids grassos poliinsaturats no poden ser sintetitzats pel nostre organisme, i han de ser ingerits com a aliments. Aquests es poden trobar com a components minoritaris en aliments com els ous o la llet, o com a components majoritaris en el peix blau. El consum humà d'olis de peix a través de la dieta com a tal és molt reduït. Per aquest motiu, els àcids grassos poliinsaturats de major interès nutritiu –l'àcid eicosapentaenoic (EPA) i l'àcid docosahexaenoic (DHA)- s'addicionen en aliments que es consumeixen amb més freqüència o bé són introduïts a la dieta com a suplement nutritiu. També n'és habitual la seva addició al pinso de consum animal.

Per la pròpia naturalesa del peix i la seva baixa capacitat de metabolització, els seus olis poden presentar nivells elevats de contaminants apolars, com és el cas dels contaminants orgànics persistents (COPs).

Segons el Conveni d'Estocolm de 2001, els COPs són aquells compostos potencialment perillosos degut a les següents característiques:

- **Persistència:** Degut a la seva estructura, aquests compostos tenen una elevada estabilitat química, tèrmica i biològica. Per aquests motius la seva degradació és molt lenta.
- **Capacitat de transport a llargues distàncies:** Gràcies a la seva persistència els COP poden ser transportats a llargues distàncies del seu focus d'emissió. Degut a això, aquests compostos són ubics.
- **Toxicitat:** Els COPs mostren efectes tòxics en éssers vius, ja sigui per intoxicació aguda o crònica. Aquest efecte és molt variat en funció del contaminant, però poden actuar com a agents carcinògens o disruptors del sistema endocrí.
- **Bioacumulació i biomagnificació:** L'estabilitat d'aquests compostos fa que siguin difícilment metabolitzables pels éssers vius. A més, degut al seu caràcter lipòfil, els COP es bioacumulen en els teixits grassos. Aquest fet genera la seva biomagnificació a través de la cadena tròfica fins a organismes superiors.

Degut a aquests motius, en la present tesi doctoral s'ha estudiat l'eliminació de COPs en oli de peix. Aquest procés s'ha dut a terme mitjançant adsorbents sòlids amb base silícica i carbonàcia, i emprant tècniques de degradació fotoquímiques.

Els contaminants emmarcats dins l'esmentat estudi han estat les dibenzo-*p*-dioxines policlorades (PCDDs), dibenzofurans policlorats (PCDFs), bifenils policlorats (PCBs), difenil èters polibromats (PBDEs), dicloro difenil tricloroetà (DDT), hexaclorobenzè (HCB) i hexabromociclododecà (HBCD).

Aquests compostos representen dificultats analítiques, ja que acostumen a presentar nivells molt baixos ( $10^{-9}$  g/g -  $10^{-12}$  g/g), i a més la majoria d'ells són famílies d'elevat nombre de

congèneres (210 PCDD/Fs, 209 PCBs i 209 PBDEs). Per aquests motius també s'han desenvolupat metodologies per l'anàlisi simultània d'aquests COPs en oli de peix.

Per tal d'estudiar l'eliminació de COPs en oli de peix, la present tesi doctoral s'estructura en els següents capítols:

- En el primer capítol s'exposen de forma general aspectes relacionats amb l'oli de peix, els COP i les tècniques per a l'eliminació d'aquests que existien prèviament. Aquest finalitza amb la definició dels objectius del present treball.
- El segon capítol és dedicat al desenvolupament analític que s'ha dut a terme per a l'anàlisi de COP en oli de peix. També s'han analitzat diversos olis de peix, per tal de verificar el correcte funcionament dels mètodes desenvolupats anteriorment. Inclou un estudi de COP en suplementos nutritius enriquits amb oli de peix, així com la caracterització dels nivells de contaminants en olis de peix emprats en la indústria d'alimentació animal.
- Durant el tercer capítol s'ha estudiat l'eliminació de COP en oli de peix mitjançant adsorbents sòlids (amb base silícica i carbonàcia), avaluant l'efecte d'aquest procés sobre les propietats nutritives de l'oli.
- De forma anàloga, en el quart capítol s'ha estudiat aquesta eliminació mitjançant tècniques fotoquímiques. També s'ha avaluat l'efecte del procés en la qualitat de l'oli.
- En el cinquè capítol s'han combinat ambdues tècniques anteriorment estudiades (adsorció en sòlids i degradació fotoquímica). Posteriorment s'han resumit els resultats obtinguts amb cada un dels mètodes desenvolupats, per tal de definir les millors condicions per l'eliminació de COPs en oli de peix
- En el sisè capítol s'ha realitzat un estudi dels isòmers i enantiòmers d'HBCD en oli de peix, que també avalua l'eliminació d'aquest contaminant amb els mètodes d'eliminació desenvolupats.
- Per acabar, en el setè capítol s'exposen les conclusions finals a les que s'ha arribat en la present tesi doctoral.

Durant aquest primer capítol es realitza una introducció als olis de peix, tractant-ne els corresponents processos d'obtenció, composició i propietats nutritives (**apartat 1.2.**). Posteriorment es descriuen els COP objecte d'estudi, amb les respectives estructures i propietats físico-químiques, fonts, toxicitat i nivells en diversos tipus de matriu, amb especial atenció en olis de peix (**apartat 1.3.**). Finalment, els objectius de la tesi doctoral s'exposen en l'**apartat 1.4.** del present capítol.

## **1.2. Els olis de peix**

---

El terme oli és un concepte genèric per definir diferents líquids grassos a temperatura ambient, que no es dissolen en aigua i que tenen menys densitat que aquesta. Tot i que originàriament el terme s'emprava per a designar l'oli d'oliva, en l'actualitat es fa servir per designar diferents olis vegetals, animals o minerals (Madrid-Vicente, 1999).

Habitualment, els olis destinats al consum humà són d'origen animal o vegetal. Els olis animals solen ser extrets de mamífers marins com la balena o la foca, o peixos com el bacallà, la sardina o l'anxova. Els olis vegetals són principalment produïts a partir d'oliva, gira-sol o d'altres llavors (Baquero i Bernardini, 1986).

La major part de la pesca es dedica directament al consum humà i animal. Tot i així, l'obtenció de productes secundaris derivats del peix -de gran importància nutritiva i econòmica- augmenta cada dia. Anualment es pesquen entorn a 80 milions de tones arreu del món, de les quals més d'un terç s'utilitza per l'obtenció de productes secundaris (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Els subproductes derivats del peix més consumits són la farina i l'oli. Aquests s'obtenen del processat i premsat de determinades espècies de peix, així com de restes de la indústria conservera. La part que se n'aprofita per a l'alimentació és només del 60% del seu pes, ja que se'n rebutgen els caps, esquelets, vísceres, escatmes i aletes. Les espècies de peix que es fan servir amb aquesta finalitat són principalment aquelles que no tenen acceptació en el mercat per al consum humà, ja sigui degut a problemes d'elaboració, mida, sabor o textura (FEDNA, 2010).

L'oli de peix es distribueix a un ampli sector industrial gràcies a l'àmplia diversitat de les seves propietats, emprant-se en la fabricació de pinsos per a peixos i bestiar en general (Howe *et al.*, 2002), on aquest oli s'ha convertit en una matèria primera fonamental. Una petita part dels seus àcids grassos són utilitzats en farmàcia, cosmètica i medicina, pel seu alt valor nutritiu i aportant elements beneficiosos als aliments (Alain *et al.*, 2006).

Degut a aquestes propietats nutritives –entre elles el seu alt valor energètic- els olis de peix s'han convertit en elements importants en la dieta humana i animal. A més tenen un alt contingut en vitamines liposolubles A, D i E, i són rics en àcids grassos omega-3.

Tot i així, els olis de peix poden oxidar-se fàcilment durant el seu refinament i emmagatzematge, degut al seu alt percentatge en àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga. Aquests àcids grassos són els responsables d'una gran part del seu valor nutritiu però també de la seva inestabilitat.

El procés d'oxidació s'accelera per calor, llum o presència de catalitzadors, però aquests fenòmens poden ser contrarestats amb l'ús d'antioxidants o emmagatzemant-los a l'abric de la llum. Degut a aquesta oxidació es poden formar un elevat nombre de substàncies volàtils i no volàtils que donen sabors anòmals al producte final (Martín-Lagos, 2007).

### 1.2.1. Processos d'obtenció i refinament dels olis de peix

Tant la farina com l'oli de peix es produeixen a partir d'espècies de peix amb baixa o nul·la demanda pel consum humà, així com d'alguns dels seus òrgans amb major contingut lipídic com és el cas del fetge de bacallà (Madrid-Vicente, 1999). Aquests són sotmesos a un procés de cocció on es coagulen les proteïnes i amb el qual s'eliminen l'aigua i l'oli retinguts. Després són premats, obtenint-se dues fases; una fase sòlida que conté un 70% de matèria seca i formada fonamentalment per proteïnes no dissoltes -farina de peix-, i una fase líquida groguenca que conté olis, vitamines i proteïnes dissoltes i en suspensió. Les partícules sòlides en suspensió són eliminades per centrifugació en un decantador, obtenint-se així l'oli de peix.

Després d'aquest procés s'obté l'oli en cru, que habitualment necessita un refinat previ per ser apte per al consum humà o animal (Aldai *et al.*, 2006). Aquest refinat també té com a objectiu l'eliminació de diversos compostos que poden generar problemes organolèptics o d'inestabilitat. Aquestes impureses poden ser fosfolípids, gomes, reïnes, àcids grassos lliures o pigments. El procés de refinat de l'oli cru consta de les següents etapes (ARPO, 2010; Winterisation, 2010):

- **Desgomat:** És la tècnica emprada per a l'eliminació de compostos presents en l'oli que condueixen a sabors desagradables d'aquest. Es tracta l'oli cru amb aigua i es centrifuga. Això permet eliminar els fosfolípids (lecitines) i altres productes en l'oli que formen gels densos. Posteriorment s'eliminen les proteïnes i els carbohidrats per addició d'àcid fosfòric, seguit de una separació del precipitat per centrifugació.
- **Neutralització:** Permet l'eliminació dels àcids grassos lliures i altres substàncies volàtils per destil·lació al buit per arrossegament de vapor. Posteriorment l'aigua s'elimina per calefacció al buit.
- **Decoloració o blanquejat:** Elimina la coloració excessiva de l'oli deguda a la presència de pigments (carotens, clorofil·les, xantofil·les...) o bé derivats de l'oxidació del tocoferol. Aquest procés es realitza mitjançant l'addició d'adsorbents com les terres de diatomees, carbons actius o argiles activades. La posterior separació d'aquests adsorbents es realitza per filtració rotatòria o de premsa. Durant aquesta fase s'eliminen contaminants, com és el cas dels hidrocarburs poliaromàtics (Hilbert *et al.*, 1998).
- **Desodorització:** Etapa on s'eliminen compostos responsables d'olors desagradables mitjançant destil·lació al buit. Aquests compostos són aldehids, cetones, esterols i compostos sulfurosos.

A part dels mètodes de refinament habituals, existeixen processos específics per tal de purificar olis de peix. Amb aquesta finalitat, una de les tècniques més utilitzades en la indústria alimentària per a la reducció dels nivells de contaminants és la destil·lació molecular, la qual consta de les següents etapes:

- **Esterificació de l'oli a esters etílics d'àcids grassos,** per tal de rebaixar el seu punt d'ebullició en evitar la formació de ponts d'hidrogen.
- **Separació dels esters etílics d'àcids grassos de la resta de contaminants a pressió reduïda,** de manera que no és necessari dur a terme el procés a elevades temperatures, fet que podria comportar a la degradació dels olis.

- Aïllament dels compostos d'interès a partir dels seus pesos moleculars, deixant els compostos indesitjats sense destil·lar.
- Recuperar els àcids grassos destil·lats en un producte final amb un nivell de contaminants extremadament baix.

Aquesta tècnica presenta com a principals avantatges la baixa oxidació dels àcids grassos al dur a terme la destil·lació a baixa temperatura, una elevada reducció dels contaminants presents inicialment en l'oli i una possible concentració dels àcids grassos desitjats a partir dels seus pesos moleculars. Per contrapartida, es tracta d'un procés força car d'implementar, a part que es perd la forma original de l'oli com a triglicèrid al passar a tenir el producte com a àcid gras (Bioriginal, 2010).

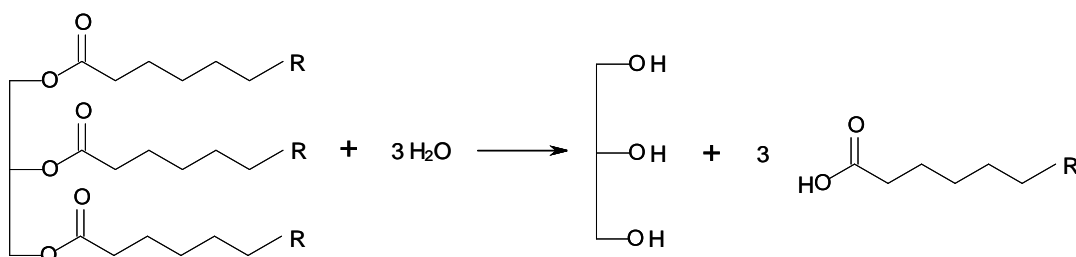
### 1.2.2. Composició dels olis de peix

L'oli de peix està constituït per una fracció saponificable -que es pot fer reaccionar en medi bàsic per donar un alcohol i la seva sal d'àcid gras- i una d'insaponificable -que no reacciona en medi bàsic-. La seva composició química és molt complexa, i pot variar en funció de l'espècie, composició del plàncton amb què es va alimentar i època de l'any.

La fracció saponificable està formada principalment per triglicèrids, i en menor proporció per diglicèrids, monoglicèrids, ceres, i ésters d'esterols. Aquesta fracció constitueix aproximadament el 97% de l'oli de peix.

La fracció insaponificable esta formada per esterols, alcohols terpènics, alcohols alifàtics, tocoferols, hidrocarburs, compostos flavonoics, pigments i compostos volàtils responsables dels olors. Aquesta fracció representa un percentatge inferior al 3% (Martín-Lagos, 2007).

Els triglicèrids -que constitueixen la major part de la fracció saponificable dels olis- són glicerolípids, fosfolípids, esfingolípids i glucolípids i tots ells formen la bicapa lipídica de les membranes cel·lulars (Voet i Voet, 1992). En els olis de peix, la majoria d'àcids grassos es troba en forma de triacilglicèrids, que són els trièsters dels àcids grassos i la glicerina (*Figura 1.1*).



**Figura 1.1.** Formació d'àcids grassos a partir de triglicèrids.

Els àcids grassos estan formats per una cadena hidrocarbonada alifàtica de longitud variable, amb un grup àcid carboxílic en un extrem. Cada àtom de carboni s'uneix al següent mitjançant un enllaç covalent simple o doble. Una petita proporció dels àcids grassos està en forma lliure.

Depenent de la concentració d'aquests, l'oli tindrà una acidesa determinada. La proporció de cadascun dels diferents àcids grassos lliures en l'oli pot variar en funció del tipus de peix i l'origen d'aquest. Els àcids grassos comuns en els éssers vius tenen un nombre parell d'àtoms de carboni, encara que alguns organismes també en sintetitzen alguns d'ells amb nombre senar de forma minoritària. Aquests es poden classificar entre saturats i insaturats.

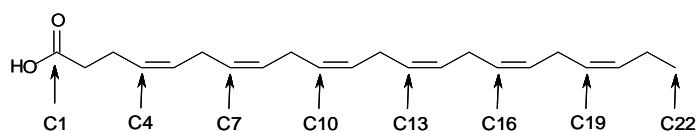
Els àcids grassos saturats estan formats per cadenes lineals d'àtoms de carboni sense cap tipus de doble enllaç. Contràriament, els àcids grassos insaturats contenen com a mínim un doble enllaç, i són els que predominen en els olis de peix. Els dobles enllaços es solen trobar separats per un grup metilè amb configuració *cis* (Mathews *et al.*, 2002). La majoria d'àcids grassos presents en plantes superiors i animals són de les famílies de 16 i 18 àtoms de carboni, i més de la meitat d'ells són insaturats. Els àcids grassos amb menys de 14 àtoms de carboni i més de 20 són menys freqüents (Supelco Notes, 1996). En la *Taula 1.1* es poden observar els principals àcids grassos, juntament amb les seves abreviatures i fórmules (Christie, 1989).

**Taula 1.1.** Nomenclatura, abreviatura i fórmula dels principals àcids grassos.

Nom trivial	Abreviatura	Fórmula
Àcid caprílic	C8:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH
Àcid càpric	C10:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH
Àcid làuric	C12:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH
Àcid mirístic	C14:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH
Àcid palmític	C16:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH
Àcid palmitoleic	C16:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH
Àcid margàric	C17:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> COOH
Àcid esteàric	C18:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH
Àcid oleic	C18:1 ω9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH
Àcid linoleic	C18:2 ω6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH
Àcid alfa linoleic	C18:3 ω3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH
Àcid gamma linoleic	C18:3 ω6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
Àcid araquídric	C20:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH
Àcid eicosenoic	C20:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH
Àcid araquidònic	C20:4 ω6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH
Àcid eicosapentaenoic (EPA)	C20:5 ω3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH
Àcid behènic	C22:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH
Àcid docosahexaenoic (DHA)	C22:6 ω3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Àcid lignocèric	C24:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH
Àcid nervònic	C24:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH

Els àtoms de carboni dels àcids grassos es numeren començant pel carboni carboxílic (-COOH), que és el número 1 ó alfa (α). Independentment del nombre de carbonis, l'extrem metílic rep el nom de carboni omega (ω). La nomenclatura habitual per denominar els àcids grassos consisteix en indicar el nombre de carbonis de la cadena alifàtica seguit per dos punts i el nombre de dobles enllaços. La localització d'aquests s'indica entre parèntesis, per on comença el doble enllaç contant a partir de l'extrem carboxílic (Mathews *et al.*, 2002). La *Figura 1.2* mostra l'exemple del DHA.





**Figura 1.2.** Àcid *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic.

Una altra nomenclatura força utilitzada darrerament pels àcids grassos és la que indica la posició dels dobles enllaços respecte a l'últim carboni ( $\omega$ ). S'anomenen amb la lletra  $\omega$  seguit de la posició del primer doble enllaç. Així doncs, un àcid gras  $\omega$ -3 serà aquell que tingui el primer doble enllaç entre els carbonis 3 i 4, començant a comptar per l'extrem metílic. Cal esmentar que aquesta nomenclatura pot ser emprada per aquells àcids grassos que tenen un o diversos dobles enllaços separats per un grup metilè. Aquesta nomenclatura és deguda a que la posició del doble enllaç pròxima a l'extrem metil defineix l'activitat biològica de la molècula.

Una de les famílies més importants dels àcids grassos són els  $\omega$ -3. Els més comuns són l' $\alpha$ -linolènic (C18:3), l'àcid eicosapentaenoic o EPA (C20:5) i l'àcid docosahexaenoic o DHA (C22:6). La Taula 1.2 mostra els noms, abreviatures i estructures dels principals àcids grassos  $\omega$ -3.

**Taula 1.2.** Principals àcids grassos  $\omega$ -3.

Nom	Abreviatura	Estructura
Àcid <i>alfa</i> linolènic Àcid 9,12,15- octadecatrenoic	C18:3 $\omega$ 3	
Àcid estearidònic Àcid 6,9,12,15- octadecatetraenoic	C18:4 $\omega$ 3	
Àcid <i>cis</i> -11,14,17- eicosatrienoic	C20:3 $\omega$ 3	
<i>ETA</i> Àcid <i>cis</i> -8,11,14,17- eicosapentaenoic	C20:4 $\omega$ 3	
<i>EPA</i> Àcid <i>cis</i> -5,8,11,14,17- eicosapentaenòic	C20:5 $\omega$ 3	
<i>DPA</i> Àcid <i>cis</i> -7,10,13,16,19- docosapentaenoic	C22:5 $\omega$ 3	
<i>DHA</i> Àcid <i>cis</i> - 4,7,10,13,16,19- docosahexaenoic	C22:6 $\omega$ 3	
Àcid <i>cis</i> - 6,9,12,15,18,21- tetracosahexaenoic	C24:6 $\omega$ 3	

Els triglicèrids es caracteritzen pel tipus d'àcids grassos que els formen i per la seva distribució en l'estructura de la glicerina. Es denominen triglicèrids simples als que només tenen un tipus d'àcid gras i triglicèrids mixtos als que en tenen dos o tres de diferents. Els olis i greixos són barreges complexes de triglicèrids simples i mixtes, la composició dels quals varia en funció de l'espècie de la qual provenen.

Les propietats físiques dels àcids grassos varien en funció de la llargada de la seva cadena hidrocarbonada i del seu grau d'insaturació. En general són molècules flexibles que poden adoptar un gran nombre de conformacions degut a la lliure rotació dels enllaços C-C simples. Els dobles enllaços acostumen a tenir configuració *cis*, el que introdueix un punt de curvatura i aporta rigidesa a l'estructura. Per aquest motiu les estructures són menys compactes i els seus punts de fusió són menors. Així doncs, la majoria de grasses riques en àcids grassos insaturats són líquides a temperatura ambient (Mathews *et al.*, 2002).

Tot i que pot variar en funció de l'espècie de la qual s'extreu, l'oli de peix té un alt contingut en àcids grassos de cadena llarga amb elevat nombre d'insaturacions, especialment pel cas dels àcids grassos  $\omega$ -3 EPA i DHA (Segura, 2010).

### **1.2.3. Beneficis dels àcids grassos omega-3 per la salut**

Els àcids grassos poliinsaturats  $\omega$ -3 també es coneixen com a àcids grassos essencials ja que –al contrari que els àcids grassos saturats i monoinsaturats– no poden ser sintetitzats per l'ésser humà, havent de ser introduïts en la dieta com a aliment (Foodtech, 2010).

Els mamífers no els poden fabricar ja que no posseeixen els enzims necessaris per introduir dobles enllaços entre els àtoms més enllà del carboni 9 (Ronaye de Ferrer, 2000). L'àcid gras alfa linolènic (Taula 1.2) es considera com el precursor de tots els  $\omega$ -3. La conversió d'aquest precursor en altres àcids grassos poliinsaturats és ineficient, i per això es recomana el consum diari d'aquests últims.

Els àcids grassos  $\omega$ -3 són sintetitzats principalment pel fitoplàncton i les algues, i s'introdueix a les espècies aquàtiques via ingesta. Per aquest motiu les espècies marines són riques en aquests àcids. Així doncs, la millor font d'àcids grassos  $\omega$ -3 són el peix blau i el fetge de peixos com el bacallà o salmó. Generalment, els peixos provinents d'aigües fredes contenen un elevat contingut d'aquests àcids grassos, ja que gràcies a l'elevat grau d'insaturacions que presenten poden romandre líquids inclòs a baixes temperatures al rebaixar el punt de fusió de l'oli.

Darrerament s'han realitzat nombrosos estudis sobre els efectes beneficiosos d'aquests àcids grassos  $\omega$ -3 a l'organisme humà. Tradicionalment s'han emprat en el tractament de malalties cardíaques, ja que al ser vasodilatadors redueixen els nivells de triacilglicerols, la possibilitat d'arítmies cardíaques i rebaixa la tensió arterial.

Tot i així, durant els últims anys se n'han descrit altres propietats beneficioses, en estar implicats en la maduració i el correcte creixement del cervell i la retina dels nens (Panchaud *et al.*, 2005). També disminueixen els processos d'inflamació com l'artritis reumàtica (Ortega *et*

al., 2008), eviten problemes de coagulació de la sang (Mata, 2004), i processos de malalties mentals (Arvindakshan, 2003) com l'esquizofrènia, trastorns de personalitat i desordres bipolars i de metabolisme (Domingo, 2008).

#### **1.2.4. Oxidació dels olis de peix**

Els olis de peix poden ser degradats per dos tipus d'oxidació, la que és deguda a fenòmens tèrmics com al ser fregits –on els olis s'escalfen repetidament en presència d'oxigen-, i la deguda a l'auto-oxidació amb oxigen de l'ambient. Altres factors que poden accelerar la degradació oxidativa d'aquests olis són l'exposició a radiació solar, la seva pròpia composició en àcids grassos i les condicions d'emmagatzematge de l'oli (temperatura, humitat, llum...). Això comporta l'aparició d'olors, sabors i colors anòmals, juntament amb la formació de compostos potencialment tòxics (Gray, 1978).

Diversos estudis han fet palès que la susceptibilitat dels àcids grassos a l'oxidació és proporcional al nombre d'insaturacions d'aquests (Cosgrave, 1987). En conseqüència, els àcids grassos més insaturats (com és el cas dels  $\omega$ -3) es degraden més ràpidament que els que presenten menor grau d'oxidació. D'altra banda, els àcids grassos lliures són més susceptibles a oxidar-se que quan es troben en forma de triglicèrids.

Aquesta oxidació dels olis de peix és una reacció en cadena, iniciada per l'oxigen, la qual condueix a la formació d'hidroperòxids lipídics, que es descomposen en productes secundaris com aldehids, cetones, alcohols o éters (Ortoll, 2009). Aquest procés es pot frenar mantenint els olis en atmosfera inert de nitrogen en absència d'oxigen, guardant-los en un lloc a l'abric de la llum o bé mitjançant l'addició de substàncies antioxidants. Aquests és el cas del 2,6-di-*tert*-butil-*para*-cresol (BHT) i el 2 i 3-*tert*-butil-*para*-hidroxianisol (BHA), o bé d'espècies naturals com els tocoferols (vitamina D).

### **1.3. Els Contaminants Orgànics Persistentes**

Els Contaminants Orgànics Persistentes (COPs) es troben definits com a tals en el Conveni d'Estocolm de 2001. Aquest document és un tractat global que té com a finalitat protegir els éssers vius i el medi ambient de compostos químics orgànics que degut a les seves propietats químic-físiques, una vegada són alliberats al medi ambient es caracteritzen per:

- Poder romandre inalterats durant llargs períodes de temps: habitualment es tracten d'estructures aromàtiques molt estables que ofereixen molta resistència a la degradació (anys).
- Ser ubics al poder desplaçar-se lluny del seu focus d'emissió: Com a resultat del seu alliberament al medi ambient durant les últimes dècades (especialment degut a activitats humanes), els COPs són a dia d'avui compostos distribuïts de forma global en molt diverses regions –incloent zones on mai s'hi havien emprat- o fins i tot arreu del món en alguns casos.
- Acumular-se en els éssers vius: Els COPs en concentren en els organismes a través d'un procés anomenat bioacumulació. Al no ser solubles en aigua, aquests compostos queden retinguts en els teixits adiposos, on les concentracions es poden arribar a magnificar fins a 70.000 cops respecte als nivells de fons (UNEP, 2005). Peixos, ocells depredadors, mamífers i humans són els organismes que es troben en nivells més elevats de la cadena alimentària, i per això en bioacumulen majors concentracions.
- Tenir efectes adversos en la salut humana o en el medi ambient. L'exposició als COPs pot generar diversos tipus de càncer o provocar seriosos problemes toxicològics al ser disruptors del sistema endocrí com disfuncions en els sistemes immunològics i reproductors, defectes de naixement, major susceptibilitat per a patir malalties o disminució de la intel·ligència (Zakrzewski, 1997).

Els COPs tenen un efecte global degut a la seva capacitat per transportar-se llargues distàncies, i no hi ha cap govern que actuant per si mateix pugui protegir els seus ciutadans o el seu medi ambient d'aquests contaminants. Per aquest motiu, el Conveni d'Estocolm –que va ser signat el 22 de maig del 2001 però va entrar en vigència el 17 de Maig del 2004- aconsella treballar de manera conjunta per tal d'establir mesures per a l'eliminació o reducció de l'alliberament d'aquests contaminants al medi ambient. El Conveni és administrat pel Programa Mediambiental de les Nacions Unides, amb seu a Ginebra, Suïssa (UNEP, 2005).

En el document inicial es varen descriure dotze substàncies com a COPs, que es podien classificar en tres categories diferents:

- Plaguicides: aldrin, endrin, dieldrin, DDT, clordà, heptaclor, HCB, mirex i toxafè.
- Productes químics industrials: HCB i PCBs.
- Subproductes no intencionats: HCB, PCDD/Fs.

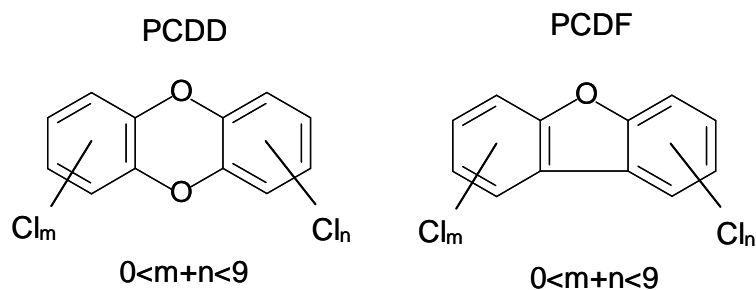
Tot i això, el 8 de Maig de 2009 es va afegir un annex al conveni que incloïa nous contaminants: hexaclorociclohexà, clordecona, pentaclorobenzè, PBDEs, hexabromobifenil, àcid perfluorooctilsulfònic i les sals d'aquest.

A continuació es descriuen amb més detall els COPs més rellevants.

### 1.3.1. PCDD/Fs

#### Aspectes generals

Les dibenzo-*p*-dioxines policlorades i dibenzofurans policlorats (PCDD/Fs) són dues famílies d'éters aromàtics clorats, amb estructures i propietats similars (Figura 1.3). Es tracten de molècules amb dos anells benzènics units en *-para* per dos àtoms d'oxigen (PCDDs) o un àtom d'oxigen i un enllaç carboni carboni (PCDFs).



**Figura 1.3.** Estructura general de PCDD/Fs

Cada anell benzènic pot contenir fins a quatre àtoms de clor (vuit per molècula), i en diferents posicions. A cadascun d'aquests isòmers constitucionals se'l denomina congènere. Es defineixen com a homòlegs als grups de congèneres amb un mateix grau de cloració. En la Taula 1.3 es mostren el nombre de congèneres per a cada grup d'homòlegs de PCDD/Fs.

**Taula 1.3.** Nombre de congèneres de PCDD/Fs per cada grup d'homòlegs.

Homòleg	PCDD	PCDF
Monoclorats	2	4
Diclorats	10	16
Triclorats	14	28
Tetraclorats	22	38
Pentaclorats	14	28
Hexaclorats	10	16
Heptaclorats	2	4
Octaclorats	1	1
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>135</b>

Així doncs existeixen un total de 75 PCDDs i 135 PCDFs, sumant un total de 210 congèneres de PCDD/Fs. Existeixen més furans que dioxines ja que aquestes últimes tenen un pla de simetria més, reduint-ne així el possible nombre d'estructures diferents que pot generar.

Per a tal d'anomenar cadascuna d'aquestes estructures existeixen diverses nomenclatures. La més habitual pel cas de les dioxines és la que indica el nom de l'homòleg precedida per les posicions de l'estructura en que s'hi troben àtoms de clor –per exemple, 2,3,7,8-TCDD-. També existeix una altra nomenclatura en la que s'adjudica un número per a cada estructura de forma sistemàtica –per exemple, TCDD-48- (Ballschmiter *et al.*, 1992).

Les dioxines i furans policlorats són subproductes de processos industrials que es duen a terme en altes temperatures, que mai s'han fabricat de forma intencionada. Inicialment es va identificar la formació de TCDD en la producció de triclorofenols –per una simple recombinació de dues molècules de 2,4,5-Triclorofenol- i certs herbicides, com és el cas de l'agent taronja. Les PCDD/Fs de major grau de cloració poden ser formades en la producció de pentaclorofenol, un compost que s'emprava com a plaguicida o en el tractament de la fusta.

Durant molts anys la seva formació només es va associar a la producció industrial d'aquests productes químics. No va ser fins el 1977 que es va descobrir la presència de PCDD/Fs en cendres d'incineradora, formant-se en processos tèrmics a partir de compostos orgànics clorats, en presència de diversos metalls que actuaven com a catalitzadors (Schechter, 1994).

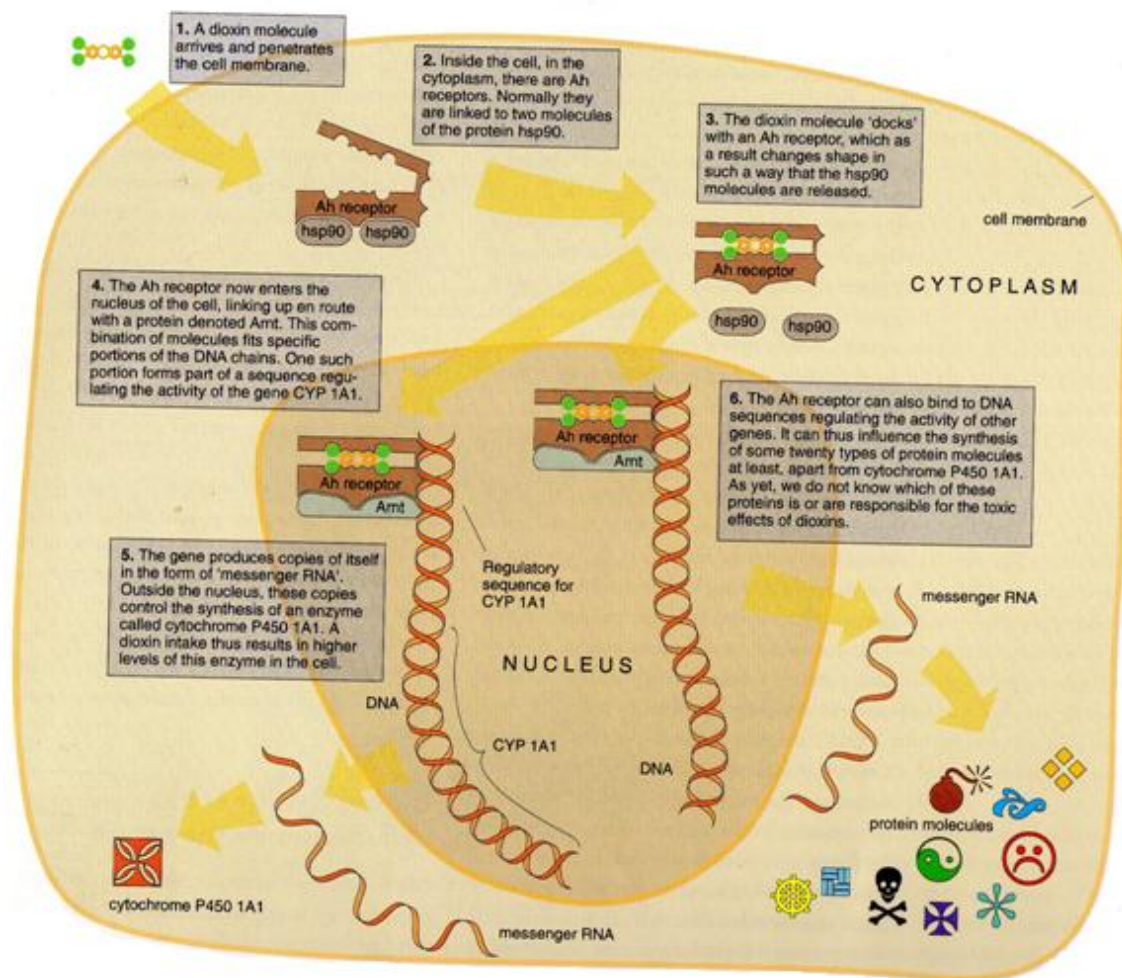
Altres fonts de generació de PCDD/Fs per combustió de matèries primes clorades són la incineració de residus hospitalaris o fangs de depuradora. També hi ha evidències de formació d'aquests COP en plantes de blanquejat de la polpa de paper, en la producció de certs metalls o en la pròpia indústria del clor –en les plantes clor-àlcali o en la fabricació de PVC- (Bernes, 1998).

## **Toxicitat**

Un dels principals motius pel qual s'estudien les PCDD/Fs és degut a la seva toxicitat. Inicialment, els seus efectes nocius per la salut van ser descoberts com a conseqüència de diferents accidents que es van donar el segle passat. Els més destacats van ser l'accident de la planta de Monsanto (Virginia, EEUU) el 1949, la planta de Seveso (Itàlia) el 1976 o l'exposició durant la guerra del Vietnam de soldats americans i vietnamites a l'agent taronja -que tenia TCDD com a subproducte- durant el final de la dècada dels 70 (Pavuk *et al.*, 2007).

La toxicitat de les dioxines i furans es deu a la seva interacció a nivell cel·lular amb el receptor citosòlic Ah. Aquest receptor és una proteïna intracel·lular que un cop unida als PCDD/F perd dues unitats proteiques hsp90. Aquesta penetra la membrana cel·lular, i en el nucli s'acobra a una altra proteïna, denominada Arnt.

Aquest complex dioxina-receptor-Arnt pot interaccionar amb una determinada seqüència d'ADN, i genera un increment de la síntesi del citocrom P450 1A1 amb les corresponents activitats monooxigenases dependents (7-etoxiresorufin O-dietilasa –o EROD- i hidroxilasa d'hidrocarburs aromàtics o AHH). La mesura de l'increment d'aquestes activitats s'utilitza sovint com a biomarcadors d'exposició dels organismes a dioxines i compostos d'activitat toxicològica similar (Díaz, 1999). Aquest procés toxicològic es troba representat en la *Figura 1.4*.



**Figura 1.4.** Esquema del mecanisme toxicològic de les PCDD/Fs segons Bernes (1998).

Les dioxines i furans policlorats tenen diversos efectes tòxics en animals i humans, com alteracions cutànies (cloracné), reducció de pes i notable disminució de massa muscular i teixit adipós, lesions hepàtiques degut al seu caràcter disruptor del sistema endocrí, atrofia del timus (òrgan fonamental en el desenvolupament del sistema immunitari), immunotoxicitat (incrementant-se així la susceptibilitat a malalties infeccioses), toxicitat reproductora (disfuncions en el sistema reproductor masculí i femení), teratogeneïtat, efectes negatius en el desenvolupament físic dels individus i carcinogeneïtat (Shecter, 1994).

Aquest últim efecte ha estat un dels més estudiats. Encara que les conseqüències cancerígenes de la 2,3,7,8-TCDD en animals és més clara, pel cas dels humans va ser molt discutida fins que el 1997 l'Agència Internacional per la Investigació sobre el Càncer (IARC) -que pertany a la Organització Mundial de la Salut (WHO)- va declarar aquesta molècula com a pertanyent al grup 1, i que per tant és cancerígena per humans (IARC, 2011).

És conegut que com major es l'afinitat de cada congènere de PCDD/Fs al receptor Ah, major és la seva toxicitat. La mateixa Organització Mundial de la Salut va definir l'any 1997 factors de toxicitat per aquells congèneres amb substitució 2,3,7,8 (que són els que tenen major afinitat per l'esmentat receptor), prenent com a referència la toxicitat de la 2,3,7,8-TeCDD a la qual es

va donar el factor de 1. Els factors de toxicitat per a la resta de congèneres es van normalitzar respecte aquest valor. Aquests valors van ser revisats i actualitzats el 2005, tot i que habitualment es continua treballant amb els factors de toxicitat del 1997, ja que són amb els que es basa la legislació actual (Díaz, 2007). Els valors per ambdós casos es troben en la *Taula 1.4*.

**Taula 1.4.** Factors de toxicitat de les PCDD/Fs (WHO-TEF) determinats per la WHO.

PCDD	1997 WHO-TEF	2005 WHO-TEF
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,7,8,9-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003

Aquests factors de toxicitat permeten establir una nova unitat de mesura de concentració total de PCDD/Fs per a qualsevol tipus de mostra, ponderant la concentració de cada congènere en funció de la seva toxicitat. Aquestes unitats, anomenades WHO-TEQ, són calculades a partir del sumatori de la concentració de cada congènere amb substitució 2,3,7,8 multiplicada pel respectiu factor de toxicitat.

#### Precedents de PCDD/Fs en oli de peix

Al tractar-se de COPs, les dioxines són compostos ubics que es poden trobar en qualsevol tipus de mostra, des d'aire fins a sang, passant per productes alimentaris o sòls, per mencionar alguns exemples (Bernes, 1998).

La principal matriu d'estudi d'aquest estudi és l'oli de peix, que pel seu caràcter lipòfil pot presentar elevats nivells de contaminants apolars, com els PCDD/Fs. Existeixen diversos estudis previs que avaluen la presència de dioxines en aquest tipus de matriu. La *Taula 1.5*. en resumeix els resultats.



**Taula 1.5.** Concentració de PCDD/Fs en olis de peix en estudis previs.

Referència	Origen	Composició	PCDD/Fs (pg WHO-TEQ/g)
Jiménez <i>et al.</i> 1996	Espanya	Oli de peix	0.06-2.08
		Oli de fetge de bacallà	8.16
FSAI 2002	Irlanda	Oli de fetge de bacallà	0.2-11.0
Zennegg i Schmid 2006	Suïssa	Oli de peix	0.32-0.83
Fernandes <i>et al.</i> 2006	Regne Unit	Oli de fetge de bacallà	0.2-8.4
Hasegawa <i>et al.</i> 2007	Japó	Oli de peix	0.27-6.0
Tsutsumi <i>et al.</i> 2007	Japó	Oli de fetge de tauró	37
		Oli de peix	<0.1-4.80
Rawn <i>et al.</i> 2008	Canadà	Oli de peix	<LD-5.20

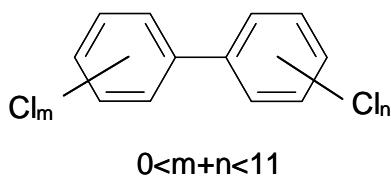
Com es pot observar en la taula, els nivells de PCDD/Fs poden variar en funció del tipus d'oli o la procedència, però generalment per aquest tipus de matrius presenta nivells de l'ordre dels picograms WHO-TEQ/g.

Pel que fa a l'abundància relativa de cada PCDD/Fs en les mostres, en derivats del peix aquests perfils solen estar caracteritzats per una major contribució dels PCDF de menor grau de cloració i PCDD de major grau de cloració.

### 1.3.2. PCBs

#### Aspectes generals

Els bifenils policlorats (PCBs) són una altra família de contaminants històricament força estudiada, inclosa dins de la llista de la *dirty dozen* del Conveni d'Estocolm del 2001. La seva estructura molecular es basa en un esquelet bifenílic amb clors com a substituents en els anells benzènics. Aquesta es mostra en la *Figura 1.5*.



*Figura 1.5.* Estructura general dels PCBs.

Cada anell benzènic pot presentar fins a un total de 5 clors, fet que genera un total de 209 possibles estructures de PCBs. Aquestes queden ordenades segons els grups d'homòlegs que es mostren en la *Taula 1.6*.

**Taula 1.6.** Nombre de congèneres de PCDD/Fs per cada grup d'homòlegs.

Homòleg	PCB
Monoclorats	3
Diclorats	12
Triclorats	24
Tetraclorats	42
Pentaclorats	46
Hexaclorats	42
Heptaclorats	24
Octaclorats	12
Nonaclorats	3
Decaclorat	1
Total	209

A diferència dels PCDD/Fs, els PCBs no són molècules estrictament planes, ja que entre els dos anells benzènics existeix un enllaç simple que pot rotar, permetent a aquesta família de contaminants establir diferents configuracions espacials. La nomenclatura més estesa per a aquesta família de COPs és la que adjudica un número de PCB per a cada estructura de forma sistemàtica (Ballshmiter *et al.* 1992)

Aquesta família de contaminants es poden trobar arreu en el medi ambient degut a la seva producció industrial, que es va iniciar l'any 1929. La seva síntesi es basa en la cloració del bifeníl en presència de catalitzadors metàl·lics. Com a producte s'obté una mescla tècnica de diversos congèneres, amb un grau de cloració que varia en funció del temps de reacció, entre 12 i 36 hores (Kimbrough i Jensen, 1989).

Aquestes mescles tècniques han estat comercialitzades amb diversos noms, com Aroclor i Pyroclor (Monsanto, EEUU), Kanechlor (Kanegafuchi, Japó), Clophen (Bayer, Alemanya), Phenoclor i Pyralène (Prodelec, França) o Fenoclor i Pyralene (Cros-Rhône Poulenc, Espanya). Pel cas dels Aroclors, el nom va acompanyat de quatre dígitos que especifiquen el grau de cloració de les mescles tècniques comercialitzades, com per exemple Aroclor 1248 o 1254 (Díaz, 1999).

Des del 1929 fins el 1989, la producció mundial de PCBs –excloent l'antiga Unió Soviètica- va ser de 1.5 milions de tones (UNEP, 1998). Tot i així, a finals de la dècada dels 70 la seva producció va disminuir considerablement degut a que es va fer manifesta la seva persistència ambiental i toxicitat.

Gràcies a la seva estabilitat tèrmica i biològica, les aplicacions de les mescles tècniques de PCBs han estat molt variades. Les més destacades són com a plastificants, lubricants o com a additius en pintures, tintes o coments (tots ells sistemes oberts), o bé com a fluids dielèctrics en transformadors i condensadors o fluids hidràulics en bombes de buit (sistemes tancats). El seu ús es va limitar a sistemes tancats fins al 2010 (Directiva 96/59/EC)

Degut a l'elevat nombre de congèneres que conté cada mescla tècnica de PCBs, històricament en l'anàlisi de mostres ambientals s'ha pres com a referència el criteri establert per l'*International Council for the Exploration of the Seas* (ICES). Aquest considera com a representatius de la família els 7 congèneres habitualment més abundants en les mesclures tècniques (PCB-28, -52, -101, -118, -138, -153 i -180), també coneguts com a PCBs indicadors.

### Toxicitat

La toxicitat d'aquesta família de contaminants depèn de diversos factors, tals com la dosi o la via d'exposició. Certs congèneres poden actuar com a disruptor endocrí a través del receptor Ah, de forma semblant als PCDD/Fs. Indueix canvis en l'expressió genètica de les fases hepàtiques I (incrementant la producció del citocrom P450) i II (incrementant la producció de glucoril transferases). Aquestes alteracions endocrines tenen efectes toxicològics diversos, com un augment en la producció de tiroxina -provocant hipertiroïdisme-, toxicitat reproductiva -alterant la producció d'estrògens- i genotoxicitat -deteriorant el material genètic de les cèl·lules- (Burkhard i Lukasewycz, 2008).

Els PCBs coneguts com a *similars a dioxines* (també anomenats coplanars o dl-PCBs, de l'anglès *dioxin-like*) són aquells que per les seves substitucions en els anells poden establir una configuració més plana, al tenir com a màxim només un clor en posició *-orto*. Aquests congèneres són el PCB-77, -81-, -105, -114, -118, -123, -126, -156, -157, -167, -169 i -189. Els factors de toxicitat determinats per l'Organització Mundial de la Salut per a cada un d'aquests PCBs similars a dioxines són els que es mostren en la *Taula 1.7*.

**Taula 1.7.** Factors de toxicitat dels PCBs similars a dioxines (WHO-TEF).

PCB	1997 WHO-TEF	2005 WHO-TEF
PCB-77	0.0001	0.0001
PCB-81	0.0001	0.0003
PCB-105	0.0001	0.0003
PCB-114	0.0005	0.0003
PCB-118	0.0001	0.0003
PCB-123	0.0001	0.0003
PCB-126	0.1	0.1
PCB-156	0.0005	0.0003
PCB-157	0.0005	0.0003
PCB-167	0.00001	0.0003
PCB-169	0.01	0.03
PCB-189	0.0001	0.0003

Pel fet de tenir els mateixos efectes toxicològics que les PCDD/Fs, la concentració d'ambdós contaminants pot ser determinada en les mateixes unitats de WHO-TEQ. És per això que la toxicitat total de les mostres es sol caracteritzar pel sumatori de PCDD/Fs+PCBs similars a dioxines, en aquestes unitats toxicològiques. Aquest valor s'obté al sumar el producte de cada dioxina, furà i PCB pel respectiu factor de toxicitat.

De la mateixa forma que pel cas dels PCDD/Fs, pel càlcul de la toxicitat deguda a dl-PCBs es sol utilitzar els factors de toxicitat del 1997, ja que són els que es troben legislats (Díaz, 2007).

### Precedents de PCBs en oli de peix

De forma anàloga a les PCDD/Fs, els PCBs són contaminants ubics que es poden trobar en tot tipus de matrius. Si ens centrem en la matriu d'estudi de la present tesi doctoral, existeixen diverses publicacions que descriuen la concentració de PCBs en olis de peix amb finalitat alimentària. Els resultats es recullen en la *Taula 1.8*.

