



TESI DOCTORAL

Determinació de fungicides en pells i en banys de procés del sector adober

MEMÒRIA I ANNEXES



Autora: Maria-Reyes Reyes Ferrera

Director de tesi: Joaquim Font Vallès

Programa doctorat: Enginyeria de Projectes i Sistemes

Data: Juny 2015

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

Agraïments

En acabar aquest treball, em venen a la memòria moltes persones del meu entorn que, cada una a la seva manera, m'han transmès els seu recolzament i m'han encoratjat en els moments baixos. A totes elles, a tots els qui m'han influït de manera positiva per tirar endavant aquest treball, va adreçat el meu més sincer agraïment.

Gràcies Eulàlia per un dels millors consells: "Escriu, encara que aquell no sigui el millor dia, la idea hi serà!"

Gràcies Marian per ajudar-me a veure nous i més amplis punts de vista, i regalar-me bona energia.

Al Joan Francesc, per moltes bones estones i per les teves reconfortants paraules. A la Joana, l'Elena, la Dolors, la Mireia G, la Rosa Cu, a les companyes i companys de despatx... els de dins i els de fora. I al Miquel, gràcies per ajudar-me aquella tarda desesperada...

Al Quim, el meu tutor de tesi, per la teva ajuda i per creure que això sortiria bé. Agraïxo molt la confiança dipositada en mi.

A la meva família, en especial a la meua mare, per estar sempre pendent de nosaltres i aportar-nos pau. Al Daniel, a qui espero haver-li mostrat que si vol, si lluita, ho podrà aconseguir. I al meu nebot Abel, per estar disponible quan la tecnologia informàtica es gira en contra!

I al Joan Carles gràcies per acompanyar-me, en el sentit més ampli. Gràcies per ser-hi.

El meu agraïment al *Ministerio de Economía y Competitividad* pel recolzament financer rebut a través del projecte "*Tecnologías limpias en tenería: aplicación de nuevos compuestos fungicidas medioambientalmente sostenibles*" (CTQ2009-08347).

Resum

Aquesta tesi es basa en el desenvolupament i validació de dos mètodes d'anàlisi per determinar fungicides d'ús comú en la indústria adobera i altres d'alternatius. Un dels mètodes determina fungicides en pell i l'altre en banys de processos d'adoberia. En ambdós mètodes es determinen simultàniament els fungicides 2-(tiocianometiltio)-benzotiazol (TCMTB), 4-cloro-3-metilfenol (PCMC), 2-fenilfenol (OPP), 2-octil-3(2H)-isotiazolona (OIT) i també 2-mercaptobenzotiazol (MBT) i 3-yodo-2-propinil-butilo (IPBC).

En el mètode sobre pell, la preparació de la mostra i el procés d'extracció s'ha realitzat seguint la norma UNE-EN ISO 13365:2011, introduint unes millores. Tanmateix s'ha comprovat que el 2,4,6-triclorofenol (TCP) i el pentaclorofenol (PCP) no interfereixen en la determinació.

El mètode de determinació de fungicides sobre pell ha ampliat l'abast de la norma ISO 13365:2011, no només per a la determinació de les quatre molècules incloses en l'àmbit d'aplicació de la norma, sinó també per a altres fungicides com el IPBC i el MBT. Els canvis introduïts permeten millorar la fiabilitat de les identifikacions i la sensibilitat de la quantificació.

La segona part d'aquesta tesi està dedicada al desenvolupament d'un mètode analític per analitzar fungicides, els mateixos que en pell, en mostres aquoses. La tècnica d'extracció emprada és la microextracció en fase sòlida (SPME) i posterior anàlisi per cromatografia líquida (HPLC-PDA).

La determinació de la concentració de fungicides en mostres aquoses resulta especialment útil per poder determinar l'eficàcia d'aplicació dels fungicides a la pell, a partir del coneixement de la fracció dissolta en el bany. Aquesta darrera dada permetrà, a més, avaluar la toxicitat aportada a les aigües residuals.

La toxicitat és un dels paràmetres establerts en el cànon de les aigües residuals, i la presència de fungicides hi contribueix, conjuntament amb altres productes utilitzats.

Finalment s'analitzen mostres reals provinents de banys de processos d'adoberia com a eina d'anàlisi de l'eficàcia en l'aplicació dels fungicides.

Paraules Clau:

ISO 13365:2011 - TCMTB - PCMC - OPP - OIT - IPBC - TCP - PCP- fungicides - cromatografia líquida - detector fotodiodes - SPME - pell - mostres aquoses



Abstract

This thesis is based on the development and validation of two analytical methods to determine fungicides commonly used in the tanning industry and other alternative. One of the methods determines fungicides in leather, while the other method examines fungicides in the float of the tanning processes. Both methods simultaneously determine fungicides such as *benzothiazol-2-ylthio)methyl thiocyanate* (TCMTB), *Chlorocresol* (PCMC), *Biphenyl-2-ol* (OPP), *2-octyl-2H-isothiazol-3-one* (OIT), *Benzothiazole-2-thiol* (MBT) and *3-iodo-2-propynyl butylcarbamate* (IPBC).

In the method applied on leather, the sample preparation and extraction process has been performed following the UNE -EN ISO 13365:2011 standard, with the introduction of some improvements. It has been verified that the 2,4,6 - trichlorophenol (TCP) and pentachlorophenol (PCP) does not interfere with the determination.

The method of determination of fungicides on leather has expanded the scope of ISO 13365:2011, not only because of the determination of the four molecules included in the scope of the standard, but also because of other fungicides, such as IPBC and MBT. The changes introduced improve the reliability of the identifications and the sensitivity of the quantifications.

The second part of this thesis is devoted to the development of an analytical method for analyzing fungicides in aqueous samples, as we previously did on leather. The extraction technique used is solid phase microextraction (SPME) and a subsequent analysis is carried out by liquid chromatography (HPLC - PDA).

The determination of the concentration of fungicide in aqueous samples is particularly useful to determine the effectiveness of application of fungicides on the leather, based on knowledge of the fraction dissolved in the float. This information will additionally enable us to evaluate the toxicity of the wastewater. Toxicity is one of the established parameters established in the wastewater taxes and of course the presence of fungicides greatly contributes to toxicity levels together with other products being used.

Finally, real samples from baths of tanning processes are analyzed as a tool to examine the effectiveness of the application of fungicides.

Keywords:

ISO 13365:2011 - TCMTB - PCMC - OPP - OIT - IPBC - TCP - PCP - fungicides - chromatography - photodiodes detector - SPME - leather - water samples