**Taula 1.8.** Concentració de PCBs en olis de peix en estudis previs.

Referència	Origen	Composició	dl-PCBs (pg TEQ/g)	PCBs indicadors (ng/g)
Jiménez <i>et al.</i> 1996	Espanya	Oli de peix	0.13-0.51	-
Jacobs <i>et al.</i> 1998	Diversos països	Oli de peix	-	<LD-1050
		Oli de fetge de bacallà	-	<LD-805
Jacobs <i>et al.</i> 2002	Escòcia	Oli de peix	-	ND-221
FSAI 2002	Irlanda	Oli de fetge de bacallà	0.2-29.8	-
Jacobs <i>et al.</i> 2004		Regne Unit	Oli de peix	-
	Oli de fetge de bacallà		-	<LD-49.0
	Oli de peix+vegetal		-	<LD-28.9
Storelli <i>et al.</i> 2004	Itàlia	Oli de fetge de bacallà	-	25-201
Zennegg i Schmid 2006	Suïssa	Oli de peix	0.04-2.0	0.23-17
Fernandes <i>et al.</i> 2006	Regne Unit	Oli de fetge de bacallà	1.12-41.5	8.3-267
Hasegawa <i>et al.</i> 2007	Japó	Oli de peix	1.0-23.6	-
Tsutsumi <i>et al.</i> 2007	Japó	Oli de fetge de tauró	450	-
		Oli de peix	<0.1-8.4	-
		Oli de peix+vegetal	<0.1-7.8	-
Rawan <i>et al.</i> 2008 i Rawan <i>et al.</i> 2009	Canadà	Oli de peix	-	0.23-54.8
Oli de peix+vegetal		-	3.30-7.63	

En els estudis que es citen en la taula, les concentracions dels PCBs indicadors són més elevades que les respectives dels similars a dioxines (si es comparen en unitats de concentració, pg/g). Aquest fet és habitual, doncs els PCBs indicadors solen ser els més abundants en les mesclures tècniques. Pel cas dels PCBs similars a dioxines la seva concentració pot variar molt, des dels pocs pg TEQ/g determinats en olis de peix per Zennegg *et al.* fins a 450 pg WHO-TEQ/g determinats en oli de fetge de tauró per Tsutsumi *et al.*

Si aquestes concentracions es comparen amb els respectius nivells de PCDD/Fs (només per aquells estudis que inclouen els dos contaminants) s'observa que la major contribució a la toxicitat total de la mostra –tot i ser del mateix ordre– és deguda als PCBs. Pel que fa a l'abundància de cada congènere, el PCB-118 sol ser el que presenta una major concentració, seguit del PCB-105, -156 i -167.

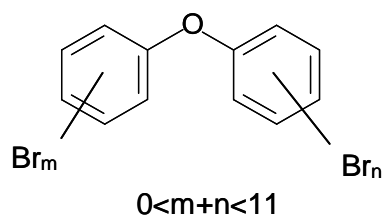
La concentració dels PCBs indicadors també és molt variable en funció de l'origen i tipus d'oli, que va des dels pocs ng/g que Zennegg *et al.* determinen en oli de peix de Suïssa fins els µg/g

determinats per Jacobs *et al.* en olis de mescles de peixos amb diferent origen. Respecte als perfils habituals dels PCBs indicadors per aquest tipus de matrius, es solen caracteritzar per una alta contribució dels congèneres -138 i -153.

### 1.3.3. PBDEs

#### Aspectes generals

Els difenilèters polibromats (PBDEs) són una família de compostos orgànics recentment inclosos dins de la categoria de COPs, segons l'annex del Conveni d'Estocolm del 2009. La seva estructura es basa en dos anells benzènics units per un pont èter, amb diversos broms com a substituents en els anells. La seva estructura genèrica es mostra en la *Figura 1.6*.



**Figura 1.6.** Estructura general dels PBDEs.

Cada un dels anells benzènics pot presentar fins a un total de 5 broms, generant 209 possibles estructures de PBDEs. Aquestes queden ordenades segons els grups d'homòlegs que es mostren en la *Taula 1.9*.

**Taula 1.9.** Nombre de congèneres de PBDEs per cada grup d'homòlegs.

Homòleg	PBDEs
Monobromats	3
Dibromats	12
Tribromats	24
Tetrabromats	42
Pentabromats	46
Hexabromats	42
Heptabromats	24
Octabromats	12
Nonabromats	3
Decabromats	1
<b>Total</b>	<b>209</b>

De la mateixa forma que els PCBs, els PBDEs no tenen una estructura plana i rígida (tal com passa amb les PCDD/Fs), ja que la molècula pot girar pel pont èter que uneix els dos anells. Això fa que cada congènere prengui una configuració diferent en l'espai, en funció dels impediments estèrics que generen els substituents.

Aquesta família de contaminants són compostos de producció industrial que s'afegeixen en plàstics, teixits, circuits elèctrics i altres materials per retardar la seva combustió. Habitualment es mesclen amb polímers o fibres tèxtils sense establir cap tipus d'enllaç químic, de manera que es poden separar de la superfície del seu substrat i alliberar-se al medi ambient amb facilitat.

La seva comercialització es va dur a terme a través de mescles tècniques de diferent grau d'halogenació, per bromació del difenilèter en presència de catalitzadors metàl·lics. El consum mundial de les principals mescles tècniques l'any 2001 va ser de 56100 tones de DecaBDE, 3709 tones de OctaBDE i 7500 tones de PentaBDE (de Wit, 2002).

Degut a les característiques de persistència i toxicitat d'aquesta família de contaminants, la producció de totes les mescles tècniques de PBDEs està prohibida en la Unió Europea, sense cap excepció (Directiva 2006/11/EC).

### **Toxicitat**

Existeixen diversos estudis que demostren que aquests contaminants també poden actuar com a disruptors del sistema endocrí en éssers vius, interaccionant a nivell cel·lular amb el receptor Ah. En aquest cas, els PBDEs i els respectius metabòlits hidroxilats poden reaccionar amb la proteïna de transport de l'hormona tiroides present en el plasma -la transtiteïna- la qual té un receptor específic per la tiroxina. Aquest fet no només impedeix el correcte transport de la tiroxina als teixits de destí, sinó que també bloqueja els receptors de la tiroides, influenciant així la regulació d'aquesta hormona en el nucli de la cèl·lula (Meerts *et al.*, 1998; EPA, 2008).

També hi ha estudis que demostren que el BDE-47 pot produir càncer en rates a través de un mecanisme no mutagen, de manera similar a altres contaminants com DDT i PCBs (Hellenday *et al.*, 1999). Tot i així, la IARC considera que, de moment, no hi han evidències que els PBDEs siguin potencialment cancerígens pels humans (IARC, 2011).

### **Precedents de PBDEs en oli de peix**

Per les seves condicions de contaminant orgànic persistent, els PBDEs es poden trobar en tot tipus de matrius. La seva presència en olis de peix destinats al consum humà ha estat publicat prèviament en diversos estudis. La *Taula 1.10.* en recull els resultats.

**Taula 1.10.** Concentració de PBDEs en olis de peix en estudis previs.

Referència	Origen	Composició	PBDEs (ng/g)
Jacobs <i>et al.</i> 2002	Escòcia	Oli de peix	<LD-12.7
		Oli de fetge de bacallà	14.6-34.2
Jacobs <i>et al.</i> 2004	Regne Unit	Oli de peix	0.8-2.7
		Oli de peix+vegetal	<LD-1.9
Zennegg i Schmid 2006	Suïssa	Oli de peix	0.07-3.8
Lin <i>et al.</i> 2007	Xina i Canadà	Oli de peix	1.96-3.72
Covaci <i>et al.</i> 2007	Bèlgica, Holanda Irlanda i Regne Unit	Oli de peix	<0.2-44
Rawn <i>et al.</i> 2008	Canadà	Oli de peix	0.22-30.8
Rawn <i>et al.</i> 2009		Oli de peix+vegetal	0.86-1.44

Com es pot observar, els estudis mostren unes concentracions de PBDEs del mateix ordre de magnitud per a la majoria de les mostres analitzades, de l'ordre dels ng/g. Aquests valors es troben entre els determinats per PCBs indicadors i similars a dioxines (Taula 1.7), però són superiors als determinats per PCDD/Fs (Taula 1.4).

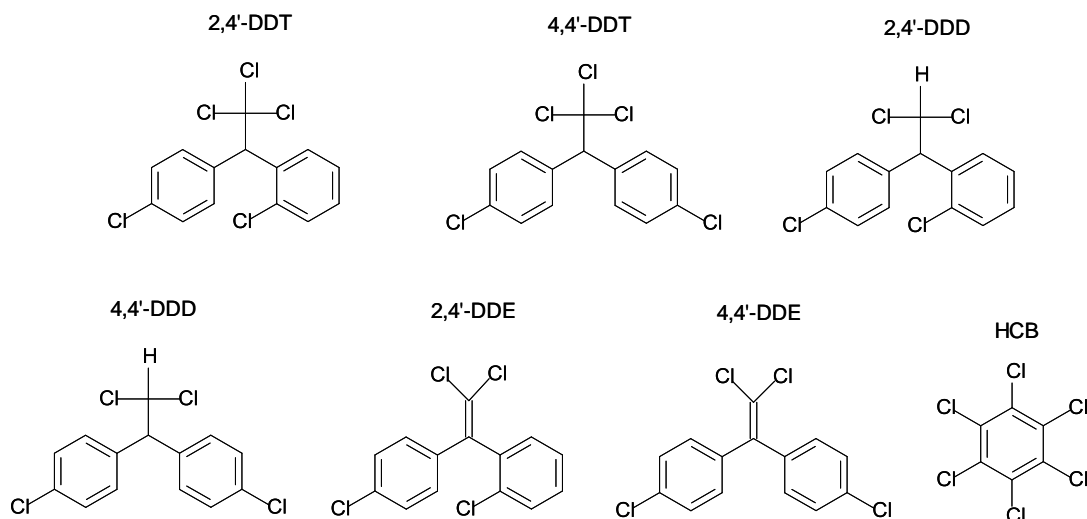
Pel que fa a la contribució de cada congènere individual a la suma total, el perfil dels PBDEs normalment és caracteritzat per una alta concentració del BDE-47, seguit del BDE-99 i -100.

### 1.3.4. Plaguicides organoclorats (DDTs i HCB)

#### Aspectes generals

Els plaguicides organoclorats són compostos de producció industrial emprats per al control de plagues. Segons el Conveni d'Estocolm original del 2001, els plaguicides organoclorats que són considerats com a COPs són l'aldrin, l'endrin, el dieldrin, el dicloro difenil tricloroetà (DDT), el clordà, l'heptaclor, l'hexaclorobenzè (HCB), el mirex i el toxafè.

La present tesi doctoral s'ha centrat en l'estudi del DDT i l'HCB ja que, degut al seu elevat ús durant el segle passat, avui tenen una destacada presència en el medi ambient i biota. Cal destacar que en l'estudi del DDT s'han inclòs els dos isòmers d'aquest (2,4'-DDT i 4,4'-DDT) i els quatre metabòlits més habituals (2,4'-DDD i 4,4'-DDD, 2,4'-DDE i 4,4'-DDE), tots ells agrupats conceptualment com a DDTs. Les seves estructures, juntament amb la de l'HCB, es poden observar en la Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Estructura dels DDTs i HCB.

El DDT és un plaguicida d'origen industrial, la síntesi del qual es coneix des del 1874 a partir de clorobenzè i tricloroacetaldehid en medi àcid. En aquestes condicions, el producte que s'obté és una mescla dels isòmers 4,4'-DDT (85%) i 2,4'-DDT (15%), amb traces de 2,2'-DDT. Tot i així, no va ser fins al 1942 que es comercialitzen els primers formulats, sota el nom de Gerasol i Neocide. La producció mundial total del DDT a finals del 2003 era estimada en 2.6 milions de tones (Zitko, 2003).

L'ús d'aquest compost ha estat en dos camps d'aplicació diferents. Per una banda s'ha emprat per a l'erradicació d'insectes que actuen com a transmissors de diverses malalties, principalment el tifus i la malària. Paral·lelament, també es va fer servir de forma àmplia en l'agricultura pel control de plagues en cultius de cotó, tabac o patates.

El seu èxit inicial va ser degut al seu baix cost de producció, baixa toxicitat en mamífers (tot i que llavors es desconeixien els seus efectes a exposicions prolongades) i que gràcies a la seva persistència la seva aplicació no havia de ser tant freqüent. Tot i així, l'ús va disminuir notablement durant la dècada dels 80 degut a la seva problemàtica ambiental i el desenvolupament de resistència per part de les plagues combatudes.

En l'actualitat, el seu ús està restringit sota registre a la producció del dicofol (un altre plaguicida organoclorat, però menys persistent) o per al control del vector de la malària en alguns països, principalment de l'Àsia o Àfrica (Zitko, 2003).

Pel que fa a l'HCB, la seva comercialització es va iniciar el 1940. La seva producció industrial era basada en la cloració del benzè a 150-200°C, catalitzada per FeCl<sub>3</sub>. Tot i que no es disposa de molta informació de fabricació per als primers anys, s'estima que la producció mundial d'aquest plaguicida organoclorat va ser d'unes 10000 tones de 1978 a 1981. La seva fabricació es va reduir durant la dècada dels 80 degut a les seves propietats com a contaminant mediambiental.

Les seves principals aplicacions són com a plaguicida (substituint inicialment d'altres fungicides basats en Hg pel tractament de llavors) i com a agent químic en la indústria pirotècnica, com a intermedi en la síntesi de compostos clorats, la fosa d'alumini o la indústria del cautxú.



Tot i així, l'HCB també es pot formar com a subproducte d'altres processos industrials, com la fabricació del pentaclorofenol, certs dissolvents orgànics clorats (tetraclorur de carboni, tictloroetilè o percloroetilè) o processos similars als de formació de dioxines (Bernes, 1998).

### **Toxicitat**

Els DDTs i HCB tenen efectes toxicològics en els éssers vius similars als de les PCDD/Fs, PCBs i PBDEs, actuant principalment com a disruptors del sistema endocrí per inhibició enzimàtica de l'adenosina trifosfat sòdica o potàssica (Longnecker, 2005). Aquest fet té diversos efectes toxicològics adversos en els éssers vius, com la disminució de la productivitat de llet, la pèrdua de teixit muscular i adipós o fins i tot la mort en casos d'intoxicacions agudes:

- En mamífers pot arribar a reduir la probabilitat de supervivència de les cries, anomalies en el cicle menstrual o alteracions sexuals que es fan patents quan l'individu és madur. També pot tenir efectes neurotòxics per disminució de dopamina.
- En aus disminueixen la producció d'ous, que s'obtenen amb una closca més prima. També pot arribar a deformar els fetus, retardar-ne el creixement o incapacitar les mares per la incubació dels ous.
- En peixos redueix l'índex de supervivència dels ous i les larves, retarda la maduració sexual de les cries i redueix la mida de les gònades (Longnecker, 2005).

### **Precedents de DDTs i HCB en oli de peix**

Com a contaminants orgànics persistents, els DDTs i HCB són compostos ubics que es poden trobar en tot tipus de matrius. En el cas que ocupa, existeixen diverses publicacions prèvies a la present tesi doctoral que estudien la concentració d'aquests plaguicides organoclorats en oli de peix. Els seus resultats es poden trobar resumits en la *Taula 1.11*.

**Taula 1.11.** Concentració de DDTs i HCB en olis de peix en estudis previs.

Referència	Origen	Composició	DDTs (ng/g)	HCB (ng/g)
Berzas Nevado <i>et al.</i> , 2010	Espanya i França	Oli de salmó	15-23	1.5-0.5
		Oli de fetge de bacallà	26	0.1
Berzas Nevado <i>et al.</i> , 2007	Espanya	Oli de salmó	13.2-51.3 <sup>a</sup>	-
		Oli de fetge de bacallà	21.6 <sup>a</sup>	-
Jacobs <i>et al.</i> 2002	Escòcia	Oli de peix	<LD-54.0	0.2-3.7
		Oli de fetge de bacallà	5.2-250	4.1-43.5
Hoh <i>et al.</i> , 2009	Alaska (EEUU)	Oli de salmó	67	-
		Oli de fetge de bacallà	6.8-76	-
Rawn <i>et al.</i> 2008	Canadà	Oli de peix	0.30-13.5	0.023-1.07
		Mescla sense salmó	0.19-15.2	0.02-0.63
		Mescla amb salmó	9.31-24.9	0.361-0.271
		Oli de salmó	4.76-250	1.55-21.9
		Oli de peix i vegetal	3.71-5.63	0.174-1.22
		Oli de tauró	309-3310	2.52-3.40
		Menhaden o poggy	28.9	0.054
	Oli de Balena	267	52.1	

<sup>a</sup> en el sumatori de DDTs només inclou els isòmers amb substitució 4,4'-

En aquesta taula es pot observar que els nivells de DDTs poden variar molt en funció del tipus d'oli de peix. La seva concentració es troba des dels 3.3 µg/g determinats per Rawn *et al.* en oli de tauró fins als 0.19 ng/g presents en una mescla d'olis sense salmó del mateix estudi. Tot i així, en aquest cas podrien existir altres factors influents a part de la pròpia naturalesa de l'oli, com l'origen o el consum al que es troben destinats (humà o animal). Respecte a l'abundància de cada isòmer en el sumatori total de DDTs, és habitual que en aquest tipus de mostres predomini el metabòlit 4-4'DDE.

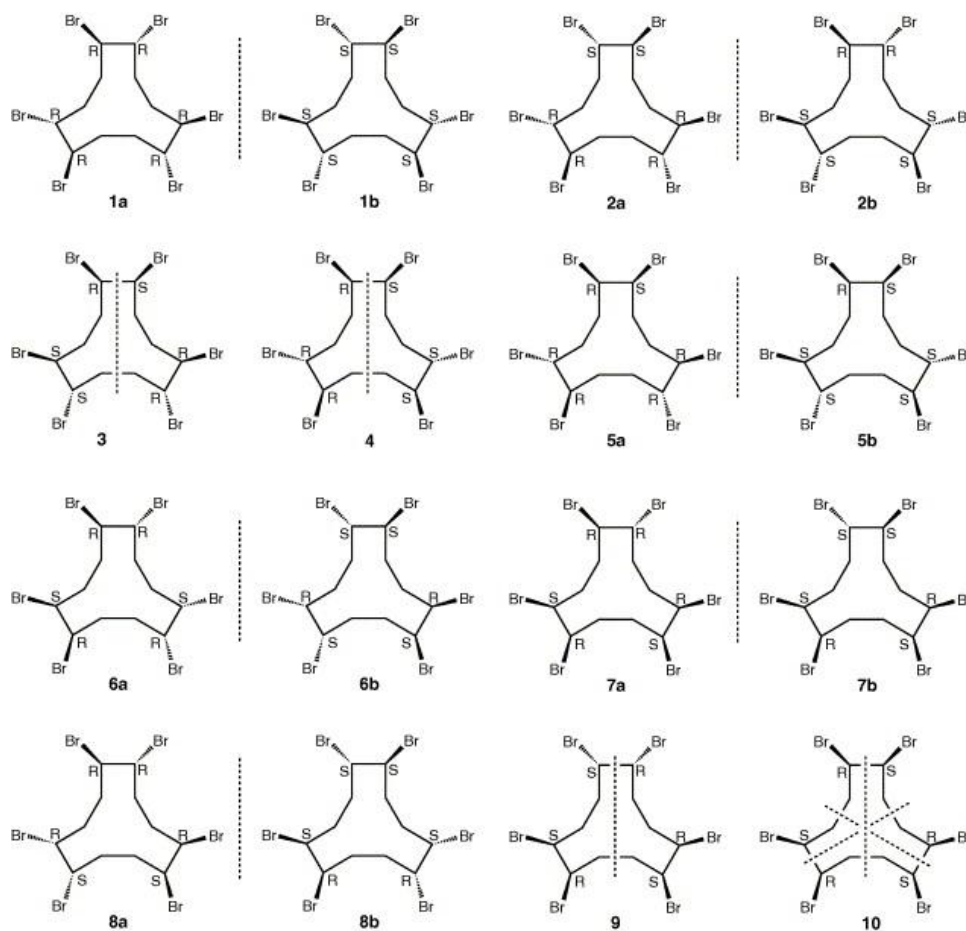
Pel cas de l'HCB, en tots els estudis inclosos en la Taula 1.10 la seva concentració era inferior als respectius nivells de DDTs. Tot i que el rang amb que varia pels diferents tipus d'oli no és tant ample com per l'altre família de pesticides organoclorats estudiada, si que pot variar entre els 52 ng/g determinats per Rawn *et al.* en oli de balena fins als 21 pg/g determinats en una mescla d'olis sense salmó del mateix estudi.

### 1.3.5. HBCD

#### Aspectes generals

L'1,2,5,6,9,10-hexabromociclododecà (HBCD) és un retardant de flama bromat àmpliament emprat en escumes de poliestirè, les quals es fan servir en l'aïllament tèrmic en els edificis (Law *et al.*, 2006). La seva producció i consum s'ha vist incrementada notablement durant els últims anys degut a la prohibició d'altres retardants de flama bromats com els PBDEs o els bifenils polibromats (Directiva 2006/11/EC).

Tenint en compte tots els elements de simetria, teòricament existeixen 16 diastereòmers d'HBCD diferents, incloent sis parells enantiomèrics així com 4 formes meso (Heeb *et al.*, 2007). Aquestes estructures es mostren en la *Figura 1.8*.



**Figura 1.8.** Diastereòmers teòrics de l'HBCD, incloent sis parells enantiomèrics (estructures 1a/b, 2a/b, 5a/b, 6a/b, 7a/b, 8a/b) i quatre formes meso (estructures 3, 4, 9, 10). Les línies discontinúes indiquen plans de simetria.

Les mesclades tècniques d'HBCD són produïdes industrialment per addició de brom al *cis-trans*-1,5,9-ciclododecatriè, obtenint-se una barreja que conté tres diastereòmers predominants: l' $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ -HBCD (que es corresponen a les estructures 6a/b, 7a/b i 8a/b de la *Figura 1.8.*, respectivament).

Habitualment, l'isòmer  $\gamma$  és el més abundant en els productes comercials (entre un 75 i 89% del total d'HBCDs), seguit per l' $\alpha$ - (10-13% del total) i el  $\beta$ -HBCD (1-12% del total) (Covaci *et al.*, 2006). A més, els diastereòmers  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ -HBCD són quirals, conduint a tres parells d'enantiòmers.

Tot i que aquest compost encara no està considerat com a contaminant orgànic persistent, degut a les seves característiques de persistència, toxicitat i bioacumulació el govern noruec l'ha proposat com a candidat per ser emmarcat dins del Conveni d'Estocolm del 2001 en el futur.

## Toxicitat

L'HBCD és un compost relativament nou, que ha substituït la producció industrial d'altres retardants de flama bromats, com els PBDEs. Tot i que per aquest motiu els seus efectes toxicològics no estan tant estudiats com per a altres COPs, existeixen publicacions que fan evident els efectes adversos d'aquest contaminant per a la salut.

L'HBCD pot actuar com a disruptor endocrí, afectant al sistema de regulació hormonal dels éssers vius (Van der Ven *et al.*, 2006). En ratolins actua com a inductor de l'enzima hepàtica (Hamers *et al.*, 2006) i té efecte neurotòxic (Eriksson *et al.*, 2006).

Un altre factor que és indicatiu del perill toxicològic que suposa l'HBCD és el fet que, tal com s'ha comentat anteriorment, les mesclures tècniques i mostres ambientals continguin  $\gamma$ -HBCD com a diastereòmer majoritari, mentre que en mostres d'origen biològic predomina l' $\alpha$ -HBCD. Aquest fet és un clar indicador que existeixen processos de metabolització en éssers vius degut a la seva activitat com a disruptor del sistema hormonal (Szabo *et al.*, 2010).

## Precedents de HBCD en oli de peix

Degut a que l'HBCD és un contaminant emergent, no existeix un elevat nombre de publicacions que descriguin la seva presència en el medi ambient o en biota. Pel cas de la matriu d'estudi en la present tesi doctoral, a dia d'avui només existeix un estudi previ sobre els nivells d'aquest contaminant en oli de peix. Sí que existeix alguna publicació més pel cas de peix. Els resultats d'aquests estudis es mostren en la Taula 1.12.

**Taula 1.12.** Concentració de HBCD en oli de peix i peix d'estudis previs.

Referència	Origen	Tipus de mostra	HBCD (ng/g)
Kakimoto <i>et al.</i> , 2007	Japó	Oli de sardina	44
		Oli de tauró	67
Sørmo <i>et al.</i> , 2009	Mar Bàltic	Gòbit negre	6.0*
		Gòbit de sorra	14*
		Merla	32*
Zhang <i>et al.</i> , 2009	Xina	Carpa cruciana	377*
		Peix llop	1791*

\*En les mostres de peix el resultat s'expressa respecte al percentatge de greix

La concentració d'HBCD en oli de peix del Japó publicada per Kakimoto *et al.* és aproximadament del mateix ordre que la determinada per Sørmo *et al.* en peix del Mar Bàltic, entre 6 i 67 ng/g. Tot i així, aquests valors són molt inferiors que els publicats per Zhang *et al.* per peix d'origen xinès, que arriba fins als 1.8  $\mu\text{g/g}$  en peix llop.

Si es comparen aquestes concentracions de PBDEs (que és un altre retardant de flama bromat) en oli de peix, s'observa que en general els nivells d'HBCD són lleugerament més alts en la majoria de casos.

### **1.3.6. Legislació**

A pesar de la problemàtica que suposen els contaminants orgànics persistents, a dia d'avui en la Unió Europea només existeixen nivells màxims legislats per al cas de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines. Els documents que regulen les seves concentracions màximes en productes alimentaris són els següents:

- El Reglament 199/2006 estableix els nivells màxims en productes destinats a l'alimentació humana. Aquestes concentracions queden recollides en la seva versió actualitzada (1881/2006), a on a més s'hi afegeixen d'altres substàncies indesitjables.
- La Recomanació de la Comissió 2006/88/CE estableix els llindars d'intervenció per productes destinats a l'alimentació humana.

Les concentracions màximes i llindars d'intervenció de PCDD/Fs i PCBs que descriuen aquests documents es resumeixen en la *Taula 1.13*.

Cal aclarir que, segons aquests reglaments, els nivells màxims estableixen la concentració per sobre de la qual l'aliment ha de ser retirat del mercat, al considerar la seva contaminació inacceptable. Els llindars d'intervenció són aquells que són superats es considera que l'aliment conté una concentració de contaminants anòmalament elevada. Això no comporta la seva retirada del mercat, però obliga a les autoritats competents o empreses involucrades a realitzar un estudi per tal de determinar quina ha estat la font d'aquesta contaminació, i a la presa de les decisions pertinents per a la seva eliminació (Díaz, 2007).

**Taula 1.13.** Nivells màxims i llindars d'intervenció de PCDD/Fs i PCBs en alimentació humana.

Producte	Llindar d'intervenció	Nivell màxim	Llindar d'intervenció	Nivell màxim
	PCDD/Fs	PCDD/Fs	dl-PCBs	PCDD/Fs+dl-PCBs
Carns i derivats (pg TEQ/g greix)				
Bovins i Ovins	1.5	3.0	1.0	4.5
Aus de corral	1.5	2.0	1.5	4.0
Porcs	0.6	1.0	0.5	1.5
Fetge i derivats	4.0	6.0	4.0	12.0
Peix i derivats (pg TEQ/g pes fresc)				
Carns de peixos i derivats excloent anguila	3.0	4.0	3.0	8.0
Carn d'anguila i derivats	3.0	4.0	6.0	12.0
Lactis (pg TEQ/g greix)				
Llet i derivats làctis (incloent greix làcti)	2.0	3.0	2.0	6.0
Ovoproductes (pg TEQ/g greix)				
Ous de gallina i ovoproductes	2.0	3.0	2.0	6.0
Greixos i olis (pg TEQ/g greix)				
Greixos animals de bovins i ovins	1.5	3.0	1.0	4.5
Greixos animals d'aus de corral	1.5	2.0	4.0	4.0
Greixos animals de porcs	0.6	1.0	0.5	1.5
Barreja de greixos animals	1.5	2.0	0.75	3.0
Olis i greixos vegetals	0.5	0.75	0.5	1.5
<b>Olis de peix</b>	<b>1.5</b>	<b>2.0</b>	<b>6.0</b>	<b>10.0</b>
Altres (ng TEQ/kg producte)				
Fruites, hortalisses i cereals	0.4	-	0.2	-

- La Directiva 2006/13/CE, transposada a la Ordre PRE/1809/2006, estableix els nivells màxims i llindars d'intervenció en productes destinats a l'alimentació animal. Aquests valors es poden trobar en la *Taula 1.14*.

**Taula 1.14.** Nivells màxims i llindars d'intervenció de PCDD/Fs i PCBs en alimentació animal.

Producte	Llindar d'intervenció PCDD/Fs	Nivell màxim PCDD/Fs	Llindar d'intervenció PCBs	Nivell màxim PCDD/Fs+ PCBs
ng TEQ/kg producte referit al 12% d'humitat				
Materies primeres d'origen vegetal, excepte olis vegetals i subproductes	0.5	0.75	0.35	1.25
Olis vegetals i subproductes	0.5	0.75	0.5	1.5
Matèries primeres d'origen mineral	0.5	1.0	0.35	1.5
Grasa animal (inclosa la d'ous i llet)	1.0	2.0	0.75	3.0
Altres productes d'animals terrestres	0.5	0.75	0.35	1.25
<b>Olis de peix</b>	<b>5.0</b>	<b>6.0</b>	<b>14.0</b>	<b>24.0</b>
Peixos, altres animals aquàtics i subproductes	1.0	1.25	2.5	4.5
Hidrolitzats de proteïnes de peix	1.75	2.25	7.0	11.0
Additius minerals aglomerants o antiaglomerants	0.5	0.75	0.5	1.5
Oligoelements	0.5	1.0	0.35	1.5
Premescles	0.5	1.0	0.35	1.5
Pinsos compostos, excepte per peixos, animals de pelleteria i animals de companyia	0.5	0.75	0.5	1.5
Pinsos per peixos i animals de companyia	1.75	2.25	3.5	7.0

Cal esmentar que en l'actualitat també existeixen certs documents que regulen els nivells de PCBs indicadors en productes d'origen animal destinats al consum humà o animal (Decisió de la Comissió 1999/449/CE), tot i que no defineix cap concentració màxima pel cas de l'oli de peix.

Tot i així, existeix una nova proposta per regular els nivells dels PCBs indicadors en aliments d'origen animal, els quals varen ser discutits en The Expert Committee of POPs in Food en diverses reunions durant els anys 2007, 2008 i 2009. Aquesta proposta -Possible harmonized levels of non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in food of animal origin (EFSA, 2009)- fixa la concentració màxima d'aquesta família de contaminants en 200 ng/g de greix pel cas de l'oli de peix.

### ***1.4. Objectius***

---

El principal objectiu de la present tesis doctoral és l'eliminació de contaminants orgànics persistents - PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines, PCBs indicadors, PBDEs, DDTs, HCB i HBCD- en olis de peix amb finalitat alimentària. Per tal de dur a terme aquest objectiu, es subdivideix en les següents etapes:

- Desenvolupament i validació dels mètodes analítics necessaris per la correcta determinació dels contaminants d'interès en oli de peix.
- Estudi de l'eliminació de COPs en oli de peix mitjançant adsorbents amb base silici i carbó, optimitzant-ne les variables experimentals per tal d'aconseguir la màxima adsorció dels contaminants. Control de l'efecte d'aquest procés al contingut en àcids grassos de l'oli, amb especial atenció als àcids grassos insaturats  $\omega$ -3.
- Estudi de l'eliminació de COPs en oli de peix mitjançant tècniques fotoquímiques. Es començarà estudiant la fotodegradació dels contaminants en dissolvents orgànics amb un fotorreactor, i posteriorment s'aplicarà el mètode optimitzat a la matriu d'estudi. Anàlogament a l'apartat anterior, també és necessari controlar el contingut en àcids grassos de l'oli de peix.
- Comparació dels resultats obtinguts amb cada una de les dues tècniques per tal de determinar quin és el millor mètode per l'eliminació de COPs en oli de peix.



## 1.5. Bibliografia

- Alain P, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destailats F (2006). Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on trans fatty acid content. *Food Chemistry* 101: 1115-1120
- Aldai N, Osoro K, Barrón L, Nájera A (2006). Gas-liquid chromatographic method for analyzing complex mixtures of fatty acids including conjugate linoleic acids (cis9trans11 and trans10cis12 isomers) and long chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids. Application to the intramuscular fat of beef meat. *Journal of Chromatography A* 1110: 133-139
- ARPO (2010). Aceites de pescado. [http://www.aceitesdepescado.com/proceso\\_productivo.asp](http://www.aceitesdepescado.com/proceso_productivo.asp)  
Data de l'última consulta: 15/06/2010
- Arvindakshan M (2003). Supplementation with a combination of  $\omega$ -3 fatty acids and antioxidants (vitamins E and C) improves the outcome of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 62 (3): 195.
- Ballschmitter K, Bacher R, Mennel A, Fischer R, Riehle U, Swerev M (1992). The determination of chlorinated biphenyls, chlorinated dibenzodioxins and chlorinated dibenzofurans by GC-MS. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15: 260-270
- Baquero J, Bernardini E (1986). *Tecnología de aceites y grasas*. Ed. Alhambra S.A., Madrid
- Berzas Nevado JJ, Martín-Doimeadiós RCR, Guzmán Bernardo FJ, Rodríguez Fariñas N, González Cogolludo JM, Castro Osma JA (2010). Multiresidue determination of organochlorines in fish oil by GC-MS: A new strategy in the sample preparation. *Talanta* 81: 887-893
- Berzas Nevado JJ, Martín-Doimeadiós RCR, Guzmán Bernardo FJ, Rodríguez Fariñas N (2007). Development and validation of an analytical methodology for the determination of p,p'-DDT, p,p'-DDE and p,p'-DDD in fish oil pills. *Microchemical Journal* 86: 183-188
- Bernes C (1998). *Persistent Organic Pollutants. A Swedish view of an international problem*. Ed. Swedish Environmental Protection Agency, Estocolm
- Bioriginal (2010). Molecular distillation or oil refining?  
<http://www.bioriginal.com/services/files/moleculardistilledoroilrefining.pdf>. Data de l'última consulta: 30/09/2010
- Burkhard LP, Lukasewycz MT (2007). Toxicity equivalency values for polychlorinated biphenyl mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (3): 529-534
- Christie WW (1989). *Gas chromatography and lipids, a practical guide*. Ed. The Oily Press, Bridgewater.
- Covaci A, Gerecke AC, Law RJ, Voorspoels S, Kohler M, Heeb NV, Leslie H, Allchin CR, De Boer J (2006). Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review. *Environmental Science and Technology* 40: 3679-3688
- Covaci A, Voorspoels S, Vetter W, Gelbin A, Jorens PG, Blust R, Neels H (2007). Anthropogenic and naturally occurring organobrominated compounds in fish oil dietary supplements. *Environmental Science Technology* 41: 5237-5244

- Cosgrave JP, Church DF, Pryor WA (1987). The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22 (5): 299-304
- Decisió de la Comissió 1999/551/CE. Decisión que modifica la Decisi.n 1999/449/CE, por la que se establecen medidas de protección contra la contaminación por dioxinas de determinados productos de origen animal destinados al consumo humano o animal. *Diario Oficial de lasComunidades Europeas*, L 209: 42-49
- Díaz J (1999). Determinación de dioxinas, furanos y PCB coplanares: Desarrollo de métodos y estudio de niveles en muestras de interés ambiental y biológico. Tesis doctoral dirigida pel Dr. Lluís Comellas i la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Rodríguez, realitzada a l'IQS
- Díaz J (2007). Dioxinas, furanos y PCBs similares a dioxinas: nueva legislación alimentaria. *Afinidad* 64 (527): 7-14
- Directiva 2006/11/EC. Directive on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. *Diari Oficial de l'Unió Europea*, L 64: 52-59
- Directiva 96/59/EC. Directive on the disposal of polychlorinated biphenyls and polychlorinated terphenyls (PCB/PCT). *Diari Oficial de l'Unió Europea*, L 243: 31-35
- Domingo JC (2008). Nuevos omega-3 de alta bioactividad. Aplicación Nutricional y dietética. Publicación Sociedad Española Dietética y Ciencias de la Alimentación. <http://www.nutricion.org/actividades/pdf/Conferencia%20w3%20Zaragoza.pdf>. Data de l'última consulta: 30/09/2010
- Eriksson P, Fisher C, Wallin M, Jakobsson E, and Fredriksson A (2006). Impaired behaviour, learning and memory, in adult mice neonatally exposed to hexabromocyclododecane (HBCD). *Environmental Toxicological Pharmacology* 21: 317:322
- EFSA (2009). Possible harmonized levels of non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in food of animal origin. [www.efsa.europa.eu/efsa/media/1157/efsa\\_jrc\\_2009\\_01.pdf](http://www.efsa.europa.eu/efsa/media/1157/efsa_jrc_2009_01.pdf). Data de l'última consulta: 29/03/2010
- EPA (2008). Toxicological review of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99). EPA/635/R-07/006F
- FEDNA (2010). Avances en nutrición y alimentación animal. [www.etsia.upm.es/fedna/mainpageok.html](http://www.etsia.upm.es/fedna/mainpageok.html) Data de l'última consulta: 15/06/2010
- Fernandes MA, Rose M, White S, Mortimer DN, Gem M (2006). Dioxins and polychlorinated byphenyls (PCBs) in fish oil dietary supplements: ocurrence and human exposure in the UK. *Food Additives Contaminants* 23: 939-947
- Foodtech (2010). Omega-3 Fatty Acids: Chemistry and Nutritional Significance. [www.foodtech-international.com/papers/omega-3.htm](http://www.foodtech-international.com/papers/omega-3.htm). Data de l'última consulta: 19/06/2010
- FAI (2002). Dioxins, Furans and PCBs in Farmed and Wild Salmon, Farmed Trout and Fish Oil Capsules.

[www.fsai.ie/monitoring\\_and\\_enforcement/monitoring/surveillance/dioxins\\_furans\\_pcb\\_s.html](http://www.fsai.ie/monitoring_and_enforcement/monitoring/surveillance/dioxins_furans_pcb_s.html). Data de l'última consulta: 30/09/2010

- Gray JI (1978). Measurement of Lipid Oxidation. *Journal of American Oil Chemist's Society* 55: 539-546
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, Legler J, and Brouwer A (2006). In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological Science* 92: 157-173
- Hasegawa J, Guruge KS, Seike N, Shirai Y, Yamata T, Nakamura M, Handa H, Yamanaka N, Miyazaki S (2007). Determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in fish oils for feed ingredients by congener-specific chemical analysis and CALUX bioassay. *Chemosphere* 69: 1188-1194
- Heeb NV, Schweizer WB, Mattrel P, Haag R, Gerecke AC, Kohler M, Schmid P, Zennegg M, Wolfensberger M (2007). Solid-state conformations and absolute configurations of (+) and (-) alpha-, beta, and gamma-hexabromocyclododecanes (HBCDs). *Chemosphere*. 68: 940-950.
- Hellenday T, Touminen K, Bregman A, Jenssen D (1999). Brominated flame retardants induce intragenic recombination in mammalian cells. *Mutation Research* 439: 137-147
- Hilbert G, Lillemark L, Balchen S, Hojskov C (1998). Reduction of organochlorine contaminants from fish oil during refining. *Chemosphere* 37: 1241-1252
- Hoh E, Lehotay SJ, Pangallo KC, Mastovska K, Ngo HL, Reddy CM, Vetter W (2009). Simultaneous Quantitation of Multiple Classes of Organohalogen Compounds in Fish Oils with Direct Sample Introduction Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2653-2660
- Howe PR, Downing JA, Grenyer BR, Grigonis-Deane EM, Bryden WL (2002). Tuna fishmeal as a source of DHA for n-3 PUFA enrichment of pork, chicken, and eggs. *Lipids* 37 (11): 1067-1076
- IARC (2011). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–100. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. Data de l'última consulta: 30/09/2010
- Jacobs MN, Santillo D, Johnston PA, Wyatt CL, French MC (1998). Organochlorine residues in fish oil dietary supplements: comparison with industrial grade oils. *Chemosphere* 37: 1709–1721
- Jacobs MN, Covaci A, Schepens P (2002). Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environmental Science and Technology* 36: 2797–2805
- Jacobs MN, Covaci A, Gheorhe A, Schepens P (2004). Time trend investigation of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides in selected n-3 polyunsaturated fatty acid rich dietary fish

oil and vegetable oil supplements; nutritional relevance for human essential n-3 fatty acid requirements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1780–1788

Jiménez B, Wright C, Kelly M, Startin JR (1996). Levels of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in dietary supplement fish oil obtained in Spain. *Chemosphere* 32: 461–467

Kakimoto K, Akutsu K, Konishi Y, Tanaka Y (2007). Hexabromocyclododecane in fish oil supplements. *Organohalogen Compounds* 69: 2307-2310

Kimbrough RD, Jensen AA (1989). Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related compounds. Ed. Elsevier, Amsterdam.

Kris-Etherton PM, Harris WS, Lawrence JA, Appel MD (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* 106: 2747-2757.

Law R, Allchin C, de Boer J, Covaci A, Herzek D, Lepom P, Morris S, Tronczynski J, de Wit C (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 64: 187-208

Lin Z, Tu F, Ma Y, Chen M, Zhang L, Sun R, Zou X, Xiaobo L, Zhaobin CH (2007). Determination of five polybrominated diphenyl ethers residues in deep sea fish oil using as chromatography-negative chemical ionization/mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography* 25: 262–266

Longnecker MP (2005). Invited Commentary: Why DDT Matters Now. *American Journal of Epidemiology* 162: 726-728

Madrid-Vicente, A (1999). *Pescados y sus productos derivados*. Ed. Mundi-Prensa Libros, Madrid

Martín-Lagos Martínez JA (2007). *Estudio de los índices de calidad en aceites de oliva de la provincia de Granada*. Ed. Universidad de Granada, Granada.

Mata P (2004). *Libro Blanco de los Omega-3*. Ed. Médica Panamericana, Madrid

Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG (2002). *Bioquímica*. Ed. Addison Wesley, Reading

Meerts I, Luijk EAC, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A, Brouwer A (1998). Polybrominated diphenyl ethers (PDBEs) as Ah-receptor agonist and antagonists. *Organohalogen Compounds* 37: 147-50

Ortega RM, Pérez Jiménez F, Bultó Sagnier L, Martín Quesada E (2008). *Prejuicios y verdades sobre las grasas y otros alimentos*.  
[http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/prejuicios\\_y\\_verdades\\_sobre\\_grasas.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/prejuicios_y_verdades_sobre_grasas.pdf).  
Data de l'última consulta: 30/09/2010

Ortoll U (2009). *Determinación de los ácidos omega 3 EPA y DHA en aceites de pescado por cromatografía de gases con detector FID*. Treball final de carrera dirigit pel Dr. Francesc Broto Puig i Eng. Lourdes Margarit Roig, realitzat a l'IQS

- Panchaud A, Avois L, Roulet M, Pilet M, Hug C, Saugy M, Decosterd LA (2005). A validated liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of leukotrienes B4 and B5 produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry* 341: 58–68
- Pavuk M, Patterson DG, Turner WE, Needham LL, Ketchum NS (2007). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in the serum of US Air Force veterans in 2002. *Chemosphere* 68: 62-68
- Rawn DFK, Breakell K, Verigin V, Nicolidakis H, Sit D, Feeley M (2008). Persistent organic pollutants in fish oil supplements on the Canadian market: polychlorinated biphenyls and organochlorine insecticides. *Journal of Food Science* 74: 14-19
- Rawn DFK, Breakell K, Verigin V, Nicolidakis H, Sit D, Feeley M (2009). Persistent organic pollutants in fish oil supplements on the Canadian market: polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Food Science* 74:31-36
- Reglamento 1999/499/CE. Reglamento que deroga el Reglamento (CEE) no 3444/90 por el que se establecen disposiciones de aplicación para la concesión de ayudas al almacenamiento privado de carne de porcino. *Diari Oficial de l'Unió Europea*, L 194: 45-46
- Ronayne de Ferrer PA (2000). Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación del lactante. *Archivos Argentinos de Pedriatía* 98 (4): 231.
- Schechter A (1994). *Dioxins and Health*. Ed. Plenum Press, Nova York.
- Segura R (2010). Àcids grassos omega-3: els àcids grassos perduts i ara retrobats?. *TECA (Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació)* 12 (2): 31-38
- Sørmo EG, Jenssen BM, Lie E, Skaare JU (2009). Brominated flame retardants in the aquatic organisms from the north sea in comparison with biota from the high arctic marine environment. *Environ. Toxicological Chemistry* 28: 2082-2089
- Storelli MM, Storelli A, Marcotrigiano GO (2004). Polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, hexachlorocyclohexane isomers, and pesticide organochlorine residues in cod liver oil dietary supplements. *Journal of Food Protection* (67): 1787–1791
- Supelco Notes (1996). Comparison of 37 component FAME Standard on Four Capillary GC Columns. *Bulletin* 907.
- Szabo DT, Diliberto JJ, Hakk H, Huwe JK, Bimbaum LS (2010). Toxicokinetics of the Flame Retardant Hexabromocyclododecane Gamma: Effect of Dose, Timing, Route, Repeated Exposure, and Metabolism. *Toxicological Sciences* 117 (2):282-293
- Tsutsumi T, Amakura Y, Tanno K, Yangl T, Kono Y, Sasaki T (2007). Dioxins and others organohalogen compounds in fish oil supplements on the Japanese market. *Organohalogen Compounds* 69: 2371-2374

- UNEP (1998). Inventory of world-wide PCB destruction capacity. Secretariat de la Convenció de Basilea.
- UNEP (2005). Ridding the world of POPs: A guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. UNEP's information unit for conventions.
- Van der Ven LT, Verhoef A, van de Kuil T, Slob W, Leonards PE, Visser TJ, Hamers T, Herlin M, Hakansson H, Olausson H (2006). A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicological Science* 94: 281–292
- Voet D, Voet JG (1992). *Bioquímica*. Ed. Omega, Barcelona
- Winterisation (2010). Fish oil. <http://www.winterisation.com/img/pdf/fabpoisson-es.pdf> (consultada el 15/06/2010)
- de Wit CA (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46: 583-624
- Zakrzewski SF (1997). *Principles of Environmental Toxicology*. Ed. American Chemical Society, Washington.
- Zenneg M, Schmid P (2006). PCDD/F, PCB, dioxin-like PCB and PBDE in fish oil used as dietary supplement in Switzerland. *Organohalogen Compounds* 68: 1967-1970
- Zhang X, Fangxing Y, Luo C, Wen S, Zhang X, Xu Y (2009). Bioaccumulative characteristics of hexabromocyclododecane in freshwater species from an electronic waste recycling area in China. *Chemosphere* 76: 1572-1578
- Zitko V (2003). *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3 Part O. Persistent Organic Pollutants*. Ed. Springer-Verlag, Berlin

## **2. DESENVOLUPAMENT ANALÍTIC**





## 2.1. Introducció

Els contaminants orgànics persistents són compostos ubics que es poden trobar en una gran diversitat de mostres, habitualment en nivells molt baixos. Això fa que els seus mètodes d'anàlisi siguin força complexos, ja que aquests han de complir amb les següents característiques:

- Baixos límits de detecció: els COPs es solen trobar a nivells de concentració molt baixos. Aquests depenen del contaminant en particular i del tipus de matriu, però acostumen a presentar concentracions de l'ordre dels nanograms o picograms per gram de mostra. A més, les legislacions vigents que emmarquen aquesta classe de contaminants tendeixen a establir nivells màxims cada cop més baixos. Per aquests motius els seus mètodes d'anàlisi cada cop han de ser capaços de detectar concentracions menors.
- Elevada selectivitat: Dins de la família dels COPs existeixen una gran diversitat de compostos, on eventualment s'hi inclouen nous contaminants. No només això, sinó que a més dins de cada un d'aquests grups poden existir un elevat nombre de congèneres. Tot això fa que els mètodes d'anàlisi per a aquests contaminants hagin de ser capaços de diferenciar un elevat nombre d'analits molt semblants entre sí.
- Vàlids per a tot tipus de matrius: Degut a la ubiqüitat d'aquests compostos, aquests mètodes d'anàlisi han de poder ser aplicables a qualsevol tipus de mostra, i suficientment robustos com per donar la mateixa resposta independentment de la matriu.

El principal objectiu de la present tesi doctoral és l'eliminació de COPs en oli de peix. En conseqüència, inicialment s'han posat a punt les metodologies d'anàlisi necessàries per a la determinació de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i diversos plaguicides organoclorats (amb especial atenció a l'HCB i DDT) en olis de peix.

Per aquest motiu en aquest capítol s'ha fet una revisió dels mètodes més habituals per l'anàlisi de COPs, amb especial èmfasi als que es duen a terme en el Laboratori Mediambiental de l'IQS per la determinació de PCDD/Fs i PCBs (**apartat 2.2**). La determinació instrumental dels COPs objecte d'estudi s'ha estudiat en l'**apartat 2.3**, mentre que la purificació d'aquests contaminants respecte l'oli de peix es detalla en l'**apartat 2.4**. L'**apartat 2.5** estudia diversos mètodes de fraccionament de les diferents famílies de contaminants. Finalment, el mètode global desenvolupat per a l'anàlisi de COPs en oli de peix és validat en l'**apartat 2.6**.

El correcte funcionament del mètode s'ha posat a prova mitjançant l'anàlisi de diverses mostres reals –incloent complements nutritius, olis de peix industrials destinats al consum humà o animal–(**apartat 2.7**). El capítol finalitza amb la bibliografia citada durant el mateix (**apartat 2.8**).

## **2.2. Metodologia analítica per a l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs**

Els PCDD/Fs i PCBs són contaminants que es solen trobar en concentracions molt baixes en una elevada diversitat de mostres (Srogi, 2008, El-Shahawi *et al*, 2010). Per aquest motiu la seva anàlisi és un procés força complex.

Des que es van començar a analitzar durant els anys 70 (Voogt, 1989), les metodiques emprades han variat molt -sobretot degut al desenvolupament tecnològic que ha sofert el camp de la instrumentació analítica durant els darrers anys-, tot i que habitualment es basa en les etapes d'extracció de la fracció lipídica, purificació de l'extracte, fraccionament dels analits i anàlisi instrumental. A continuació es detalla cadascuna d'aquestes etapes.