Índex

Agraïments

Resum

Abstract

Índex *i*

Introducció..... **1**

1. Justificació (Hipòtesi de Treball) 1

2. Objectius del treball 3

Capítol 1. La pell i els biocides **5**

1.1. Introducció 5

1.2. Estructura de la pell 5

1.3. Fabricació del cuir 6

1.3.1. *Conservació de la pell* 6

1.3.2. *Operacions de ribera o humides* 6

1.3.3. *Operacions d'adobatge* 8

1.3.4. *Post-adobatge i operacions d'acabat* 8

1.4. El paper dels biocides en el procés d'adobatge 11

1.4.1. Fungicides utilitzats en el procés d'adobatge 11

1.4.2. *Concentració efectiva dels fungicides* 13

1.4.3. *Consideracions sobre el TCMTB* 16

1.5. Legislació dels fungicides 18

1.6. Biocides a les aigües de procés 21

Capítol 2. Fonaments de la determinació de fungicides en pell **23**

2.1. Selecció dels fungicides investigats 23

2.2. Mètodes d'anàlisi de fungicides. Revisió bibliogràfica 25

2.2.1. Extracció dels fungicides de la pell 25



2.2.2.	Tècniques instrumentals	25
2.3.	Modificacions respecte a la norma ISO 13365:2011.....	27
2.3.1.	Instrumentació i material.....	27
2.3.2.	Reactius	27
2.3.3.	Detector PDA (photodiode array)	30
Capítol 3. Validació del mètode d'anàlisi de fungicides en pell		39
3.1.	Criteris de validació d'un mètode analític.....	39
3.2.	Definicions.....	39
3.3.	Selectivitat.....	40
3.4.	Linealitat i rang. Calibratge	41
3.5.	Precisió	43
3.5.1.	Estudi de repetibilitat.....	43
3.5.2.	Estudi de reproductibilitat. Estudi global.....	45
3.5.3.	Estudi de reproductibilitat. Resultats per dies i per analista	46
3.6.	Exactitud.....	47
3.7.	Límit de detecció (LD).....	52
3.8.	Càlcul de la incertesa del mètode	54
3.8.1.	Introducció	54
3.8.2.	Components de la incertesa.....	54
3.8.3.	Fórmules de càlcul emprades.....	56
3.8.4.	Resultats.....	57
3.8.5.	Conclusions.....	58
3.9.	Anàlisi de mostres reals	61
3.10.	Conclusions	64
Capítol 4. Fonaments de la determinació de fungicides en mostres aquoses		67
4.1.	Tècniques de preparació de mostra.....	67
4.2.	Mètodes d'extracció de fungicides en mostres aquoses: Revisió bibliogràfica	71
4.2.1.	Determinació de fungicides no fenòlics per SPME.....	73
4.2.2.	Determinació de fungicides fenòlics per SPME.....	74



4.3.	Introducció a la tècnica SPME	75
4.4.	Mecanisme d'extracció d'una fibra SPME.....	77
4.4.1.	Tipus de recobriments SPME	77
4.4.2.	Fibres adsorbents o absorbents	78
4.4.3.	Relació entre el recobriment i la mida de l'analit	80
4.4.4.	Efecte de la concentració de la mostra.....	81
4.5.	Variables que afecten al procés SPME	81
4.6.	Aspectes teòrics de la SPME.....	82
4.6.1.	Extracció d'equilibri	83
4.6.2.	Extracció exhaustiva	84
4.6.3.	Extracció per difusió	85
4.7.	Calibratge en SPME	86
4.7.1.	Calibratge extern	86
4.7.2.	Calibratge per addició de patró.....	87
4.7.3.	Calibratge per patró intern (Pi)	88
Capítol 5 . Procediment per a la selecció d'una fibra SPME		89
5.1.	Selecció de fungicides analitzats	89
5.2.	Procediment per a la selecció de la fibra	90
5.2.1.	Condicions inicials	91
5.3.	Descripció del mètode	93
5.4.	Instrumentació i material utilitzat.....	94
5.4.1.	Instrumentació	94
5.4.2.	Reactius i material.....	94
5.5.	Comparació de les 3 fibres SPME seleccionades	95
5.6.	Comparació de 2 fibres: Carboxen/PDMS i PDMS/DVB.....	96
5.7.	Procediment de neteja de les fibres	97
5.8.	Conclusions proves preliminars	98
Capítol 6 . Desenvolupament del procés de desorció		99
6.1.	Efecte del pH de l'eluent de desorció	99

6.2.	Efecte de la temperatura de desorció.....	100
6.3.	Efecte del temps de desorció.....	102
6.4.	Conclusions	103
Capítol 7. Ajustament del procés d'extracció		105
7.1.	Efecte de la força iònica	105
7.2.	Efecte de la temperatura d'extracció.....	107
7.3.	Efecte del temps d'extracció i concentració de treball.....	108
7.4.	Rangs de concentració lineals	112
7.5.	Conclusions	115
Capítol 8. Calibratge.....		117
8.1.	Patró intern (Pi).....	117
8.1.1.	Concentració de treball del Pi	119
8.1.2.	Relació del Pi amb la resta d'analits.....	120
8.2.	Calibratge extern vs calibratge amb patró intern (Pi).....	121
8.3.	Conclusions	121
Capítol 9. Validació del mètode d'anàlisi de fungicides en mostres aquoses		123
9.1.	Criteris de validació d'un mètode analític.....	123
9.2.	Selectivitat.....	123
9.3.	Linealitat i rang.....	124
9.4.	Exactitud i veracitat.....	125
9.4.1.	Disseny de l'estudi de veracitat.....	125
9.4.2.	Resultats de l'estudi de veracitat	126
9.4.3.	Conclusions de l'estudi de veracitat.....	127
9.5.	Precisió	128
9.5.1.	Disseny de l'estudi de precisió	128
9.5.2.	Resultats de l'estudi de precisió.....	129
9.5.3.	Conclusions de l'estudi de precisió	133
9.6.	Càlcul de la incertesa del mètode	133
9.6.1.	Resultats.....	133



9.7. Robustesa del mètode	134
9.8. Límits	137
9.9. Altres consideracions del mètode	138
9.9.1. Influència de la matriu del bany	138
9.9.2. Vida útil de les fibres	139
9.10. Anàlisi de mostres reals	141
9.11. Conclusions	143
9.12. Referències bibliogràfiques	¡Error! Marcador no definido.
Capítol 10. Conclusions finals	145
Capítol 11. Difusió dels resultats	149
Referències bibliogràfiques	151
Índex de Taules	159
Índex de Figures	161
Abreviatures	163
Glossari	165
Annex 1. Anàlisi ANOVA de la regressió	167
1. Fungicides en Pell	169
2. Fungicides en banys de procés	170
Annex 2.	171
PNT Determinació fungicides en mostres aquoses	171
Annex 3. Publicacions	179



Introducció

1. Justificació (Hipòtesi de Treball)

En la producció i distribució del cuir es poden donar dos tipus de biodegradacions: la deguda a bacteris i la deguda a fongs. L'atac de bacteris ocorre generalment en la etapa inicial de la fabricació del cuir, i el de fongs sol aparèixer després de l'etapa d'adobatge (Hauber i Germann 1997).

Els fongs es manifesten visualment en forma de taques, però a més la pell pateix una degradació del col·lagen, la qual cosa produeix una disminució de les propietats físiques, reduint així la qualitat de la pell (Landau 1937).

Com quasi tots els éssers vius, els fongs necessiten certes condicions bàsiques per créixer i multiplicar-se: humitat, nutrients i condicions climàtiques adequades.

- La pell en wet-blue és una bona font d'humitat. I alguns dels productes utilitzats poden actuar com a nutrients (sals amòniques, fosfats, tensioactius) (Orlita 2004).
- En la pell acabada el contingut en humitat és molt més baix, i el creixement de fongs és menor, però durant el transport entre diferents zones climàtiques, o si les condicions d'emmagatzematge no són les adequades, el contingut d'humitat pot augmentar.

Durant el procés de fabricació de la pell és necessari l'addició de biocides que evitin l'atac de bacteris i fongs, per tal d'evitar pèrdues i deterioraments.

Els biocides utilitzats estan regulats pel Reglament sobre Biocides, Reglament (EU) nº 528/2012, conegut per les inicials en anglès BPR (Biocidal Products Regulation). Tot i complir amb la legislació, cal tenir en compte que tots els biocides són tòxics: són

utilitzats per destruir certes formes de vida. En aquesta línia, l'article 18 del Reglament estableix la promoció de les millors pràctiques per reduir al mínim l'ús de biocides.

En aquest treball s'han desenvolupat dos mètodes analítics per determinar fungicides en dos matrius diferents: sobre pell i en mostres aquoses. Els fungicides investigats són TCMTB, PCMC, OPP, OIT, MBT, IPBC, TCP i PCP.

L'anàlisi de fungicides en pell es realitza amb una tècnica d'extracció sòlid-líquid i posterior anàlisi per cromatografia líquida (HPLC-PDA).

L'anàlisi de fungicides en mostres aquoses es realitza amb la tècnica SPME (microextracció en fase sòlida) i posterior anàlisi per cromatografia líquida (HPLC-PDA).

El coneixement sobre el contingut de fungicides a les pells, i al mateix temps a les aigües de procés, pot permetre establir una correlació entre la dosificació i el rendiment sobre la pell, contribuint a un ús sostenible dels biocides.

Els mètodes analítics desenvolupats han servit com a eina per optimitzar el procés d'aplicació a la pell de nous fungicides, com l'IPBC, en el marc del *Proyecto del Plan Nacional I+D+I "Aplicación de nuevos compuestos fungicidas mediambientalmente sostenibles"* (CTQ2009-08347) finalitzat el 2013.

La contribució d'aquest treball al Projecte ha estat en el desenvolupament de mètodes d'anàlisi per determinar les concentracions de fungicides presents al cuir, i a les aigües de procés.

L'estudi de viabilitat dels nous fungicides en el procés de fabricació del cuir escapa de l'abast d'aquest Treball.

2. Objectius del treball

El treball té 2 objectius principals:

- 1er.** El primer objectiu és desenvolupar i validar un mètode cromatogràfic per a l'anàlisi simultani de vuit fungicides de pells. Quatre d'aquests fungicides són els més utilitzats en adoberia i s'ha adaptat la norma d'anàlisi: la UNE-EN ISO 13365:2011.