### **2.2.1. Extracció de la fracció lipídica de la matriu**

Degut al caràcter apolar dels COPs, aquests es solen trobar concentrats en el greix de les mostres. Per tal de separar-los de la resta de matriu, cal extreure aquest greix amb dissolvents orgànics apolars. En funció del tipus de mostra, el sistema d'extracció pot ser diferent. Les metodologies més habituals són les següents:

- Extracció líquid-líquid: Pel cas de mostres aquoses líquides –com poden ser l'aigua, la sang o la llet- el mètode d'extracció més comú és l'extracció líquid-líquid. La diferència existent entre les polaritats de la mostra (que al ser aquosa és polar) i el dissolvent (ha de ser apolar) fa que ambdós fases siguin immiscibles, i per tant quedin separades. Tots els compostos de caràcter apolar que presenti la mostra originàriament, com són els COPs, passaran a la fase orgànica. És una tècnica que sol funcionar molt bé, amb una extracció quantitativa dels analits d'interès, tot i que presenta com a inconvenients l'elevada quantitat de dissolvent que cal emprar i la possible formació d'emulsions en la interfase. Per aquest motiu s'està tendint a substituir aquesta tècnica per extracció en fase sòlida, amb reïnes polimèriques tipus XAD-2 o cartutxos i discs de C<sub>18</sub> (Montaña, 2000).
- Extracció en Soxhlet: És una de les tècniques tradicionalment més emprades per a l'extracció de COPs en mostres sòlides. Aquesta es basa en successives extraccions dels analits amb el mateix dissolvent, que és reutilitzat a través de la seva evaporació en el matràs de destil·lació i posterior condensació en el cartutx d'extracció. Els dissolvents emprats de forma més habitual són el toluè i el diclorometà. Per tal de millorar aquest procés és important que la mostra no contingui aigua, ja que impediria un correcte contacte entre aquesta i el dissolvent. Per tal d'evitar això, habitualment s'homogeneïtzen les mostres amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre, que absorbeix les traces d'humitat (Grau, 2004).
- Extracció accelerada: La fracció adiposa de la mostra sòlida s'extreu amb dissolvents apolars similars als emprats pel cas del Soxhlet, però sota elevada pressió. Aquest fet augmenta el punt d'ebullició dels dissolvents, reduint la durada del procés al poder realitzar les extraccions a temperatura més elevada. També permet reduir considerablement el volum del dissolvent emprat (Wang *et al.*, 2010).

- Extracció amb fluids supercrítics: Es basa en extreure la fracció apolar de la mostra sòlida amb un fluid (habitualment CO<sub>2</sub>) en condicions de pressió i temperatura per sobre del seu punt crític. En aquestes condicions, el fluid que es genera té una baixa viscositat i alt coeficient de difusió (Kawashima *et al.*, 2006). Un dels principals avantatges d'aquest sistema és que, degut a la seva elevada selectivitat, s'obtenen extractes molt nets, simplificant així la posterior etapa de purificació. Per contrapartida, presenta problemes de robustesa enfront al tipus de matriu, i només permet tractar petits volums de mostra.

És destacable que aquesta etapa d'extracció no és necessària pel cas de les mostres amb un alt contingut adipós, com és el cas de l'oli o el llard.

### 2.2.2. Purificació de l'extracte

De l'anterior etapa s'obté un extracte a on, a part dels analits d'interès, també es coextreuen de forma majoritària altres compostos apolars. Aquests són bàsicament triglicèrids i àcids grassos, que podrien interferir en la posterior anàlisi instrumental, i per això és necessària la seva eliminació. Els mètodes més habituals per a la purificació dels extractes són els que es detallen a continuació:

- Columnes de sílica multicapa: Els COPs són separats de la resta de matriu per la seva elució a través de columnes de sílica amb dissolvents apolars. Aquesta sílica pot estar impregnada de diversos agents químics (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, AgNO<sub>3</sub>...), capaços de degradar el greix de la mostra i d'altres possibles interferents, com és el cas de compostos amb sofre (Grau, 2004).
- Columnes de Florisil: Aquest adsorbent és un silicat magnèsic patentat per la U.S. Silica Company, compost per un 84.0% de SiO<sub>2</sub>, 15.5% de MgO i 0.5% de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre. La principal peculiaritat del Florisil respecte a les columnes de sílica convencionals és que permet separar els COPs respecte d'altres compostos apolars que no es degraden amb les síliques modificades, com és el cas de les ceres. Per aquest motiu sovint s'utilitza en les mostres d'origen vegetal, que solen presentar aquest tipus de compostos (US Silica Company, 2011).
- Tractament amb àcid sulfúric concentrat: Es realitza una partició líquid-líquid entre l'àcid sulfúric i l'extracte –habitualment diluït en algun dissolvent orgànic apolar–, que permet la degradació dels lípids i lipoproteïnes de l'extracte. Els compostos degradats queden en la fase inorgànica, mentre que els COPs romanen en la fase orgànica. Aquest mètode és una tècnica senzilla i ràpida. Per contrapartida, no és possible la seva automatització, i depenent del contingut en greixos de l'extracte pot generar emulsions que dificultin la posterior separació entre fases (Montaña, 2000).

### 2.2.3. Fraccionament dels analits

Cada família de COPs pot constar d'un elevat nombre de congèneres -per exemple, 210 PCDD/Fs, 209 PBDEs o 209 PCBs-. A més, existeix un elevat nombre de compostos que, per la seva similitud amb els analits d'interès, no s'han pogut purificar en les etapes prèvies, com diversos plaguicides o -pel cas demostres d'origen biològic- metabòlits hidroxilats i metoxilats dels propis COPs (Marcè, 2001).

Degut a això, una anàlisi simultània de tots ells seria instrumentalment massa complexa, i és per això que és necessari separar prèviament els contaminants objecte d'estudi per grups o famílies. Els mètodes més comuns per aquest fraccionament són els que s'exposen a continuació:

- Tubs d'extracció en fase sòlida preempaquetats amb carbó: Aquest sistema es basa en l'elució de la mescla de COPs purificada a través de tubs de carbó grafititzat. L'estructura laminar d'aquesta fase estacionària és capaç de separar els analits en funció de la seva planaritat, quedant més retinguts els compostos més plans. L'elevat grau d'empaquetament del carbó fa que les mostres hagin de ser eluïdes connectant els tubs a una bomba de buit. Habitualment aquesta tècnica s'empra per la separació de PCBs respecte de PCDD/Fs (Díaz, 1999). Els PCBs, al ser menys plans, poden ser fàcilment eluïts a través dels tubs d'extracció amb dissolvents apolars (generalment mescles d'hexà i toluè). Els PCDD/Fs, en canvi, queden tant adsorbits en el carbó que pràcticament no penetren dins del tub. Per això, un cop separats els PCBs, cal donar la volta al cartutx i recuperar-los en flux invers.
- HPLC-PYE: En aquesta etapa, la separació es duu a terme en un cromatògraf de líquids equipat amb una columna funcionalitzada amb grups pirenil. El mecanisme de separació és semblant al dels tubs de carbó, per planaritat. Al tractar-se generalment d'analits amb estructura aromàtica, com més plana és la seva configuració més retinguts queden en la fase estacionària, sent eluïts més tard (Haglund *et al*, 1990a). Aquest sistema ofereix una resolució més elevada que l'anterior mètode de fraccionament. Permet la separació de PCDD/Fs i PCBs, i dins d'aquesta última família de contaminants, permet separar els congèneres més plans (PCBs similars a dioxines o coplanars) dels que ho són menys.
- Columnes de Florisil: Aquesta fase estacionària no només es pot emprar en la purificació dels COPs de lípids i ceres (tal com es detalla en l'anterior apartat), sinó que també és capaç de fraccionar les famílies de PCBs i PCDD/Fs. Tot i així, aquesta tècnica no té suficient resolució com per separar els PCBs indicadors dels similars a dioxines.
- Columnes d'alúmina: L'alúmina o òxid d'alumini ( $Al_2O_3$ ) és, juntament amb la sílica, un dels adsorbents més àmpliament utilitzats en el camp de la cromatografia com a fase estacionària, degut a la seva moderada polaritat. Això fa que retengui els compostos més polars, mentre que els compostos més apolars (com és el cas dels COPs) s'elueixen més fàcilment. De la mateixa forma que el Florisil o els tubs de carbó grafititzats, l'alúmina és

capaç de separar la família de les PCDD/Fs i els PCBs. Tot i així, no és capaç de fraccionar els PCBs indicadors dels similars a dioxines (Concejero *et al.*, 2001).

- Columnes d'adsorbents basats en carbó: Aquesta família d'adsorbents es tracta de carbons -generalment d'origen vegetal- amb diverses estructures, mides de partícula i funcionalitzacions, per tal de modificar-ne les propietats com a fase estacionària. Són comercialitzats per diverses empreses, entre els quals cal destacar l'Amoco PX-21 (SDS, França) o el Carbonsphere (Crompack, Holanda). Les columnes cromatogràfiques d'aquest material són capaces de separar les PCDD/Fs i PCBs en diferents fraccions. A més, ofereix suficient resolució com per separar alguns grups de PCBs en funció de les seves substitucions. Tot i així, no és capaç de separar completament els PCBs *no-orto* dels *mono-orto*, pel que la separació completa entre PCBs indicadors i similars a dioxines tampoc és completa (Concejero *et al.*, 2001).

#### 2.2.4. Determinació instrumental dels COPs

Degut a que els COPs solen ser volàtils o semi-volàtils, la seva anàlisi es duu a terme mitjançant cromatografia de gasos. Depenent de l'anàlisi en qüestió, la seva detecció es pot realitzar mitjançant un detector de captura d'electrons (HRGC-ECD) (Korytár *et al.*, 2005) o espectrometria de masses d'alta resolució (HRGC-HRMS). És necessari que aquests sistemes instrumentals tinguin baixos límits de detecció, ja en que la determinació de compostos que estan a nivell d'ultra traça és necessari poder determinar concentracions d'anàlisi molt petites.

Històricament, en el camp dels COPs s'ha emprat la detecció per captura d'electrons (Rodríguez, 1996) ja que es tracta de un detector amb límits de detecció molt baixos i selectiu pels compostos amb grups electronegatius –com és el cas de la majoria d'aquests contaminants, que tenen grups halogenats-. Aquesta tècnica encara s'empra en l'actualitat per a l'anàlisi de compostos que es troben en concentracions relativament més elevades (de l'ordre dels nanograms per gram de mostra) i que per tant es veuen menys influenciats per possibles interferents de concentracions més baixes. Aquest és el cas dels plaguicides organoclorats i els PCBs que es trobaven en major concentració en les mesclures tècniques d'Aroclors, també anomenats PCBs indicadors (Glynn A, 2009).

D'altres famílies de contaminants –com és el cas dels PCDD/Fs o els PCBs similars a dioxines- necessiten sistemes de detecció que siguin encara més selectius, ja que poden comprendre un gran nombre de congèneres molt semblants entre ells. És en aquest cas que s'empra la detecció per espectrometria de masses d'alta resolució, que –posterior a la separació cromatogràfica- és capaç de discriminar entre masses molt semblants (habitualment es treballa a resolució 10.000) amb límits de detecció molt baixos (Díaz, 1999).

El fet que les mètodes per a l'anàlisi per a COPs siguin tant llargues i complexes fa que sovint existeixin inevitables pèrdues d'anàlisi durant el procés. Per aquest motiu és necessari treballar amb addició de patró intern al inici de l'anàlisi, que permetrà quantificar aquestes pèrdues i poder així corregir aquest error.

La detecció dels analits per espectrometria de masses ens permet treballar segons el mètode de dilució isotòpica (EPA 1613 Method, 1994), que es basa en l'ús dels mateixos congèneres de PCDD/Fs i PCBs objecte d'estudi marcats amb  $^{13}\text{C}$  com a patró intern. Aquests congèneres tenen un comportament químic idèntic però el seu diferent pes molecular fa que puguin ser diferenciats per espectrometria de masses.

### **2.2.5. Mètodes d'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs del Laboratori Mediambiental de l'IQS**

El Laboratori Mediambiental de l'IQS té una gran experiència en el camp de l'anàlisi de COPs, especialment per al cas dels PCDD/Fs i PCBs. Els mètodes analítics emprats es basen en les etapes d'anàlisi habituals per a aquest tipus de compostos comentades anteriorment: extracció de la fracció lipídica, purificació de l'extracte, fraccionament dels analits i anàlisi instrumental.

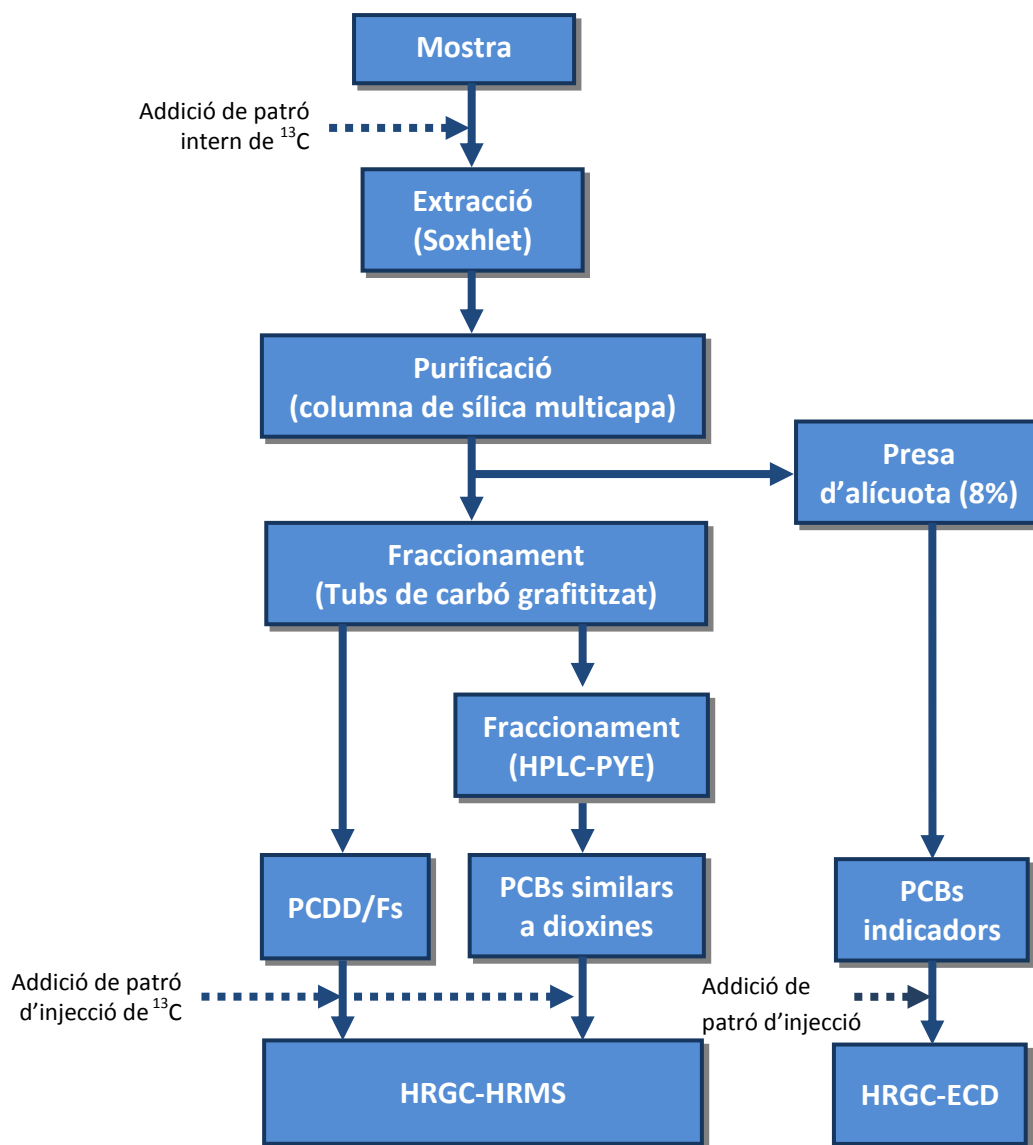
Cal destacar que el fraccionament es sol dur a terme en dues etapes. Inicialment es separen PCDD/Fs de la resta de contaminants mitjançant tubs de carbó grafititzat. A continuació, els PCBs similars a dioxines es separen de la resta de PCBs i d'altres interferents mitjançant el sistema HPLC-PYE.

Un cop obtingudes cadascuna de les fraccions, es concentren les mostres a volums molt reduïts (entorn 15-20  $\mu\text{l}$ ) amb un suau flux de nitrogen. Això fa que els analits es trobin més concentrats en l'extracte i, per tant, es rebaixen els límits de detecció del mètode.

Prèviament a l'anàlisi instrumental, s'addiciona un patró d'injecció o xeringa a cada fracció. Aquest fa que el resultat final no sigui directament dependent del volum a que s'ha concentrat la mostra -que és un paràmetre difícil de controlar-, a part de corregir problemes de reproduïbilitat durant la injecció.

Pel que fa als PCBs indicadors, no és necessari fraccionar-los, ja que es troben a concentracions més elevades que la resta d'analits i per tant no es veuen tant influenciats per les possibles interferències. Per a aquest motiu s'analitza una alíquota de l'extracte purificat del 8%, prèviament al fraccionament, mitjançant HRGC-ECD.

Així doncs, la metodologia per a l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs que es duu habitualment en el Laboratori Mediambiental de l'IQS és el que es pot observar en la *Figura 2.1*.



**Figura 2. 1.** Esquema de la metodologia d'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs.

Tot i així, es desconeix si aquests mètodes validats per l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs són igualment útils per altres contaminants objecte d'estudi en la present tesi, com PBDEs, DDTs i HCB. Per aquest motiu el principal objectiu del present capítol és el desenvolupament d'un mètode per a la determinació de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs, DDTs i HCB en oli de peix basant-se en les etapes d'anàlisi descrites en la figura anterior.

Com que la matriu d'estudi és l'oli de peix, no és necessària una etapa prèvia d'extracció de la fracció lipídica de la matriu, doncs es tracta d'un tipus de greix de per sí. Les etapes estudiades amb més profunditat són la purificació dels analits en columna de sílica multicapa, fraccionament de les diferents famílies de contaminants i determinació instrumental.

Cal destacar que durant tot el desenvolupament analític que s'ha dut a terme en aquest capítol, s'ha estudiat amb particular atenció el cas dels PBDEs. Al tractar-se de un contaminant emergent, no es disposava de tanta informació i experiència en la seva anàlisi com pel cas dels altres contaminants.

### 2.3. Determinació instrumental dels COPs

Tot i que seqüencialment és l'última etapa analítica, prèviament als estudis de purificació i fraccionament dels contaminants és necessari la posada al punt d'un mètode cromatogràfic que permeti la millor separació possible dels analits.

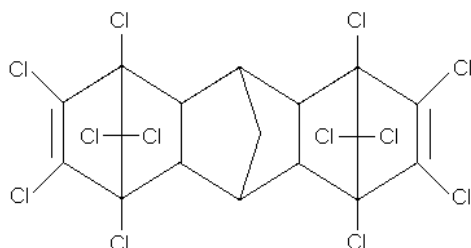
Per tal d'assolir aquest objectiu de forma més comprensiva i facilitar la identificació dels compostos, s'ha estudiat la separació de PBDEs i plaguicides organoclorats per separat, per acabar establint un mètode cromatogràfic global per la separació de totes les famílies de COPs objecte d'estudi.

#### 2.3.1 Determinació instrumental de PBDEs

Els PBDEs són COPs estructuralment molt semblant a les PCDD/Fs o PCBs (dos anells benzènics units per un grup éter) tot i que es tracta de compostos bromats. Això fa que els pesos moleculars dels PBDEs siguin molt més elevats que els dels COPs clorats, amb tots els problemes instrumentals que això suposa i que s'exposaran a continuació. Dels possibles 209 PBDEs que existeixen, el present estudi s'ha centrat en els 8 congèneres característics de seguiment recomanats per l'Agència de Protecció del Medi Ambient Americana (EPA 1614 Method, 2007). Aquests són els BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 i -209.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquesta anàlisi es durà a terme mitjançant HRGC-HRMS, degut a les baixes concentracions que solen presentar en oli de peix (Blanco i Vieites, 2010) i al gran nombre de possibles interferents que poden tenir. Tot i així, inicialment s'ha optimitzat un mètode cromatogràfic per a la separació d'una mescla de patrons dels 8 congèneres d'estudi emprant HRGC-ECD, ja que és una tècnica més ràpida i senzilla –e igualment vàlida per a l'estudi cromatogràfic-.

Per tal d'augmentar la repetibilitat de les mesures es fa servir la tècnica del patró d'injecció, que fa negligible les petites variacions experimentals que es puguin donar durant aquesta etapa. Aquest patró ha de ser un compost amb propietats quimicofísiques semblants als analits objecte d'estudi, però no ha d'interferir cromatogràficament en la seva anàlisi. Per al cas dels PBDEs, s'ha seleccionat el Dechlorane® (Figura 2.2).



**Figura 2. 2.** Estructura del Dechlorane®.



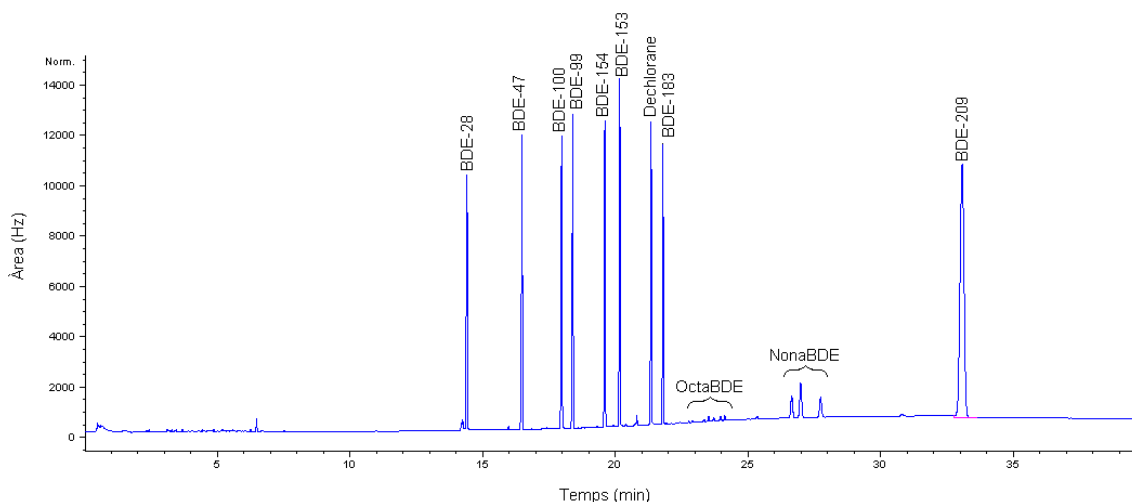
Inicialment s'ha realitzat una recerca bibliogràfica dels mètodes instrumentals existents per a l'anàlisi de PBDEs, per tal d'establir unes condicions cromatogràfiques de partida. Els mètodes seleccionats han estat el recomanat per l'EPA (EPA 1614 Method, 2007), els de les cases comercials Agilent (Khun *et al.*, 2003) i Thermo (Thermo Scientific, 2005), i un mètode desenvolupat en el propi laboratori en estudis previs (Bernshtam, 2005). Aquestes condicions cromatogràfiques es poden trobar resumides en la *Taula 2.1*.

**Taula 2. 1.** Condicions cromatogràfiques inicials per a l'anàlisi de PBDEs.

	Mètode EPA	Mètode Agilent	Mètode Thermo	Mètode IQS
Columna	DB-5HT, 30m x 0.25mm x 0.1µm	DB-XLB, 30m x 0.25mm x 0.1µm	TR-5MS, 15m x 0.25mm x 0.1µm	RTX-5MS, 15m x 0.25mm x 0.25µm
T injector	300°C	Cool-on-column	280°C	330°C
V d'injecció	1 µl	0.5 µl	1 µl	2 µl
Flux	He, 3 ml/min	He, 1 ml/min	He, 1 ml/min	He, 3 ml/min
Programa de T	100°C (3 min), fins a 320°C a 5°C/min (5 min)	100°C (1 min), fins a 340°C a 20°C/min (12 min)	120°C (2 min) fins 230°C a 15°C/min, fins 270°C a 5°C/min, fins 330°C a 10°C/min (5 min)	100°C (3 min), fins a 300°C a 10°C/min (37 min)
T detector	320°C	325°C	280°C	330°C

El cromatògraf que s'ha utilitzat és un Agilent 6890-N, equipat amb un detector de captura d'electrons (Santa Clara, EUA). El patró de PBDEs que es fa servir per a l'estudi de la seva separació va ser adquirit a Cambridge Isotope Laboratories Inc. (New Haven, EUA), fent servir per a l'estudi una dilució de 100 ng/ml per al cas dels PBDEs i el Dechlorane®. El BDE-209 és l'únic congènere amb una concentració diferent, de 1000 ng/ml.

Per motius de disponibilitat, totes les proves es van dur a terme en columnes capil·lars tipus RTX-5MS (de 15 o 30 metres, depenent el cas), que és una fase semblant a la proposada en els mètodes bibliogràfics de l'EPA i Thermo (5% fenil 95% dimetilsiloxà). La millor separació de tots els congèneres amb uns temps de cromatografia raonables va ser el quart (mètode experimental). El cromatograma que s'obté amb aquest mètode es mostra en la *Figura 2.3*.



**Figura 2. 3.** Separació cromatogràfica dels PBDEs.

Es pot observar que la separació obtinguda en aquestes condicions cromatogràfiques és força satisfactòria, ja que tots els pics apareixen ben resolts, estrets, sense solapar-se i sense cues per davant o per darrere. La identificació d'aquestes senyals s'ha realitzat mitjançant la informació subministrada pel proveïdor, bibliografia existent (Mydlová *et al.*, 2007) i –pel cas del Dechlorane®- pel temps de retenció observat en una injecció del patró per separat. La majoria de PBDEs han mostrat uns temps de retenció entre 14 i 22 minuts, amb un ordre d'elució que segueix el grau de bromació dels compostos.

És destacable el comportament cromatogràfic del BDE-209. Aquest congènere apareix molt més tard –entorn al minut 33- i amb una amplada de pic superior a la resta de congèneres, ja que al tractar-se d'un compost decabromat el seu pes molecular és molt superior (959 g/mol). En el cromatograma també s'observen petits pics corresponents a octa- i nona-BDEs (que no figuren en la mescla de patrons inicial) producte de la degradació tèrmica del BDE-209 a congèneres menys bromats.

La repetibilitat instrumental s'ha avaluat mitjançant el càlcul del coeficient de variació (CV) corresponent a la injecció de deu repeticions de la mescla de patrons. Els càlculs s'han realitzat per àrees i alçades de pic, i corregint el valor respecte el patró d'injecció i sense. Els resultats es mostren en la *Taula 2.2*.

**Taula 2. 2.** Estudi de repetibilitat instrumental dels PBDEs.

Congènere	Àrees		Alçades	
	CV (%)	CV corr (%)	CV (%)	CV corr (%)
BDE-28	4.7	1.3	6.3	5.4
BDE-47	5.0	1.6	6.8	5.7
BDE-100	4.5	1.1	5.3	4.9
BDE-99	5.6	2.1	6.2	5.5
BDE-154	4.7	1.2	4.1	4.3
BDE-153	6.1	2.4	6.1	5.1
Dechlorane	3.8	-	3.2	-
BDE-183	5.4	1.9	5.8	4.3
BDE-209	5.4	2.2	6.6	4.5

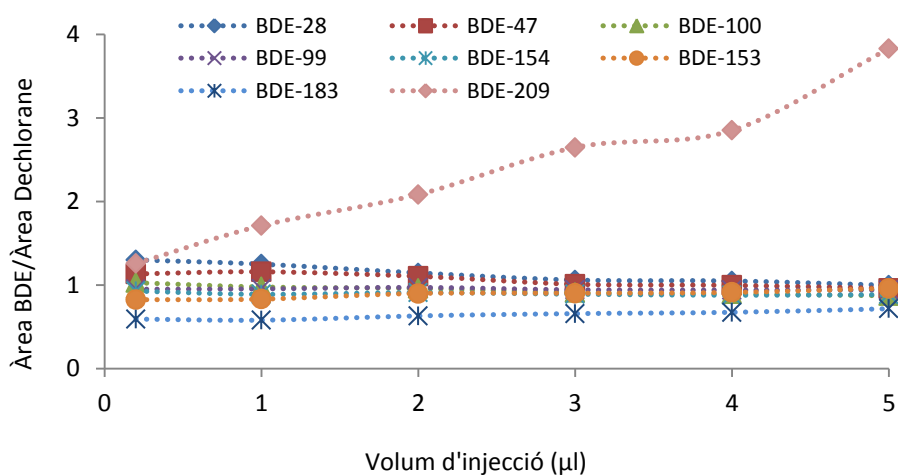
Es pot observar que en tots els casos la repetibilitat és molt bona, sempre inferior al 7%. Els coeficients de variació són lleugerament inferiors quan es quantifiquen els senyals per àrees en lloc de per alçades, i que la precisió augmenta quan es corregeix aquest valor amb el patró d'injecció (CV < 3%). En conseqüència la quantificació de PBDEs es realitzarà mitjançant les seves àrees corregides respecte el patró d'injecció.

Un cop establertes les condicions cromatogràfiques inicials, es va decidir d'optimitzar certs paràmetres cromatogràfics que tenen una elevada repercussió en el resultat final, com és el cas del volum d'injecció, la temperatura del detector i la longitud de la columna. També s'ha estudiat l'efecte de l'estat d'aquesta columna (nova o usada) en la separació cromatogràfica.

### Volum d'injecció.

Els sistemes d'injecció més habituals dels cromatògrafs de gasos actuals permeten realitzar injeccions entre 0.1 i 5 µl. Com menor és aquest volum d'injecció més ràpida és la volatilització de la mostra (i per tant la separació és més bona al entrar l'analit més ràpidament al cap de columna), però el límit de detecció és major. Per contrapartida, quan s'injecten volums elevats de mostra, el límit de detecció és més baix (entra més quantitat d'analit al cromatògraf) però pot generar cues degudes a que la mostra no s'ha volatilitzat suficientment ràpid, fins al punt de solapar-se els pics.

Per a optimitzar aquest paràmetre per al cas dels PBDEs, es van realitzar injeccions de l'anterior mescla de patrons de 100 ng/ml (1000 ng/ml pel BDE-209) amb volums compresos entre 0.2 i 5 µl. La relació de l'àrea corregida de cada PBDE respecte al volum d'injecció es pot observar en la *Figura 2.4*.



**Figura 2. 4.** Estudi del volum d'injecció dels PBDEs.

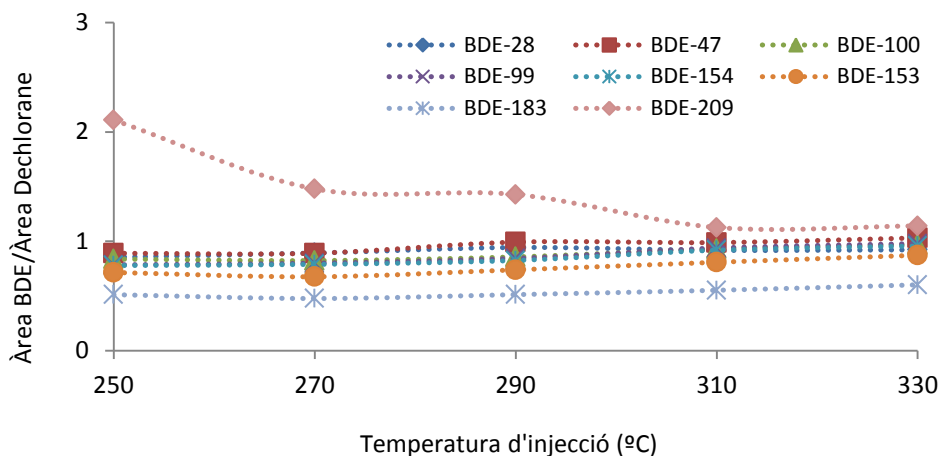
Tal i com es pot observar en la figura, el factor de resposta es va mantenir constant al llarg de tots els volums d'injecció, excepte pel cas del BDE-209. En aquest cas, la sensibilitat del instrument augmenta amb la quantitat de mostra injectada. Això indica que en augmentar el volum d'injecció proporcionalment es dona menys degradació en el injector.

Cal tenir en compte que durant una anàlisi convencional de mostres reals, l'efecte matriu (presència d'altres interferents no purificats) augmenta amb el volum d'injecció, fet que no es pot apreciar al treballar amb patrons. Per aquest motiu, per tal d'obtenir una bona sensibilitat amb un efecte matriu moderat s'ha determinat com a compromís que el volum d'injecció més adequat és el de 2 µl.

### Temperatura d'injecció.

La temperatura d'injecció també pot ser un paràmetre cromatogràfic crític en l'anàlisi de certs COPs. Una temperatura massa baixa no permet la correcta volatilització dels analits, mentre que si aquesta és massa alta es poden degradar en el injector.

Per a l'optimització d'aquest paràmetre es va analitzar l'anterior mescla de patrons amb temperatures d'injecció entre 250 i 330°C. Els resultats observats es mostren en la següent figura (Figura 2.5).



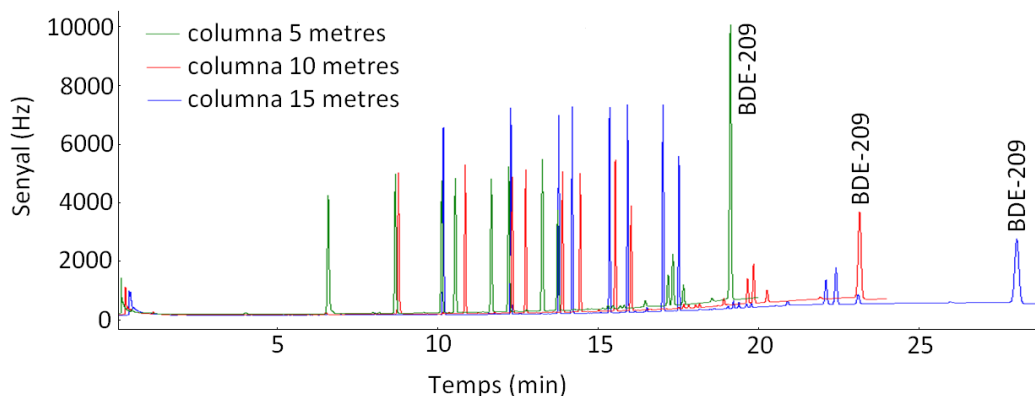
**Figura 2. 5.** Estudi de la temperatura d'injecció dels PBDEs.

En augmentar la temperatura d'injecció la majoria de PBDEs es volatilitzen més efectivament, amb un lleuger increment dels seus senyals. L'única excepció és el BDE-209, que mostra un elevat grau de degradació a altes temperatures. Com a situació de compromís es va determinar que la millor temperatura d'injecció per a tots els congèneres és a 270°C.

### Longitud de la columna cromatogràfica.

Un altre paràmetre cromatogràfic que s'ha estudiat és la longitud de la columna cromatogràfica. Novament cal establir una solució de compromís, ja que com més llarga és la columna més capacitat de separació té, però els pics també són més amples i es pot donar una major degradació dels analits en la columna. A més, els temps de cromatografia són més llargs.

Per a la realització de l'estudi s'ha injectat la mescla de patrons de PBDEs en columnes de 5% fenil 95% dimetilsiloxà amb longituds de 5, 10 i 15 metres. Els cromatogrames que se n'obtenen es mostren en la Figura 2.6.



**Figura 2. 6.** Influència de la longitud de la columna en la separació de PBDEs.

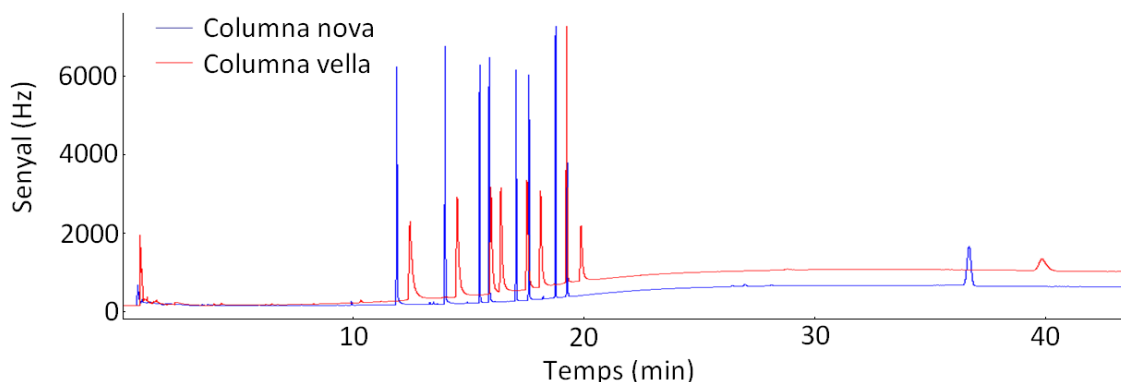
Les àrees –corregides respecte al patró d'injecció– per la majoria de congèneres van ser similars en les tres columnes, amb l'única excepció del BDE-209. Pel fet de ser un compost més inestable (Kierkegaard *et al.*, 2009), aquest contaminant mostra senyals de menor àrea i alçada en augmentar la longitud de la columna, al degradar-se més.

Per aquest motiu és recomanable l'ús de columnes de 5 metres per a l'anàlisi del BDE-209. També es pot emprar aquesta longitud de columna per a la separació de la resta de contaminants sempre que no s'observin problemes d'interferències amb altres compostos. Alternativament, també es pot usar una columna més llarga que ofereixi més resolució (15 m) per analitzar els PBDEs, i una columna més curta (5 m) per l'anàlisi del BDE-209.

### Estat de la columna cromatogràfica

Les columnes cromatogràfiques capil·lars poden veure disminuïda la seva capacitat de retenció quan han estat exposades de forma prolongada a altes temperatures. Per avaluar com afecta aquest fet en l'anàlisi de PBDEs s'ha estudiat aquesta separació en dues columnes de 5% fenil 95% dimetilsiloxà de 15 metres.

En aquest cas, una era nova i la altra havia estat usada de forma intensiva durant un període de 3 mesos per l'anàlisi de PCDD/Fs. Els cromatogrames obtinguts es mostren en la *Figura 2.7*.



**Figura 2. 7.** Efecte de l'estat de la columna en la separació de PBDEs.

La columna nova va mostrar millor resolució de pics, menys cues i temps de retenció inferiors. Com era d'esperar, l'envelliment de les columnes afecta negativament l'anàlisi cromatogràfica dels PBDEs, al crear punts actius on els analits queden retinguts en excés. Aquest fenomen és especialment destacable en cas del BDE-209, a on l'alçada del seu pic cromatogràfic disminueix a menys de la meitat al emprar la columna més vella. En conseqüència, es conclou que l'estat de la columna cromatogràfica és determinant en l'anàlisi de PBDEs.

Així doncs, les condicions cromatogràfiques millorades per a l'anàlisi de PBDEs que s'han determinat experimentalment són les que es mostren en la *Taula 2.3*.

**Taula 2. 3** *Condicions cromatogràfiques millorades per a l'anàlisi de PBDEs.*

Paràmetre cromatogràfic	Valor
Columna	RTX-5MS
Longitud, diàmetre i espesor de la fase de la columna	5m x 0,25 mm x 0,25µm
Gas portador	He
Flux del gas portador	3 ml/min
Temperatura de l'injector	270 °C
Tipus d'injecció	splitless (1 min)
Flux d'split	30 ml/min
Detector	µECD
Temperatura del detector	350 °C
Gas auxiliar	N <sub>2</sub>
Flux del gas auxiliar	30 ml/min
Volum d'injecció	2 µl
Programa de temperatures	100°C (3 min) a 10°C/min fins 300°C (37 min)

### Detecció dels PBDEs per espectrometria de masses d'alta resolució

Com s'ha comentat anteriorment, l'ús de l'espectrometria de masses per a la detecció de PBDEs en mostres reals és pràcticament imprescindible, degut a les baixes concentracions en que es solen trobar en qualsevol tipus de matriu i l'elevat nombre d'interferents que poden presentar (de la Cal *et al.*, 2003). En aquest apartat s'ha estudiat la determinació d'aquests contaminants per HRGC-HRMS basant-se en la separació cromatogràfica determinada experimentalment en l'anterior apartat.

Mitjançant aquesta tècnica, els analits d'interès (que ja han estat separats prèviament per cromatografia) es seleccionen en funció de la seva massa molecular, augmentant així la selectivitat i la sensibilitat –es disminueix el soroll- de l'anàlisi. És important el fet de treballar en el camp de l'alta resolució, ja que només així es poden assolir els límits de detecció i selectivitat necessàries per a aquest tipus d'anàlisi (Marcè, 2001).

A més, aquesta tècnica permet la possibilitat de treballar segons el mètode de dilució isotòpica, que permet corregir les pèrdues d'analit que tenen lloc durant les etapes de preparativa de mostra.

D'acord amb els mètodes de referència (EPA 1614 Method, 2007) i diverses proves prèvies realitzades, es decideix treballar mitjançant ionització per impacte electrònic (35 eV) a una resolució de 10.000. L'espectrometria de masses ofereix un altre avantatge: la possibilitat de monitoritzar diverses masses simultàniament. Gràcies a això es pot fer el seguiment de dos isòtops diferents per a cada analit. El compliment d'aquesta proporció isotòpica -que ve determinat per la pròpia naturalesa de l'element- és un altre criteri d'identificació.

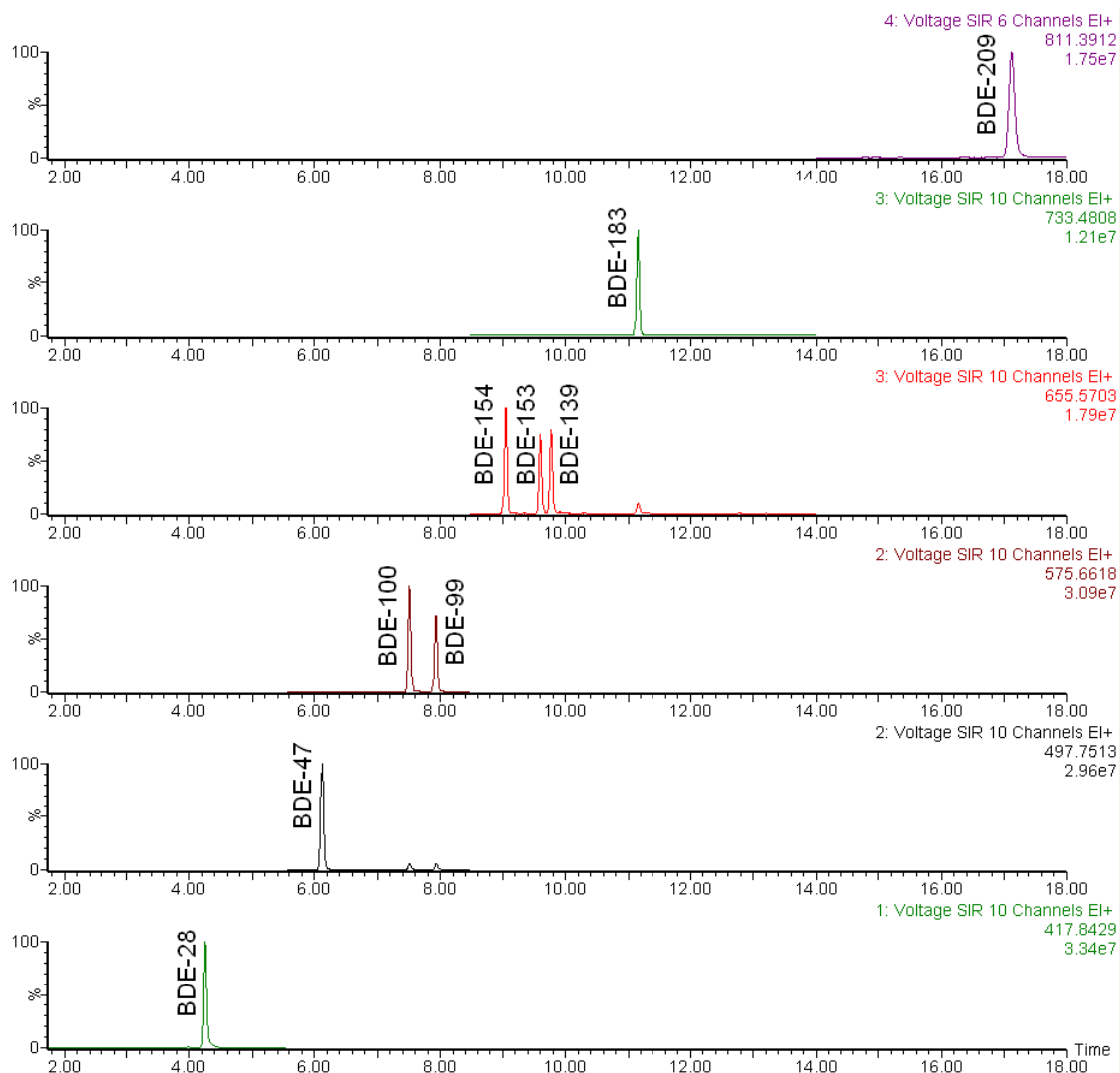
Així doncs, es realitza el seguiment de quatre masses per cada un dels PBDEs estudiats; dos isòtops dels congèneres natius ( $^{12}\text{C}$ ) i dos més del patró intern ( $^{13}\text{C}$ ). Aquestes són les que es mostren en la *Taula 2.4*.

**Taula 2. 4.** Masses monitoritzades per a l'anàlisi de PBDEs.

Grup d'homòlegs	Masses monitoritzades de $^{12}\text{C}$		Masses monitoritzades de $^{13}\text{C}$	
Tri-BDE	405.8046	407.8006	417.8429	419.8409
Tetra-BDE	483.7131	485.7111	495.7533	497.7513
Penta-BDE	563.6215	565.6195	575.6618	577.6598
Hexa-BDE	641.5320	643.5300	653.5723	655.5703
Hepta-BDE	721.4405	723.4385	733.4808	735.4788
Deca-BDE (-2Br)	797.2354	799.3334	809.3756	811.3736

La ionització de la mostra es realitza per impacte electrònic. Al treballar a potencials de ionització relativament baixos (35 eV) la majoria de PBDEs es ionitzen sense fragmentar. El BDE-209 n'és l'única excepció, ja que al potencial de ionització de treball el fragment corresponent a la pèrdua de dos àtoms de brom és el majoritari.

El cromatograma que s'obté en aquestes condicions instrumentals d'una mescla de  $^{13}\text{C}$ -PBDEs a una concentració de 50 ng/ml és el que es mostra en la *Figura 2.8*.



**Figura 2. 8.** Cromatograma HRGC-HRMS del patró de PBDEs

Un altre factor que pot afectar als resultats finals és l'estratègia de quantificació emprada. Això vol dir amb quants patrons i de quina concentració es realitza la corba de calibratge, respecte a la qual es quantificarà la mostra.

En l'anàlisi de PBDEs per HRGC-HRMS, les dissolucions de calibratge comercials (Cambridge Isotope Laboratories Inc., EUA) tenen concentracions de 1, 5, 50, 500 i 2500 ng/ml – anomenades de CS1 a CS5 respectivament-. Per tal de decidir quina és la millor corba de calibratge, s'ha quantificat un patró de concentració coneguda (CS3) com si fos una mostra, i s'ha estudiat la desviació del valor obtingut amb el real (exactitud).

Al quantificar el patró amb una corba incloent els cinc patrons, s'obté una variabilitat promig del 27%. Si es quantifica emprant de CS2 a CS5 aquesta desviació disminueix fins al 3%. Si es fa servir de CS2 a CS4 la desviació és del 1.7%, i de CS3 a CS5 del 3.2%.

Es pot observar que quan s'inclou el patró de concentració més baixa en la corba de calibratge, les desviacions promig augmenten significativament. Tenint en compte que per la resta de corbes les desviacions són totes baixes i del mateix ordre, es decideix que la millor quantificació s'obté emprant de CS2 a CS5 –sempre que els valors de la mostra que s'estigui



quantificant es trobin entre 5 i 2500 ng/ml-, ja que així la corba té un abast de concentracions major.

El mètode de quantificació de la dilució isotòpica també necessita un patró d'injecció per a la quantificació final. Aquest patró ha de tenir un caràcter químic similar al dels analits però no pot interferir en la determinació instrumental. Per aquest motiu es van avaluar dos patrons d'injecció comercials, els  $^{13}\text{C}$  PCB-52+ $^{13}\text{C}$  PCB-138 i el  $^{13}\text{C}$  BDE-139.

Quan es va quantificar CS3 com si fos una mostra amb la corba de calibració de CS2 a CS5, es va observar menor desviació global emprant el BDE-139 (8.8%) que amb els PCB-52+PCB-138 (17.1%). D'aquesta manera es determina que el  $^{13}\text{C}$  BDE-139 és el patró d'injecció més adequat.

### 2.3.2. Determinació instrumental de plaguicides organoclorats

Aquest apartat no només s'ha centrat en els plaguicides objecte d'estudi en la present tesi doctoral –DDTs i HCB- sinó que s'ha ampliat amb molts d'altres contaminants de la mateixa família. Amb aquesta finalitat s'ha adquirit un patró que contenia una barreja de 26 plaguicides organoclorats diferents (Dr. Ehrenstorfer GmbH ,Ausbürg, Alemanya).

Alguns d'ells es troben descrits com a COPs segons el conveni d'Estocolm (UNEP, 2005), com per exemple el DDT i metabòlits, HCB, Aldrin, Endrin, Dieldrin o Mirex. El patró també contenia 6 PCBs indicadors. La composició exacta d'aquest es detalla en la *Taula 2.5*.

**Taula 2. 5.** Composició del patró de plaguicides organoclorats estudiats.

Compost			
alpha-HCH	2,4'-DDE	alpha-Endosulfan	trans-Chlordane
beta-HCH	4,4'-DDE	beta-Endosulfan	Mirex
gamma-HCH	2,4'-DDD	Heptachlor	PCB-28
delta-HCH	4,4'-DDD	Methoxychlor	PCB-52
epsilon-HCH	Aldrin	Heptachlor-exo-epoxide	PCB-101
Hexaclorobenzene	Endrin	Heptachlor-endo-epoxide	PCB-138
2,4'-DDT	Dieldrin	oxy-Chlordane	PCB-153
4,4'-DDT	Isodrin	cis-Chlordane	PCB-180

El mètode cromatogràfic de partida ha estat basat en la documentació subministrada pel fabricant del patró. Per intentar millorar la separació, s'han provat diversos tipus de columna.

S'ha observat que amb columnes amb cert caràcter polar com la DB-DIOXIN (60m x 0,25 mm x 0,25µm) els analits de major polaritat –com és el cas dels DDTs- queden massa retinguts i amb pics amples i asimètrics. Per això s'ha decidit utilitzar una columna més apolar com és la ZB-5 (60m x 0.25 mm x 0.25µm, composició: 5% fenil 95% dimetilsiloxà).

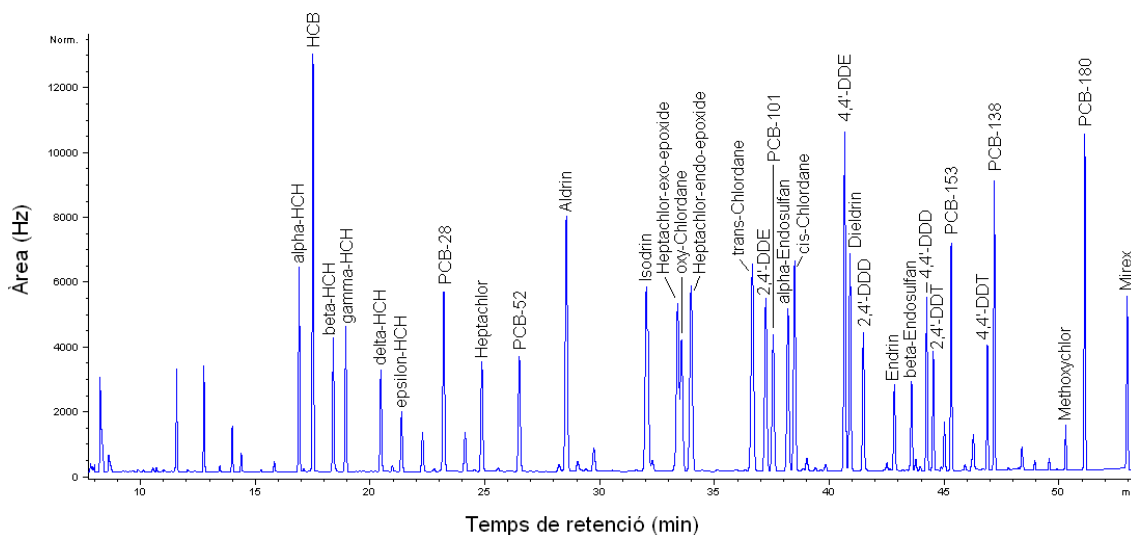
El programa de temperatures del forn també s'ha dissenyat per tal d'oferir la major resolució possible. El mètode cromatogràfic que ha ofert la millor separació dels plaguicides és el següent (Taula 2.6):

**Taula 2. 6.** Mètode cromatogràfic per a la separació de plaguicides organoclorats.

Paràmetre cromatogràfic	Valor
Columna	ZB-5 (60m x 0.25 mm x 0.25µm)
Gas portador	He, 1 ml/min
Temperatura del injectador	300 °C
Tipus d'injecció	splitless (1 min)
Flux de Split	30 ml/min
Detector	µECD
Temperatura del detector	350 °C
Volum d'injecció	2 µl
Programa de temperatures	De 100 a 195°C a 20°C/min, de 195 a 210°C a 0,5°C/min, de 210 a 280°C a 5°C/min (15 min)

La identificació dels pics s'ha realitzat mitjançant el temps de retenció corresponents a les anàlisis d'alguns dels plaguicides per separat (DDTs i metabòlits, HCB, hexaclorociclohexà i PCBs), i la resta amb la documentació subministrada pel fabricant.

En les condicions cromatogràfiques exposades a la Taula 2. 6 el cromatograma que s'obté d'una dissolució de 300 ng/ml de cada compost és el que es mostra en la Figura 2.9.



**Figura 2. 9.** Cromatograma de la mescla de plaguicides organoclorats i PCBs indicadors.

Com es pot observar, en aquestes condicions cromatogràfiques tots els plaguicides s'han pogut determinar sense interferències. Les úniques excepcions són pel cas de l'Heptaclor-exo-èpoxid i l'oxi-clordà, que no s'han pogut separar en la seva totalitat.

En aquest cas la repetitivitat instrumental (N=10) segueix sent bona, amb coeficients de variació inferiors al 10% tot i no haver utilitzat patró d'injecció. També s'ha estudiat la linealitat de resposta respecte a diversos volums d'injecció (entre 0.2 i 5 µl), observant-se un bon ajust entre els senyals i les concentracions.

### **2.3.3. Determinació instrumental simultània de PBDEs, PCBs, PCDD/Fs i plaguicides organoclorats.**

S'ha desenvolupat un mètode cromatogràfic global per a la separació simultània de PBDEs, PCBs, PCDD/Fs i plaguicides organoclorats, prenent com a partida les condicions cromatogràfiques més adequades per a cada família de contaminants determinades previament.

Cal destacar que l'objectiu d'aquest apartat no és el de resoldre totes les interferències que s'observin, ja que cromatogràficament seria força complex degut a l'elevat nombre d'analits i la semblança existent entre ells. L'objectiu principal és la d'obtenir la millor separació cromatogràfica possible de cada un dels contaminants. Posteriorment s'estudiarà la separació de les interferències observades a través de l'etapa de fraccionament.

Novament, aquest estudi s'ha dut a terme mitjançant detecció per captura d'electrons (HRGC-ECD), ja que només es pretenia estudiar la separació cromatogràfica. A més, s'ha realitzat amb patrons concentrats de COPs, pel que no hi ha problemes de límits de detecció.

Primerament s'ha preparat una mescla de patrons que contingués tots els analits objecte d'estudi, que en total són més de 70. La composició d'aquesta mescla de patrons, juntament amb les seves concentracions, es poden observar en la *Taula 2.7*.

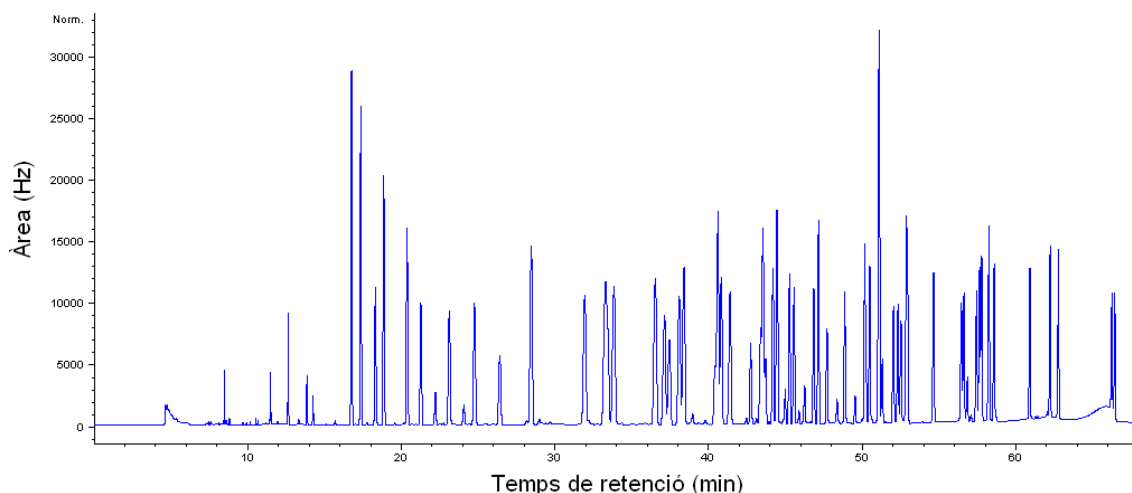
**Taula 2. 7. Composició del patró mescla de contaminants.**

Compost	Concentració (ng/ml)	Compost	Concentració (ng/ml)	Compost	Concentració (ng/ml)
alpha-HCH	300	alpha-Endosulfan	300	OCDD	400
beta-HCH	300	beta-Endosulfan	300	PCB-81	200
gamma-HCH	300	Heptachlor-exo-epoxi	300	PCB-77	200
delta-HCH	300	Heptachlor-endo-epoxi	300	PCB-105	200
epsilon-HCH	300	oxy-Chlordane	300	PCB-114	200
Hexaclorobenzene	300	cis-Chlordane	300	PCB-118	200
PCB-28	300	trans-Chlordane	300	PCB-123	200
PCB-52	300	Mirex	300	PCB-126	200
PCB-101	300	2,3,7,8-TCDF	40	PCB-156	200
PCB-138	300	1,2,3,7,8-PeCDF	200	PCB-157	200
PCB-153	300	2,3,4,7,8-PeCDF	200	PCB-167	200
PCB-180	300	1,2,3,4,7,8-HxCDF	200	PCB-169	200
2,4'-DDT	300	1,2,3,6,7,8-HxCDF	200	PCB-170	200
4,4'-DDT	300	2,3,4,6,7,8-HxCDF	200	PCB-180	200
2,4'-DDD	300	1,2,3,7,8,9-HxCDF	200	PCB-189	200
4,4'-DDD	300	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	200	BDE-28	100
2,4'-DDE	300	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	200	BDE-47	100
4,4'-DDE	300	OCDF	400	BDE-99	100
Aldrin	300	2,3,7,8-TCDD	40	BDE-100	100
Endrin	300	1,2,3,7,8-PeCDD	200	BDE-153	100
Dieldrin	300	1,2,3,4,7,8-HxCDD	200	BDE-154	100
Isodrin	300	1,2,3,6,7,8-HxCDD	200	BDE-138	100
Heptachlor	300	1,2,3,7,8,9-HxCDD	200	BDE-209	1000
Methoxychlor	300	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	200		

Experimentalment s'ha comprovat que les condicions instrumentals desenvolupades per a l'anàlisi de plaguicides no són vàlides en aquest cas, ja que les dioxines i furans policlorats tenen temps de retenció més elevats que la durada del mètode cromatogràfic.

Per tal de solucionar aquest problema, s'ha modificat el programa de temperatures. En aquest cas, després d'estar 5 minuts a 280°C es torna a augmentar la temperatura fins a 320°C a 5°C/minut, temperatura que es manté durant 10 minuts més. La resta de paràmetres no han estat modificats respecte als exposats en la *Taula 2. 6*.

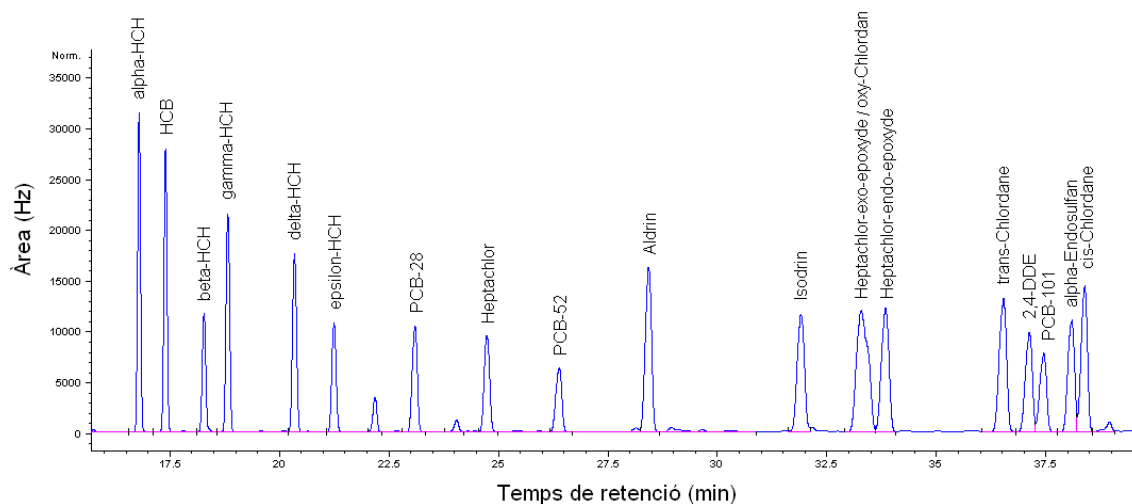
En aquestes condicions, el cromatograma que s'obté del patró de mescla de contaminants és el que es mostra en la *Figura 2.10*.



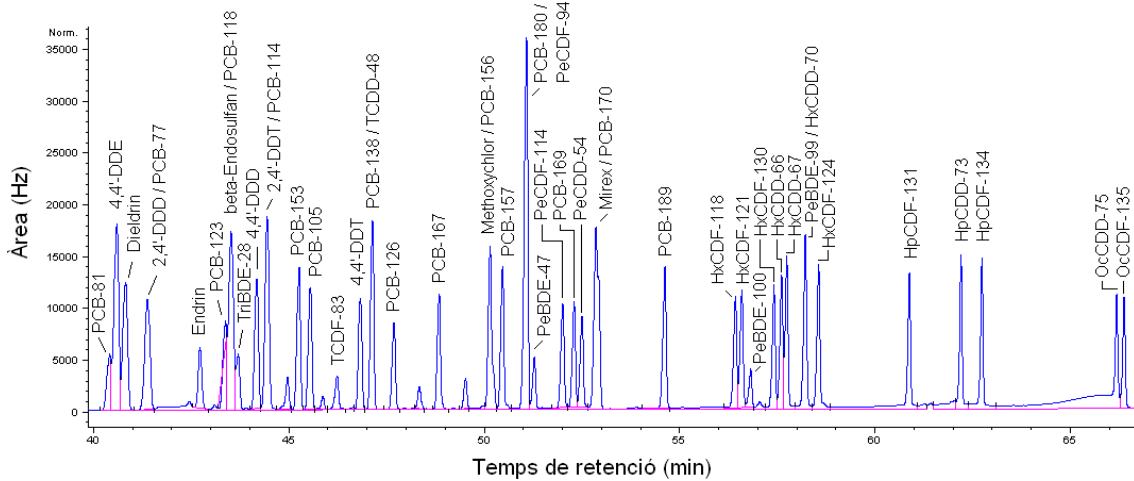
**Figura 2. 10.** Cromatograma de la mescla de contaminants.

Com es pot observar, en aquest cas el cromatograma és força més complex. Tot i que existeix una gran quantitat de senyals que apareixen ben resoltes, entre els minuts 35 i 60 es produeixen un gran nombre d'interferències degut a l'elevat nombre d'analits, i la semblança que hi ha entre aquests. A més, cal destacar que durant les anàlisis de mostres reals encara poden existir més espècies interferents.

La identificació dels senyals s'ha realitzat pels temps de retenció determinats en l'anàlisi per separat de cada una de les famílies de contaminants. Els resultats es poden observar en les ampliacions corresponents a les *Figures 2.11 i 2.12*.



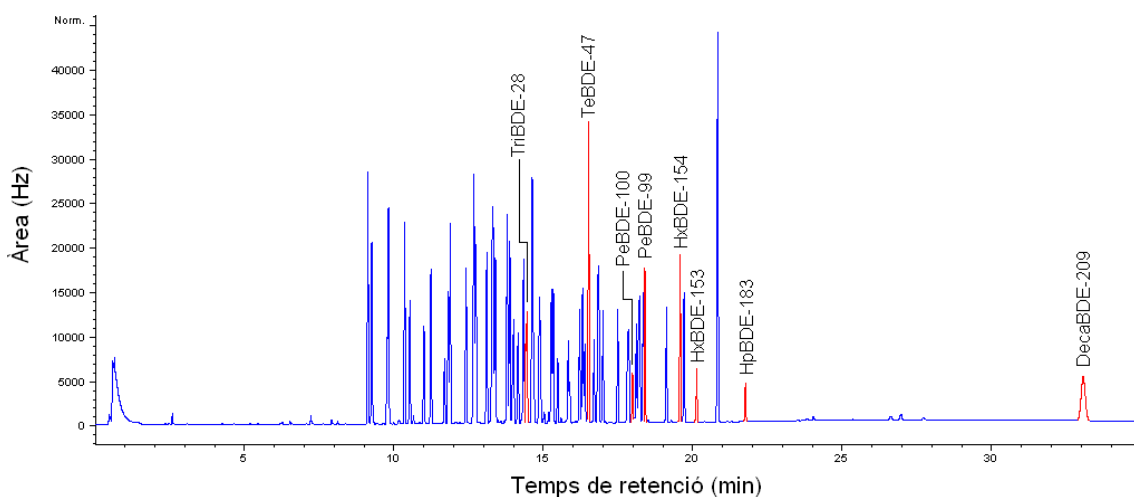
**Figura 2. 11.** Identificació del cromatograma de la mescla de contaminants.



**Figura 2. 12.** Identificació del cromatograma de la mescla de contaminants.

En aquests cromatogrames es pot observar com, fins al minut 40, només podem trobar una interferència; l'Heptaclor-exo amb l'oxi-Clordà (Figura 2. 11). A partir d'aquí (Figura 2. 12), s'observa un elevat nombre d'interferències entre PCBs i plaguicides, PBDEs i PCBs o PCBs amb PCDD/Fs. Comparant els temps de retenció de cada família de COPs es pot concloure que generalment en cromatografia de gasos, els plaguicides organoclorats són els contaminants que tenen menor temps de retenció, seguits pels PCBs, PBDEs i finalment PCDD/Fs.

Els PBDEs de major grau de bromació no s'han pogut detectar a causa de l'elevada longitud de la columna emprada (60 metres). Per aquest motiu, paral·lelament al mètode cromatogràfic posat al punt en aquest apartat, els PBDEs hauran de ser analitzats per separat en columnes de 5 metres segons el mètode desenvolupat en l'apartat 2.3.1. Emprant aquest mètode, el cromatograma que s'obté de la mescla de contaminants és el que es mostra en la Figura 2.13. Com que la resolució és menor, encara s'observen més interferències; els congèneres -153, -183 i -209 són els únics que no coelueixen amb cap altre analit.



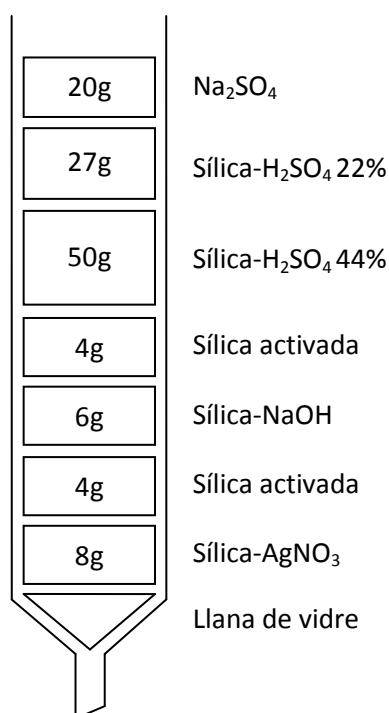
**Figura 2. 13.** Cromatograma de la mescla de contaminants en columna de 5 metres.

Es fa palès doncs que la cromatografia de gasos és una tècnica que per sí mateixa no ofereix suficient resolució per a la correcta anàlisi d'aquests contaminants de forma simultània.

## 2.4. Purificació dels COPs en columna de sílica multicapa

El mètodes instrumentals d'HRGC-ECD i d'HRGC-HRMS per a la determinació de COPs que s'han posat a punt en l'anterior apartat permeten estudiar possibles procediments de purificació dels analits objecte d'estudi en oli de peix.

Aquesta etapa es porta a terme per tal de separar els contaminants presents en l'oli d'altres compostos que no són d'interès, principalment greixos. Habitualment, al Laboratori Mediambiental de l'IQS aquest pas es realitza en una columna de sílica multicapa. Es tracta de una columna cromatogràfica de vidre de 4 cm de diàmetre, amb la següent composició (Figura 2.14):



**Figura 2. 14.** Columna de purificació de sílica multicapa.

La primera capa és de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre, que permet absorbir restes d'humitat que puguin haver en la mostra. A continuació, la sílica modificada amb H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reté els interferents bàsics, a part de reaccionar amb d'altres compostos (com els lípids) per deshidratació, oxidació i condensació àcida. S'utilitzen síliques sulfúriques al 22 i 44% per tal de que les reaccions es portin a terme de manera més progressiva, i evitar així l'obturació de la columna. La sílica activada reté compostos polars, i també evita la neutralització entre la sílica àcida i bàsica. La sílica amb NaOH reté i/o reacciona amb els compostos àcids. Finalment, la sílica amb AgNO<sub>3</sub> degrada possibles interferents que hagin pogut resistir, com alguns compostos amb sofre.

Els analits objecte d'estudi –els COPs– són compostos apolars. Conseqüentment, per tal de poder eluir-los a través de la columna cromatogràfica cal emprar una fase mòbil de polaritat semblant. En aquest cas s'ha emprat hexà com a eluent.

### 2.4.1. Purificació de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides organoclorats.

La primera prova realitzada per avaluar aquest mètode de purificació ha estat l'estudi de les recuperacions que s'obtenen al sembrar 100 µl del patró de mescla de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides organoclorats emprat en l'anterior apartat cromatogràfic (Taula 2.7) en la columna de sílica multicapa.

Com que es desconeix el volum de fase mòbil necessari per l'elució dels PBDEs, inicialment s'han emprat 500 ml d'hexà. Els mètodes cromatogràfics per analitzar l'extracte obtingut són els que s'han desenvolupat durant l'apartat 2.3, emprant una columna de 60 metres per a tots els contaminants excepte pel cas dels PBDEs, que era de 5 metres. Les recuperacions obtingudes per a cada un dels contaminants estudiats es mostren en la Taula 2.8.

**Taula 2. 8.** Recuperacions de COPs en l'etapa de purificació en columna de sílica multicapa.

Compost	Recuperació (%)	Compost	Recuperació (%)	Compost	Recuperació (%)
alpha-HCH	84	2,4'-DDT	81	PCB-167	85
beta-HCH	0	4,4'-DDT	72	PCB-156	86
gamma-HCH	8.2	BDE-28	78	PCB-157	85
delta-HCH	0	BDE-47	88	PCB-169	85
epsilon-HCH	11	BDE-99	84	PCB-170	87
Hexaclorobenzene	89	BDE-100	91	PCB-189	85
Heptachlor	0	BDE-153	85	2,3,7,8-TCDF	66
Aldrin	0	BDE-154	69	2,3,7,8-TCDD	39
Endrin	0	BDE-183	86	1,2,3,7,8-PeCDF	67
Dieldrin	0	BDE-209	94	2,3,4,7,8-PeCDF	72
Isodrin	0	PCB-28	95	1,2,3,7,8-PeCDD	57
Heptachlor-exo-epoxide	0	PCB-52	95	1,2,3,4,7,8-HxCDF	76
Heptachlor-endo-epoxide	0	PCB-101	93	1,2,3,6,7,8-HxCDF	82
oxy-Chlordane	89	PCB-138	92	2,3,4,6,7,8-HxCDF	83
cis-Chlordane	91	PCB-153	92	1,2,3,4,7,8-HxCDD	70
trans-Chlordane	89	PCB-180	92	1,2,3,6,7,8-HxCDD	66
alpha-Endosulfan	0	PCB-81	83	1,2,3,7,8,9-HxCDD	73
beta-Endosulfan	0	PCB-77	84	1,2,3,7,8,9-HxCDF	80
Methoxychlor	0	PCB-123	86	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	75
Mirex	90	PCB-118	84	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	57
2,4'-DDE	93	PCB-114	84	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	75
4,4'-DDE	95	PCB-105	85	OCDD	37
2,4'-DDD	92	PCB-126	84	OCDF	74
4,4'-DDD	83				

Com es pot observar, la majoria de plaguicides organoclorats no es recuperen, ja que són degradats en la columna. Tot i així, sí que s'han obtingut bones recuperacions per al cas dels plaguicides objecte d'estudi en aquest treball (entre 72-93% pels DDTs i 89% per l'HCB). D'aquesta manera s'aconsegueix eliminar algunes espècies organoclorades que podrien haver interferit durant l'anàlisi instrumental, degut a les seves propietats químiques similars.

Els PBDEs (que com s'ha comentat anteriorment s'han determinat a part en una columna de 5 metres) també han estat recuperats de forma satisfactòria, entre un 69-94%. Els PCBs tampoc han sofert processos de degradació o retenció excessiva en columna, havent-se recuperat en un 92-95% pel cas dels indicadors i 84-87% pel cas dels similars a dioxines.



Pel cas de les PCDD/Fs, la majoria de recuperacions han estat força satisfactòries, entorn al 60-80%. Tot i així hi ha alguns congèneres que han presentat recuperacions anòmalament baixes –especialment la 2,3,7,8-TCDD, en un 39%-. Això es deu a que la quantificació d’alguns congèneres és més difícil degut a la presència d’interferències cromatogràfiques, al no haver-hi etapa de fraccionament prèvia i estar treballant amb detecció per captura d’electrons enlloc d’espectrometria de masses. Aquest fenomen és especialment destacable pels compostos que –com el cas de la 2,3,7,8-TeCDD- es troben en menor concentració que la dels corresponents interferents.

### 2.4.2. Purificació de PBDEs en columna de sílica multicapa.

Tal i com s’ha exposat anteriorment, cal estudiar amb especial nivell de detall cada etapa d’anàlisi pel cas dels PBDEs, doncs és la família de contaminants de la qual es té menys experiència analítica d’entre tots els compostos analitzats. En aquest cas s’ha estudiat l’etapa de purificació dels PBDEs en columnes de sílica multicapa.

Per a la realització d’aquest estudi s’ha fet servir una nova dissolució de patrons, que no es basa en els congèneres de seguiment habituals (EPA 1614 Method, 2007) sinó que inclou més congèneres de diferent grau d’halogenació (BDE-28, -47, -66, -85, -99, -100, -138, -153, -154 i -183) per tal d’estudiar millor el comportament global d’aquesta família de contaminants.

En l’anterior apartat s’ha observat que s’obtenien bones recuperacions d’aquests contaminants al emprar 500 ml d’hexà com a eluent. Per tal d’optimitzar el procés d’anàlisi i evitar el malbaratament de dissolvent, cal determinar quin és el volum d’hexà necessari per tal d’eluir els PBDEs.

Per això s’ha sembrat l’esmentat patró de PBDEs en la columna de purificació i s’han recollit fraccions de 50 ml, fins a 500 ml. L’experiment s’ha realitzat per duplicat, i cada una de les fraccions s’ha analitzat mitjançant HRGC-ECD. Els resultats es mostren en les següents figures (Figures 2.15 a 2.17).

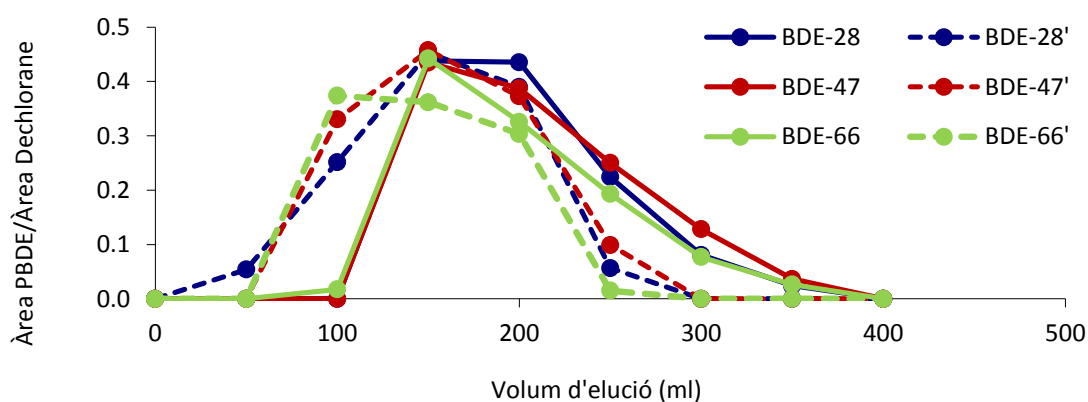


Figura 2. 15. Volum d’elució per la purificació dels BDE-28, -47 i -66.

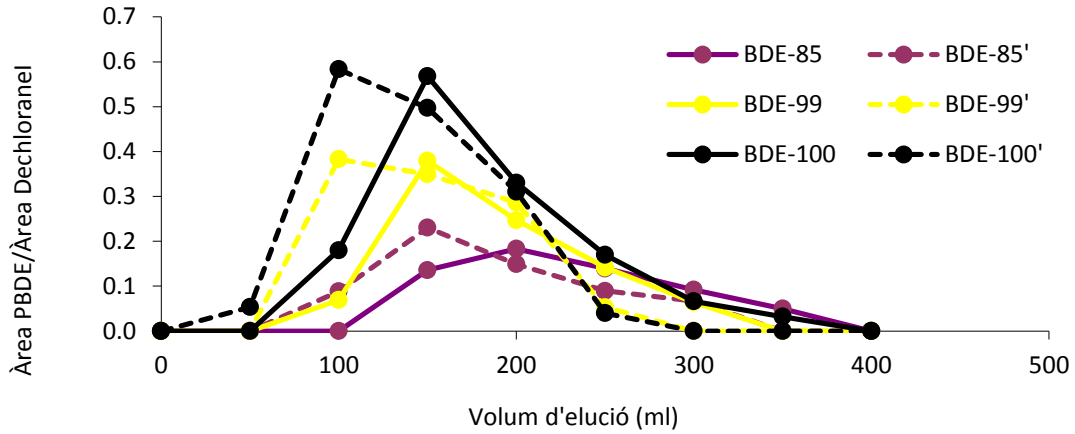


Figura 2. 16. Volum d'elució per la purificació dels BDE-85, -99 i -100.

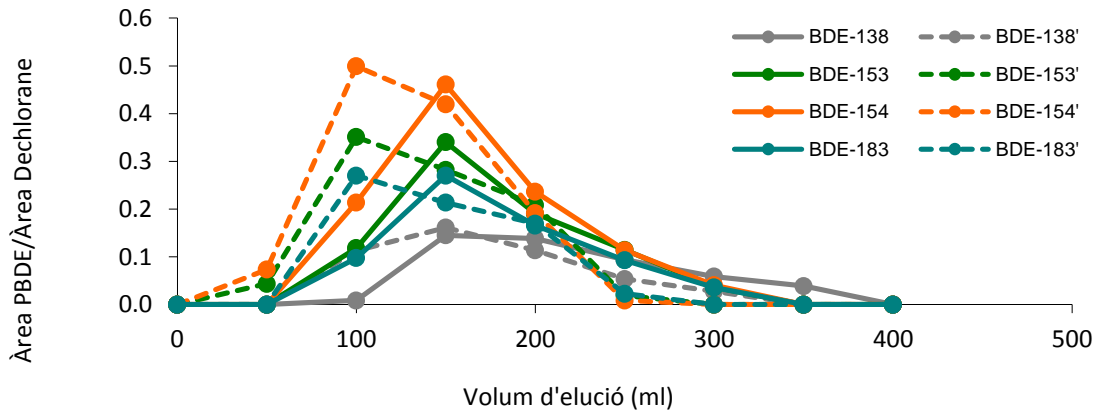


Figura 2. 17. Volum d'elució per la purificació dels BDE-138, -153, -154 i -183.

Tal i com es pot observar, els PBDEs estudiats s'elueixen entorn als 150 ml. No s'observa cap relació entre el grau d'halogenació de cada un dels congèneres estudiats i el seu volum d'elució. En la Figura 2. 18 es pot observar el volum d'hexà necessari per l'elució de la totalitat dels PBDEs per cada una de les repeticions.

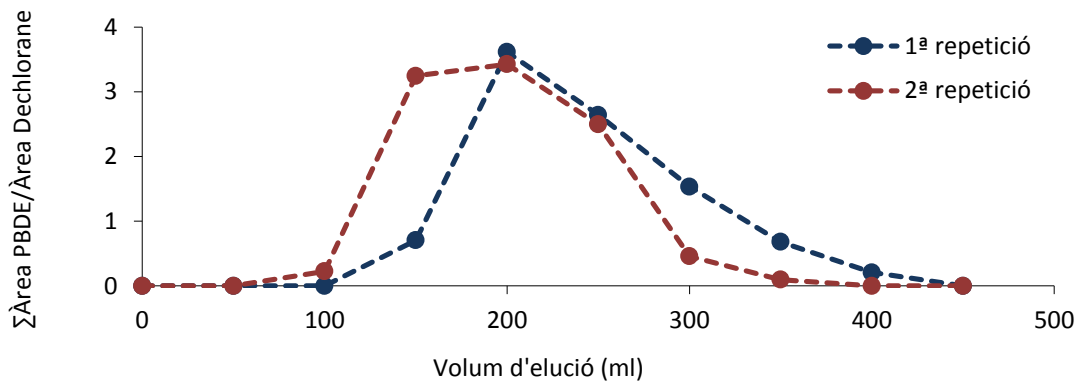


Figura 2. 18. Volum d'elució per la purificació de ΣPBDE.

Existeix un lleuger decalatge entre les dues repeticions de l'experiment, probablement degut a la poca reproduïbilitat de les columnes de sílica empaquetades a mà. En qualsevol cas, es pot observar que un volum de 400 ml d'hexà és suficient per a una elució quantitativa dels PBDEs a través de la columna de purificació. Així doncs es prendrà aquest volum com a referència per a les posteriors anàlisis en mostres reals.

Cal destacar que aquesta quantitat d'hexà és lleugerament superior a la que es fa servir habitualment per a la purificació de mostres en l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs (300 ml), pel que es dedueix que els PBDEs es veuen més retinguts en aquest tipus de columnes. Les recuperacions d'aquesta família de COPs emprant 400 ml com a volum d'elució són les que es mostren en la *Taula 2.9*.

**Taula 2. 9.** Recuperació dels patrons de PBDE.

Congènere	Recuperació (%)	Congènere	Recuperació (%)
BDE-28	97	BDE-100	81
BDE-47	95	BDE-138	96
BDE-66	92	BDE-153	83
BDE-85	97	BDE-154	72
BDE-99	94	BDE-183	80

Totes les recuperacions obtingudes es troben compreses entre un 72-97%. Tenint en compte que aquesta petita pèrdua de mostra serà corregida mitjançant patrons interns quan es treballi amb espectrometria de masses, es pot afirmar que els patrons de PBDEs són ben recuperats de l'etapa de purificació quan s'empra un volum de 400 ml d'hexà com a fase mòbil.

A part de l'estudi del volum d'elució, també es necessari comprovar que aquestes recuperacions segueixen sent satisfactòries en presència de mostra. Amb aquesta finalitat s'ha analitzat una mostra de llard de porc i una altra d'oli de peix.

Per a poder conèixer els valors de recuperació de PBDEs s'han analitzat les mostres de 6 grams sense addició de patró (per conèixer els nivells inicials) i amb addició, comparant-los amb els resultats del patró injectat directament a l'HRGC-ECD. Els resultats de les dues proves es presenten en la *Taula 2.10*.

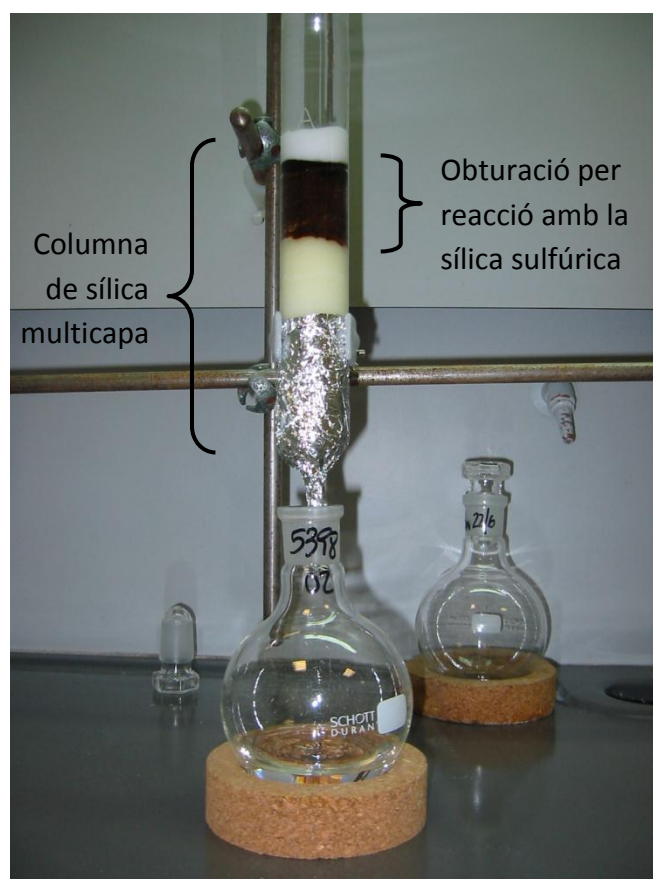
**Taula 2. 10.** Recuperació dels patrons de PBDE en llard de porc i oli de peix.

	Recuperació (%)			Recuperació (%)	
	Llard de porc	Oli de peix		Llard de porc	Oli de peix
BDE-28	71	116	BDE-100	74	109
BDE-47	73	107	BDE-138	96	74
BDE-66	69	94	BDE-153	96	95
BDE-85	75	71	BDE-154	89	96
BDE-99	78	99	BDE-183	105	86

Pel cas del llard de porc els greixos han reaccionat amb la columna, deixant una taca negra retinguda a la zona de la sílica sulfúrica. Tot i així, aquest fet no ha afectat gaire a les recuperacions dels analits d'interès, doncs han estat totes entre un 69-105% de recuperació. És destacable que inicialment el llard de porc no ha mostrat concentracions detectables per aquest contaminant.

Les recuperacions obtingudes del patró addicionat en l'oli de peix (a les quals s'ha restat les concentracions inicials de PBDEs en la mostra) es troben totes entre un 70-115 %, pel que les recuperacions de PBDEs es consideren satisfactòries tot i la presència de matriu. Respecte a l'oli de peix, ha mostrat nivells inicials detectables de congèneres de baix grau d'halogenació (BDE-28 i -47).

Un fet que pot donar variabilitat i alenteix molt aquesta etapa de purificació és la possible obturació de la columna degut als productes de reacció entre els greixos i la sílica sulfúrica al 22% (Figura 2.19).



**Figura 2. 19.** Fotografia de la columna obturada per descomposicions de l'oli de peix.

Una possible solució a aquest problema pot ser l'addició d'una capa de sílica sulfúrica de menor concentració (per exemple, al 11%). D'aquesta manera s'aconsegueix una reacció del greix més progressiva, evitant l'obturació de la columna. Aquest tipus de columna s'estudia posteriorment en l'apartat 2.6.1 de la present tesi.

## **2.5. Fraccionament dels COPs**

Un cop s'ha purificat la matriu, s'obté un extracte que conté tots els POPs presents en la mostra inicial. Molts d'aquests contaminants formen famílies d'un elevat nombre de congèneres (209 PBDEs, 209 PCBs o 210 PCDD/Fs, per exemple) que poden suposar una interferència cromatogràfica o màssica durant la posterior etapa d'anàlisi instrumental. La quantificació simultània de tots aquests compostos precisaria d'una resolució cromatogràfica inassequible amb la tecnologia actual o bé treballar amb una resolució de l'espectròmetre de masses tant alta que augmentaria molt els límits de detecció (Marcè, 2001).

A tall d'exemple, l'ió  $[M+4]^+$  de la PeCDD (massa exacta de 357.8517) i el  $[M]^+$  de l'HexaCB (massa exacta 357.8444) tenen temps de retenció semblants en el cromatògraf de gasos, pel que per tal de resoldre una interferència cromatogràfica l'espectròmetre de masses hauria de treballar a una resolució superior a 49345. El mateix fet s'observa amb la  $[M+2]^+$  del HpCDF (massa exacta 407.7818) i la  $[M+6-2Br]^+$  del PeBDE (massa exacta 407.7829), que necessitaria una resolució superior a 345871 per a la seva separació. A més, alguns contaminants (PCBs o PBDEs) se solen trobar en nivells superiors que d'altres (PCDD/Fs), generant interferències difícils de resoldre. Per tots aquests motius és necessària una etapa de fraccionament dels analits prèvia a l'anàlisi instrumental.

Habitualment, en el Laboratori Mediambiental de l'IQS aquest pas es duu a terme en dues etapes diferents: un cop purificada la mostra, les PCDD/Fs són separades de la resta de COPs en tubs de carbó grafititzats. Posteriorment, els PCBs similars a dioxines són separats dels indicadors i d'altres interferents en l'equip HPLC-PYE.

En el present estudi, en primer lloc s'ha estudiat la separació dels PBDEs amb aquestes dues tècniques per separat. D'acord amb els resultats obtinguts s'ha decidit quina és la millor estratègia global de fraccionament de PBDEs, PCDD/Fs i PCBs (mitjançant tubs de carbó, HPLC-PYE o combinació de les dues). L'estudi s'ha complementat amb el fraccionament dels plaguicides –tot i que la majoria d'aquests compostos es degrada en l'etapa de purificació-, incloent els DDTs i HCB.

### **2.5.1 Fraccionament de PBDEs mitjançant tubs d'extracció en fase sòlida preempaquetats amb Carbo-pack B**

La primera etapa de fraccionament estudiada pels PBDEs es porta a terme mitjançant tubs SPE d'extracció en fase sòlida amb carbó grafititzat (Carbo-pack B). Gràcies a l'estructura laminar del carbó, aquesta fase estacionària separa els analits en funció de la seva planaritat i aromaticitat. Els compostos més plans i aromàtics queden més retinguts entre les capes de grafit, alhora que les substàncies menys planes s'elueixen més fàcilment (Concejero *et al.*, 2001).

El muntatge del sistema consta d'un tub de carbó on s'hi sembla l'extracte purificat de l'etapa anterior. Aquest es troba connectat a una cubeta on s'hi aplica el buit mitjançant una bomba, i aquesta diferència de pressions fa circular la fase mòbil a través del tub (Figura 2.20).



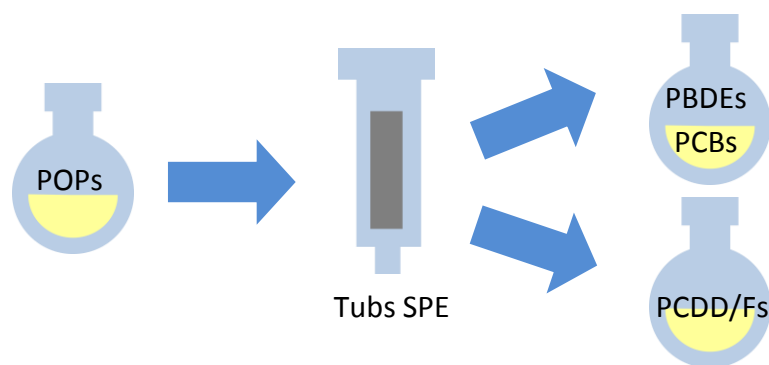
**Figura 2. 20.** Muntatge del sistema de fraccionament per carbons: Tubs de carbó (1), cubeta de buit (2), bomba de buit (3), recipients per la fase mòbil (4)

En aquesta etapa, un cop s'han condicionat els tubs amb 20 ml d'hexà es sembra la mostra, i es fa eluir amb 15 ml d'aquest dissolvent (Fracció C1). Posteriorment, s'elueixen 20 ml d'una fase mòbil (C2), composta per una barreja de hexà i toluè 99:1. La fracció que se n'obté està composta dels PCBs menys plans (entre ells, els PCBs indicadors). Es recull conjuntament la fracció C3, que és la que s'elueix amb 20 ml d'hexà i toluè 75:25. Aquesta conté els PCBs més plans (PCBs similars a dioxines), que són aquells que no presenten clors en posicions *orto*- i per tant poden tenir configuracions més planes. Per tant, com a conjunt, s'obté la fracció C1+C2+C3, que conté els PCBs.

Amb l'elució indicada anteriorment les dioxines i furans policlorats, que són els compostos més plans, queden retinguts en la fase estacionària. La fracció C4, corresponent a aquests compostos, es recull donant la volta al tub i fent circular en flux invers 60 ml de toluè (Díaz, 1999).

Per tal d'estudiar com es fraccionen els PBDEs en aquesta etapa, es sembren en tubs de carbó amb patró i es recullen les fraccions prèviament esmentades (C1+C2+C3 i C4). En l'anàlisi mitjançant HRGC-ECD s'observa com els PBDEs apareixen en la fracció on apareixen els PCBs (C1+C2+C3), alhora que no s'observa cap senyal d'aquests en la fracció de les dioxines (C4).

Així doncs, l'esquema de fraccionament dels PBDEs i altres POPs mitjançant tubs de carbó grafititzat és el següent (Figura 2.21):



**Figura 2. 21.** Esquema de la separació de PBDEs, PCBs i PCDD/F mitjançant carbons

Les recuperacions de PBDEs que s'obtenen d'aquesta etapa de fraccionament són les que es mostren en la *Taula 2.11*.

**Taula 2. 11.** Recuperació dels patrons de PBDE per carbons en la fracció C1+C2+C3.

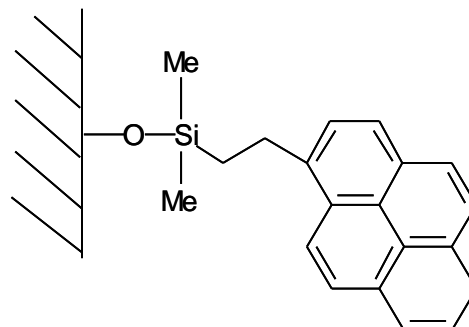
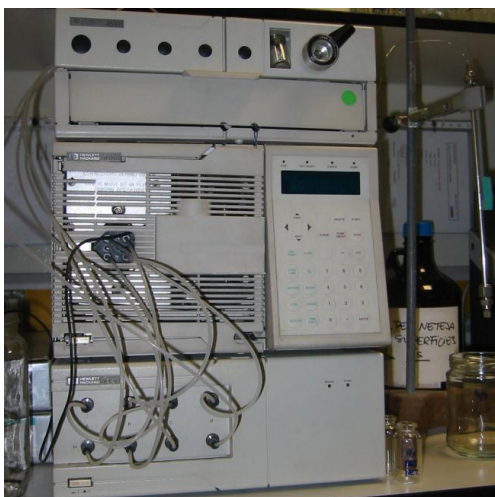
Congènere	Recuperació (%)	Congènere	Recuperació (%)
BDE-28	95	BDE-138	100
BDE-47	96	BDE-153	86
BDE-66	93	BDE-154	102
BDE-85	94	BDE-183	97
BDE-99	101	BDE-209	54
BDE-100	102		

En el fraccionament d'aquesta família de contaminants a través dels carbons s'obtenen unes bones recuperacions, entorn del 94 i 101 %. El BDE-209 n'és l'única excepció, amb unes recuperacions entre 50-60%. Aquest fet es deu a que al ser una molècula més voluminosa, el volum emprat d'hexà per eluir-lo possiblement no hagi estat suficient. Aquest fenomen es podria solucionar emprant més eluent, encara que això modificaria la posterior en l'elució de PCDD/Fs, que es recuperen amb flux invers.

Tot i així, l'ús dels tubs de carbó garafinitzat és un mètode adequat pel fraccionament de POPs, ja que permet separar PCBs i PBDEs de les PCDD/Fs -contaminants que solen trobar-se en nivells més baixos-, evitant així interferències difícils de resoldre instrumentalment.

### 2.5.2. Fraccionament de PBDEs mitjançant HPLC-PYE

La segona etapa de fraccionament que s'ha estudiat pels PBDEs es duu a terme mitjançant un HPLC equipat amb una columna tipus PYE. La fase estacionària consta de grups pirenil enllaçats a la sílica (*Figura 2.22*). El mecanisme de separació és semblant al dels carbons; separa els compostos en funció de la seva planaritat per interacció  $\pi$ - $\pi$  entre els orbitals d'aquests amb els del grup pirenil (Haglund, 1990a; Haglund, 1990b).



**Figura 2. 22.** Sistema HPLC/PYE (esquerra) i estructura molecular de las PYE (dreta).

En aquest cas, però, la interacció es realitza sobre una superfície menor (la del grup pirenil) que en els carbons, que interacciona amb tota la superfície de la fase estacionària (que té estructura de grafit). Gràcies a aquest fet els compostos no queden tant retinguts, i es poden separar famílies d'analits que en els carbons plantejarien problemes de resolució.