La determinació simultània dels vuit conservants de pell es duu a terme sense modificar substancialment les condicions ja establertes a la norma. La nova proposta cromatogràfica es presenta com a una opció addicional a la existent, permetent obtenir més sensibilitat i especificitat en l'anàlisi, a partir d'una única injecció.

Els conservants estudiats sobre pell han estat p-cloro-m-cresol (PCMC), o-fenilfenol (OPP), n-octilisotiazolinona (OIT), 2-tiocianometiltiobenzotiazol (TCMTB), 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbammat (IPBC), 2-mercaptobenzothiazol (MBT), 2,4,6-triclorofenol (TCP) i pentaclorofenol (PCP).

- 2on.** El segon gran objectiu és desenvolupar un mètode d'anàlisi pels fungicides estudiats a la primera part (amb excepció del TCP i PCP) sobre mostres aquoses.

Per dur a terme l'anàlisi de fungicides en mostres aquoses es treballa amb la tècnica SPME (microextracció en fase sòlida) i posterior anàlisi per cromatografia líquida (HPLC-PDA).

No s'estudiarà l'extracció dels fungicides TCP i PCP en mostres aquoses ja que no serà probable trobar-los en aquest medi, contràriament en pell, en què es podrien arribar a trobar en funció de la legislació del país d'origen.

El segon objectiu comprèn objectius específics, que es detallen a continuació.

El treball final de Màster d'Enginyeria del Cuir realitzat va ser la iniciació d'aquest estudi, on es van assolir els dos primers objectius:



- Realitzar una recerca documental de treballs publicats sobre anàlisi de fungicides per SPME en mostres aquoses, amb l'objectiu d'obtenir una primera selecció de tipus de fibres per iniciar l'estudi.
- Experimentar amb els diferents tipus de fibra per seleccionar-ne la més adient pel grup de fungicides estudiats.
- Ajustar les condicions d'extracció i desorció dels analits (temperatura, temps, pH, força iònica, velocitat d'agitació).
- Realitzar un calibratge per a cada un dels fungicides, una vegada definides les millors condicions per a l'anàlisi.
- Validar el mètode.
- Analitzar mostres reals provinents d'aigües de procés com a eina d'anàlisi de l'eficàcia en l'aplicació dels fungicides.

Capítol 1. La pell i els biocides

1.1. Introducció

El procés d'adobatge consisteix a transformar la pell de l'animal (vaca, ovella, cabra, porc o altres), un material altament putrescible, en cuir, un material estable. La finalitat és impedir la putrefacció del cuir assegurant la seva estabilitat química i biològica, i donar-li unes propietats i efectes de moda segons requereixi el mercat (Morera i Marí 2000; European Commission 2003)

La fabricació del cuir implica una seqüència de processos químics i mecànics complexes. D'entre ells, l'adobatge és l'etapa fonamental que confereix al cuir la seva estabilitat i caràcter essencial (Joint-Research-Centre 2013).

1.2. Estructura de la pell

La pell és un òrgan format per 3 capes: l'epidermis, la derma i el teixit subcutani.

Epidermis: es troben els fol·licles capil·lars (els pèls). Representa l'1% del gruix total. Aquesta capa és eliminada durant el pellam, a excepció de les pells en què interessa conservar el pèl.

Derma: és la part interessant des del punt de vista de l'adobatge. Representa el 85% del gruix de la pell. Està formada fonamentalment per fibres de proteïna (col·lagen) però també de fibres elàstiques, reticulina, vasos sanguinis, nervis, cèl·lules grasses i teixit muscular.

Teixit subcutani o carnassa: representa el 15% del gruix, i és eliminada durant el descarnat. (Bacardit i Font 2009).