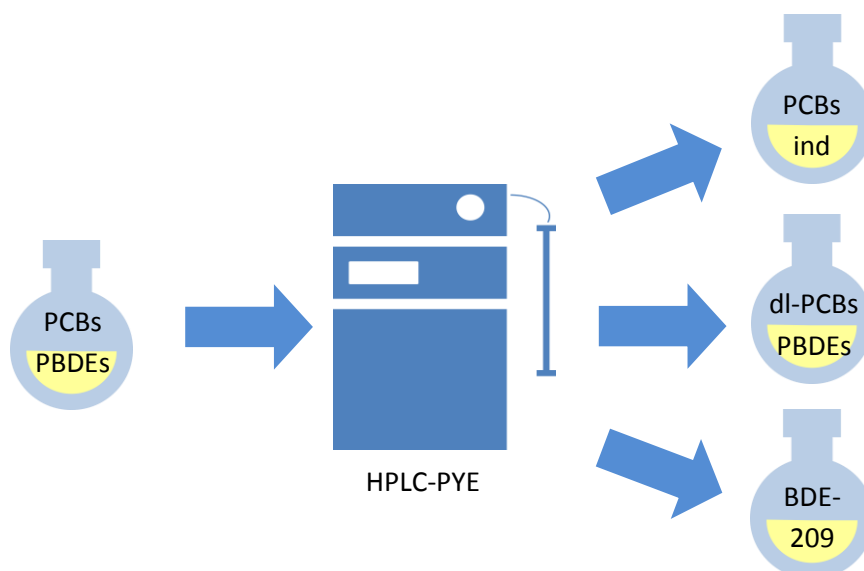
L'equip emprat en aquest estudi ha estat un HPLC HP-1050 (Hewlett-Packard, EUA) equipat amb un loop d'injecció de 300 µl i una columna Cosmosil 5-PYE (250 mm x 4.6 mm d.i., mida de partícula de 5 µm, Nacalai Tesque, Japó) a temperatura ambient (entre 20 i 25°C).

Les proves han estat realitzades amb un programa de fluxos consistent en 1 ml/min d'hexà durant els primers 15 minuts, seguit per 1 ml/min de toluè els següents 30 minuts. Finalment es torna al flux de 1 ml/min d'hexà inicial durant 10 minuts més per condicionar l'equip per a la següent anàlisi. El loop d'injecció es neteja deu cops entre mostra i mostra per tal d'evitar problemes d'efecte memòria. L'ús del tolué com a una de les fases mòbils es deu a que té un major poder elutròpic, i és capaç d'eluir compostos que amb hexà seria més difícil, com per exemple les dioxines. Aquest mètode està basat en el que es troba descrit en la bibliografia per al fraccionament de PCBs i PCDD/Fs (Martínez-Cored *et al.*, 1999).

Habitualment en el Laboratori Mediambiental aquest mètode s'empra per tal de separar els PCBs menys plans dels PCBs similars a dioxines. S'elueix primer la fracció P1 entre els minuts 0 i 4.5 (on es recullen els PCB indicadors i d'altres interferents), i posteriorment la fracció P2 entre els minuts 4.5 i 15 (PCB similars a dioxines). En aquest estudi també s'ha recollit la fracció P3, en la que segons bibliografia apareixerien les PCDD/Fs.

S'injecta al sistema HPLC-PYE la mescla patró de PBDEs per tal d'estudiar el seu fraccionament en aquestes condicions cromatogràfiques. Analitzant les fraccions obtingudes mitjançant HRGC-ECD, s'observa que els PBDEs s'han eluït en la fracció P2, juntament amb els PCBs similars a dioxines. L'única excepció és el BDE-209, que degut al seu elevat volum s'ha recollit amb la fracció P3. Així doncs, l'esquema del fraccionament dels PBDEs i PCBs a través del sistema HPLC/PYE és el següent (Figura 2.23):





**Figura 2. 23.** Esquema de la separació de PBDEs, i PCBs mitjançant HPLC/PYE

Les recuperacions de PBDEs corresponents a aquesta etapa de fraccionament per HPLC-PYE es mostren en la *Taula 2.12*.

**Taula 2. 12.** Recuperació dels patrons de PBDE per HPLC-PYE.

Congènere	Recuperació (%)	Congènere	Recuperació (%)
BDE-28	93	BDE-138	98
BDE-47	92	BDE-153	98
BDE-66	94	BDE-154	96
BDE-85	94	BDE-183	105
BDE-99	96	BDE-209	94
BDE-100	96		

S'han obtingut unes bones recuperacions en el fraccionament dels PBDEs mitjançant HPLC-PYE. Totes elles es troben entre un 92-105%.

Si es comparen els mètodes de fraccionament estudiats (tubs de carbó i HPLC-PYE), es pot concloure que ambdues tècniques són igualment vàlides per a la separació de PBDEs. L'avantatge dels tubs de carbó respecte a l'HPLC-PYE recau en que és una tècnica més ràpida, doncs permet fraccionar diverses mostres alhora. Per contrapartida, només permet separar les dioxines dels PCBs i PBDEs. Si es volguessin separar més les famílies de COPs caldria incorporar més etapes de fraccionament.

Per altra banda, el sistema HPLC-PYE és una tècnica més lenta, ja que només pot fraccionar una mostra a la vegada, i amb mètodes cromatogràfics que duren entorn una hora. Tot i així, permet la possibilitat de separar en una sola etapa PCBs indicadors de PCBs similars a dioxines i PBDEs.

Degut a la seva major capacitat de separació, es decideix emprar l'equip HPLC-PYE per l'estudi del fraccionament de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides organoclorats en una sola etapa.

### 2.5.3. Fraccionament de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides organoclorats per HPLC-PYE.

S'ha observat durant l'anterior estudi de fraccionament de PBDEs que el sistema HPLC-PYE és una eina molt adequada en l'anàlisi de COPs, ja que ofereix una elevada capacitat de separació per a aquest tipus de compostos. Mitjançant aquest fraccionament, s'ha documentat en el passat el fraccionament de PCBs i PCDD/Fs en mostres d'aigua i fusta (Martínez-Cored *et al.*, 1999), així com de PBDEs i alguns PCBs en mostres ambientals (Kannan *et al.*, 2005).

En el present estudi s'ha comprovat empíricament la separació simultània de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i els 32 plaguicides organoclorats (incloent DDTs i HCB) mitjançant aquesta tècnica de fraccionament. El mètode cromatogràfic emprat ha estat el mateix que el que s'ha fet servir en l'anterior estudi dels PBDEs.

Per estudiar la separació de COPs que s'obté amb aquest mètode es van injectar 150 µl de la mescla de contaminants (*Taula 2.7*) directament a l'HPLC. Es van recollir fraccions cada minut durant els primers 15 minuts (fase mòbil: hexà) i després cada 5 minuts fins als 45 minuts (fase mòbil: toluè), tal i com es mostra en la *Taula 2.13*.

**Taula 2. 13.** Fraccions recollides de l'HPLC-PYE.

Minut	Nom fracció	Minut	Nom fracció
0-1	H1	11-12	H12
1-2	H2	12-13	H13
2-3	H3	13-14	H14
3-4	H4	14-15	H15
4-5	H5	15-20	T16
5-6	H6	20-25	T17
6-7	H7	25-30	T18
7-8	H8	30-35	T19
8-9	H9	35-40	T20
9-10	H10	40-45	T21
10-11	H11		

Seguidament, cada fracció va ser analitzada per HRGC-ECD. La fracció en què apareix cada un dels analits, juntament amb el seu temps de retenció en cromatografia de gasos, pot ser observada en la *Taula 2.14*. Com s'ha comentat anteriorment, els PBDEs han estat determinats instrumentalment a part en una columna de 5 metres.

**Taula 2. 14.** Fraccionament HPLC-PYE i temps de retenció dels contaminants estudiats.

Contaminant	Tr en col. 60 metres (min)	Fracció PYE	Tr en PYE(min)	Contaminant	Tr en col. 60 metres (min)	Fracció PYE	Tr en PYE(min)
$\alpha$ -HCH	16.8	H5-6	4-6	1,2,3,6,7,8-HxCDF	56.6	T17	20-25
$\beta$ -HCH	18.3	T16	15-20	2,3,4,6,7,8-HxCDF	57.4	T17	20-25
$\gamma$ -HCH	18.8	H6	5-6	1,2,3,7,8,9-HxCDF	58.5	T17	20-25
$\delta$ -HCH	20.4	T16	15-20	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	60.9	T18	25-30
$\epsilon$ -HCH	21.3	T16	15-20	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	62.7	T17	20-25
Hexaclorobenzene	17.4	H9	8-9	OCDF	66.4	T19	30-35
PCB-28	23.1	H5	4-5	2,3,7,8-TCDD	47.1	T16	15-20
PCB-52	26.4	H5	4-5	1,2,3,7,8-PeCDD	52.5	T17	20-25
PCB-101	37.4	H5	4-5	1,2,3,4,7,8-HxCDD	57.6	T17	20-25
PCB-138	47.1	H6	5-6	1,2,3,6,7,8-HxCDD	57.7	T17	20-25
PCB-153	45.2	H5-6	4-6	1,2,3,7,8,9-HxCDD	58.2	T17	20-25
PCB-180	51.1	H6	5-6	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	62.2	T17	20-25
2,4'-DDT	44.4	H5	4-5	OCDD	66.2	T18	25-30
4,4'-DDT	46.8	H7	6-7	PCB-81	40.4	H8-9	7-9
2,4'-DDD	41.4	H7	6-7	PCB-77	41.4	H9	8-9
4,4'-DDD	44.2	H11	10-11	PCB-105	45.5	H7	6-7
2,4'-DDE	37.1	H5	4-5	PCB-114	44.4	H6-7	5-7
4,4'-DDE	40.6	H5	4-5	PCB-118	43.5	H6-7	5-7
Aldrin	28.4	H4	3-4	PCB-123	43.4	H6-7	5-7
Endrin	42.7	H7	6-7	PCB-126	47.7	H11	10-11
Dieldrin	40.8	H5-6	4-6	PCB-156	50.1	H7-8	6-8
Isodrin	31.9	H5	4-5	PCB-157	50.5	H8	7-8
Heptachlor	24.7	H4	3-4	PCB-167	48.8	H7	6-7
Heptachlor-exo	33.3	H5	4-5	PCB-169	52.3	H13	12-13
Heptachlor-endo	33.8	H6-7	5-7	PCB-170	52.8	H7	6-7
oxy-Chlordane	33.3	H5	4-5	PCB-180	51.1	H6	5-6
cis-Chlordane	38.4	H5-6	4-6	PCB-189	54.6	H8-9	7-9
trans-Chlordane	36.5	H8	7-8	BDE-28	43.7 (14.4*)	H5-6	4-6
$\alpha$ -Endosulfan	38.1	H5	4-5	BDE-47	51.3 (16.5*)	H7	6-7
$\beta$ -Endosulfan	43.5	T16	15-20	BDE-99	58.2 (18.4*)	H7	6-7
Methoxychlor	50.1	H7-8	6-8	BDE-100	58.8 (18.0*)	H7	6-7
Mirex	52.8	H4-5	3-5	BDE-153	-(20.1*)	H8	7-8
2,3,7,8-TCDF	46.2	T16	15-20	BDE-154	62.0 (19.6*)	H7	6-7
1,2,3,7,8-PeCDF	51.1	T16-17	15-25	BDE-183	-(21.8*)	H9	8-9
2,3,4,7,8-PeCDF	52.0	T17	20-25	BDE-209	-(33.1*)	T16	15-20
1,2,3,4,7,8-HxCDF	56.4	T17	20-25				

Tr: Temps de retenció

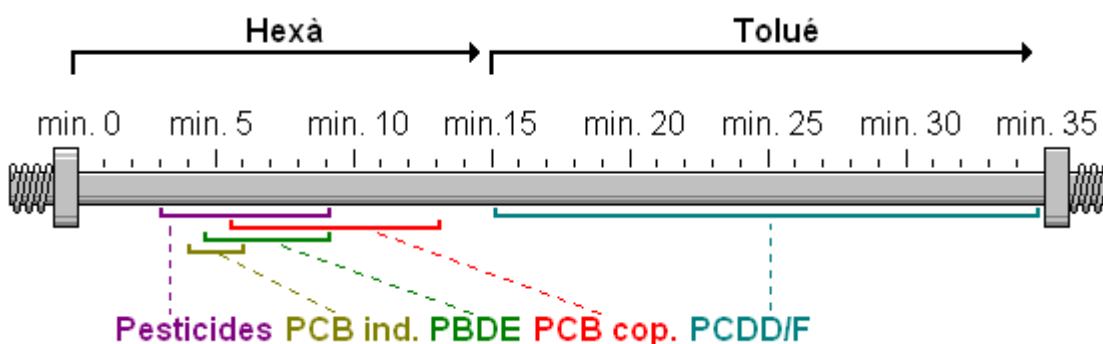
\*: Temps de retenció en columna de 5 metres

Les diferents famílies de contaminants estudiades s'han fraccionat de la següent manera:

- Pesticides organoclorats: En general són els contaminants que ofereixen menor temps de retenció en la columna PYE, entre els minuts 3 i 9. Això és degut a que acostumen a tenir estructures poc planes i petites. Aquestes estructures, però, són molt diverses, i per això hi ha alguns plaguicides que ofereixen retencions que s'escapen d'aquesta tendència, com alguns dels isòmers més plans de l'HCH (minuts 15-20) amb els clors en posició equatorial.
- PCBs indicadors: Degut a la seva configuració menys plana, aquests contaminants surten entre els minuts 4 i 6. Els congèneres menys clorats (PCB-28, -52) surten abans que els que ho són més (PCB-138, -180), probablement degut a la seva menor mida molecular.

- PBDEs: Aquests s'obtenen entre els minuts 4.5 i 9. Tot i no tractar-se de compostos especialment plans, tenen un temps de retenció superior al dels PCBs indicadors ja que els àtoms de brom que incorporen en la seva estructura són molt més voluminosos que els de clor. L'única excepció és el BDE-209, que al tenir deu àtoms de brom no s'elueix fins els minuts 15-20.
- PCBs similars a dioxines: Degut a la configuració més plana que poden adaptar aquests contaminants, el seus temps d'elució són lleugerament superiors als dels seus homòlegs indicadors (entre el minut 5.5 i 13), eluint-se abans els congèneres menys halogenats.
- PCDD/Fs: L'estructura de doble anell tancada d'aquestes molècules fa que siguin totalment planes, i en conseqüència siguin els contaminants que es troben més retinguts en la columna PYE. S'elueixen tots els congèneres entre els minuts 15 i 35, amb toluè com a fase mòbil.

Un esquema general del fraccionament de contaminants obtingut és el que es mostra en la *Figura 2.24*.



**Figura 2. 24.** Esquema del fraccionament de COPs en columna de tipus pirenil.

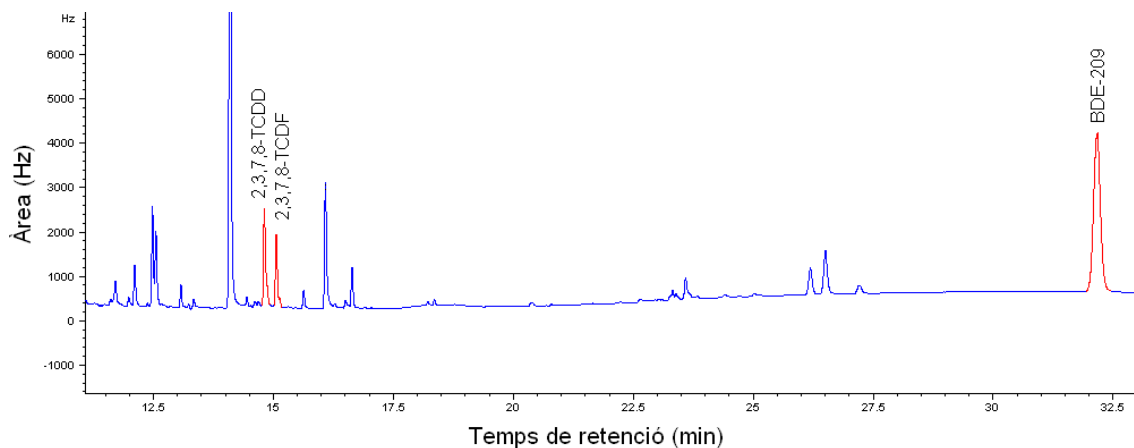
Tenint en compte els resultats observats, existeixen diverses possibles estratègies de fraccionament. La que s'ha decidit adoptar de cara a les futures anàlisis és la següent:

- Fracció P1 (min. 0-4.5): Plaguicides + PCBs indicadors
- Fracció P2 (min. 4.5-15): Plaguicides + PCBs similars a dioxines + PBDEs (excepte BDE-209)
- Fracció P3 (min. 15-35): PCDD/Fs + BDE-209

Alternativament, si només es desitja realitzar una anàlisi de PBDEs, pot ser útil el fraccionament obtingut entre els minuts 4.5 i 20.

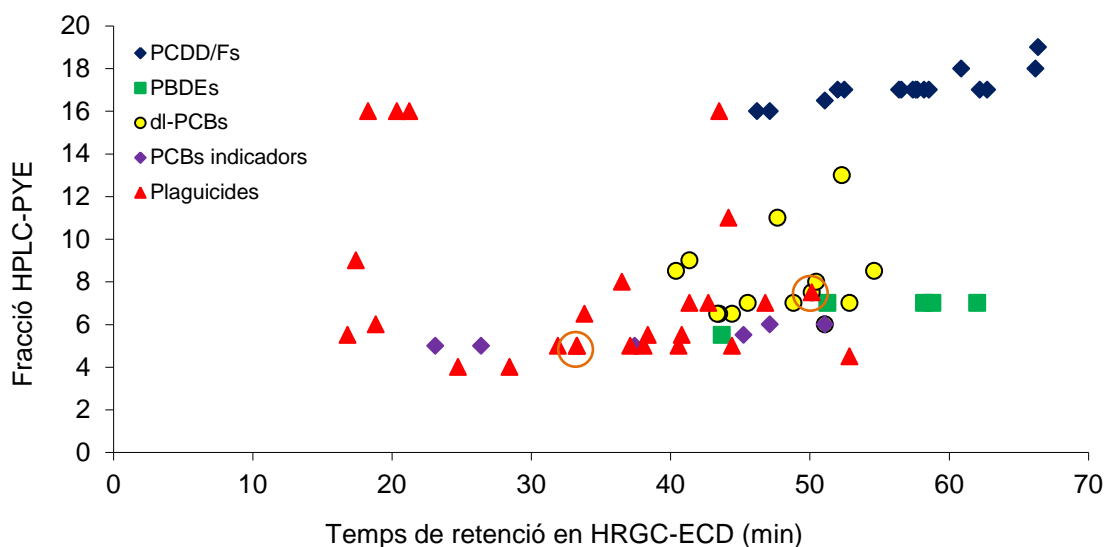
Per tal de millorar aquest fraccionament de contaminants per famílies, es va estudiar més detalladament la separació observada entre els minuts 15 i 20 (minut a minut). L'objectiu era esbrinar si el BDE-209 s'elueix abans que les TeCDD/Fs, i així poder modificar les fraccions per tal de separar en la seva totalitat els PBDEs de les PCDD/Fs.

Malauradament, aquests analits coelueixen durant el minut 19 (que és aproximadament quan es comença a eluir pel final de la columna PYE el toluè com a fase mòbil) tal i com s'observa en la *Figura 2.25*, pel que aquest fraccionament no és possible. Per aquest motiu el BDE-209 es recull en la fracció de les PCDD/Fs.



**Figura 2. 25.** Cromatograma dels analits eluïts per l'HPLC-PYE durant els minuts 19-20.

Així doncs, amb aquesta etapa de fraccionament mitjançant HPLC-PYE en l'anàlisi de COPs es poden resoldre les interferències que no s'havien pogut resoldre anteriorment amb cromatografia de gasos. Relacionant el temps de retenció en l'equip HPLC-PYE amb el temps de retenció en HRGC, s'obté la *Figura 2.26*.



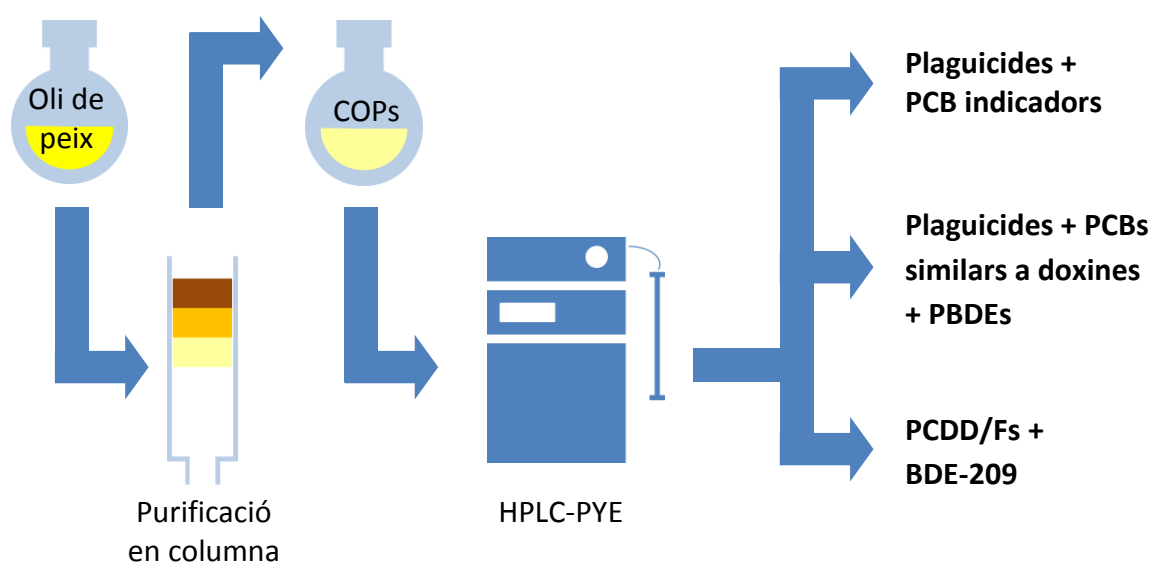
**Figura 2. 26.** Temps de retenció en HPLC-PYE vs temps de retenció en HRGC-ECD.

En la figura es pot observar gràficament com s'han resolt la majoria d'interferències que s'havien determinat anteriorment mitjançant només cromatografia de gasos. Les úniques interferències que no s'han pogut resoldre completament són les que es troben marcades amb un cercle taronja, que es corresponen amb l'Heptaclor-exo amb l'oxi-Clordà i el Metoxiclor amb el PCB-156.

Respecte aquesta última interferència, el PCB es podrà determinar correctament quan es treballi per espectrometria de masses. Aquesta interferència també quedarà resolta si els analits són purificats prèviament en columnes de sílica multicapa, doncs el Metoxiclor es degrada en aquesta etapa.

Es pot concloure que el fraccionament de COPs mitjançant el sistema HPLC-PYE és una tècnica vàlida per a separar les principals famílies de contaminants en una sola etapa. Aquest pas permet obviar l'etapa de fraccionament de les PCDD/Fs mitjançant tubs de carbó preempaquetats, millorant les recuperacions al tractar-se d'una metodologia d'anàlisi més curta i ràpida.

Conseqüentment, l'esquema global per a l'anàlisi de PBDEs, PCBs, PCDD/Fs i plaguicides organoclorats en oli de peix és tal i com es mostra en la *Figura 2.27*.



**Figura 2. 27.** Esquema global per a l'anàlisi de PBDEs ,PCDD/s, PCBs i plaguicides.

L'anàlisi de PBDEs, PCBs similars a dioxines i PCDD/Fs es realitzarà per HRGC-HRMS d'acord amb el mètode de dilució isotòpica. Els PCBs indicadors i els plaguicides s'analitzaran per presa d'alíquota (8%) de l'extracte purificat, mitjançant HRGC-ECD.

## **2.6. Validació del mètode analític i estudis d'intercalibratge**

Per tal de verificar el bon funcionament del mètode global desenvolupat per a l'anàlisi de PBDEs, PCBs, PCDD/Fs i plaguicides organoclorats (en aquest cas HCB i DDT) en oli de peix, s'ha portat a terme la seva validació.

Per concloure la posada al punt metodològica, s'ha participat en diversos estudis d'intercalibratge per avaluar l'exactitud del mètode de PBDEs. A continuació es presenten amb detall els resultats d'ambdós estudis.

### **2.6.1. Validació del mètode.**

Aquesta validació s'ha realitzat a través de l'anàlisi per triplicat d'una mostra de 6 grams d'oli de fetge de bacallà amb concentracions de COPs conegudes, adquirit al Laboratori de Referència de l'Institut Noruec de la Salut Pública. Cal destacar que paral·lelament també s'han realitzat blancs analítics i instrumentals per tal d'avaluar possibles contaminacions inesperades de les mostres.

S'ha calculat l'exactitud respecte als valors de referència certificats, precisió entre els resultats de les tres repeticions i incertesa global del mètode d'anàlisi, d'acord amb les següents fórmules:

$$\text{Precisió (\%)} = \frac{\text{Desviació estàndard}}{\text{Promig}} \times 100$$

$$\text{Exactitud (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{valor real} - \text{valor experimental}}{\text{Valor real}} \times 100 \right)$$

$$\text{Incertesa (\%)} = \sqrt{U^2 \text{ patró (\%)} + U^2 \text{ sistema instrumental (\%)} + U^2 \text{ mostra (\%)}}$$

L'equació del càlcul de la incertesa (U) inclou els termes associats a la incertesa del patró, de l'instrument i de la mostra. Al mateix temps, la incertesa del patró inclou la que està associada a la del propi fabricant i a la preparativa d'aquests –aquest últim terme és negligible ja que no s'han manipulat els patrons preparats pel fabricant, sinó que s'han adquirit els patrons directament a la concentració desitjada–.

La incertesa de l'instrument (ja sigui HRGC-ECD o HRGC-HRMS) inclou la precisió (N=6) i exactitud instrumental corresponents a l'anàlisi d'un patró de concentració coneguda. Finalment, la incertesa de la mostra és la que es troba associada a la preparació d'aquesta, i a la seva precisió (N=3) i exactitud. Així doncs, l'equació final de la incertesa del mètode d'anàlisi és la que es mostra a continuació:

$$U (\%) = \sqrt{\left( U^2 \text{ patró (\%)} + U^2 \text{ preparació (\%)} \right) + \left( U^2 \text{ precisió (\%)} + U^2 \text{ exactitud (\%)} \right) + \left( U^2 \text{ preparació (\%)} + U^2 \text{ precisió (\%)} + U^2 \text{ exactitud (\%)} \right)}$$

Els resultats de les anàlisis de PCDD/Fs, PCBs indicadors, PCBs similars a dioxines, PBDEs, DDTs i HCB en l'oli de peix de la validació del mètode es mostren en la *Taula 2.15*. El límit de detecció es va estimar com la concentració de cada COP equivalent a tres vegades la senyal del soroll.

**Taula 2. 155. Resultats de la validació del mètode de COPs.**

COP	Concentració (pg/g)	Precisió (%)	Exactitud (%)	Incertesa (%)	COP	Concentració (pg/g)	Precisió (%)	Exactitud (%)	Incertesa (%)
HCB	14.3 x 10E3	0.62	-	12	PCB-157	545	1.0	95	7.9
ΣDDT	12.5 x 10E4	1.3	-	17	PCB-167	1.06 x 10E3	1.0	98	5,7
PCB-28	2.38 x 10E3	2.6	97	17	PCB-169	17.3	3.0	98	10
PCB-52	6.31 x 10E3	2.5	94	8.3	PCB-189	153	0.87	94	8.3
PCB-101	11.1 x 10E3	1.5	92	10	Σdl PCB	27.0 x 10E3	1.1	96	5.3
PCB-153	30.3 x 10E3	1.6	94	8.7	Σdl PCB(TEQ)	12.9	0.64	97	7.1
PCB-138	25.4 x 10E3	2.0	96	9.5	2,3,7,8-TCDF	7.19	1.6	99	13
PCB-180	8.46 x 10E3	0.40	94	9.7	1,2,3,7,8-PeCDF	1.12	1.0	93	12
Σmk PCB	83.9 x 10E3	0.95	98	6.7	2,3,4,7,8-PeCDF	1.17	4.1	94	12
BDE-28	602	0.21	98	3.6	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.26	2.0	98	9.2
BDE-47	11.3 x 10E3	0.93	91	11	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.44	1.0	99	8.0
BDE-99	282	1.2	94	7.4	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.42	2.3	98	8.6
BDE-100	1.65 x 10E3	0.79	92	10	1,2,3,7,8,9-HxCDF	<LD	-	-	-
BDE-153	43.6	4.9	99	6.3	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.16	2.3	98	9.1
BDE-154	763	0.84	91	12	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.03	-	-	-
BDE-183	5.63	4.4	95	7.8	OCDF	0.03	-	-	-
BDE-209	31.00	17.9	94	22	2,3,7,8-TCDD	0.36	0.26	96	8.0
ΣPBDE	14.6 x 10E3	0.83	96	10	1,2,3,7,8-PeCDD	0.18	0.14	100	5.9
PCB-81	3.93	0.21	94	8.7	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.04	-	-	-
PCB-77	89.7	1.5	91	12	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.45	1.5	98	7.9
PCB-105	6.35 x 10E3	0.14	89	18	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.10	7.2	96	14.3
PCB-114	368	1.3	100	5.7	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.20	4.6	97	9.5
PCB-118	16.2 x 10E3	2.0	99	4.9	OCDD	0.20	-	-	-
PCB-123	238	2.5	96	8.7	ΣPCDD/F	12.4	1.6	99	7.1
PCB-126	80.2	0.74	99	6.5	ΣPCDD/F(TEQ)	2.09	0.49	97	7.7
PCB-156	1.99 x 10E3	0.71	90	12					

La incertesa final del mètode d'anàlisi que mostra la taula anterior s'ha expressat com a incertesa estesa, que s'obté multiplicant aquest valor per 2. Això significa que existeix un 95% de probabilitats de trobar el valor real dins d'aquest rang de concentracions. Les *Taules 2.16* i *2.17* mostren com s'ha calculat aquest paràmetre. Es pot trobar més informació sobre les dades de la validació en l'annex de la present tesi doctoral.

**Taula 2. 16. Càlcul de la incertesa de la validació del mètode (1).**

	Incerteses (%)						Incertesa estesa
	U patró	U sistema instrumental		U mostra		Incertesa	
	U patró	U precisió	U exactitud	U precisió	U exactitud		
PCB 28	0.58	0.71	8.30	1.48	1.98	8.70	17.4
PCB 52	0.58	1.07	1.41	1.43	3.42	4.14	8.29
PCB 101	0.58	0.86	0.95	0.87	4.73	5.01	10.0
PCB 153	0.58	0.72	2.53	0.93	3.32	4.37	8.74
PCB 138	0.58	1.09	3.68	1.14	2.50	4.76	9.51
PCB 180	0.58	0.50	3.50	0.23	3.28	4.86	9.72
ΣPCB ind	0.58	0.73	2.95	0.46	1.18	3.34	6.69



**Taula 2. 17. Càlcul de la incertesa de la validació del mètode (2).**

	Incerteses (%)						
	U patró	U sistema instrumental		U mostra		Incertesa	Incertesa estesa
	U patró	U precisió	U exactitud	U precisió	U exactitud		
PCB 81	1.15	0.17	2.00	0.12	3.67	4.34	8.68
PCB 77	1.15	0.42	1.52	0.86	5.42	5.82	11.7
PCB 123	1.15	0.33	3.21	1.43	2.30	4.37	8.74
PCB 118	1.15	0.16	1.77	1.15	0.41	2.45	4.89
PCB 114	1.15	0.30	2.47	0.73	0.10	2.84	5.68
PCB 105	1.15	0.36	5.83	0.08	6.80	9.04	18.1
PCB 126	1.15	0.26	2.83	0.43	0.88	3.22	6.45
PCB 167	1.15	0.36	2.18	0.58	1.25	2.85	5.69
PCB 156	1.15	0.30	0.68	0.41	5.78	5.95	11.9
PCB 157	1.15	0.43	2.05	0.58	3.10	3.95	7.91
PCB 169	1.15	0.57	4.36	1.73	1.02	4.98	9.95
PCB 189	1.15	0.22	1.88	0.50	3.45	4.13	8.26
ΣTEQ PCB cop	1.15	0.23	2.90	0.37	1.60	3.53	7.06
ΣPCB cop	1.15	0.06	0.19	0.63	2.27	2.63	5.26
2378-TCDF	2.89	0.42	5.74	0.92	0.77	6.55	13.1
12378-PeCDF	2.89	0.54	3.52	0.59	4.01	6.12	12.2
23478-PeCDF	2.89	0.41	3.12	2.39	3.71	6.14	12.3
123478-HxCDF	2.89	0.40	3.08	1.17	1.37	4.61	9.21
123678-HxCDF	2.89	0.59	2.61	0.58	0.53	4.01	8.03
234678-HxCDF	2.89	0.53	2.67	1.33	0.91	4.28	8.56
123789-HxCDF	2.89	1.06	3.49	-	-	-	-
1234678-HpCDF	2.89	0.74	3.03	1.35	1.02	4.57	9.14
1234789-HpCDF	2.89	1.05	0.62	-	-	-	-
OCDF	2.89	0.94	3.00	-	-	-	-
2378-TCDD	2.89	1.17	1.33	0.15	2.16	4.02	8.04
12378-PeCDD	2.89	0.34	0.47	0.08	0.16	2.95	5.90
123478-HxCDD	2.89	0.82	1.75	-	-	-	-
123678-HxCDD	2.89	0.83	1.97	0.84	1.41	3.95	7.90
123789-HxCDD	2.89	0.41	4.48	4.15	2.37	7.17	14.4
1234678-HpCDD	2.89	0.36	2.06	2.68	1.65	4.75	9.51
OCDD	2.89	1.02	1.86	-	-	-	-
ΣTEQ PCDD/F	2.89	0.20	1.84	0.28	1.71	3.85	7.70
Σ2,3,7,8 PCDD/F	2.89	0.23	1.86	0.64	0.59	3.56	7.11
BDE-28	1.15	0.39	0.55	0.12	1.18	1.79	3.57
BDE-47	1.15	0.58	0.42	0.54	5.38	5.57	11.2
BDE-100	1.15	0.18	0.70	0.67	3.36	3.68	7.37
BDE-99	1.15	0.91	0.89	0.46	4.78	5.10	10.2
BDE-154	1.15	0.33	0.05	2.80	0.81	3.15	6.31
BDE-153	1.15	0.49	1.64	0.48	5.46	5.86	11.7
BDE-183	1.15	0.57	0.14	2.57	2.63	3.90	7.79
BDE-209	1.15	1.44	3.77	10.32	0.51	11.2	22.3
ΣPBDE	1.15	0.84	2.35	0.48	4.67	5.44	10.9
HCB	0.58	0.72	0.07	0.36	6.08	6.33	12.7
2,4'-DDE	0.58	1.13	1.45	0.76	3.85	4.29	8.58
4,4'-DDE	0.58	0.99	1.20	1.07	4.75	5.01	10.0
2,4'-DDD	0.58	0.33	0.26	4.01	4.75	6.43	12.9
4,4'-DDD	0.58	1.27	1.49	6.20	9.67	11.6	23.1
2,4'-DDT	0.58	2.95	0.01	4.17	11.2	12.4	24.8
4,4'-DDT	0.58	4.81	1.42	1.27	16.2	16.9	33.9
ΣDDT	0.58	1.23	1.00	2.02	8.08	8.49	17.0

Els resultats d'incertesa per al mètode d'anàlisi global s'han expressat per a cada congènere individual i per al sumatori de congèneres de cada família. Pel cas dels PCBs similars a dioxines i PCDD/Fs, aquest últim valor s'ha inclòs en la taula de validació en unitats de concentració (pg/g) i toxicitat (pg WHO-TEQ/g).

L'exactitud instrumental i de preparació de la mostra són els paràmetres que tenen una contribució més alta en la incertesa final, encara que no es poden observar diferències significants entre els analits determinats per HRGC-ECD (PCBs indicadors, HCB i DDTs) o HRGC-HRMS (PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines i PBDEs).

Un fet destacable és que les incerteses corresponents a la suma de congèneres tenen un valor inferior al dels congèneres per separat. Això és degut a que aquest paràmetre va ser calculat com a la incertesa de la suma de congèneres, enlloc de la incertesa mitjana obtinguda per cada un dels congèneres. A pesar d'això, no s'observen grans diferències quan s'expressen aquests valors en unitats de concentració (pg/g) o toxicitat (pg WHO-TEQ/g), el que significa que els congèneres més tòxics tenen incerteses semblants als menys tòxics.

També es pot observar que tots els analits inclosos en la validació tenen una baixa incertesa estesa, inferior al 18% per a tots ells i inferior al 10% per a la majoria de contaminants. Malauradament, no ha estat possible calcular la incertesa de tots els congèneres –com és el cas de les dioxines i furans més clorats- ja perquè les seves concentracions en l'oli de fetge de bacallà de referència es trobaven per sota dels límits de detecció, o bé perquè els valors certificats tenien una desviació estàndard massa alta.

Tenint en compte els resultats de la validació (*Taula 2.15*), el mètode ha demostrat tenir una bona precisió entre les tres repeticions de l'exercici (amb valors de coeficient de variació inferiors al 5%) i bona exactitud amb la concentració real de cada un dels analits estudiats (biaixos inferiors al 10%).

Les recuperacions de patró intern per aquells contaminants analitzats d'acord amb el mètode de dilució isotòpica es troben entorn un 50 i 110%. Cap dels blancs analítics va mostrar una contaminació anòmala de les mostres. Tots aquests resultats compleixen amb els corresponents reglaments de la Unió Europea per a l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs en aliments (Normativa 1883/2006).

### **2.6.2. Estudis d'intercalibratge de PBDEs**

Com a mesura de l'exactitud dels mètodes d'anàlisi per a PCDD/Fs, PCBs i PBDEs, el Laboratori Mediambiental de l'IQS ha participat en els estudis d'intercalibratge en aliments corresponents als anys 2008, 2009 i 2010 (Interlaboratory Comparison on Dioxins in Food). En aquesta classe d'estudis, un elevat nombre de laboratoris especialitzats en l'anàlisi de COPs analitzen les mateixes mostres. D'aquesta manera cada laboratori pot avaluar l'exactitud de les seves mesures (si es considera la mitja de tots els valors experimentals com a valor real) tot comparant-se amb els altres laboratoris.

En aquests exercicis d'intercalibratge són d'especial interès els resultats corresponents als PBDEs, doncs el mètode d'anàlisi ha estat desenvolupat en els anteriors apartats de la present tesi. A més, el Laboratori Mediambiental de l'IQS mai abans s'havia participat en un estudi d'aquest tipus pels PBDEs.

Pel cas de l'estudi del 2008, on varen participar 120 laboratoris d'arreu del món, les mostres a analitzar van ser de patró de PBDEs (per avaluar l'exactitud instrumental), carn de cérvol, carn d'anguila i crema de llet. El mètode d'anàlisi aplicat a aquestes mostres va ser el desenvolupat per a l'anàlisi de COPs en oli de peix, amb l'excepció d'una etapa prèvia d'extracció en Soxhlet de la fracció lipídica de la matriu.

Per a l'estudi d'intercalibratge de PBDEs corresponent a l'any 2009 van participar 103 laboratoris. En aquest cas, les mostres a analitzar van ser les de patró de PBDEs, oli de mantega, carn de vedella i d'arengada. Novament, les mostres van ser analitzades segons el mètode posat al punt per PBDEs en la present tesi, amb una etapa prèvia d'extracció en Soxhlet de la fracció lipídica.

Finalment, en l'estudi d'intercalibratge de PBDEs de l'any 2010 van participar un total de 94 laboratoris. Les mostres analitzades van ser de patró de PBDEs, llet materna, carn de porc i de truita. Prèvia a l'etapa de purificació, es va dur a terme una extracció amb Soxhlet de les mostres de carn de porc i de truita i una extracció líquid-líquid pel cas de la llet materna.

Els resultats dels tres estudis es mostren en la *Taula 2.18*, on es troben representats els nivells promig de cada PBDE per a cada una de les mostres, la desviació estàndard de l'exercici i el resultat del Laboratori Mediambiental de l'IQS. Finalment, s'ha calculat el valor de Z (valor absolut de la diferència entre cada valor promig i el del propi laboratori dividit per la desviació estàndard de l'exercici), paràmetre que ens permet quantificar l'exactitud de les mesures en funció de la dispersió dels resultats.

**Taula 2. 18. Resultats dels estudis d'intercalibratge de PBDEs dels anys 2008, 2009 i 2010.**

Intercalibratge 2008					Intercalibratge 2009				Intercalibratge 2010			
Promig	Desviació estàndard	Valor IQS	Valor de Z		Promig	Desviació estàndard	Valor IQS	Valor de Z	Promig	Desviació estàndard	Valor IQS	Valor de Z
Patró PBDEs (ng/ml)					Patró PBDEs (ng/ml)				Patró PBDEs (ng/ml)			
BDE-28	25	2.5	23	0.80	25	2.5	26	0.41	25	2.5	24	0.40
BDE-47	25	2.3	25	0.00	24	2.1	25	0.48	25	2.1	23	0.95
BDE-99	25	2.8	24	0.36	25	2.4	27	0.84	25	2.0	23	1.0
BDE-100	26	3.1	25	0.32	25	2.3	26	0.43	25	2.0	25	0.00
BDE-153	26	2.6	25	0.38	26	2.3	26	0.00	25	2.5	26	0.40
BDE-154	26	2.1	25	0.48	25	2.1	25	0.00	25	2.5	25	0.00
BDE-183	25	3.0	26	0.33	24	2.4	26	0.84	25	3.3	26	0.31
BDE-209	94	12	84	0.82	86	7.1	90	0.56	100	10	104	0.40
Crema (ng/g)					Oli de mantega (ng/g)				Llet materna (ng/g)			
BDE-28	0.91	0.74	0.60	0.42	18	4.0	18	0.00	2	0.76	<LD	-
BDE-47	23	11	24	0.09	270	65	264	0.09	20	5.0	59	7.8
BDE-99	14	5.2	14	0.00	136	30	138	0.07	4	1.6	29	15
BDE-100	3.5	1.6	5.5	1.2	27	6.5	28	0.15	6.4	1.7	11	2.8
BDE-153	2.4	0.94	2.7	0.32	113	20	111	0.10	22	4.8	30	1.7
BDE-154	2.1	1.1	2.6	0.44	16	5.0	15	0.20	0.7	0.22	<LD	-
BDE-183	1.5	1.5	1.5	0.00	36	8.6	37	0.12	0.81	0.25	<LD	-
BDE-209	41	25	44	0.12	30	18	-	-	5.6	4.0	268	66
Cèrvol (ng/g)					Vedella (ng/g)				Porc (ng/g)			
BDE-28	0.8	0.45	0.74	0.13	1.3	0.65	1.7	0.62	1.6	0.67	<LD	-
BDE-47	13	7.2	19	0.84	44	14	46	0.15	274	63	281	0.11
BDE-99	6.4	3.5	6.1	0.09	42	11	48	0.55	400	88	393	0.08
BDE-100	1.5	0.93	5.0	3.8	8.6	2.1	8.7	0.05	75	16	74	0.06
BDE-153	2.8	1.4	11	5.9	12	3.2	13	0.31	61	13	59	0.15
BDE-154	0.97	0.66	3.2	3.4	4.6	1.5	4.6	0.00	47	9.4	49	0.21
BDE-183	2.3	1.4	130	88	2.4	1.3	3.7	1.02	24	7.9	29	0.63
BDE-209	83	49	226	2.9	43	28	266	7.9	22	13	102	6.2
Anguila (ng/g)					Arençada (ng/g)				Truita (ng/g)			
BDE-28	280	87	258	0.25	17	3.9	17	0.00	236	73	252	0.22
BDE-47	13820	2902	14689	0.30	511	107	552	0.38	51226	17417	64653	0.77
BDE-99	480	96	492	0.13	126	28	130	0.14	10114	2731	11549	0.53
BDE-100	7813	2031	7908	0.05	122	32	127	0.16	17850	4998	22267	0.88
BDE-153	1007	211	1028	0.10	23	4.6	26	0.65	2681	751	3057	0.50
BDE-154	1092	229	1133	0.18	57	15	54	0.19	4597	1379	5676	0.78
BDE-183	32	8.3	35	0.36	1.9	0.84	9.0	8.5	8.6	3.4	14	1.6
BDE-209	27	19	62	1.8	22	17	183	9.8	18	12	296	23

Els resultats de l'estudi del 2008 han estat satisfactoris per a la major part de congèneres, tal i com demostra un 78% dels valors de Z inferiors a 1. No s'han observat problemes a nivell d'exactitud instrumental en la determinació dels PBDEs mitjançant HRGC-HRMS (per a l'anàlisi del patró tots els valors de Z són inferiors a 1). Per la mostra de crema -la seva anàlisi era especialment important degut a ser una matriu amb un alt contingut lipídic, com l'oli de peix- tots els valors de Z també són inferiors a 1, fins i tot pel cas del BDE-209.

Els resultats de la mostra de cérvol són els que han mostrat una pitjor exactitud, especialment pel BDE-183 (no es va separar bé cromatogràficament d'un interferent). Pel cas de l'anguila, els resultats tornen a ser satisfactoris, fet que demostra que incloure una etapa prèvia d'extracció de la fracció lipídica de la matriu no altera de forma dràstica l'exactitud dels resultats finals. Pel que fa als resultats del BDE-209 -la seva anàlisi és particularment complicada-, han estat molt satisfactoris per les mostres de patró i crema, i acceptables pel cérvol i l'anguila. Tot i així, és destacable la dispersió existent entre els resultats obtinguts pels laboratoris participants.

En l'estudi del 2009 un 87% dels resultats obtinguts tenen valors de Z inferiors a 1, pel que es consideren aquests com a satisfactoris. A diferència de l'exercici de l'any anterior, el seu valor per a totes les matrius analitzades ha estat similar.

Finalment, en l'estudi d'intercalibratge corresponent a l'any 2010 el 63% de les concentracions determinades pels PBDEs tenen valors de Z inferiors a 1, pel que en general els resultats són satisfactoris. Tot i així, aquest valor és inferior al d'altres anys, doncs la mostra de llet materna no s'ha pogut analitzar correctament degut a problemes de recuperació (cal tenir en compte que el mètode validat en la present tesi doctoral és per oli de peix).

Tal i com s'ha observat repetidament durant el desenvolupament metodològic per als PBDEs i la seva validació, el BDE-209 mostra un comportament molt diferent al de la resta de congèneres estudiats. Això es deu a que al tractar-se d'un compost decabromat, el seu pes molecular és molt superior al de la resta d'analits, i per tant té un comportament físico-químic molt diferent. També es tracta d'un contaminant que tendeix a degradar-se fàcilment (Kierkegaard *et al.*, 2009), fet que genera problemes de recuperació de patró intern durant la seva anàlisi.

Seguint el mateix mètode d'anàlisi de PBDEs, també es va participar en un estudi d'intercalibratge per a cendres i sòls del 2009 (14<sup>th</sup> Round of the International Intercalibration Study). Les mostres analitzades van ser un patró de PBDEs i quatre sediments. Els valors de Z per a tots els congèneres van ser inferiors a 1 excepte pel BDE-183 (entre 1 i 2 per tres dels quatre sediments). Tot i així, aquests resultats demostren que el mètode d'anàlisi té una elevada exactitud i és força robust pel que fa al tipus de mostra.

En general, aquests resultats -juntament amb la validació del mètode exposada anteriorment- fan palès que el mètode desenvolupat permet analitzar satisfactòriament PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i diversos plaguicides organoclorats en oli de peix.

## 2.7. Anàlisi de mostres reals d'oli de peix

Per tal de provar el bon funcionament del mètode d'anàlisi de COPs en oli de peix que s'ha desenvolupat, s'han realitzat dos estudis amb mostres reals, cada un d'ells amb diferent finalitat. Això no només permetrà avaluar la robustesa del mètode, sinó que aportarà informació experimental dels nivells habituals de COPs en els olis de peix.

Els estudis que s'han portat a terme han estat els següents:

- Nivells de COPs en oli de peix amb diferent finalitat (consum humà o animal), origen i grau de refinament (9 mostres).
- Nivells de COPs en complements nutritius enriquits amb oli de peix (15 mostres).

A continuació es descriuen cada un d'aquests estudis.

### 2.7.1. Nivells de COPs en olis de peix amb diferent finalitat i origen.

Per a aquest estudi s'han analitzat un total de 9 mostres. Aquestes olis eren destinats al consum humà –i per tant havien estat sotmesos a processos de refinament més exigents- o al consum animal –que pràcticament es tractava de l'oli en cru-. Els olis també tenien diferents orígens –Espanya, Xile o Nord d'Europa-, encara que no totes elles tenien una procedència coneguda amb molta exactitud. La *Taula 2.19* resumeix les principals característiques de cada mostra.

**Taula 2. 19.** Mostres d'oli de peix analitzades.

Mostra	Procedència	Consum	Tipus d'oli	Tipus de peix
Oli 1	Espanya	Animal	Cru	*
Oli 2	Xile	Animal	Semirefinat	*
Oli 3	Espanya	Humà	Refinat	Salmó
Oli 4	*	Humà	Refinat	*
Oli 5	*	Animal	Refinat	Salmó
Oli 6	Espanya	Animal	Refinat	Tonyina
Oli 7	Espanya	Animal	Cru	Tonyina
Oli 8	Nord d'Europa	Animal	Refinat	Salmó
Oli 9	Nord d'Europa	Animal	Cru	Salmó

\*Dades desconegudes

Es van realitzar les anàlisis de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs, HCB i DDTs de cada un dels olis d'acord amb el mètode d'anàlisi validat en l'anterior apartat. Els resultats es mostren en les següents taules (*Taules 2.20 i 2.21*). Seguint el mateix criteri emprat en la validació metodològica, el límit de detecció s'ha determinat com la concentració de contaminant equivalent a tres cops la senyal del soroll. Pel cas dels sumatoris de famílies de contaminants, per aquells analits que han estat inferiors al límit de detecció s'ha sumat el valor d'aquest últim (valor upperbound).

**Taula 2. 20.** Nivells de COPs en les mostres analitzades.

Contaminant	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9
PCDD/Fs (pg/g)									
2,3,7,8-TCDF	4.39	0.37	<0.21	0.13	0.45	1.54	1.29	14.9	14.0
1,2,3,7,8-PeCDF	1.28	<0.08	<0.13	0.09	0.13	0.66	0.70	2.41	2.47
2,3,4,7,8-PeCDF	3.01	<0.08	<0.13	0.12	0.26	1.19	1.21	6.69	6.21
1,2,3,4,7,8-HxCDF	<0.31	<0.27	<0.33	<0.15	<0.09	<0.10	1.70	0.74	0.85
1,2,3,6,7,8-HxCDF	<0.30	<0.25	<0.32	<0.14	<0.10	<0.10	0.72	0.71	0.83
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.41	<0.24	<0.33	<0.14	0.09	<0.12	0.83	0.75	0.83
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0.46	<0.31	<0.42	<0.18	0.07	<0.13	<0.40	<0.31	<0.59
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.17	<0.08	<0.16	<0.09	0.10	0.15	4.04	0.22	<0.36
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	<0.17	<0.14	<0.25	<0.15	<0.11	<0.10	0.81	<0.25	<0.65
OCDF	0.50	<0.13	<0.25	<0.13	0.12	0.45	2.26	<0.17	<0.40
2,3,7,8-TCDD	0.25	<0.07	<0.30	<0.09	<0.08	0.09	<0.10	0.45	<0.38
1,2,3,7,8-PeCDD	0.64	<0.18	<0.27	<0.11	0.14	0.35	0.30	1.57	1.55
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.34	<0.12	<0.27	<0.14	<0.09	<0.09	<0.20	0.32	0.54
1,2,3,6,7,8-HxCDD	<0.20	<0.13	<0.29	<0.16	0.15	0.21	0.21	1.49	1.30
1,2,3,7,8,9-HxCDD	<0.20	<0.13	<0.29	<0.16	0.11	<0.10	0.24	0.51	<0.46
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.65	0.11	<0.17	0.13	0.44	1.06	1.86	1.66	1.47
OCDD	2.44	0.30	0.33	0.44	0.77	8.19	7.74	4.60	2.82
Σ PCDD/F	16.6	2.98	4.45	2.55	3.30	14.1	24.6	37.8	35.7
Σ PCDD/F-TEQ	3.14	0.48	0.90	0.39	0.48	1.30	1.67	7.48	7.12
PCBs similars a dioxines (pg/g)									
PCB 81	42.2	2.96	0.74	<1.00	3.09	125	<28.1	80.6	59.6
PCB 77	560	44.3	14.7	11.4	81.0	492	278	993	843
PCB 123	365	99.5	13.6	14.7	49.0	190	1122	688	795
PCB 118	13723	563	423	333	1312	4316	5824	21624	21446
PCB 114	216	7.95	7.10	6.00	23.6	80.8	112	279	247
PCB 105	4544	223	166	126	568	1041	1451	6623	5874
PCB 126	158	10.1	3.61	2.08	14.5	46	74.0	128	109
PCB 167	1990	50.0	83.3	33.4	89.4	572	1003	2446	2152
PCB 156	3397	76.8	132	55.6	151	900	1336	3343	3230
PCB 157	669	17.0	28.4	14.2	36.4	198	298	938	851
PCB 169	35.0	1.38	0.93	<1.15	1.58	23.2	45.6	30.7	24.9
PCB 189	457	9.13	24.7	9.26	15.8	127	219	466	422
Σ dl-PCB	26155	1105	898	608	2346	8110	11791	37639	36053
Σ dl-PCB-TEQ	20.2	1.17	0.52	0.31	1.77	6.04	9.6	18.5	16.3
PBDEs (ng/g)									
BDE-28	202	38.4	9.03	13.3	55.3	193	145	387	358
BDE-47	4729	536	293	345	783	4063	3589	6106	5657
BDE-99	732	120	78.4	110	210	617	569	953	857
BDE-100	1945	92.0	71.4	92.6	158	1534	1232	1772	1630
BDE-153	198	7.97	14.4	18.4	26.7	240	146	302	274
BDE-154	576	39.9	43.8	57.1	68.7	776	666	920	839
BDE-183	10.4	1.08	3.18	1.92	14.5	10.6	7.45	20.2	19.1
BDE-209	843	78.0	987	590	<118	1138	1138	<107	343
Σ PBDE	9237	913	1500	1229	1434	8572	7493	10568	9977

LD: Límit de detecció

**Taula 2. 21.** Nivells de COPs en les mostres analitzades.

Contaminant	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9
PCBs indicadors (ng/g)									
PCB 28	0.80	<0.13	<0.16	<0.16	<0.13	0.39	0.40	1.80	1.75
PCB 52	2.66	<0.16	<0.21	<0.21	0.62	1.09	0.82	5.95	5.58
PCB 101	6.48	0.73	<0.15	<0.15	1.37	3.99	2.82	14.2	12.1
PCB 118	15.1	0.76	0.69	<0.24	1.59	5.23	4.13	25.6	24.7
PCB 153	74.0	1.53	2.54	0.95	2.79	22.4	17.6	93.3	87.3
PCB 138	49.0	1.04	1.75	0.71	2.05	14.7	9.60	59.6	54.6
PCB 180	35.3	0.75	1.67	<0.16	1.02	11.5	8.76	32.9	31.6
Σ PCB ind	183	5.10	7.17	2.59	9.56	59.3	44.1	233	218
DDTs i HCB (ng/g)									
HCB	17.2	8.92	<0.32	<0.32	9.36	14.6	12.8	15.0	14.7
2,4'-DDE	9.53	<0.62	<0.80	<0.80	<0.62	10.6	9.34	<0.74	<0.74
4,4'-DDE	67.7	17.6	6.98	15.4	13.5	73.9	64.3	76.1	72.2
2,4'-DDD	17.0	5.99	<0.84	4.84	4.96	15.3	11.2	27.1	25.6
4,4'-DDD	8.04	5.50	4.17	3.38	6.22	23.2	13.5	16.6	11.8
2,4'-DDT	6.73	7.91	7.64	4.31	8.76	10.3	9.33	11.0	25.9
4,4'-DDT	13.8	<7.53	30.3	<972	<7.52	16.5	13.9	17.5	17.2
Σ DDT	123.0	45.1	51.0	38.8	41.6	150.0	121.0	149	153

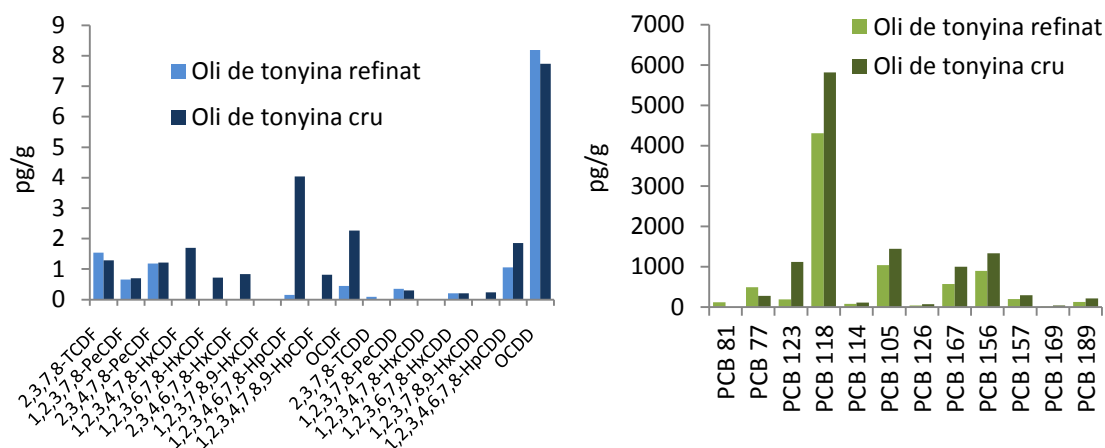
LD: Límit de detecció

Analizant els resultats s'observa que, a nivell general, els PCBs indicadors i els plaguicides organoclorats són els contaminants que presenten concentracions més elevades (de l'ordre dels ng/g). Per altra banda, les PCDD/Fs són els contaminants que mostren nivells més baixos (de l'ordre dels pg/g), tal i com sol ser habitual en aquest tipus de mostres (Nácher-Mestre *et al.*, 2009).

Si es relaciona els nivells de contaminants de cada oli de peix amb la seva finalitat, es pot observar que les mostres destinades al consum humà –Olis 3 i 4- presenten concentracions molt més baixes que les que són destinades al consum animal. Això possiblement es deu a que se les ha tractat específicament per reduir-ne la seva concentració (veure apartat 1.4 del primer capítol) i així complir la legislació vigent per alimentació humana (Reglament 1881/2006).

Tot i així, és destacable el cas dels olis de tonyina 6 i 7, que es corresponen al mateix oli de peix però en diferent estat, refinat i sense refinar respectivament. El procés de refinat ha disminuït la seva concentració de PCDD/Fs en un 40% i la de PCBs similars a dioxines en un 30% (d'acord amb les observacions formulades per Hilbert *et al.*, 1998), tal i com es mostra en la *Figura 2.28*. El procés no ha afectat significativament els nivells dels altres contaminants. Tanmateix, aquest fenomen no s'ha observat pel cas dels olis 8 i 9, que es corresponen al mateix oli de salmó refinat i sense refinat.





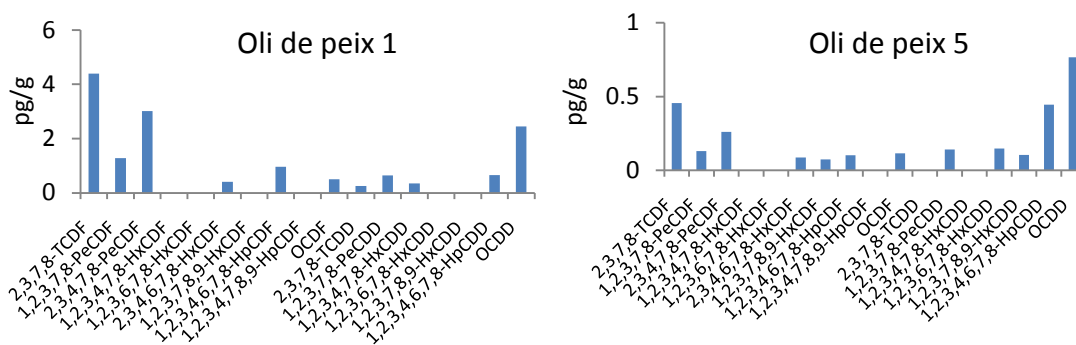
**Figura 2. 28.** Nivells de PCDD/Fs (esquerra) i PCBs similars a dioxines (dreta) en olis de tonyina refinats i sense refinar.

Comparant els resultats amb l'origen de les mostres, l'oli de salmó refinat procedent del nord d'Europa –Oli 8- té uns nivells de contaminants molt més elevats que els de salmó refinat espanyol –Oli 3-, tot i que aquest fet possiblement es pugui relacionar també amb el tractament que ha sofert cada oli. Aquest últim oli espanyol –Oli 3- presenta uns nivells de COPs del mateix ordre que l'oli procedent de Xile –Oli 2-, pel que no s'observen diferències significatives entre aquestes dues mostres de diferent origen.

En general, els olis de peix produïts a partir de salmó (Olis 8 i 9) presenten nivells més elevats de contaminants que els que són produïts a partir de tonyina (Olis 6 i 7). Tot i així, amb les mostres estudiades no es pot discriminar si això es deu a que aquestes espècies de peix bioacumulen els COPs de forma diferent o bé que el salmó procedeix d'aigües del nord, que solen estar més contaminades (Asplund *et al.*, 1997).

La contribució de cada congènere en la suma total de PCDD/Fs, PCBs, PBDEs i plaguicides pot ser un criteri útil per a la caracterització de les mostres, i pot arribar a determinar l'origen de la contaminació o fins i tot quan aquesta va ser produïda. Tot i les diferents característiques de cada un dels olis estudiats, els perfils de contaminants determinats en cada una de les mostres segueixen el mateix patró.

Els PCDD/Fs mostren una major contribució per part dels furans de menor grau de cloració i dioxines de major grau de cloració, encara que els olis menys processats (Oli 1) o destinats al consum animal (Oli 5) també presenten dioxines menys clorades (Figura 2.29). Els olis menys processats també mostren aquesta proporció més alta pels furans que per les dioxines, seguint els perfils típics per mostres de peix i derivats (Zennegg i Schmid, 2006).



**Figura 2. 29.** Perfils de PCDD/Fs per les mostres d'oli de peix 1 i 5.

Pel que fa als PCBs similars a dioxines, els seus perfils es troben caracteritzats per una elevada contribució dels congèneres -118, -105 i -156, mentre que els PCBs indicadors ho estan pels congèneres -153 i -138. Els PBDEs mostren nivells elevats de BDE-47 en totes les mostres, encara que només els olis de consum animal tenen elevades concentracions del congènere -209. Finalment, els plaguicides organoclorats venen caracteritzats per una elevada contribució de 4,4'-DDE –el metabòlit més estable del DDT (Scheringer, 2009)- i nivells variables d'HCb, que no és detectable en les mostres destinades al consum humà.

Com es detalla en l'apartat 1.3.6 del primer capítol de la present tesi doctoral, existeixen nivells màxims legislats de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines en olis de peix destinats a l'alimentació humana (Reglament 1881/2006) i animal (Directiva 2006/13/EC). Aquests nivells estan establerts per al sumatori de tots els congèneres, en unitats de toxicitat (pg WHO-TEQ/g). Les concentracions màximes es troben definides per al cas de PCDD/Fs i pel sumatori de PCDD/Fs i PCBs, ja que presenten el mateix tipus d'efecte tòxic. Aquests valors es mostren en la *Taula 2.22*, juntament amb els resultats dels olis de peix analitzats en aquest estudi.

**Taula 2. 22.** Nivells màxims de PCDD/Fs i PCDD/Fs+PCBs en oli de peix.

	PCDDFs (pg WHO-TEQ/g)	dl-PCBs (pg WHO-TEQ/g)	PCDD/Fs + dl-PCBs (pg WHO-TEQ/g)
Nivell màxim en alimentació humana	2.0	-	10.0
Llindar d'intervenció en alimentació humana	1.5	6.0	-
Nivell màxim en alimentació animal	6.0	-	24.0
Llindar d'intervenció en alimentació animal	5.0	14.0	-
Oli 1	<b>3.14</b>	<b>20.2</b>	<b>23.4</b>
Oli 2	0.48	1.17	1.65
Oli 3	0.90	0.52	1.42
Oli 4	0.39	0.31	0.70
Oli 5	0.48	1.77	2.25
Oli 6	1.28	<b>6.04</b>	7.32
Oli 7	1.51	<b>9.63</b>	<b>11.1</b>
Oli 8	<b>7.45</b>	<b>18.5</b>	<b>25.9</b>
Oli 9	<b>6.91</b>	<b>16.3</b>	<b>23.2</b>

Comparant els resultats de les mostres d'olis de peix analitzades amb els seus respectius màxims legiscats, es conclou que els olis de peix 2, 3, 4, 5 i 6 són aptes tant pel consum animal com pel consum humà, ja que no superen els respectius nivells màxims de PCDD/Fs i PCDD/Fs + dl-PCBs. Tot i així l'oli 6 supera el llindar d'intervenció pels PCBs, de manera que caldria estudiar les causes d'aquesta contaminació.

Per altra banda, l'oli de peix 1 no és apte per al consum humà degut al seu alt contingut en PCDD/Fs i PCDD/Fs + dl-PCBs, però sí que ho és per al consum animal. L'oli de peix 7 tampoc és apte per al consum humà, degut al seu alt contingut en PCDD/Fs + d-l PCBs. Finalment, els olis de peix 8 i 9 no són aptes ni pel consum animal ni pel consum humà, doncs superen els nivells màxims de PCDD/Fs i PCDD/Fs + d-l PCBs.

### **2.7.2. Nivells de COPs en complements nutritius enriquits amb oli de peix**

El peix -juntament amb els productes derivats d'aquest- és un aliment d'elevada importància nutritiva pel seu alt contingut en àcids grassos  $\omega$ -3, els quals tenen nombroses propietats beneficioses per la salut humana i animal (Fournier *et al.*, 2006).

Per aquest motiu, durant els últims anys han aparegut al mercat diversos complements nutritius enriquits amb oli de peix. Són presentats com a font alternativa al consum directe de peix, per tal d'incorporar els àcids grassos  $\omega$ -3 a la dieta. Aquests suplementes solent presentar un elevat contingut en EPA i DHA (Howe *et al.*, 2002), habitualment barrejat amb d'altres components com minerals o vitamines.

Els nivells de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines en suplementes nutritius basats en oli de peix han estat prèviament investigats a Suïssa (Zennegg i Schmid, 2006), Regne Unit (Fernandes *et al.*, 2006), Irlanda (FSAI, 2002), Japó (Tsutsumi *et al.*, 2007) i Canadà (Rawn *et al.*, 2009). Els PCBs també han estat estudiats al Regne Unit (Fernandes *et al.*, 2006, Jacobs *et al.*, 2004), Itàlia (Storelli *et al.*, 2004), Suïssa (Zennegg i Schmid, 2006) i Canadà (Rawn *et al.*, 2008). Finalment, els PBDEs han estat estudiats en suplementes basats en oli de peix a Bèlgica (Covaci *et al.*, 2007), Canadà (Rawn *et al.*, 2009), Xina (Lin *et al.*, 2007), Suïssa (Zennegg i Schmid, 2006) i Regne Unit (Jacobs *et al.*, 2004).

Tot i així, hi ha molt poca informació disponible pel que respecta al mercat espanyol (Jiménez *et al.*, 1996). Per a aquest motiu, en el present estudi s'han analitzat suplementes nutritius enriquits amb oli de peix adquirits a Espanya, per determinar els seus nivells en PCDD/Fs, PCBs, PBDEs, DDTs i HCB. També s'ha estimat quina és l'exposició a aquests contaminants a través del consum d'aquests productes.

Per completar l'estudi també s'han analitzat diversos complements nutritius basats en olis vegetals i en minerals, per poder comparar els nivells de COPs i la corresponent ingesta entre els diferents tipus d'olis. En total, s'han analitzat 15 mostres (*Figura 2.30*), totes elles adquirides en farmàcies o botigues dietètiques.



**Figura 2. 30.** Mostres analitzades en l'estudi de COPs en complements nutritius.

Dels complements nutritius analitzats, 7 eren basats en oli de peix, 5 en oli vegetal – principalment oli de prímula-, i 2 contenien una mescla d'ambdós olis. Finalment s'ha inclòs un últim suplement basat en minerals (seleni i zinc). Alguns d'aquests productes eren especialment recomanats per a dones embarassades o amb menopausa. En la *Taula 2.23* es mostra informació més detallada d'aquestes mostres, així com la seva codificació.

**Taula 2. 23.** Característiques dels complements nutritius analitzats.

Codi	Composició principal	Altres components*	Format	Quantitat d'oli	Dosi recomanada*
P1	Oli de peix	Proteïnes, carbohidrats i vitamina E	perles	500 mg/perla	2 perles/dia
P2	Oli de peix	-	ampolla	100%	1 cullerada (3.3. g)/dia
P3	Oli de peix	Policosanols, cera d'abelles	perles	450 mg/perla	2 perles/dia
P4	Oli de peix	Vitamines i minerals	perles	500 mg/perla	1 perles/dia
P5	Oli de peix	Vitamines i minerals	perles	200 mg/perla	1 perles/dia
P6	Oli de fetge de bacallà	Proteïnes i carbohidrats	perles	410 mg/perla	3-6 perles/dia
P7	Oli de fetge de bacallà	Vitamina E	perles	500 mg/perla	2 perles/dia
PV1	Oli de peix + lli	Vitamina E	perles	418 mg oli de peix/ perla i 46 mg oli lli/perla	4 perles/dia
PV2	Oli de peix + primula	Isoflavones, calci i magnesi	perles	150 mg oli de peix/ perla i 200 mg oli primula/perla	2 perles/dia
V1	Oli de llavors de carbassa	Tocoferols	perles	400 mg/perla	6 perles/dia
V2	Oli de primula	Tocoferols, vitamina E	perles	497 mg/perla	1-2 perles/dia
V3	Oli vegetal ric en $\omega$ -6	-	perles	360 mg/perla	2-3 perles/dia
V4	Oli de primula	Vitamina E	perles	500 mg/perla	1 perles/dia
V5	Oli de primula	$\alpha$ -tocopherol	perles	1 g/ perla	1-2 perles/dia
M1	Seleni i zinc	Vitamines A, B6, C, E	pastilles	0.6 g/pastilla	1 pastilla/dia

\*Segons les recomanacions dels fabricants

Es van analitzar 6 grams d'oli per mostra. Per tal d'obtenir-los, es va haver d'obrir les càpsules i recollir l'oli de l'interior (entorn 0.5 g per perla) fins a reunir la quantitat desitjada. Pel cas de la mostra mineral, es va haver de realitzar una extracció prèvia dels compostos apolars amb toluè a una mostra de 36 grams, en soxhlet durant 24 hores. L'anàlisi de COPs es va realitzar d'acord amb el mètode d'anàlisi que s'ha desenvolupat prèviament. Els resultats es resumeixen en la *Taula 2.24*. El límit de detecció s'ha determinat com la concentració de contaminant equivalent a tres cops la senyal del soroll.

**Taula 2. 24.** Concentracions de COPs en els complements nutritius estudiats.

Codi	$\Sigma$ PCDD/Fs pg/g	$\Sigma$ PCDD/Fs pg TEQ/g	$\Sigma$ dI-PCBs pg/g	$\Sigma$ dI-PCBs pg TEQ/g	$\Sigma$ PBDEs ng/g	PCB ind ng/g	$\Sigma$ DDT ng/g	HCB ng/g
P1	12.2	0.63	1666	1.39	0.62	8.15	13.2	0.90
P2	1.60	0.29	4751	0.88	1.15	17.9	25.1	0.19
P3	2.61	0.41	624	0.92	0.46	3.29	13.3	<0.04
P4	29.7	1.26	84.9	0.29	0.19	0.17	1.47	<0.04
P5	4.65	0.33	664	1.17	0.50	3.49	4.00	0.15
P6	7.18	0.9	27806	12.1	18.2	116	184	17.8
P7	15.5	2.4	15819	8.51	8.68	59.3	68.6	12.5
PV1	2.97	0.34	372	0.43	0.11	1.41	2.33	<0.04
PV2	2.08	0.33	872	0.39	0.30	3.29	6.86	0.74
V1	1.60	0.21	19.7	0.02	0.08	0.45	0.95	4.48
V2	1.08	0.18	21.2	0.03	0.11	0.91	1.43	0.77
V3	1.89	0.18	28.3	0.02	0.20	0.78	0.69	0.12
V4	1.13	0.16	14.7	0.03	0.11	1.00	1.09	0.40
V5	1.65	0.2	66.6	0.05	0.07	0.89	2.01	3.85
M1	0.55	0.04	4.91	0.01	0.10	0.48	0.69	0.02

#### Anàlisi dels nivells de COPs presents en els complements nutritius.

En la taula de resultats es poden observar importants diferències en funció del tipus d'oli en què es basa el complement nutritiu. Les mostres amb un contingut més elevat de COPs són les basades en oli de peix (P1-P7), seguides per les basades en mesclades d'olis de peix i vegetals (PV1, PV2) i les vegetals (V1-V5). El suplement de seleni i zinc (M1) és la que mostra uns nivells més baixos per a tots els contaminants.

Aquestes diferències poden ser explicades per la pròpia naturalesa de l'oli. Els COPs en animals –especialment pel peix- sofreixen un procés de bioacumulació d'aquests compostos en els teixits adiposos, i biomagnificació a través de la xarxa tròfica (Kelly *et al.*, 2007). A més, els peixos tendeixen a acumular més COPs que d'altres espècies, degut a la seva baixa capacitat de metabolització (Voorspoels *et al.*, 2004).

Pel cas dels vegetals, en canvi, aquests són incorporats en les parts exteriors de la planta per fenòmens de deposició de partícules sòlides presents en l'ambient (Malavia *et al.*, 2007). Quan l'oli és extret, els COPs són transferits en aquesta fase. Tot i així, no sofreixen fenòmens de

bioacumulació o biomagnificació, i per això les mostres vegetals solen presentar nivells més baixos per aquests tipus de contaminants.

També es pot observar l'elevada variabilitat de concentracions de COPs presents en les mostres d'oli de peix, molt més elevada que pel cas de les mostres vegetals, on són totes del mateix ordre. És destacable el cas de les mostres P6 i P7, que presenten nivells de PCBs similars a dioxines molt més elevats que pels altres compostos. Una possible explicació pot ser que són els únics complements nutritius basats exclusivament en oli de fetge de bacallà, una de les parts més adiposes dels peixos. Aquestes dues mostres també presenten unes concentracions molt més elevades de DDTs i HCB.

S'han comparat les dades experimentals amb les existents en bibliografia. Respecte a l'únic estudi espanyol existent en oli de peix (Jiménez *et al.*, 1996), els valors per a PCDD/Fs són del mateix ordre. Contràriament, els nivells de PCBs similars a dioxines són molt més elevats en el present estudi. Els valors per a PCDD/Fs, PCBs i PBDEs en oli de fetge de bacallà provinents d'estudis d'altres països (Jacobs *et al.* 1998, FSAI 2002, Jacobs *et al.* 2004, Storelli *et al.* 2004, Fernandes *et al.* 2006) són en general més elevats que per l'oli de peix, tal i com també s'observa en el present estudi.

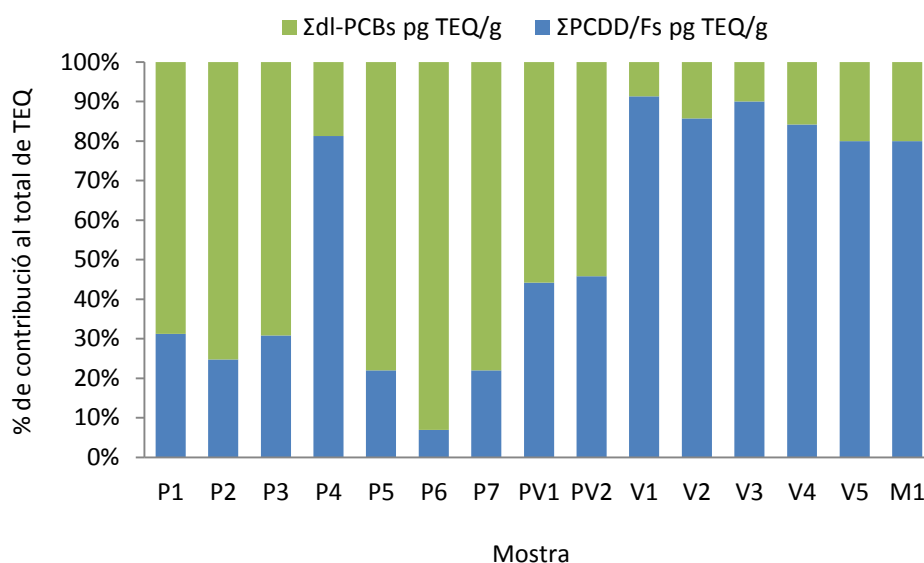
Tot i ser del mateix ordre de magnitud, les concentracions de COPs observades en els complements nutritius del present estudi són en general lleugerament més baixes que les dades publicades. Per exemple, pel cas dels PBDEs Covaci *et al.* van trobar nivells entre <0.20 i 44 ng/g, Lin *et al.* (2007) entre 1.96 i 3.72 i Rawn *et al.* (2008) entre 0.22 i 30.8 ng/g. Pel cas del present estudi, els valors es trobaven entre 0.19 i 1.15 ng/g.

No existeix tanta informació pel cas dels complements nutritius basats en olis vegetals. Tot i així, els nivells determinats en el nostre estudi són semblants a aquells publicats per Jacobs *et al.* (1998), Tsutsumi *et al.* (2007) o Rawn *et al.* (2009). En general, en aquest tipus de mostres els nivells de COPs són inferiors que als presents en suplement nutritiu basat en oli de peix, amb la majoria de congèneres per sota els límits de detecció o a prop d'ells.

Com s'ha comentat anteriorment, d'acord amb la legislació vigent (Reglament 1831/2003), els nivells màxims establerts per la Unió Europea pels olis marins emprats en alimentació humana són de 2.0 pg TEQ/g per PCDD/Fs i 10.0 pg TEQ/g per la suma de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines (Taula 2. 22). Els mateixos nivells màxims establerts pel cas dels olis vegetals són de 0.75 pg TEQ/g per PCDD/Fs i 1.5 pg TEQ/g per la suma de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines.

Les concentracions de PCDD/Fs detectades en els olis estudiats són inferiors a aquests nivells, excepte pel cas de P6 i P7 –ambdues d'oli de fetge de bacallà-. La concentració de PCBs similars a dioxines de la mostra P6 era molt elevada (12.1 pg TEQ/g) i, en conseqüència, superava el màxim establert pel sumatori de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines. En la mostra P7, els nivells de PCDD/Fs superaven els màxims legislat (2.4 pg TEQ/g). La seva concentració de PCBs també era força alta (8.51 pg TEQ/g), i per aquest fet aquesta mostra també superava els nivells màxims establerts pel sumatori de contaminants (10.9 pg TEQ/g). Aquests dos complements nutritius no s'haurien d'haver alliberat al mercat, doncs no compleixen amb la legislació vigent.

Les diferències existents entre els suplementos basats en oli de peix i vegetal també es poden veure en la contribució de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines a la concentració total de TEQ, tal i com mostra la *Figura 2.31*.



**Figura 2. 31.** Contribució de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines al total de TEQ.

En els suplementos nutritius basats en oli de peix, la major contribució al total de TEQ és per part dels PCBs similars a dioxines. Contràriament, en els suplementos basats en olis vegetals tenen una major contribució les PCDD/Fs. La contribució dels PCBs en les mostres d'oli de peix es troben entre un 69% i un 93%, en mostres d'oli mixtes entorn el 45% i per les mostres vegetals aquesta contribució és inferior al 20%. Pel suplement M1, basat en minerals en lloc d'oli, la contribució de PCBs també és molt baixa (14%).

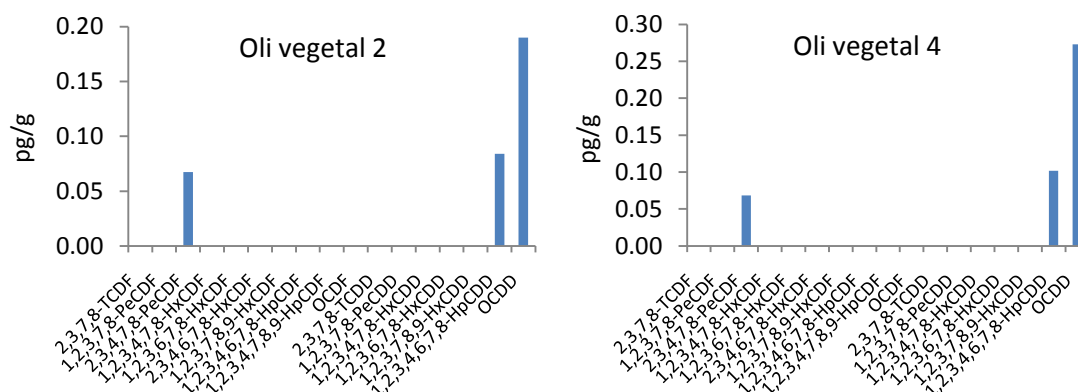
Aquesta alta contribució dels PCBs en les mostres d'oli de peix es pot explicar per la baixa capacitat de metabolització dels peixos per aquest analit (Voorspoels, 2004). Per altra banda, en els olis vegetals l'origen dels contaminants és bàsicament per deposició atmosfèrica, a on la contribució de les PCDD/Fs –expressades en TEQ- poden ser més altes. Això es deu a que les possibles emissions de PCDD/Fs a l'atmosfera són més altes que pel cas dels PCBs, que provenen de l'evaporació d'aquests quan són en un medi terrestre cap a l'atmosfera.

Entre tots els complementos nutritius basats en oli de peix, només la mostra P4 s'escapa d'aquesta tendència; la proporció de PCDD/Fs és major que per als altres olis (la contribució dels PCBs similars a dioxines és del 18%). Aquest complement, a part d'oli de peix, també contenia diversos minerals. Probablement aquests han contribuït a aquest augment de PCDD/Fs, ja que el perfil de congèneres és completament diferent a les altres mostres d'oli de peix.



### Anàlisi dels perfils dels COPs presents en els complements nutritius.

Les mostres basades en olis vegetals mostren un perfil de PCDD/Fs caracteritzat per la presència de pocs congèneres, dominat per l'OCDD, seguit de l'1,2,3,4,6,7,8-HpCDD i el 2,3,7,8-PeCDF a menor concentració (Figura 2.32).



**Figura 2. 32.** Perfil de PCDD/Fs en mostres d'oli vegetal.

Aquest perfil coincideix amb els observats en altres estudis d'olis vegetals (Montaña *et al.*, 2006). Els suplementos basats en minerals i mesclades d'olis de peix i vegetals també tenen un perfil de PCDD/Fs similar.

Pel que fa als olis de peix, es poden observar diferents tipus de perfils de dioxines. Les mostres P6 i P7 mostren el perfil típic per a aquest tipus de mostres, tal i com està descrit en estudis previs (Montaña *et al.*, 2006, Shelepchikov *et al.*, 2008), caracteritzat per altes concentracions de furans de baix grau de cloració –especialment 2,3,7,8-TCDF–, amb nivells decreixent a mesura que augmenta el grau d'halogenació del congènere. Pel cas de les dioxines s'observa el fenomen invers, amb major presència dels congèneres més clorats. La Figura 2. 33 mostra el cas de l'oli de peix 7.

Altres mostres -com P1, P2, P3 i P5- presenten molts pocs congèneres, amb nivells proporcionalment elevats d'OCDD. Això pot ser degut a que els olis de peix emprats per a aquests suplementos nutritius han estat sotmesos a algun procés de purificació, que ha reduït el nivell de PCDD/Fs (Figura 2. 33).

L'oli de peix 4 té un perfil diferent. En aquesta mostra el contingut en furans és més elevat que pels altres olis, amb una major contribució de 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, seguit d'OCDF i 1,2,3,4,7,8-HxCDF. Els nivells de dioxines augmenten amb el grau de cloració (Figura 2.33). La raó per la qual el perfil d'aquesta mostra divergeix tant de la resta d'olis de peix pot ser deguda a la presència d'altres ingredients –com minerals– en la mostra.

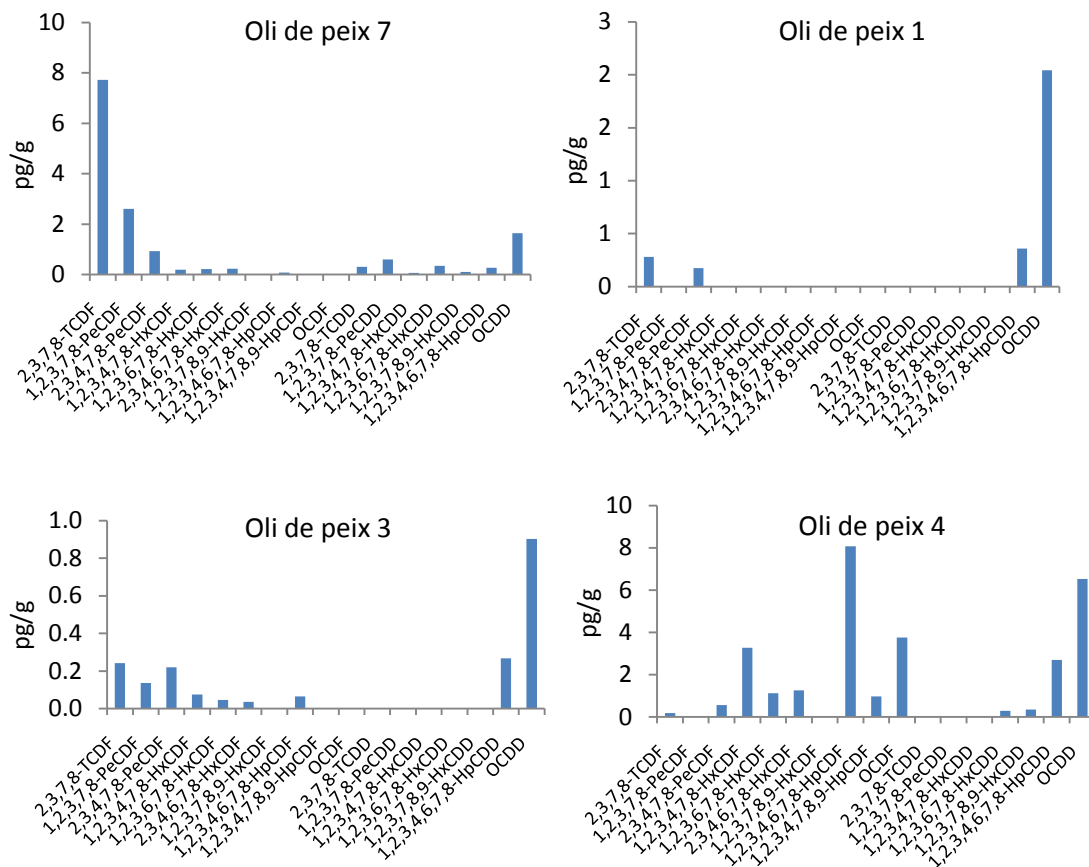


Figura 2. 33. Perfils de PCDD/Fs en mostres d'oli de peix.

Pel que fa als PCBs similars a dioxines, tots els complements nutritius analitzats tenen un perfil semblant, independentment de si estan basats en oli de peix o vegetal. El PCB-118 és el congènere amb major concentració, seguit dels PCB-105, -156 i -167. La Figura 2.34 mostra l'exemple de les mostres P1 i V1. Igualment, el congènere que més ha contribuït al total de TEQ en tots els casos és el PCB-126, degut al seu elevat factor de toxicitat (0.1).

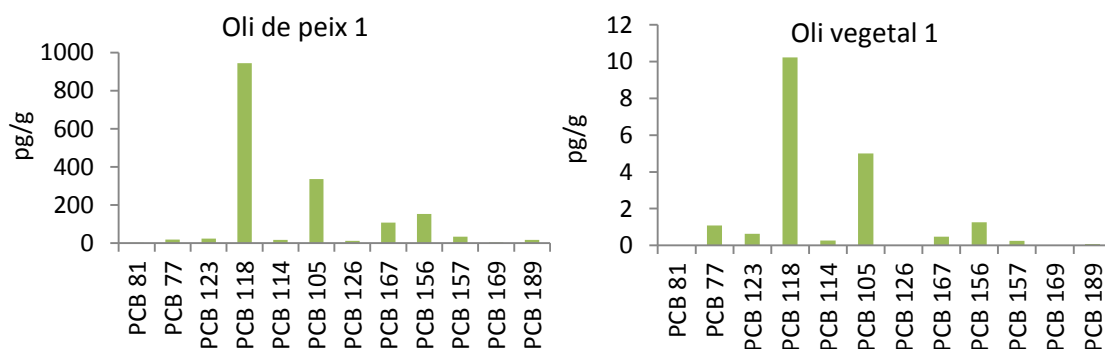
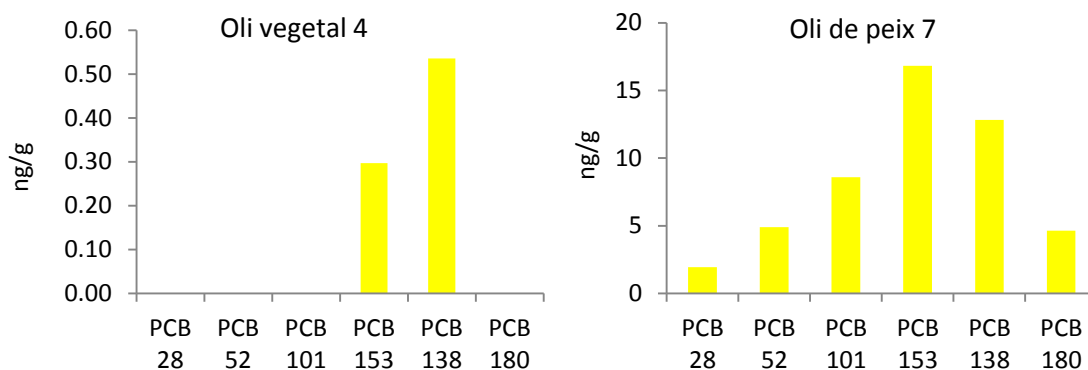


Figura 2. 34. Perfils de PCB similars a dioxines en olis de peix i vegetals.

Els perfils per als PCBs indicadors mostren diferències importants entre els olis de peix i els vegetals. Pel cas dels olis vegetals, només s’han detectat els congèneres -138 (majoritari) i -153. En canvi, en les mostres d’oli de peix s’han detectat tots els congèneres estudiats, amb un perfil dominat pel PCB-153 (Figura 2.35).

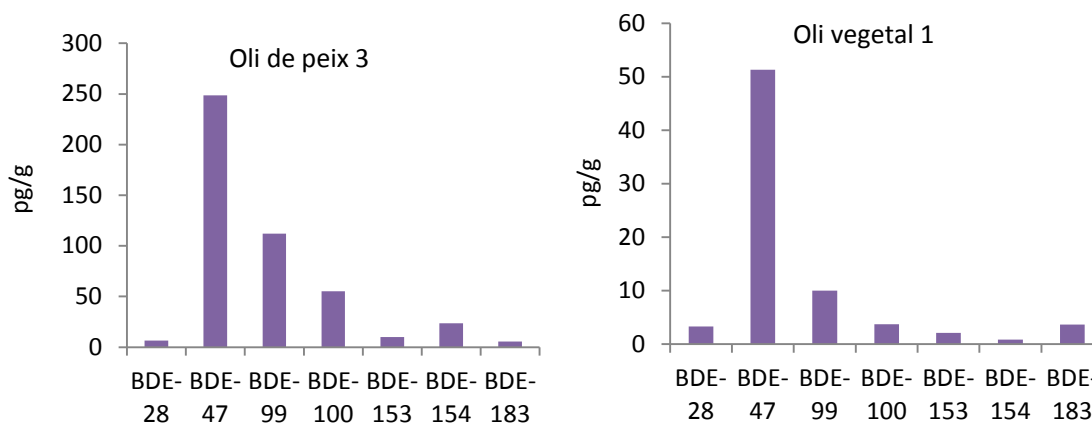


**Figura 2. 35.** Perfils de PCBs indicadors en olis de peix i vegetals.

Aquest fet està en concordança amb la informació publicada pels olis de peix (Jacobs *et al.* 2002, Jacobs *et al.* 2004, Zennegg and Schmid 2006, Fernandes *et al.* 2006, Rawn *et al.* 2008). L’acumulació d’aquests congèneres és degut a la presència de clors en substitució *-para*, juntament amb l’absència d’hidrògens en posicions veïnes (especialment en les posicions 3 i 4), que fa que siguin congèneres amb una alta resistència a la degradació metabòlica. Per aquest motiu, el PCB-153 (2,2’,3,3’,5,5’-PCB) és un dels congèneres amb nivells més elevats en les mostres d’origen animal (Storr-Hansen i Spliid, 1993). Els complements nutritius basats en mescles d’olis de peix i vegetals mostren un perfil similar a l’obtingut pels olis de peix.

Pel que fa al cas dels PBDEs, el congènere predominant en totes les mostres és el BDE-47 – independentment de si és una mostra d’origen animal o vegetal-, tal i com certs autors han publicat anteriorment (Jacobs *et al.* 2004, Covaci *et al.* 2007, Zennegg and Schmid 2006, Lin *et al.* 2007, Rawn *et al.* 2009). Tot i així, en les mostres d’oli de peix aquesta contribució és habitualment superior al 50%, mentre que per les mostres vegetals és inferior al 50%. Pel cas dels complements de barreja d’olis, el BDE-47 suposa respectivament el 54% i 77% del total de PBDEs.

Pel que fa a les mostres d’oli de peix, només la mostra P4 té una contribució de BDE-47 menor al 50% (29%). Per les mostres d’oli vegetal, la contribució d’aquest congènere es troba entre el 26% i 48%. Només l’oli vegetal 1 mostra una concentració d’aquest congènere més elevada (64%). El BDE-99 és el segon congènere més abundant, amb menor contribució en mostres d’oli de peix (entre un 9% i un 24%) i major en mostres d’oli vegetals (entre un 12% i 49%). La Figura 2.36 mostra els perfils per a aquest contaminant en els olis P3 i V1.

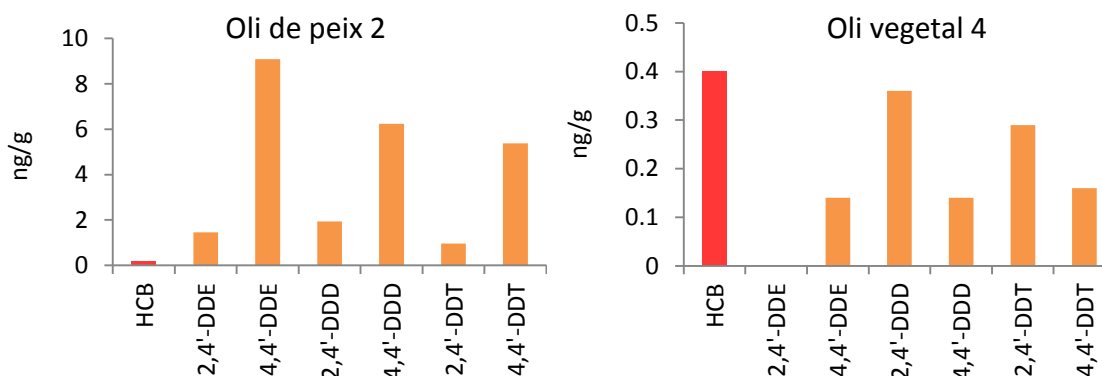


**Figura 2.36.** Perfils de PBDEs en olis de peix i vegetals.

Una altra diferència entre els olis de peix i vegetals es troba en la relació existent entre els seus congèneres de PBDEs. La proporció entre els congèneres -99 i -100 és més alta en les mostres d'origen vegetal i mineral (amb quocient del 99/100 entre 2.7 i 13) que per les mostres d'oli de peix (entre 0.6 i 2.0). Pel que fa a la proporció entre els BDEs -153 i -154, la proporció 153/154 és menor en mostres d'oli de peix (valors entre 0.2 i 0.5) que pel cas de les vegetals i mineral (entre 1.1 i 3.0).

Pel cas dels DDTs i HCB, s'han pogut detectar la majoria de contaminants en totes les mostres. Novament, existeixen certes diferències en funció de l'origen de l'oli. Els perfils corresponents a les mostres animals tenen una contribució majoritària del metabòlit 4,4'-DDE, tot i que els altres isòmers del DDT també hi són presents en concentracions notables. L'HCB, en canvi, presenta nivells molt inferiors en les mostres d'origen vegetal (Figura 2.37).

L'efecte observat és l'invers en la majoria de mostres d'origen vegetal (V1, V2, V4 i V5), on l'HCB és el contaminant que té més participació. La resta de metabòlits de DDT presenten nivells més variables, però a diferència dels olis animals, el 4,4'-DDE no sempre és majoritari (Figura 2.37). Pel que fa a la mostra mineral, presenta un alt contingut en 2,4'-DDT, degut a que en mostres inorgàniques no hi ha metabòlisi.



**Figura 2.37.** Perfils de DDTs i HCB en mostres d'oli de peix i vegetals.

### **Ingesta de COPs a través de complements nutritius.**

Les ingestes de COPs han estat estimades multiplicant la concentració dels contaminants en cada complement nutritiu per la dosi diària màxima recomanada pel fabricant (*Taula 2. 23*).

Les ingestes de PCBs indicadors es troben entre 0.08 ng/dia i 284 ng/dia pel cas de les mostres d'oli de peix (incloent les de fetge de bacallà) i entre 0.50 ng/dia i 1.79 ng/dia pels olis vegetals. Pels PBDEs, en les mostres basades en oli de peix les seves ingestes corresponents es trobaven entre 0.10 ng/dia i 44.8 ng/dia, mentre que per les mostres d'origen vegetal estaven entre 0.06 ng/dia i 0.22ng/dia. Aquests valors es troben en el rang baix respecte a les dades publicades pel cas d'oli de peix o barreja d'olis animal i vegetal (Jacobs *et al.* 1998, Storelli *et al.* 2004, Covaci *et al.* 2007, Rawn *et al.* 2008, Rawn *et al.* 2009).

Per a la suma de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines, expressant les concentracions en unitats toxicològiques TEQ, les ingestes estimades van ser més baixes pel cas dels complements nutritius basats en olis vegetals (entre 0.10 pg TEQ/dia i 0.55 pg TEQ/dia) que pels olis de peix o barreja d'olis (entre 0.30 pg TEQ/dia i 32.0 pg TEQ/dia). Aquests valors també es troben en el rang baix respecte a la informació publicada per altres autors pel cas d'olis marins (Rawn *et al.*, 2009).

La ingesta causada per la suma de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines deguda als complements nutritius basats en olis de peix analitzats en el present estudi (entre 0.30 pg TEQ/dia i 3.84 pg TEQ/dia) és inferior a la produïda pel consum directe de peix a Espanya segons diversos autors: 21.5 pg TEQ/dia (Bocio i Domingo, 2005), 24.8 pg TEQ/dia (Fernandez *et al.*, 2004). Només les mostres basades en oli de fetge de bacallà superarien la ingesta deguda al consum directe de peix, ja que seria de 32.0 pg TEQ/dia.

Pels PBDEs, Bocio *et al.* (2007) van publicar ingestes de 30.7 pg TEQ/dia degudes al consum de peix i marisc a Catalunya. La majoria d'ingestes de PBDEs estimades pels complements nutritius analitzats en aquest estudi són molt més baixes que aquest valor (entre 8 i 500 vegades menors). Novament, només pel cas d'una de les mostres basades en oli de fetge de bacallà (P6), la ingesta d'aquests contaminants seria més alta que la que se'n deriva del consum directe de peix.

En general, les ingestes calculades per les mostres basades en olis vegetals i mineral són inferiors que les d'olis de peix i mescla d'olis, especialment pel cas dels PCBs (indicadors i similars a dioxines) i PBDEs.

En l'Annex de la present tesi doctoral es pot trobar d'informació més retallada referent a aquest estudi.

## 2.8. Bibliografia

---

- Asplund L, Athanasiadou M, Ericsson U, Sjödin A, Boörjeson H, Bregman A (1997). Mass spectrometric screening for organohalogenated substances (OHs) in blood plasma from Baltic salmon (*Salmo salar*). *Organohalogen Compounds* 33: 355-359
- Bershtam Levitanus, V (2005). Desarrollo de técnicas cromatográficas para el análisis de PBDE . Treball final de carrera dirigit pel Dr. Jordi Díaz, realitzat a l'IQS
- Blanco LS, Vieites JM (2010). Single-run determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) di- todeca-brominated in fish meal, fish oil and fish feed by isotope dilution: Application of automated sample purification and gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry (GC/ITMS). *Analytica Chimica Acta* 672: 137-146
- Bocio A, Domingo JL, Martí-Cid R, Mata E, Teixidó A, Llobet JM (2007). Dietary intake of PBDEs by the population of Catalonia, Spain. Temporal trend. *Organohalogen Compounds* 69: 2710–2712
- de la Cal A, Eljarrat E, Barceló D (2003). Determination of 39 polybrominated diphenyl ethers congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification. *Journal of Chromatography A* 1021: 165-173
- Concejero M, Ramos L, Jiménez B, Gómara B, Abad E, Rivera J, González MJ (2001). Suitability of several carbon sorbents for the fractionation of various sub-groups of toxic polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Journal of Chromatography A* 917:227-237
- Covaci A, Voorspoels S, Vetter W, Gelbin A, Jorens PG, Blust R, Neels H (2007). Anthropogenic and naturally occurring organobrominated compounds in fish oil dietary supplements. *Environmental Science Technology* 41: 5237–5244
- Díaz J (1999). Determinación de dioxinas, furanos y PCB coplanares: Desarrollo de métodos y estudio de niveles en muestras de interés ambiental y biológico. Tesis doctoral dirigida pel Dr. Lluís Comellas i la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Rodríguez, realitzada a l'IQS
- Directiva 2006/13/EC. Amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed as regards dioxins and dioxin-like PCBs. *Diari Oficial de la Unió Europea*, L 32: 44-53
- El-Shahawi MS, Hamza A, Basshammakh AS, Al-Saggaf WT (2010). An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80: 1587-1597
- EPA 1613 Method (1994). Tetra-Trough Octa Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC-HRMS Revision B.
- EPA 1614 Method (2007). Brominated biphenyl ethers in water, soil, sediment and tissue by HRGC-HRMS.

- European Pharmacopoeia 6.2, 01/2008: 20429 corrected 6.2.
- Fernández MA, Gómara B, Bordajandi LR, Herrero L, Abad E, Ábalos M, Rivera J, González MJ (2004). Dietary intakes of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in Spain. *Food Additives Contaminants* 21: 983–991
- Fernandes MA, Rose M, White S, Mortimer DN, Gem M (2006). Dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in fish oil dietary supplements: occurrence and human exposure in the UK. *Food Additives Contaminants* 23: 939-947
- Fournier V, Juanera P, Destaillets F, Dionisi F, Lambelet P, Sebedio JL, Berdeaux O (2006). Analysis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization. *Journal of Chromatography A* 1129: 21-28
- FSAI (2002). PCDD/F and PCB in Farmed and Wild Salmon, Farmed Trout and Fish Oil Capsules. [http://www.fsai.ie/monitoring\\_and\\_enforcement/monitoring/surveillance/dioxins\\_furans\\_pcb.html](http://www.fsai.ie/monitoring_and_enforcement/monitoring/surveillance/dioxins_furans_pcb.html). Data de l'última consulta: 30/09/2010
- Glynn A, Aune M, Nilsson I, Darnerund PO, Ankarberg EH, Bignert A, Nordlander I (2009). Declining levels of PCB, HCB and *p,p'*-DDE in adipose tissue from food producing bovines and swine in Sweden 1991-2004. *Chemosphere* 74: 1457-1462
- Grau J (2004). Estudi de la metodologia per l'anàlisi de PCDD/F i PCB coplanars en mostres de carn, peix i derivats. Treball final de carrera dirigit pel Dr. Jordi Díaz, realitzat a l'IQS
- Haglund P, Asplund L, Järnberg U, Jansson B (1990a). Isolation of toxic polychlorinated biphenyls by electron donor—acceptor high-performance liquid chromatography on a 2-(1-prenyl)ethyldimethylsilylated silica column. *Journal of Chromatography A* 507: 389-398
- Haglund P, Asplund L, Järnberg U, Jansson B (1990b). Isolation of mono- and non-ortho polychlorinated biphenyls from biological samples by electron-donor acceptor high performance liquid chromatography using a 2-(1-pyrenyl)ethyldimethylsilylated silica column. *Chemosphere* 20: 887-894
- Hilbert G, Lillemark L, Balchen S, Hojskov C (1998). Reduction of organochlorine contaminants from fish oil during refining. *Chemosphere* 37: 1241-1252
- Howe PR, Downing JA, Grenyer BR, Grigonis-Deane EM, Bryden WL (2002). Tuna fishmeal as a source of DHA for n-3 PUFA enrichment of pork, chicken, and eggs. *Lipids*, 37 (11), 1067-1076
- Jacobs MN, Santillo D, Johnston PA, Wyatt CL, French MC (1998). Organochlorine residues in fish oil dietary supplements: comparison with industrial grade oils. *Chemosphere* 37: 1709–1721

- Jacobs MN, Covaci A, Schepens P (2002). Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environmental Science and Technology* 36: 2797–2805
- Jacobs MN, Covaci A, Gheorhe A, Schepens P (2004). Time trend investigation of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides in selected n-3 polyunsaturated fatty acid rich dietary fish oil and vegetable oil supplements; nutritional relevance for human essential n-3 fatty acid requirements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1780–1788
- Jiménez B, Wright C, Kelly M, Startin JR (1996). Levels of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in dietary supplement fish oil obtained in Spain. *Chemosphere* 32: 461–467
- Kannan N, Hee Hong S, Ryoung Oh J, Hyuk Yim U, Li D, Joon Shim W (2005). PYE [2-(1-pyrenyl)ethyltrimethylsilylated silica] Column HPLC and HR-GC-(micro) ECD in the Accurate Determination of Toxic Co-planar PCBs and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs). *Bulletin of the Korean Chemical Society* 26:529-536
- Kawashima A, Iwakiri R, Honda K (2006). Experimental study on the removal of dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) from fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10294-10299
- Kelly BC, Ikononou MG, Blair JD, Morin AE, Gobas, FAPC (2007). Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants. *Science* 317:236-239
- Kierkegaard A, Sellström U, McLachlan MS (2009). Environmental analysis of higher diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane. *Journal of Chromatography A* 1216: 364-375
- Korytár P, Covaci A, de Boer J, Gelbin A, Brinkman UA (2005). Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* 1065: 239-249
- Kuhn ER, Ellis J, Vickers AK (2003). GC/MS analysis of polybrominated flame retardants. *Catàleg comercial d'Agilent*.
- Lin Z, Tu F, Ma Y, Chen M, Zhang L, Sun R, Zou X, Xiaobo L, Zhaobin CH (2007). Determination of five polybrominated diphenyl ether residues in deep sea fish oil using gas chromatography-negative chemical ionization/mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography* 25: 262–266
- Malavia J, Abalos M, Santos FJ, Abad E, Rivera J, Galceran MT (2007). Analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in vegetable oil samples by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1149: 321–332
- Marcè Ibáñez N (2001). Treball final de carrera: Estudi de famílies de contaminants orgànics halogenats com a possibles interferències per l'anàlisi de PCDD/Fs i PCBs. Dept. Química Analítica, IQS.



- Martínez-Cored M, Pujadas E, Díaz-Ferrero J, Coll M, Martí R, Broto-Puig F, Comellas L, Rodríguez-Larena MC (1999). Fractionation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and planar polychlorinated biphenyls by high performance liquid chromatography on a pyrenyl-silica column. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364:576-583
- Montaña MJ (2000). Posada al punt d'un procediment d'anàlisi de dioxines, furans i bifenils policlorats en plasma sanguini humà. Aplicació a mostres d'un grup de població de Catalunya. Treball final de carrera dirigit per la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Rodríguez i el Dr. Lluís Comellas, realitzat a l'IQS.
- Montaña MJ, Bescós L, Martí R, Ferrer C, Yusà V, Díaz-Ferrero J (2006). Results from food monitoring program for dioxins in Comunitat Valenciana (Spain): 2004–2005. *Organohalogen Compounds* 68: 1874–1877
- Mydlová J, Krupčík J, Korytár P, Sandra P (2007). On the use of computer assisted resolution of non-separable peaks in a congener specific polybrominated diphenyl ether capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 1147:95-104
- Nácher-Mestre J, Serrano R, Benedito-Palos L, Navarro JC, López FJ (2009). Effects of fish oil replacement and re-feeding on the bioaccumulation of organochlorine compounds in gilthead sea bream (*Spaurus aurata L.*) of market size. *Chemosphere* 76: 811-817
- Rawn DFK, Breakell K, Verigin V, Nicolidakis H, Sit D, Feeley M (2008). Persistent organic pollutants in fish oil supplements on the Canadian market: polychlorinated biphenyls and organochlorine insecticides. *Journal of Food Science* 74: 14-19
- Rawn DFK, Breakell K, Verigin V, Nicolidakis H, Sit D, Feeley M (2009). Persistent organic pollutants in fish oil supplements on the Canadian market: polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Food Science* 74:31-36
- Reglament 1881/2006. Reglamento que fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diari Oficial de la Unió Europea*, L 364: 5-24
- Reglament 1883/2006. Reglamento que establecen métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de los niveles de dioxinas y PCB similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios. *Diari Oficial de la Unió Europea*, L364: 32-43
- Rodríguez Larena MC (1996). Desarrollo y comparación de métodos para el análisis de bifenilos, dibenzo-*p*-dioxinas y dibenzofuranos policlorados en muestras de interés ambiental. Tesi doctoral dirigida pel Dr. Lluís Comellas, realitzada a l'IQS.
- Scheringer M (2009). Long-range transport of organic chemicals in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (4):677-690

- Shelepchikov AA, Shenderyuk VV, Brodsky ES, Feshin D, Baholdina LP, Gorogankin SK (2008). Contamination of Russian Baltic fish by polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like biphenyls. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25: 136–143
- Srogi K (2008). Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review. *Environmental Chemical Letters* 6:1-28
- Storelli MM, Storelli A, Marcotrigiano GO (2004). Polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, hexachlorocyclohexane isomers, and pesticide organochlorine residues in cod liver oil dietary supplements. *Journal of Food Protection* (67): 1787–1791
- Storr-Hansen E, Spliid H (1993). Coplanar polychlorinated biphenyl congeners levels and patterns and the identification of separate populations of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Denmark. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 44–58
- Thermo Scientifics (2005). Catàleg comercial d'espectrometria de masses.
- Tsutsumi T, Amakura Y, Tanno K, Yangl T, Kono Y, Sasaki T (2007). Dioxins and others organohalogen compounds in fish oil supplements on the Japanese market. *Organohalogen Compounds* 69: 2371-2374
- UNEP (2005). Ridding the world of POPs: A guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. UNEP's information unit for conventions.
- US Silica Company (2011). Florisil. [www.u-s-silica.com/media/13560/berflorisil%20pds.pdf](http://www.u-s-silica.com/media/13560/berflorisil%20pds.pdf).  
Data de l'última consulta: 30/03/2011
- Voorspoels S, Covaci A, Schepens P (2004). Brominated flame retardans in birds of prey from Flanders, Belgium. *Organohalogen Compounds* 66: 3884-3891
- de Voogt P (1989). Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related compounds. Ed Kimbrough and Jensen.
- Wang P, Zhang Q, Wang Y, Wang T, Li X, Ling D, Jiang G (2010). Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples. *Analytical Chimica Acta* 663: 43-48
- Zennegg M, Schmid P (2006). PCDD/Fs, PCB, dioxin-like PCB, and PBDE in fish oil used as dietary supplement in Switzerland. *Organohalogen Compounds* 68: 1967-1970

**3. ELIMINACIÓ DE COPs EN OLI DE PEIX MITJANÇANT**  
**ADSORBENTS SÒLIDS**



### **3.1. Introducció**

---

El principal objectiu de la present tesi doctoral és el desenvolupament de tècniques per a l'eliminació de COPs en oli de peix. En aquest capítol s'ha estudiat l'eliminació de PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines, PCBs indicadors, PBDEs, DDTs i HCB mitjançant l'ús d'adsorbents sòlids.

Existeix un elevat nombre d'adsorbents comercials, cadascun d'ells amb diferents propietats, composició o finalitat. En aquest capítol s'ha estudiat l'eliminació de COPs en oli de peix amb adsorbents amb base silícica i base carbonàcia.

En l'**apartat 3.2** s'ha realitzat un estudi d'alguns adsorbents silícics disponibles comercialment, amb la corresponent caracterització de cadascun dels sòlids seleccionats. Posteriorment s'ha portat a terme el procés d'eliminació dels contaminants, a través de condicions inicials d'adsorció basades en la bibliografia existent. Els nivells de contaminants anteriors i posteriors aquest procés s'han determinat mitjançant les metodologies analítiques desenvolupades durant el capítol 2. Finalment, s'ha estudiat el procés d'adsorció més a fons mitjançant un disseny d'experiències, a través del qual s'ha determinat quins factors experimentals afecten significativament l'adsorció de COPs i de quina manera.

Anàlogament, en l'**apartat 3.3** s'ha estudiat l'eliminació de COPs en oli de peix mitjançant adsorbents carbonacis. Amb aquesta finalitat s'ha realitzat un estudi inicial dels adsorbents sòlids disponibles al mercat espanyol, i se n'han caracteritzat les seves propietats físiques més importants. Posteriorment, s'ha avaluat la capacitat d'aquests tipus de sòlids per a l'adsorció de COPs en olis de peix, basant les condicions experimentals inicials en les que es trobaven recollides bibliogràficament. Novament, aquest procés d'adsorció s'ha estudiat de forma més exhaustiva mitjançant un disseny d'experiències, i s'ha optimitzat el mètode experimental a través d'un disseny d'evolució. Finalment, s'ha avaluat la capacitat de reutilització d'aquesta classe d'adsorbents per a l'eliminació de COPs.

Cal recordar que els olis de peix es consumeixen per les seves propietats beneficioses per la salut. Per aquest motiu, en l'**apartat 3.4** s'han caracteritzat els olis tractats des de un punt de vista nutritiu –composició en àcids grassos- abans i després dels processos d'adsorció, per tal d'avaluar com afecta aquesta etapa a les característiques inicials dels olis. El capítol finalitza amb l'exposició de la bibliografia citada en l'**apartat 3.5**.

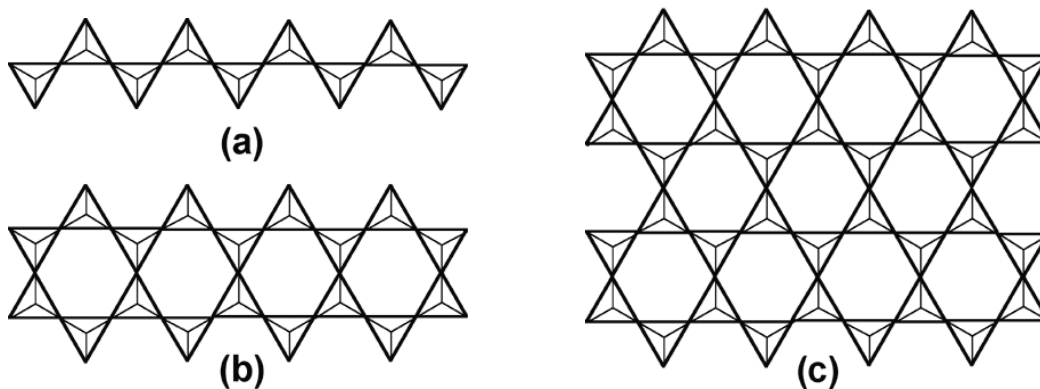
## 3.2. Eliminació de COPs amb adsorbents silícics

### 3.2.1. Els adsorbents silícics

Existeixen diverses publicacions que han estudiat l'eficàcia de sòlids amb base carbó per a l'adsorció de PCDD/Fs i PCBs similars a dioxines en diferents tipus de matrius, ja siguin líquides (Trinh *et al.*, 2006) o bé gasoses (Chang *et al.*, 2008a). Basant-se en les condicions experimentals d'aquests estudis, en el present apartat s'ha volgut avaluar l'eliminació de PCDD/Fs, PCBs i PBDEs en oli de peix mitjançant adsorbents sòlids amb estructura silícica.

Aquests adsorbents són àmpliament emprats en la indústria química per a l'eliminació de contaminants orgànics volàtils com el benzè, toluè o diversos cloroalcans (Chang *et al.*, 2008b), o en la indústria alimentària per la purificació d'olis (EUBA, 2007). Per aquest motiu s'han escollit aquests adsorbents, per tal d'avaluar la seva capacitat per l'eliminació de COPs en olis de peix.

En l'estudi s'han inclòs cinc classes d'adsorbents comercials, cadascun d'ells amb una estructura diferent: gel de sílice, Florisil, XAD-2, bentonites i sepiolites. Amb l'excepció del XAD-2 –que es tracta d'un adsorbent polimèric–, tots els adsorbents pertanyen a la família dels silicats. L'estructura d'aquests compostos es basa en àtoms de silici amb geometria tetraèdrica, amb un àtom d'oxigen en cada un dels quatre vèrtexs. Aquests tetraedres poden compartir un, dos o tres dels seus vèrtexs amb d'altres tetraedres, generant així estructures de cadena, doble cadena o plana (Figura 3.1).



**Figura 3. 1.** Diferents estructures dels silicats: cadena (a), doble cadena (b) i plana (c).

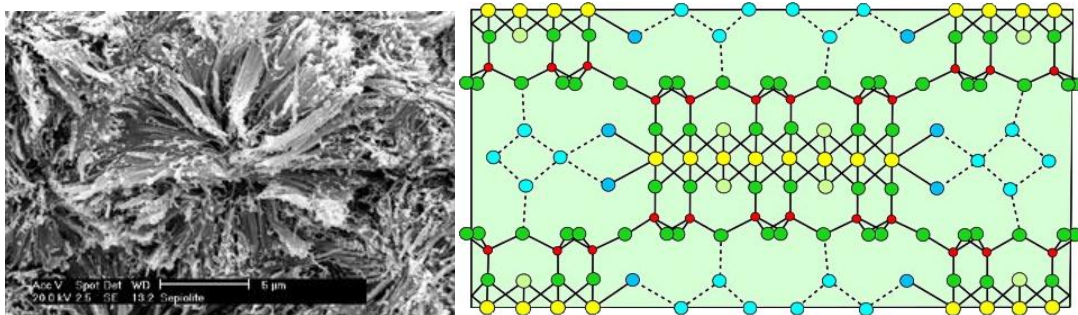
Les sepiolites i bentonites pertanyen al grup de compostos silícics amb estructura plana (Figura 3. 1 C), també coneguts com a fil·losilicats. En aquestes estructures els tetraedres de silici comparteixen tres vèrtexs amb tetraedres contigus, generant estructures en forma de làmines planes de composició monomèrica corresponent a Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Aquesta estructura en forma laminar és la característica més important dels fil·losilicats -que ve del grec *phyllos*, que vol dir fulla- (Klein, 1997), i els hi dona una direcció d'exfoliació dominant. Degut a això, aquest tipus de silicats generalment són tous, de baixa densitat i elevada superfície específica. A continuació es descriuen amb més grau de detall cada un dels adsorbents estudiats.

### Sepiolites

La sepiolita és un mineral de color blanquinós, no molt abundant a la terra, i que es troba principalment a Turquia, Grècia, Espanya, Marroc, Tanzània i als Estats Units. És un fil·losilicat de magnesi hidratat de fórmula molecular  $Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2 \cdot 6(H_2O)$ , i químicament molt inert.

Aquest adsorbent té una densitat de 2.0 a 2.3 g/cm<sup>3</sup> i una superfície específica entorn als 350 m<sup>2</sup>/g. La seva estructura cristal·lina genera uns canals longitudinals interns, anomenats canals zeolítics, que són els que realment proporcionen a la sepiolita la capacitat adsorbent en augmentar considerablement la seva superfície específica. En la *Figura 3.2* es pot observar la morfologia superficial de la sepiolita, així com la seva estructura molecular.



**Figura 3. 2.** Imatge de la sepiolita obtinguda a través de microscòpia electrònica d'escombrat (esquerra) i estructura molecular (dreta), amb els àtoms de silici en vermell, magnesi en groc, oxigen en verd, grups hidròxid en gris i molècules d'aigua en blau (Weaver, 1989).

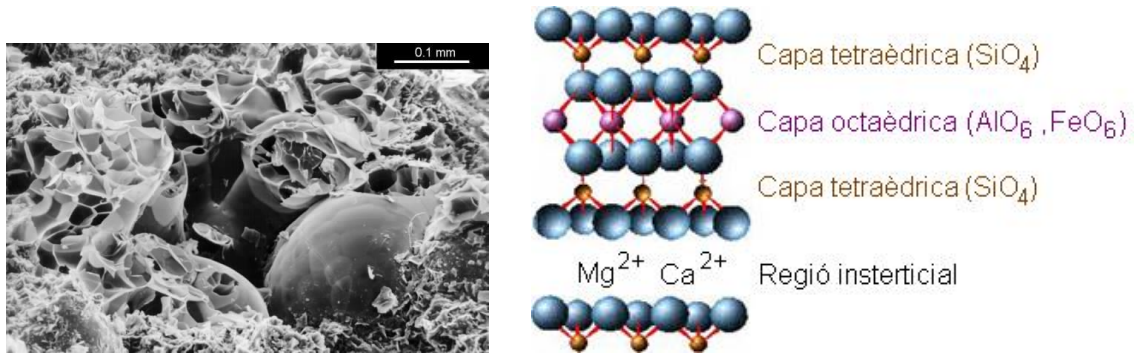
La sepiolita té moltes aplicacions a nivell industrial, amb finalitats molt diferents. Gràcies a la seva elevada superfície específica, es fa servir àmpliament com a adsorbent d'orins en sòls o llits d'animals (gats), així com a adsorbents en processos de purificació del petroli o decolorant en el filtratge de líquids. També s'empren en diversos processos de clarificació i floculació.

En la indústria farmacèutica es fa servir com a excipient de principis actius, al tractar-se d'un sòlid no tòxic, com a additiu en sistemes sota pressió o com a espessidor gràcies a les seves propietats aglomerants.

En la indústria alimentària s'utilitza com a additiu en pinsos animals, i està reconeguda per la Unió Europea amb el N<sup>o</sup> E-562. Per les seves propietats aglomerants es recomana per a totes les espècies animals fins a un màxim d'un 2% en la dieta, ja que permet reduir la velocitat del trànsit intestinal i millorar la digestió (Escribano, 2004).

### Bentonites

La bentonita és un mineral força abundant a la terra, que pertany al grup de les esmectites. Té estructura laminar formada principalment per montmorillonita, i es tracta d'un silicat hidratat d'alumini i magnesi. L'estructura de la montmorillonita consisteix en una capa octaèdrica formada per òxids d'elements metàl·lics (generalment alumini o magnesi i ferro en petites quantitats) entre dues capes tetraèdriques de silici i oxigen (SiO<sub>4</sub>). La *Figura 3.3* mostra la seva morfologia de superfície, així com la seva estructura molecular.



**Figura 3. 3.** Imatge de la bentonita obtinguda a través de microscòpia electrònica d'escombrat (esquerra) i la seva estructura molecular (dreta) (EUBA, 2007).

En la figura que es mostra en l'estructura de la dreta, els àtoms d'alumini poden ser substituïts parcialment per àtoms de magnesi o ferro. Aquesta substitució genera una càrrega negativa, que es compensa amb l'absorció de diferents ions -generalment calci, sodi o magnesi- generant els diferents tipus de bentonites. La seva fórmula molecular és  $(Al_{32}Mg_{0.8})(Si_8)O_{20}(OH)_4X_{0.8}$ , on X és el calci, sodi o magnesi que substitueix a l'alumini.

De la mateixa manera que les sepiolites, les bentonites tenen nombroses i molt variades aplicacions a nivell industrial i comercial. El seu ús més habitual és com a sorra per a la fabricació de motlles per a diferents materials. També són emprades com a fangs de perforació. En aquest cas la bentonita es troba com a suspensió d'argila en aigua, i s'utilitza en processos de perforació de pous de petroli i gas, amb l'objectiu de netejar el fons del pou, refredant i lubricant la broca o element perforador.

Degut a la seva elevada superfície específica, les bentonites es poden utilitzar com a adsorbent en la decoloració d'olis, o en la purificació d'aigües contaminades amb olis industrials i contaminants orgànics.

Finalment, també són sòlids àmpliament emprats en la indústria alimentària, com a additiu en pinsos animals en quantitats aproximadament d'un 1%. Això genera importants beneficis, com per exemple en els ous dels animals, ja que n'augmenta la producció en un 15%, la mida en un 10%, i la closca es fa més dura. Actua com a promotor del creixement i pot adsorbir o absorbir toxines (EUBA, 2007).

### Florisil

El Florisil és un producte comercial patentat per la U.S. Silica Company, que esta compost de  $SiO_2$  (84.0%),  $MgO$  (15.5%) i a  $Na_2SO_4$  anhidre (0.5%). Es tracta d'un sòlid de reduïda mida de partícula, emprat generalment en l'àmbit de la cromatografia per a la purificació de diferents compostos, com per exemple hormones, hidrocarburs, compostos aromàtics o pesticides. També es fa servir com a decolorant de greixos i ceres.



### Gel de sílice

La sílice és un mineral format per silici i oxigen, amb fórmula  $\text{SiO}_2$ . És un sòlid blanc, dur, inert i amb un punt de fusió molt alt. Té diferents aplicacions industrials, com el reforç de pintures i la seva protecció contra atacs químics, agent filtrant, fase estacionària cromatogràfica o en la fabricació de vidres i ceràmiques.

### XAD-2

Aquest sòlid és d'origen polimèric, i per tant és l'únic adsorbent del present estudi que no té base silícica. Es tracta d'una resina hidrofòbica copolimèrica d'estirè-divinilbenzè comercialitzada per Supelco. S'utilitza per adsorbir compostos orgànics presents en l'aigua, aire o dissolvents orgànics.

Tot i així, s'ha inclòs en l'estudi perquè presenta una elevada porositat i superfície específica (entorn  $300 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Està compost per petites boles blanques, d'una mida entre 0.3 i 0.9 mil·límetres de diàmetre. Cadascuna d'aquestes petites boles està formada alhora d'un conglomerat de petites microesferes, que generen els microporus per on pot penetrar el líquid (Sigma-Aldrich, 1997). La Figura 3.4 mostra un esquema de la partícula de XAD-2.

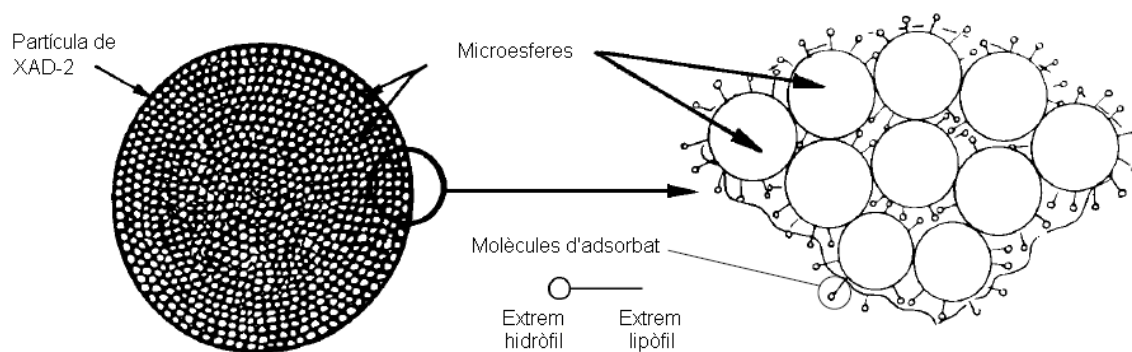


Figura 3. 4. Esquema de una partícula de XAD-2 (Sigma-Aldrich, 1997).

### Minsorb

Aquest adsorbent és un producte patentat i comercialitzat per Sorbacal, empresa especialitzada en l'eliminació de diversos compostos químics, com l'àcid clorhídric, àcid fluorhídric o metalls pesats en gasos. L'eficàcia d'aquest adsorbent ha estat provada per l'adsorció de PCDD/Fs en emissions de plantes municipals incineradores de residus sòlids (Leroy *et al.*, 2004). La seva composició és d'un 80% fil·losilicat i un 20% dolomita  $-\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2-$ .

### **3.2.2. Caracterització dels adsorbents silícics emprats**

Per a la realització de l'estudi d'eliminació de COPs en oli de peix, s'han adquirit un total de 11 adsorbents silícics comercials, tots ells basats en les cinc estructures anteriorment comentades.

Alguns dels adsorbents inclosos en l'estudi es troben disponibles al Laboratori Mediambiental de l'IQS, ja que es fan servir habitualment per a la purificació de les mostres (Florisil i sílica) o com a adsorbents en captadors (XAD-2).

Les bentonites càlciques Volcansil DE/11 i DE/23 han estat adquirides a través del fabricant Benesa, i són silicats d'alumini i magnesi hidratats emprats com a terres de blanquejament i decoloració d'olis vegetals. Els dos sòlids es diferencien en la mida de partícula; pel Volcansil DE/11, aquesta és més petita i per tant té una major superfície específica.

Per altra banda, el Minsorb ha estat adquirit a través l'empresa Sorbacal, tal i com s'ha comentat en l'anterior apartat.

Finalment, els adsorbents amb estructura sepiolítica (Hexal-H, Pansil, Pansil 400, Pangel B20 i Pangel B40) han estat facilitats per Tolsa. L'Hexal-H és un silicat de magnesi hidratat, amb un mínim d'un 75% de sepiolita i un 25% d'altres argiles. El Pansil i el Pansil 400 són silicats de magnesi hidratats que es diferencien per la seva superfície específica, puresa i granulometria, ja que el Pansil té una puresa en sepiolita del 85%, mentre que en el Pansil 400 és aproximadament del 65-70%. Són utilitzats com a càrrega mineral reforçant en emulsions asfàltiques.

El Pangel B20 i B40 són silicats de magnesi hidratats modificats orgànicament, que contenen un 15% d'una sal d'amoni quaternari. La diferència entre els dos es troba en els diferents agents modificants presents en cada un. El Pangel B40 va ser desenvolupat per productes d'elevada polaritat, i el Pangel B20 per productes menys polars.

Per tal de caracteritzar aquests sòlids comercials, se n'ha determinat la seva superfície específica. Aquest paràmetre és un dels més importants per als adsorbents, ja que com major sigui aquesta superfície major serà la seva capacitat d'adsorció, en haver més superfície d'interacció entre l'adsorbent i l'adsorbat.

Les superfícies específiques dels adsorbents emprats s'han determinat per ajust a la isoterma de BET -Brunauer-Emmet-Teller-, el qual es basa en l'adsorció física d'una monocapa de gas inert (generalment nitrogen) en la superfície del sòlid a caracteritzar (Gregg i Sing, 1982). Aquesta informació es recull en la *Taula 3.1*.

**Taula 3. 1.** Adsorbents silícics inclosos en l'estudi.

Adsorbent	Fabricant	Superfície específica (m <sup>2</sup> /g)	Descripció
Sílica	Merk	522*	Òxid de silici
Florisil	Supelco	152*	Silicat de magnesi
XAD-2	Supelco	300 aprox.**	Adsorbent polimèric
Volcansil DE/11	Benesa	130*	Bentonita càlcica
Volcansil DE/23	Benesa	99*	Bentonita càlcica
Minsorb	Sorbacal	152 *	80% Fil·losilicat/20% Dolomita [CaMg(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
Hexal-H	Tolsa	184*	Sepiolita. Fil·losilicat
Pansil 400	Tolsa	220 aprox**	Sepiolita. Silicat de magnesi hidratat
Pansil	Tolsa	285**	Sepiolita. Silicat de magnesi hidratat
Pangel B20	Tolsa	89**	Sepiolita organofílica. Silicat de magnesi hidratat modificat orgànicament
Pangel B40	Tolsa	80**	Sepiolita organofílica. Silicat de magnesi hidratat modificat orgànicament

\*Superfície específica determinada experimentalment en el laboratori de Ciència dels Materials de l'IQS

\*\*Superfície específica facilitada pel fabricant

Encara que totes elles són elevades, es pot observar que les superfícies específiques de cada un dels adsorbents estudiats són molt diferents. La sílica és el sòlid que té un major valor per aquest paràmetre (522 m<sup>2</sup>/g), seguida de la XAD-2 i el Pansil (300 i 285 m<sup>2</sup>/g respectivament). Contràriament, el Pangel B20 i B40 són els adsorbents que han mostrat una menor superfície (89 i 80 m<sup>2</sup>/g). La resta de sòlids estudiats tenen unes superfícies específiques entre 100 i 200 m<sup>2</sup>/g.

### 3.2.3. Eliminació de COPs amb adsorbents silícics

En aquest estudi s'ha utilitzat un oli de peix cru amb uns elevats nivells inicials de COPs, per tal de facilitar l'avaluació dels diferents processos d'adsorció portats a terme. Per al cas del Minsorb, també es va realitzar l'etapa d'adsorció en un oli refinat (la mostra d'oli de fetge de bacallà P6, de l'anterior estudi de complements nutritius), amb la finalitat de conèixer si l'estat de refinament de l'oli pot influir en l'eficàcia del procés.

Les concentracions inicials de PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines, PCBs indicadors i PBDEs en ambdós olis es mostren en la Taula 3.2.

**Taula 3. 2.** Olis de peix emprats en l'estudi d'eliminació de COPs amb adsorbents silícics.

	Oli cru	Oli refinat
∑PCDD/Fs (pg/g)	15.6	7.18
∑dl-PCBs (ng/g)	24.8	10.1
∑PCBs ind (ng/g)	168	98.3
∑PBDEs (ng/g)	8.44	18.2

Com que no existeixen publicacions anteriors entorn a l'eliminació de COPs amb aquest tipus d'adsorbents, les condicions experimentals d'adsorció s'han determinat basant-se en les metodologies descrites en la bibliografia per a l'eliminació de COPs amb carbons actius (Carbonelle *et al.*, 2005; Kawashima *et al.*, 2006). D'acord amb aquests mètodes, el procés d'adsorció es va realitzar inicialment a una temperatura de 50°C, a pressió atmosfèrica, 1.5% en pes d'adsorbent i agitació contínua durant 60 minuts.

Els experiments es van realitzar amb 20 g d'oli de peix i 0.3 g d'adsorbent per cada cas. L'oli es va escalfar amb un bany d'aigua termostatada, i mantenint-se en agitació. Un cop finalitzat el procés, l'adsorbent va ser separat de l'oli per filtració a través d'un filtre d'HPLC de nylon (0.45 µm, 25 mm de diàmetre), havent-se centrifugat prèviament la mostra.

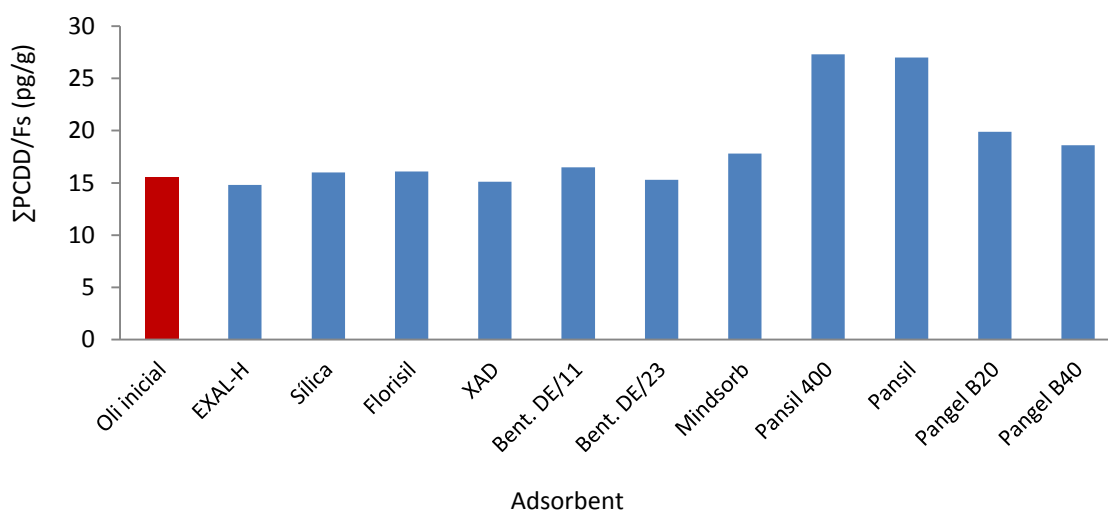
A nivell experimental, cal esmentar que l'oli analitzat era sense refinar, molt dens i espès, i presentava moltes dificultats tècniques per fer-lo passar a través del filtre d'HPLC. Això provocava que calgués exercir molta força sobre la xeringa, el que podria provocar que els adsorbents més fins passessin a través del filtre, així com el trencament d'aquest.

Pel que fa a l'oli refinat, el procés de filtració va ser molt més senzill i efectiu, el que assegura que l'adsorbent quedava totalment separat de l'oli.

Un cop finalitzat el procés d'adsorció, els nivells de PCDD/Fs, PCBs i PBDEs dels olis tractats van ser determinats d'acord amb els mètodes d'anàlisi desenvolupats en la present tesi doctoral. A continuació es detallen els resultats obtinguts per a cada una de les famílies estudiades.

### Eliminació de PCDD/Fs

Els nivells totals de PCDD/Fs determinats en l'oli cru i els olis tractats amb cadascun dels adsorbents estudiats es mostren en la *Figura 3.5*.



**Figura 3. 5.** Nivells totals de PCDD/Fs abans i després del procés d'adsorció.

Tal i com s'observa en el gràfic, cap dels adsorbents estudiats aconsegueix reduir significativament els nivells de PCDD/Fs en l'oli de peix. Encara més, per als casos del Pansil, Pansil 400, Pangel B20 i Pangel B40 els nivells posteriors al tractament són superiors als inicials. Possibles explicacions per a aquest fet anòmal són les següents:

- Contaminació de la mostra: L'oli de peix es pot haver contaminat durant el procés d'anàlisi. Això és poc probable, ja que els resultats obtinguts en els diferents blancs realitzats no mostren contaminació.
- Contaminació dels adsorbents: Els adsorbents presenten una contaminació inicial de PCDD/Fs, que passen a l'oli durant el procés d'adsorció. Aquest fet suposaria el procés invers al desitjat.
- Mala filtració dels adsorbents: Si el procés de filtració no és prou bo, aquest adsorbent pot crear una suspensió col·loïdal en l'oli, de manera que durant el procés analític (concretament en fer passar la mostra per la columna de sílica multicapa), els contaminants de l'adsorbent poden ser extrets per l'hexà. Aquests es sumarien als que provenien de l'oli, donant un nivell final més alt que l'oli original.

Cal destacar que la possibilitat de contaminació de la mostra a través de l'adsorbent va ser estudiada més a fons posteriorment. Amb aquesta finalitat, es va realitzar una extracció amb toluè en soxhlet durant 24 hores dels possibles COPs presents en deu grams dels adsorbents suposadament contaminats. Tot i així, l'anàlisi dels extractes no va mostrar uns nivells de PCDD/Fs suficientment alts com per que expliquessin la contaminació observada dels olis, pel qual es descarta aquesta possibilitat.

Tornant als olis tractats, s'han estudiat els resultats per a cada congènere, per tal de comprovar si hi havia hagut eliminació selectiva per algun d'ells. Pels casos en que els nivells totals són més alts que els de l'oli original, també es pretén estudiar quins congèneres han provocat aquesta contaminació. Les Taules 3.3 i 3.4 mostren respectivament les concentracions i eliminacions de cada congènere de PCDD/Fs en pg/g per l'oli de peix abans i després dels diferents tractaments. Les eliminacions negatives indiquen que els valors obtinguts del procés d'adsorció són superiors als originals.

També es mostren els nivells totals en pg TEQ/g, i l'eliminació total, que són les unitats en que es troben definits els màxims legistats per a PCDD/Fs en olis marins (Reglament 1881/2006). A més, els valors en pg TEQ/g, donen una idea de si l'eliminació obtinguda és efectiva i redueix els nivells dels congèneres més tòxics.

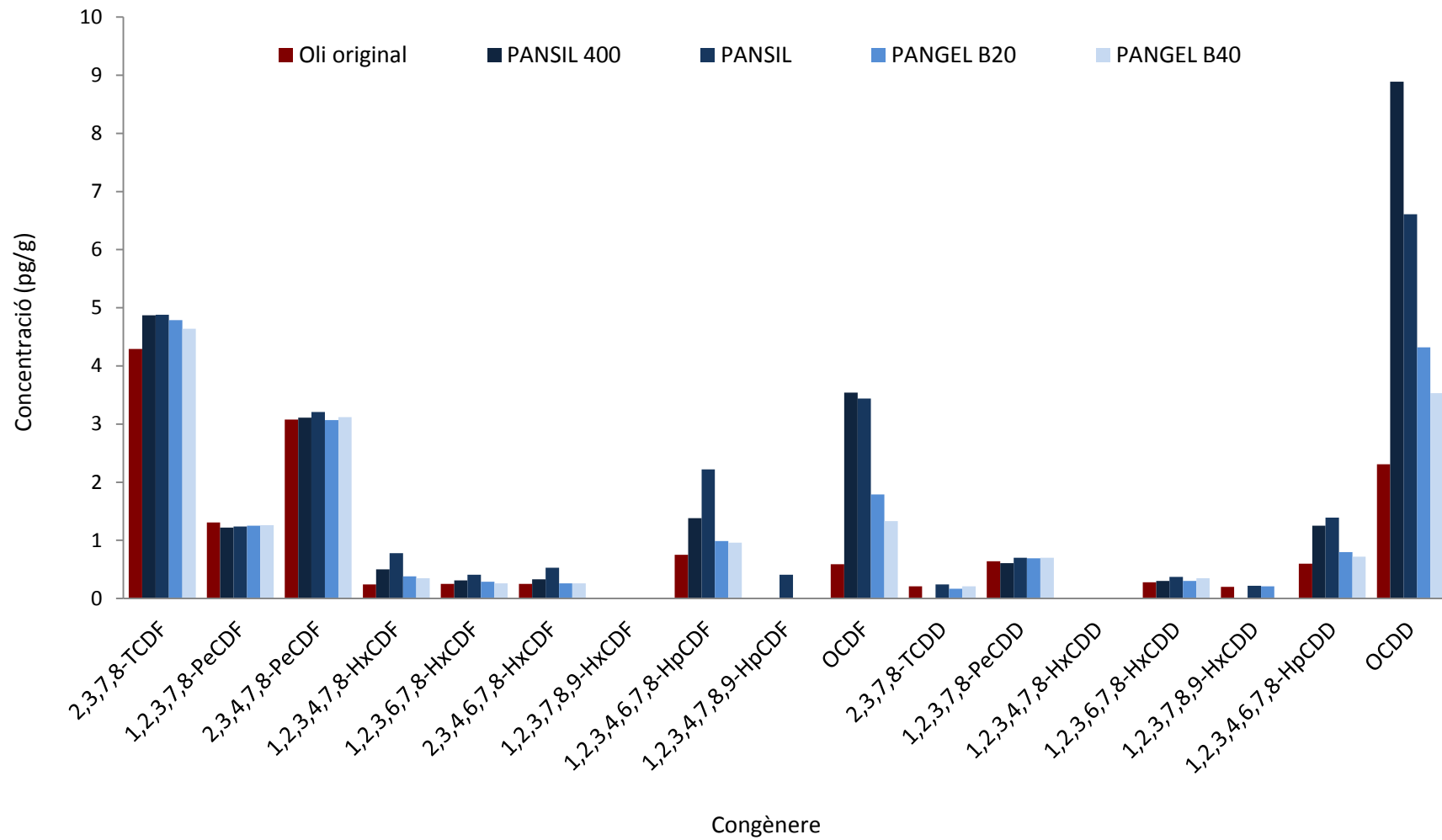
Analitzant les dades que es mostren en les taules, s'observa que les concentracions per a cada un dels congèneres de PCDD/Fs estudiats no disminueixen significativament després del procés d'adsorció. Les eliminacions es troben totes entre un 5% (Hexal-H) i un -75% (Pansil 400), aquest últim degut a les contaminacions ja esmentades. Si es calculen aquestes eliminacions en unitats toxicològiques (pg TEQ/g), es troben en un rang entre 2% (Hexal-H) i -11% (Pansil). En aquest cas l'efecte de la contaminació no és tant notable, ja que aquesta és causada per aquells congèneres que tenen un factor d'equivalència tòxica més baix.

**Taula 3. 3.** Concentració de PCDD/Fs (en pg/g) en oli de peix cru abans i després del procés d'adsorció.

Congènere	Concentració (pg/g)											
	Oli original	EXAL-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/11	Bent.DE/23	Minsorb	PANSIL 400	PANSIL	PANGEL B20	PANGEL B40
2,3,7,8-TCDF	4.29	4.27	4.31	4.39	4.14	4.41	4.48	4.56	4.87	4.88	4.79	4.64
1,2,3,7,8-PeCDF	1.31	1.22	1.27	1.22	1.10	1.19	1.23	1.18	1.22	1.24	1.25	1.26
2,3,4,7,8-PeCDF	3.08	3.00	2.98	2.96	2.84	3.02	2.95	2.93	3.11	3.21	3.07	3.12
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.24	0.25	0.34	0.37	0.28	<0.27	<0.17	0.62	0.50	0.78	0.38	0.35
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.25	0.22	0.23	0.16	0.19	<0.25	0.18	0.30	0.31	0.41	0.29	0.26
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.25	0.27	0.27	0.33	0.26	0.31	0.24	0.26	0.33	0.53	0.26	0.26
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0.21	<0.16	<0.22	<0.24	<0.27	<0.81	<0.23	<0.18	<0.24	<0.17	<0.27	<0.26
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.75	0.77	0.84	0.78	0.69	0.77	0.80	0.91	1.38	2.22	0.99	0.96
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	<0.22	<0.22	<0.22	<0.20	<0.26	<0.21	<0.21	<0.22	<0.25	0.41	<0.24	<0.27
OCDF	0.59	0.36	0.74	0.96	0.70	0.69	0.59	1.36	3.54	3.44	1.79	1.33
2,3,7,8-TCDD	0.21	0.21	0.16	0.16	0.20	0.18	0.25	0.29	<0.15	0.24	0.17	0.21
1,2,3,7,8-PeCDD	0.64	0.64	0.71	0.81	0.61	0.64	0.69	0.55	0.61	0.70	0.69	0.70
1,2,3,4,7,8-HxCDD	<0.17	0.17	0.17	<0.16	<0.15	<0.28	<0.15	<0.14	<0.17	<0.18	<0.15	<0.19
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.28	<0.17	0.31	0.30	0.37	<0.32	0.28	0.29	0.30	0.37	0.30	0.35
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.20	<0.17	<0.16	<0.18	0.22	<0.46	<0.17	0.19	<0.18	0.22	0.21	<0.20
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.60	0.53	0.51	0.49	0.46	0.50	0.53	0.68	1.25	1.39	0.80	0.72
OCDD	2.31	2.17	2.56	2.42	2.39	2.22	2.20	3.19	8.89	6.61	4.32	3.53
Total 2,3,7,8 (Upperbound)	15.6	14.8	16.0	16.1	15.1	16.5	15.3	17.8	27.3	27.0	19.9	18.6
Total 2,3,7,8 (pg TEQ/g)	3.07	2.99	3.04	3.13	2.89	3.12	3.08	3.04	3.04	3.40	3.14	3.16

**Taula 3. 4.** Eliminació de PCDD/Fs (en % de pg/g) en oli de peix cru degut al procés d'adsorció.

Congènere	Eliminació (%)										
	EXAL-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/11	Bent.DE/23	Minsorb	PANSIL 400	PANSIL	PANGEL B20	PANGEL B40
2,3,7,8-TCDF	0.51	-0.35	-2.12	3.59	-2.67	-4.34	-6.2	-13.3	-13.7	-11.4	-8.01
1,2,3,7,8-PeCDF	7.29	3.20	7.21	15.9	9.11	6.53	10.5	7.12	5.46	4.79	3.88
2,3,4,7,8-PeCDF	2.41	3.27	3.88	7.68	1.84	4.02	4.86	-1.06	-4.23	0.16	-1.25
1,2,3,4,7,8-HxCDF	-2.49	-39.6	-49.8	-14.2	100	100	-153	-104	-220	-54.1	-41.6
1,2,3,6,7,8-HxCDF	10.7	7.69	37.9	23.3	100	28.8	-20.7	-22.5	-64.0	-16.1	-3.47
2,3,4,6,7,8-HxCDF	-6.25	-4.45	-30.3	-3.76	-22.5	6.91	-4.17	-28.5	-108	-0.31	-0.52
1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-2.20	-10.8	-3.29	8.25	-1.57	-6.32	-20.8	-83.3	-194	-31.4	-27.6
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCDF	39.6	-24.0	-61.5	-18.6	-16.4	1.53	-129	-495	-478	-201	-122
2,3,7,8-TCDD	1.64	25.1	25.43	7.14	13.8	-16.7	-34.6	100	-13.0	22.1	4.12
1,2,3,7,8-PeCDD	0.82	-10.6	-26.0	4.92	0.59	-7.55	13.6	4.40	-9.00	-7.95	-8.68
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2,3,6,7,8-HxCDD	100	-13.2	-8.74	-34.6	100	-0.57	-6.53	-9.98	-33.6	-9.27	-27.3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	100	100	100	-6.94	100	100	6.25	100	-8.96	-0.43	100
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	10.7	13.6	16.9	22.7	15.4	10.7	-13.6	-110	-133	-33.9	-21.3
OCDD	6.20	-10.8	-4.85	-3.46	4.07	4.60	-38.3	-284	-186	-86.9	-52.8
Total 2,3,7,8	5.26	-2.32	-3.04	3.12	-5.68	1.81	-14.0	-74.7	-72.7	-27.6	-18.8
Total 2,3,7,8 (% de pg TEQ/g)	2.37	0.91	-2.18	5.86	-1.64	-0.52	0.88	0.92	-11.0	-2.46	-2.91



**Figura 3. 6.** Concentració de cada un dels congèneres de PCDD/Fs presents en l'oli de peix abans i després dels tractaments amb adsorbents.



Pel que fa a l'augment en els nivells totals pel Pansil, Pansil 400, Pangel B20 i Pangel B40, en la *Figura 3.6* es pot observar que els congèneres que han contribuït més en la contaminació dels olis són el 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD/F i sobretot els OCDD/F, que mostren concentracions molt més elevades després del procés d'adsorció. També s'observa que la contaminació per part del Pansil i Pansil 400 presenten un major augment que el Pangel B20 i B40 en la majoria de congèneres.

Un cop descartada la possibilitat de contaminació de les mostres d'oli a través dels adsorbents, el més probable és que aquest augment de PCDD/Fs d'alt grau de cloració hagi estat aportat per part del material de vidre de laboratori emprat durant les anàlisis, doncs aquests congèneres es queden adsorbits amb facilitat a la superfície del vidre.

Com s'ha comentat anteriorment, aquest estudi d'eliminació de COPs també s'ha realitzat amb un oli refinat, per veure com afecta l'estat de l'oli en el procés d'adsorció. En aquest cas l'adsorbent escollit ha estat el Minsorb. Les concentracions de cada PCDD/F de l'oli abans i després del tractament, així com l'eliminació que suposa el procés, es mostren en la *Taula 3.5*.

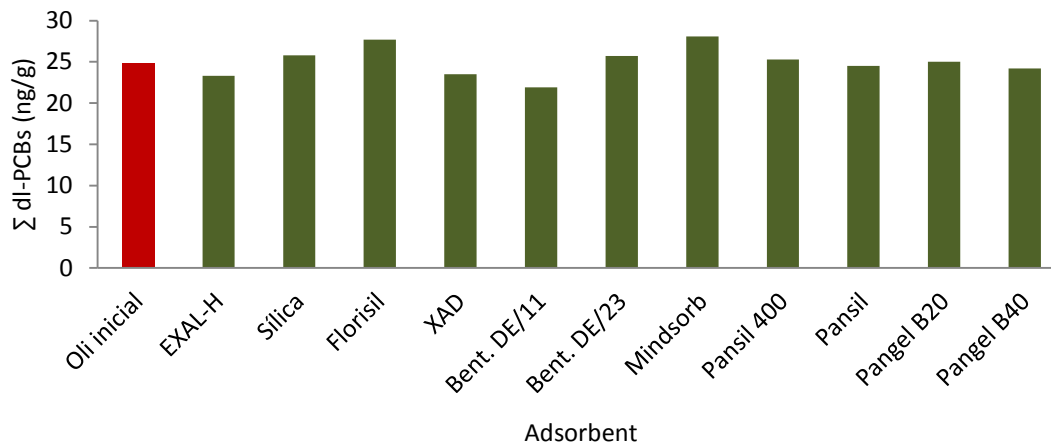
**Taula 3.5.** Concentracions i eliminacions de cada congènere de PCDD/Fs en oli de peix refinat, abans i després de ser tractats amb Minsorb.

Congènere	Concentració (pg/g)		Eliminació (%)
	Oli original	Minsorb	Minsorb
2,3,7,8-TCDF	3.13	2.72	13.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.49	0.39	20.0
2,3,4,7,8-PeCDF	0.65	0.60	7.89
1,2,3,4,7,8-HxCDF	<0.10	0.30	-
1,2,3,6,7,8-HxCDF	<0.11	0.22	-
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.36	0.34	6.07
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0.14	<0.18	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	<0.12	0.35	-
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	<0.17	<0.22	-
OCDF	<0.20	0.47	-
2,3,7,8-TCDD	<0.07	<0.13	-
1,2,3,7,8-PeCDD	<0.15	<0.13	-
1,2,3,4,7,8-HxCDD	<0.18	<0.13	-
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.37	0.29	23.3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	<0.21	<0.14	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.27	0.31	-14.8
OCDD	0.46	0.69	-50.3
Total 2,3,7,8 (Upperbound)	7.18	7.59	-5.70
Total 2,3,7,8 (pg TEQ/g)	1.04	1.01	2.73

El baix nivell inicial de PCDD/Fs de l'oli refinat fa que no es puguin quantificar les eliminacions observades per molts dels congèneres. Tot i així no s'ha observat una eliminació significativa per a cap d'ells. Pel que fa a les eliminacions totals, aquestes tampoc no són significatives, ni pel cas del total en unitats màssiques (pg/g) ni toxicològiques (pg TEQ/g).

### Eliminació de PCBs similars a dioxines

Els nivells totals de PCBs similars a dioxines de l'oli de peix cru inicial, juntament amb el que s'obté després del procés d'eliminació de COPs amb cadascun dels adsorbents seleccionats, es mostren en la *Figura 3.7*.



**Figura 3. 7.** Nivells totals de PCBs similars a dioxines abans i després del procés d'adsorció.

A l'histograma es pot observar que els nivells d'aquests contaminants en els olis tractats no són molt diferents respecte els que hi havia inicialment en l'oli cru, sent tots del mateix ordre. Tot i així, en alguns casos els nivells de PCBs similars a dioxines han disminuït lleugerament (Bentonita DE/11, Exal-H o XAD-2), mentre que d'altres han augmentat lleugerament, com són els casos del Florisil o el Mindsorb.

Per a avaluar més a fons aquest procés, cal estudiar l'eliminació dels PCBs congènere a congènere (*Taules 3.6 i 3.7*). En aquest cas no s'ha pogut estudiar el PCB-81, ja que en l'oli inicial presentava un valor per sota del límit de detecció. Per a la resta de congènere, l'adsorbent que mostra unes eliminacions més elevades és la Bentonita DE/11. Aquest sòlid aconseguix una eliminació total d'un 12% de la càrrega contaminant inicial, tot i que per alguns congènere mostra efectivitats més elevades que per d'altres (per exemple, l'eliminació del PCB-189 és d'un 29% i pel PCB-167 d'un 5%).

També s'ha pogut observar una lleugera eliminació de PCBs per part dels adsorbents Hexal-H i XAD-2, d'un 6% i 5% respectivament. Novament, s'observa certa selectivitat en l'adsorció d'alguns congènere; amb l'Hexal-H les eliminacions es troben entre un 19% pel PCB-77 i un 0.3% pel PCB-156. En el cas de la XAD-2, les eliminacions es comprenen entre un 34% pel PCB-123 i un 7% pel PCB-156.

També és destacable que alguns adsorbents -com els Pansil i el Pangel- no aconseguen una eliminació total significativa, però sí que són capaços de reduir el nivell d'algun congènere en particular. Per exemple, el PCB-189 pateix una eliminació d'aproximadament el 22% amb aquests 4 adsorbents, mentre que pel PCB-167, l'eliminació és d'un 6%. Respecte al Mindsorb, l'eliminació aconseguida no és elevada, i tot i que per alguns congènere hi ha una petita reducció, no arriba en cap cas al 10%.

**Taula 3. 6.** Concentració de PCBs similars a dioxines (en ng/g) en oli de peix cru abans i després del procés d'adsorció.

Congènere	Concentració (ng/g)											
	Oli original	EXAL-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/11	Bent.DE/23	Minsorb	PANSIL 400	PANSIL	PANGEL B20	PANGEL B40
PCB 81	<0.001	0.005	0.007	0.008	0.007	<0.03	<0.001	0.011	0.014	<0.019	0.018	0.018
PCB 77	0.21	0.17	0.20	0.19	0.19	0.15	0.21	0.20	0.17	0.24	0.23	0.20
PCB 123	0.23	0.23	0.15	0.19	0.15	0.18	0.14	0.21	0.53	0.62	0.47	0.68
PCB 118	12.4	11.5	12.8	15.3	11.7	10.7	12.4	15.5	12.3	11.5	12.3	11.5
PCB 114	0.22	0.20	0.23	0.22	0.20	0.20	0.24	0.21	0.21	0.21	0.21	0.22
PCB 105	4.80	4.56	5.11	4.85	4.54	4.35	5.15	4.92	4.81	4.69	4.77	4.69
PCB 126	0.17	0.16	0.18	0.17	0.16	0.15	0.19	0.17	0.17	0.16	0.17	0.17
PCB 167	2.19	1.93	2.23	2.02	1.91	2.07	2.22	2.05	2.07	2.03	2.05	2.07
PCB 156	3.26	3.25	3.43	3.43	3.49	3.11	3.61	3.64	3.69	3.74	3.64	3.65
PCB 157	0.68	0.67	0.74	0.72	0.68	0.59	0.78	0.69	0.73	0.73	0.71	0.71
PCB 169	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
PCB 189	0.56	0.59	0.68	0.58	0.50	0.42	0.73	0.46	0.46	0.46	0.46	0.47
Total dl-PCB (Upperbound)	24.8	23.3	25.8	27.7	23.5	21.9	25.7	28.1	25.3	24.5	25.0	24.2
Total dl-PCB (pg TEQ/g)	21.5	20.3	22.5	21.5	20.3	19.1	23.1	21.4	21.3	20.8	21.1	21.1

**Taula 3. 7. Eliminació de PCBs similars a dioxines (en % de pg/g) en oli de peix cru degut al procés d'adsorció.**

Congènere	Eliminació (%)										
	Hexal-H	Sílica	Florisol	XAD-2	Bent.DE/11	Bent.DE/23	Minsorb	PANSIL 400	PANSIL	PANGEL B20	PANGEL B40
PCB 81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCB 77	19.3	3.34	7.49	7.51	26.2	0.55	5.09	-7.82	-13.8	-11.5	3.84
PCB 123	0.99	34.3	17.8	34.2	22.7	40.6	8.49	-127	-164	-100	-191
PCB 118	6.84	-3.24	-23.6	5.71	13.7	-0.20	-25.1	0.38	6.74	0.66	7.34
PCB 114	9.65	-4.37	2.23	7.88	10.8	-8.43	4.47	2.81	3.03	3.02	2.41
PCB 105	5.04	-6.29	-0.95	5.52	9.43	-7.21	-2.35	-0.09	2.45	0.73	2.49
PCB 126	6.23	-4.87	2.67	6.81	11.7	-7.85	3.26	2.83	5.16	3.30	2.89
PCB 167	11.8	-1.94	7.66	12.5	5.08	-1.72	6.16	5.06	6.96	6.24	5.09
PCB 156	0.33	-4.97	-4.99	-7.07	4.88	-10.6	-11.5	-13.2	-14.6	-11.4	-11.7
PCB 157	2.05	-7.70	-5.30	0.66	13.8	-14.1	-1.69	-6.43	-7.04	-3.41	-4.25
PCB 169	0.57	6.81	-12.9	-6.80	5.23	-0.89	-0.59	-10.6	-14.4	-3.93	-13.3
PCB 189	0.61	-13.4	2.44	15.9	29.2	-23	23.1	23.5	22.2	23.6	21.2
Total dl-PCBs	5.86	-3.91	-11.8	4.99	11.5	-3.73	-13.3	-0.77	2.82	-0.06	3.54
Total dl-PCB (% pg TEQ/g)	5.66	-4.66	0.18	5.45	11.2	-7.58	0.32	1.15	3.27	1.86	1.77

Pel que fa a la selectivitat observada del mecanisme d'adsorció enfront certs congèneres, el PCB que globalment s'elimina millor és el -189 (l'eliminació promig entre tots els adsorbents és d'un 11%). Tot i així, aquest fet no s'ha pogut correlacionar ni amb la seva estructura (el PCB-169 és molt semblant estructuralment però no s'elimina tant bé), mida (el PCB-77 és molt més petit però alhora és el tercer millor eliminat, 4%) ni concentració inicial (és intermèdia).

Si es comparen les eliminacions totals de PCBs similars a dioxines calculades a partir de les concentracions màssiques (% ng/g) o toxicològiques (% pg TEQ/g), es pot comprovar que s'obtenen resultats molt semblants. Això significa que el mecanisme d'adsorció no és selectiu enfront a la toxicitat –o el que és el mateix, planaritat- de cada congènere.

Respecte a l'estudi amb olis refinats, la *Taula 3.8* mostra les concentracions de cada un d'aquests congèneres abans i després del tractament amb l'adsorbent Minsorb, juntament amb les corresponents eliminacions.

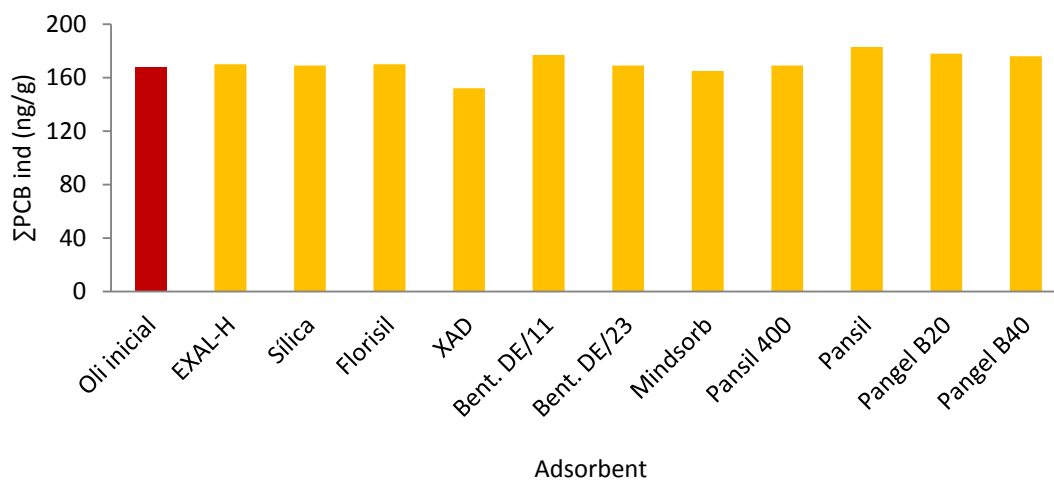
**Taula 3. 8.** Concentracions i eliminacions de cada congènere de PCBs similars a dioxines en oli de peix refinat, abans i després de ser tractats amb Minsorb.

Congènere	Concentració (ng/g)		Eliminació (%)
	Oli original	Minsorb	Minsorb
PCB 81	0.005	0.007	-
PCB 77	0.12	0.11	6.73
PCB 123	0.15	0.16	-4.35
PCB 118	<0.001	<0.001	<0.001
PCB 114	0.36	0.33	9.13
PCB 105	5.70	6.15	-7.85
PCB 126	0.08	0.08	3.72
PCB 167	1.10	1.08	1.50
PCB 156	1.85	1.78	3.55
PCB 157	0.48	0.43	9.91
PCB 169	0.02	0.02	-17.8
PCB 189	0.18	0.14	22.6
Total dl-PCB (Upperbound)	10.1	10.3	-2.41
Total dl-PCB (pg TEQ/g)	10.6	10.3	2.91

En aquest cas tampoc s'observa una eliminació efectiva de PCBs. Tot i així, el congènere 189 ha estat un altre cop el que millor s'ha eliminat, en un 23%. Així doncs, l'estat de l'oli no afecta significativament en el procés d'eliminació de PCBs similars a dioxines amb adsorbents amb base silícica.

### Eliminació de PCBs indicadors

El següent histograma (Figura 3.8) mostra les concentracions totals de PCBs indicadors en l'oli cru inicial i els obtinguts després del tractament amb els adsorbents estudiats.



**Figura 3. 8.** Nivells totals de PCBs indicadors abans i després del procés d'adsorció.

Anàlogament als seus homòlegs similars a dioxines, les eliminacions totals de PCBs indicadors amb adsorbents silícics és pràcticament nul·la. Només la XAD-2 sembla haver reduït lleugerament aquests nivells inicials. Per contrapartida, alguns adsorbents –com el Pansil- han augmentat la concentració inicial d'aquest contaminant.

La *Taula 3.9* mostra les concentracions de cadascun dels congèneres estudiats en ng/g, mentre que la *Taula 3.10* mostra el percentatge d'eliminació obtinguda amb el procés d'adsorció respecte les concentracions de l'oli inicial.

Tot i que no molt elevada, només amb l'ús de la XAD-2 es pot observar una disminució del total de PCBs indicadors (8%). Per a la resta d'adsorbents les eliminacions han estat molt baixes, de l'ordre de l'error experimental (veure la validació del mètode per a l'anàlisi de COPs en oli de peix de l'apartat 2.5 de la present tesi), pel que no són significatives.

Tot i així, és destacable l'eliminació del congènere 101 en el procés d'adsorció amb Pansil 400 i Pangel B40, d'un 79% en ambdós casos. Malgrat tot, aquest fet no té repercussió en l'eliminació global de PCBs, ja que en aquest oli el PCB-101 es trobava a una concentració inicial molt baixa.

Per altra banda, en la *Taula 3.11* es mostren les concentracions de PCBs indicadors en l'oli refinat de fetge de bacallà, abans i després de ser tractat amb Mindsorb. En ella no s'observa una eliminació significativa per cap dels congèneres estudiats. Per aquest fet, s'arriba a la conclusió que l'estat de l'oli no afecta a l'eficàcia del procés d'adsorció.

**Taula 3. 9.** Concentració de PCBs indicadors en oli de peix cru abans i després del procés d'adsorció.

Congènere	Oli original	Concentració (ng/g)										
		EXAL-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/11	Bent.DE/23	Minsorb	PANSIL 400	PANSIL	PANGEL B20	PANGEL B40
PCB 28	0.81	0.84	0.84	0.85	0.75	0.81	0.81	0.73	0.90	0.94	0.87	0.89
PCB 52	2.61	2.55	2.51	2.62	2.39	2.68	2.59	2.55	2.81	2.99	2.81	2.93
PCB 101	6.37	6.52	6.30	6.30	6.03	6.69	6.62	6.15	1.36	6.02	6.79	1.34
PCB 153	74.1	73.9	74.0	74.4	66.4	77.4	73.2	73.3	75.1	79.0	76.9	77.4
PCB 138	48.8	50.5	50.2	50.5	46.2	52.4	50.5	47.1	50.7	54.9	52.1	52.5
PCB 180	35.3	35.7	35.2	35.8	32.6	36.8	35.4	35.3	38.1	39.7	38.9	40.9
Total PCB ind	168	170	169	170	154	177	169	165	169	183	178	176

**Taula 3. 10.** Eliminació de PCBs indicadors en oli de peix cru degut al procés d'adsorció.

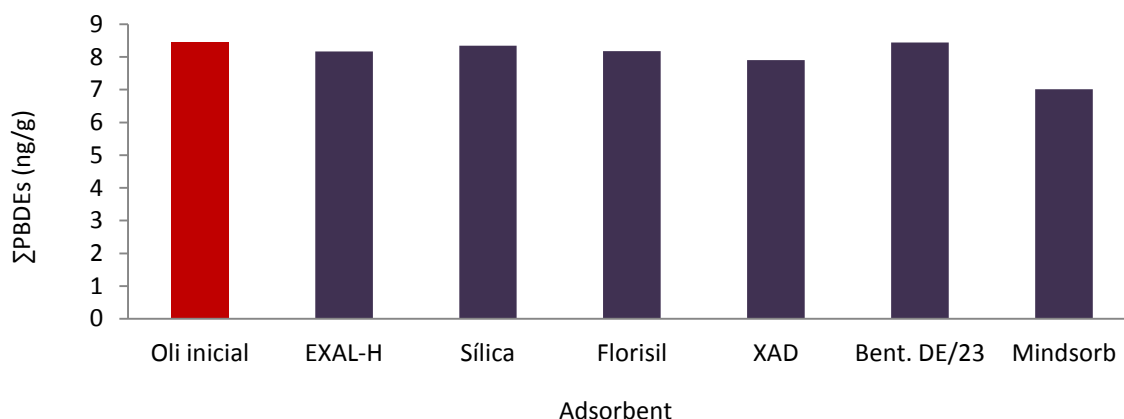
Congènere	Eliminació (%)										
	EXAL-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/11	Bent.DE/23	Minsorb	PANSIL 400	PANSIL	PANGEL B20	PANGEL B40
PCB 28	-3.00	-3.18	-5.06	7.53	1.03	0.08	9.87	-11.2	-16.0	-7.50	-9.60
PCB 52	2.35	3.79	-0.39	8.21	-2.71	0.79	2.24	-7.90	-14.5	-7.80	-12.0
PCB 101	-2.39	1.19	1.15	5.32	-4.94	-3.94	3.44	78.7	5.53	-6.63	78.9
PCB 153	0.20	0.13	-0.41	10.3	-4.44	1.20	1.06	-1.41	-6.65	-3.84	-4.52
PCB 138	-3.33	-2.86	-3.38	5.44	-7.27	-3.33	3.53	-3.69	-12.4	-6.66	-7.57
PCB 180	-1.11	0.12	-1.34	7.59	-4.15	-0.32	-0.22	-7.91	-12.4	-10.2	-15.9
Total PCB ind	-1.18	-0.66	-1.43	8.09	-5.17	-0.65	1.66	-0.55	-9.24	-6.18	-4.77

**Taula 3. 11.** Concentracions i eliminacions de cada congènere de PCB indicadors en oli de peix refinat, abans i després de ser tractats amb Minsorb.

Congènere	Concentració (ng/g)		Eliminació (%)
	Oli original	Minsorb	Minsorb
PCB 28	2.71	2.48	8.39
PCB 52	7.85	8.17	-4.17
PCB 101	15.9	16.1	-1.11
PCB 153	35.1	33.2	5.32
PCB 138	26.6	25.8	3.01
PCB 180	10.0	9.58	4.25
Total PCB ind	98.3	95.4	2.87

### Eliminació de PBDEs

Pel cas dels PBDEs, l'estudi només s'ha dut a terme amb els congèneres detectats en l'oli de peix inicial. Aquests han estat el BDE-28, -47, -100, -183 i -209. L'eliminació s'ha dut a terme amb els adsorbents Hexal-H, Sílica, Florisil, XAD-2, Bentonita DE/23 i Minsorb. Els resultats del total de PBDEs monitoritzats per a l'oli cru original i el que s'obté dels diversos tractaments es mostren en la *Figura 3.9*.



**Figura 3. 9.** Nivells totals de PBDEs abans i després del procés d'adsorció.

No s'han observat grans diferències entre els nivells de PBDEs inicials i els dels olis tractats. Només en el cas del Minsorb s'obté una eliminació significativa, entorn al 17%. Els resultats d'aquestes concentracions per a cada congènere es mostren en la *Taula 3.12*, i les eliminacions obtingudes en la *Taula 3.13*.

Tot i que no té una elevada repercussió en l'eliminació global (donada la seva baixa concentració en l'oli inicial tractat en el present estudi), són destacables les eliminacions del BDE-100 per part del Minsorb (25%).



**Taula 3. 12.** Concentració de PBDEs en oli de peix cru abans i després del procés d'adsorció.

Congènere	Concentració (ng/g)						
	Oli original	EXLA-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/23	Minsorb
BDE-28	0.20	0.20	0.22	0.21	0.20	0.21	0.21
BDE-47	5.14	5.06	5.21	4.99	4.78	4.98	5.04
BDE-100	2.34	2.18	2.16	2.25	2.17	2.23	1.75
BDE-183	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
BDE-209	0.74	0.72	0.75	0.72	0.74	-	-
Total PBDEs	8.44	8.17	8.34	8.18	7.90	8.44	7.01

**Taula 3. 13.** Eliminació de PBDEs en oli de peix cru degut al procés d'adsorció.

Congènere	Eliminació (%)					
	EXAL-H	Sílica	Florisil	XAD-2	Bent.DE/23	Minsorb
BDE-28	0.15	-7.59	-3.1	1.79	-3.40	-6.40
BDE-47	1.67	-1.28	2.97	7.08	3.10	2.07
BDE-100	6.81	7.61	3.77	7.03	4.71	25.1
BDE-183	1.38	24.6	19.5	29.9	28.8	-3.41
BDE-209	2.52	-1.00	2.25	0.54	-	-
Total PBDEs	3.14	1.10	3.01	6.40	-0.08	16.8

En general, d'aquest apartat se'n pot concloure que en les condicions de treball emprades cap dels adsorbents estudiats fins ara ha aconseguit reduir de manera significativa els COPs en oli de peix, amb eliminacions inferiors al 10% per la majoria dels casos.

### **3.2.4. Estudi del procés d'adsorció mitjançant disseny d'experiències**

Com s'ha comentat anteriorment, les eliminacions de PCDD/Fs, PCBs i PBDEs obtingudes amb adsorbents silícics no han estat satisfactòries, degut al baix rendiment del procés. Aquestes proves s'han dut a terme amb unes condicions experimentals basades en la bibliografia existent per a l'eliminació de PCDD/Fs i PCBs amb carbó actiu. Per tal de millorar-ne els resultats, s'ha decidit estudiar més a fons les condicions experimentals d'adsorció, i així poder avaluar quins paràmetres afecten a l'eliminació de COPs en oli de peix amb aquesta classe d'adsorbents i de quina manera.

Per dur a terme aquest estudi de forma sistemàtica, tot realitzant el menor nombre d'experiments possibles però alhora extraient-ne la màxima informació sobre el procés, s'ha realitzat un disseny d'experiències.

Els dissenys d'experiències són una eina estadística que ajuda a planificar l'experimentació i la corresponent anàlisi de dades, aportant la màxima informació tot realitzant el mínim nombre d'experiments. La seva finalitat és la de conèixer com afecten cada una de les variables experimentals incloses en l'estudi (Factors) als resultats finals del procés (Respostes), estudiant cada variable amb diversos valors (Nivells).

Les etapes necessàries per a correcta realització d'un disseny d'experiències són les que es descriuen a continuació (Tye, 2004):

- 1) Definició del problema: Justificar la raó per la qual és necessari realitzar un disseny d'experiències.
- 2) Establir un objectiu: Aquest fet evitarà desviacions cap a qüestions secundàries de menor importància que poden desembocar a conclusions poc útils.
- 3) Seleccionar els Factors: S'ha de escollir quines són les variables a estudiar que es considera que poden tenir un major grau d'afectació als resultats finals.
- 4) Determinar els Nivells dels Factor: Cal determinar entre quins valors experimentals s'estudiarà cada variable. Aquest pas és crític, ja que un factor influent pot ser determinat com a no important si els nivells escollits són massa propers o allunyats entre sí.
- 5) Dissenyar l'experiment: S'ha de seleccionar el disseny estadístic més adequat d'acord amb els Factors i Nivells escollits i els objectius de l'estudi.
- 6) Realitzar les experiències: Es duen a terme els assajos necessaris d'acord amb els Factors i Nivells seleccionats.
- 7) Anàlisi de dades i interpretació de resultats: Realitzar el tractament estadístic més adequat als resultats dels experiments per tal d'extreure'n el màxim d'informació.

Un dels punts claus i crítics dels dissenys d'experiències és la selecció de la matriu de disseny que s'adapti millor als objectius de l'estudi, havent d'assolir una situació de compromís entre la informació que es vol obtenir i el nombre d'experiències a realitzar. Els diferents dissenys d'experiències existents són els següents (García, 2007):

- Dissenys factorials complets: En general, un disseny d'experiments contempla la realització de dissenys factorials, és a dir, que els valors dels seus paràmetres varien simultàniament. Aquests, permeten obtenir la màxima informació i estudien l'efecte de les interaccions que hi ha entre factors però presenten un inconvenient, i és que el número d'experiments a realitzar creix enormement en augmentar el nombre de factors.
- Dissenys factorials fraccionats: Es tracta de dissenys que permeten estudiar un nombre més elevat de factors amb un menor nombre d'experiments, els quals empren la nomenclatura  $N^{k-p}$ , on  $N$  indica el número de nivells, "k" el dels factors i "p" el grau de fraccionament. Això s'aconsegueix substituint l'estudi de les interaccions que es consideren menys importants per nous factors.
- Disseny factorial de Plackett-Burman: Es tracta d'un cas particular dels dissenys factorials fraccionats, a on es confonen totes les interaccions per nous factors. S'estudien  $k=n-1$  variables, on "k" és el número de factors, "n" el número d'experiments múltiple de 4. Les matrius de Plackett-Burman s'usen com a mètode d'escombratge (*screening*), amb l'objectiu d'identificar les variables importants d'un procés que realment tenen influència en la resposta.

A partir dels nombre de nivells i factors a estudiar es pot conèixer el nombre d'experiments, tot realitzant les combinacions pertinents. Per això, s'ha de partir d'una matriu ortogonal  $n \times m$  de  $s$  elements diferents:  $L_n(s^m)$ , on  $n$  és el número d'experiències,  $m$  el número de factors i  $s$  el número de nivells per factor.

Així doncs, en primer lloc cal escollir quines variables experimentals (factors) podrien ser influents en el procés d'adsorció, i amb quins valors (nivells) caldria estudiar-los. Per a l'elecció d'aquests paràmetres, també cal tenir en compte l'elevada durada i complexitat de cadascuna de les anàlisis. Basant-se en la bibliografia existent (Carbonelle *et al.*, 2005; Eppe *et al.*, 2005), així com en la pròpia experiència personal adquirida durant l'estudi dels adsorbents comercials anterior, es va decidir basar aquest disseny d'experiències en una matriu tipus Plackett-Burman de 7 factors a 2 nivells, havent de realitzar un total de 8 experiències –matriu  $L_8(2^7)$ –.

Aquests dissenys no permeten l'estudi d'interaccions entre factors, però permeten avaluar un elevat nombre de factors amb un reduït nombre d'experiències. Així doncs, és un disseny molt útil per a la identificació dels factors influents en un procés, com és el cas que ocupa. Com a resposta es va prendre el % d'eliminació per a cada família de contaminants.

Els factors seleccionats han estat la quantitat d'adsorbent, la temperatura, pressió i temps d'adsorció, el tipus d'adsorbent i l'activació d'aquest. Es va decidir confondre el setè factor amb l'error experimental, per tal de poder discriminar si els efectes de cada factor eren significatius o no en l'eliminació de COPs. La *Taula 3.14* mostra aquests factors, amb els corresponents nivells alt i baix als quals s'ha estudiat.

**Taula 3. 14.** Factors i nivells seleccionats pel disseny d'experiències.

Factor	Codi	Nivell alt	Nivell baix
Quantitat d'adsorbent ( % en pes)	A	1.5	0.5
Temperatura d'adsorció (°C)	B	70	40
Temps (min)	C	60	30
Tipus d'adsorbent	D	Pansil	Pangel B40
Activació de l'adsorbent	E	Sí	No
Pressió (hPa)	F	200	1000
Error experimental	G	+	-

Els adsorbents escollits van ser el Pansil i el Pangel B40, ja que tenen una superfície específica molt diferent (220 i 80 m<sup>2</sup>/g). A més el Pangel B40 incorpora una sal d'amoni quaternària en la seva estructura (*Taula 3. 1*), fet que pot generar un comportament químicofísic diferent durant el procés d'adsorció.

L'activació dels adsorbents (en aquelles experiències en què va ser necessari) es va realitzar a 180°C, en una mufla, durant 10 hores. Per realitzar les experiències, es va estudiar també l'efecte de treballar a pressió reduïda, ja que segons la bibliografia podria tenir importància en el resultat final (Carbonelle et al., 2005). Per tal de poder escalfar i agitar les mostres, i a la vegada poder treballar a pressió reduïda quan fos necessari, el procés d'adsorció es va realitzar en un rotavapor.

La *Taula 3.15* mostra la matriu de disseny de Plackett-Burman que es va utilitzar, on s'indica el nivell de cada factor en cada experiència. El nivell alt d'un factor s'indica amb 1, mentre que -1 indica que el factor està en el seu nivell baix.

**Taula 3. 15.** Matriu de disseny Plackett-Burmann.

Experiència	Factor						
	A	B	C	D	E	F	G
1	1	1	1	-1	1	-1	-1
2	-1	1	1	1	-1	1	-1
3	-1	-1	1	1	1	-1	1
4	1	-1	-1	1	1	1	-1
5	-1	1	-1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1	1
7	1	1	-1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Si es combinen els factors i nivells seleccionats (*Taula 3.14*) amb la matriu Plackett-Burmann (*Taula 3.15*), s'obté la matriu experimental (*Taula 3.16*). Aquesta és la que defineix en quines condicions exactes cal realitzar cada una de les experiències de l'estudi.

**Taula 3. 16.** Matriu experimental.

Experiència	Factor						
	A	B	C	D	E	F	G
1	1.5%	70°C	60 min	Pangel B40	Activat	1000 hPa	-
2	0.5%	70°C	60 min	Pansil	No activat	200 hPa	-
3	0.5%	40°C	60 min	Pansil	Activat	1000 hPa	+
4	1.5%	40°C	30 min	Pansil	Activat	200 hPa	-
5	0.5%	70°C	30 min	Pangel B40	Activat	200 hPa	+
6	1.5%	40°C	60 min	Pangel B40	No activat	200 hPa	+
7	1.5%	70°C	30 min	Pansil	No activat	1000 hPa	+
8	0.5%	40°C	30 min	Pangel B40	No activat	1000 hPa	-

Per a cada una de les 8 experiències es van analitzar els nivells de PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines i PCBs indicadors, ja que es va considerar que aquests contaminants eren suficientment representatius com per estudiar el procés d'adsorció amb el grau de detall desitjat. El mètode d'anàlisi ha estat el que s'ha validat en l'apartat 2.6 de l'anterior capítol.

Havent comprovat empíricament que l'estat de l'oli (cru o refinat) no afecta significativament al procés d'adsorció, s'ha decidit realitzar aquest estudi amb un oli refinat, ja que així és molt més fàcil de separar de l'adsorbent per filtració. Per tal d'assegurar que aquest tingués uns nivells de COPs inicials suficientment alts com per estudiar la seva eliminació còmodament, així com disposar-ne d'una quantitat suficient per a la realització de totes les anàlisis, es va preparar una mescla dels complements nutritius basats en oli de peix prèviament caracteritzats en l'apartat 2.7.2. També s'hi va afegir un altre oli refinat que no forma part de l'estudi anterior. La *Taula 3.17* mostra la composició exacta d'aquesta barreja.

**Taula 3. 17.** Composició de la barreja d'olis de peix.

Codi oli	pes afegit (g)	%
Oli nou	19.6	18.2
P1	23.9	22.2
P2	21.8	20.3
P6	6.89	6.41
P7	35.3	32.9

En la *Taula 3.18* es resumeixen les concentracions totals de PCDD/Fs, PCBs similars i dioxines i PCBs indicadors en l'oli abans i després del tractament amb adsorbents, així com l'eliminació que aquesta diferència de concentracions suposa.

**Taula 3. 18.** Concentració total i eliminació de PCDD/Fs, PCBs similars a dioxines i PCBs indicadors de les anàlisis del disseny d'experiències.

	Oli original	Experiència							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Concentració $\Sigma$ PCDD (pg/g)	1.91	2.01	1.77	1.91	1.88	2.01	2.08	1.92	1.94
Concentració $\Sigma$ PCDF (pg/g)	5.26	5.31	5.37	5.26	5.35	5.28	5.23	5.33	5.35
Concentració $\Sigma$ PCDD/F (pg/g)	7.17	7.32	7.14	7.17	7.22	7.29	7.31	7.25	7.29
Concentració $\Sigma$ dl-PCB (ng/g)	14.4	14.4	14.2	14.6	14.5	14.5	14.4	14.2	14.2
Concentració $\Sigma$ PCB Ind (ng/g)	37.1	35.8	34.0	37.5	36.6	36.6	36.6	35.6	36.7
Eliminació $\Sigma$ PCDD (%)	-	-5.25	7.18	-0.18	1.57	-5.43	-9.17	-0.8	-1.7
Eliminació $\Sigma$ PCDF (%)	-	-0.88	-1.99	0.12	-1.58	-0.42	0.56	-1.29	-1.67
Eliminació $\Sigma$ PCDD/F (%)	-	-2.05	0.45	0.04	-0.75	-1.75	-2.03	-1.16	-1.68
Eliminació $\Sigma$ dl-PCB (%)	-	0.14	1.62	-0.98	-0.31	-0.42	0.55	1.54	1.47
Eliminació $\Sigma$ PCB Ind (%)	-	3.52	8.23	-1.01	1.37	1.26	1.42	3.98	0.98

Tal i com s'observa en la taula de resultats, cap de les 8 experiències realitzades ha aconseguit disminuir el nivell de cap dels contaminants estudiats en més d'un 10%, independentment de les condicions experimentals. La millor eliminació ha estat d'un 8% pel cas dels PCBs indicadors en l'experiència 2.

Per tal d'abordar aquests resultats d'una manera sistemàtica es procedeix a quantificar el valor del efectes, que en aquest estudi es correspondran al % d'eliminació que es guanya al passar de nivell baix a nivell alt. Aquest valor s'obté del producte de la matriu experimental Plackett-Burman i la matriu de Box, Hunter i Hunter.

Com s'ha dit anteriorment, la resposta és el percentatge d'eliminació total per a cada contaminant. La matriu de de Box, Hunter i Hunter permet el càlcul de l'efecte de cada factor sobre la resposta de cada experiència, i és la que es descriu genèricament en la *Taula 3.19*.

**Taula 3. 19.** Matriu genèrica de Box, Hunter i Hunter.

Experiència	Factors				Resposta
	A	B	...	...n	
1	-1	-1	...	-1	$Y_1$
2	1	-1	...	-1	$Y_2$
3	-1	1	...	-1	$Y_3$
4	1	1	...	-1	$Y_4$
5	-1	-1	...	1	$Y_5$
6	1	-1	...	1	$Y_6$
7	-1	1	...	1	$Y_7$
8	1	1	...	1	$Y_8$
Total	$\Sigma(\text{signe}_{ij} \cdot Y_i)$				
Divisor	nº d'experiències/2				
Efecte	Total/Divisor				

La Taula 3.20 combina la matriu de Plackett-Burmann emprada amb les respostes d'eliminació obtingudes per a cada una de les famílies de contaminants estudiades.

**Taula 3. 20.** Matriu de Box, Hunter i Hunter aplicada a la matriu de disseny i les respostes (% d'eliminació de cada COP) obtingudes en l'estudi.

Experiència	Factor							Resposta		
	A	B	C	D	E	F	G	PCDD/F	dl-PCB	PCB ind
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-2.05	0.14	3.52
2	-1	1	1	1	-1	1	-1	0.45	1.62	8.23
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.04	-0.98	-1.01
4	1	-1	-1	1	1	1	-1	-0.75	-0.31	1.37
5	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1.75	-0.42	1.26
6	1	-1	1	-1	-1	1	1	-2.03	0.55	1.42
7	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1.16	1.54	3.98
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1.68	1.47	0.98

Si s'aplica aquest algoritme a les dades experimentals, s'obtenen els valors dels efectes corresponents als factors estudiats per a cada una de les famílies de contaminants per separat. Aquests efectes (expressats com a % de millora al passar de nivell baix a nivell alt) es resumeixen en la Taula 3.21.

**Taula 3. 21.** Efecte dels factors estudiats en l'eliminació de COPs.

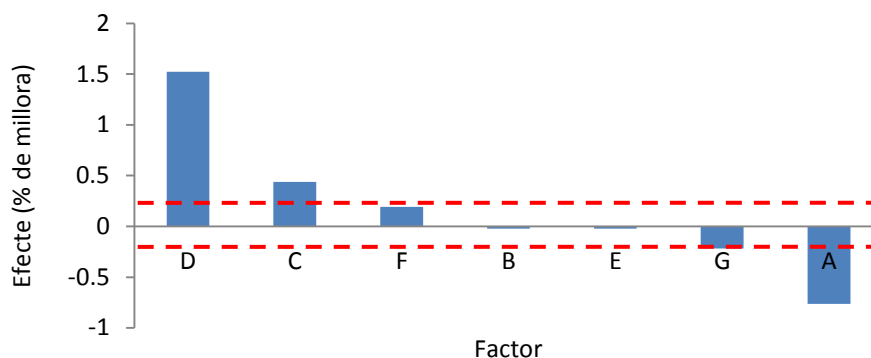
COP	Efecte dels factor (% de millora al passar de nivell baix a alt)						
	A	B	C	D	E	F	G
PCDD/Fs	-0.76	-0.02	0.44	1.52	-0.02	0.19	-0.22
dl-PCBs	0.06	0.54	-0.24	0.03	-1.69	-0.18	-0.56
PCBs indicadors	0.21	3.56	1.14	1.35	-2.37	1.20	-2.11

Per a facilitar la comprensió d'aquests resultats, s'ha realitzat un diagrama de Pareto pels efectes de cada contaminant. Aquest tipus de diagrames s'obtenen al representar els valors obtinguts, ordenats de major a menor, en un histograma.

El valor absolut del Factor G -error experimental- determinarà quins dels efectes són significatius, que seran els que tinguin un valor absolut major que per aquest factor. A continuació s'estudien els diagrames de Pareto de cada família de contaminants.

### PCDD/Fs

La *Figura 3.10* mostra el diagrama de Pareto dels efectes dels factors estudiats per l'eliminació de PCDD/Fs amb adsorbents silícics.



**Figura 3. 10.** Efecte dels factors en l'eliminació de PCDD/Fs.

El factor amb un major efecte –i amb signe positiu- és la classe d'adsorbent (Factor D), el que significa que realitzar l'adsorció amb Pansil enlloc de Pangel B40 suposa una millora d'un 1.5% en l'eliminació. Aquesta adsorció de PCDD/Fs també sembla que millori de forma molt subtil, en un 0.4%, al augmentar el temps de contacte de 30 a 60 minuts (Factor C).

La quantitat d'adsorbent (Factor A) té un efecte negatiu, indicant que l'eliminació de PCDD/Fs augmenta un 0.8% al reduir de 1.5 a 0.5% la proporció del sòlid. Aquest fet no està d'acord amb la bibliografia existent (Epepe *et al.*, 2005), però es podria explicar en el cas de que els adsorbents estiguessin contaminats, tal i com s'apunta en l'apartat 3.2.2 del present capítol.

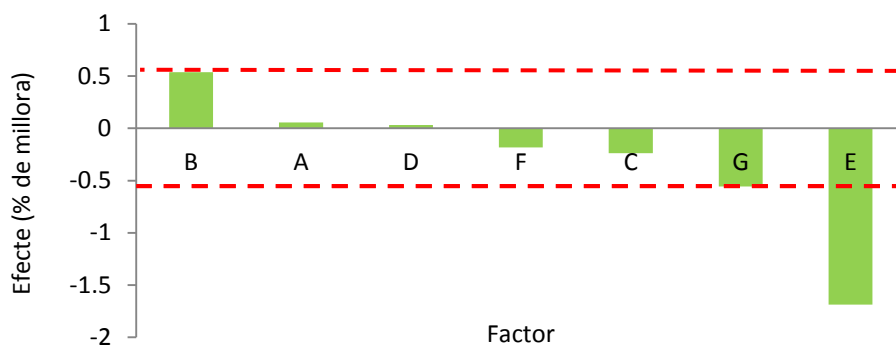
La resta dels factors experimentals estudiats no tenen un efecte significatiu en l'eliminació de PCDD/Fs, ja que els seus valors d'efecte absoluts són inferiors que el de l'error experimental (Factor G).

Tot i així, cal remarcar que deguda a la baixa eliminació obtinguda per aquesta família de contaminants, els valors pels efectes de cada factor també són baixos. En conseqüència, cal donar una interpretació d'aquests resultats de caire més qualitatiu que quantitatiu.



### PCBs similars a dioxines

El diagrama de Pareto per a l'eliminació d'aquests contaminants és el que es mostra en la Figura 3.11.



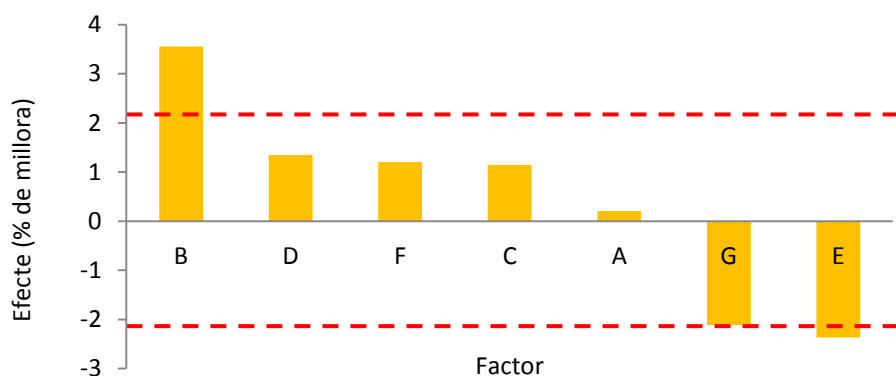
**Figura 3. 11.** Efecte dels factors en l'eliminació de PCBs similars a dioxines.

En l'eliminació de PCBs similars a dioxines, l'únic factor que té un efecte significatiu és l'activació de l'adsorbent (Factor E). En aquest cas, el seu valor és negatiu, fet que indica que l'adsorció millora un 1.7% quan l'adsorbent no ha estat activat. Aquest fet es correspon amb la informació facilitada pel fabricant, segons el qual aquest adsorbent no cal que sigui activat.

La resta de factors estudiats no han mostrat un efecte significatiu en el procés d'adsorció, al mostrar un valor absolut inferior al de l'error experimental. Novament, el fet de que les eliminacions obtingudes hagin estat tant baixes fa que els resultats s'hagin d'entendre com a orientatius, i no com a un valor numèric.

### PCBs indicadors

La Figura 3.12 mostra el diagrama de Pareto corresponent a l'eliminació de PCBs indicadors.



**Figura 3. 12.** Efecte dels factors en l'eliminació de PCBs indicadors.

En aquest cas, les eliminacions observades són lleugerament més altes que pels altres contaminants. Això fa que els valors pels efectes dels factors estudiats siguin més elevats, i per tant puguin ser quantificats d'una forma més fiable.

D'acord amb el diagrama, la temperatura d'adsorció (Factor B) és el factor més influent en el procés d'adsorció de PCBs indicadors, incrementant l'eliminació en quasi un 4% quan es treballa a 70°C enlloc de 40°C.

Tampoc sembla que l'activació de l'adsorbent (Factor E) sigui una etapa indispensable, doncs té un efecte negatiu, tot i que del mateix ordre que l'error experimental (Factor G). La resta de variables experimentals estudiades no afecten significativament al procés.

Comparant els resultats per a l'eliminació de cada una de les famílies de COPs, sembla ser que el tipus, la quantitat, i l'activació de l'adsorbent, juntament amb la temperatura d'adsorció, són els factors experimentals més influents en l'eliminació de COPs amb aquest tipus de sòlids. Tot i així, la realització del disseny d'experiències no ha aconseguit una millora significativa del procés.

En l'annex de la present tesi doctoral es pot trobar informació més detallada respecte a les dades d'eliminació de COPs en oli de peix amb adsorbents silícics.