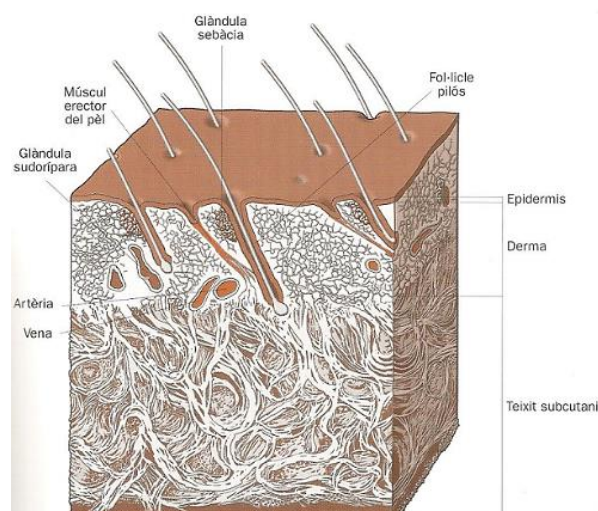


Fig. 1. Esquema de la pell
Font: Jordi Ballonga i Victor Navarro
(Bacardit i Font 2009)

1.3. Fabricació del cuir

El procés de fabricació el cuir es pot classificar en quatre categories principals:

1. Conservació de les pells
2. Operacions de ribera o humides
3. Operacions d'adobatge
4. Post-adobatge i operacions d'acabats

1.3.1. Conservació de la pell

Des del moment en què s'extreu la pell de l'animal, comença un procés de degradació per la proliferació de bacteris. Per aquesta raó, si no hi ha intenció d'iniciar el procés d'adobatge immediatament a continuació, s'hauran d'aplicar uns tractaments de conservació. Els dos més habituals són l'assecat i el salat, o una combinació d'ambdós (Morera i Marí 2000).

1.3.2. Operacions de ribera o humides

Són una sèrie d'operacions que preparen el cuir per l'adobatge. Per exemple es remullen les pells provinents de conservació per rehidratar-les, estovar-les, netejar-les de sang i brutícia, per així facilitar la penetració de substàncies que espongin el cuir (Morera i Marí 2000).

Comprèn operacions com el remull, pellam i calciner, descarnat i dividit, desencalcinament i rendiment, i desgreixatge.

Remull

És la primera operació del procés. Consisteix a netejar i hidratar la pell.

Segons la pell sigui fresca, salada o seca, el remull serà diferent en durada, acció mecànica aplicada i en els productes auxiliars addicionats.

El remull és un tractament amb aigua que té una doble funció. D'una banda eliminar la brutícia, residus i restes de sang, i d'altra, recuperar la hidratació original de la pell amb ajuda de productes auxiliars (Morera i Marí 2000).



Pellam i calciner

El pellam consisteix en l'eliminació de l'epidermis i el pèl. El calciner produeix un "buidat" de l'estructura fibrosa del col·lagen.

Els productes més utilitzats per eliminar el pèl són el sulfhidrat i el sulfur de sodi. La seva funció és trencar els ponts disulfur de la queratina.

En el calciner s'utilitza hidròxid sòdic per trencar els ponts d'hidrogen de les fibres de col·lagen (Morera i Marí 2000).

Descarnat i dividit

El descarnat consisteix a netejar el costat carn de la pell de restes de carn i greix.

Quan la pell es massa gruixuda per a un determinat l'article es pot dividir. Aquesta operació es fa en una màquina que separa la pell transversalment, de manera que s'obté una part amb el costat de flor igualat a un gruix concret, i la part de carn anomenada serratge (Morera i Marí 2000).

Desencalcinament

En aquesta etapa s'eliminen els àlcalis presents a la pell que d'altra manera produirien problemes d'absorció durant l'adobament, produint defectes com taques i poca resistència (Morera i Marí 2000).

Rendiment

El rendiment té com a objectiu l'afluixament de l'estructura de col·lagen per acció d'enzims proteolítics. La intensitat del rendiment anirà en concordança al nivell de flonjor desitjat a l'article (Morera i Marí 2000).

Desgreixatge

El greix natural de la pell pot provocar taques fosques, una menor penetració de productes, i altres efectes no desitjables sobre la pell, per això convé eliminar-lo. Per fer-ho es tracta en bombo amb tensioactius, emulsionant així el greix que s'elimina finalment per rentat (Morera i Marí 2000).

Píquel

En aquesta etapa s'elimina la cal combinada amb el col·lagen, interromp l'acció dels enzims del rendiment i prepara la pell per a l'adobatge.

Es un tractament amb sals i àcid. L'àcid acidifica la pell i impedeix una precipitació de l'agent adobant a les capes externes. La sal impedeix l'inflament àcid del col·lagen.

Després del píquel la pell està preparada per adobar. A vegades es fa un píquel de conservació molt àcid per mantenir la pell sense adobar un cert temps (Morera et al. 2000).

1.3.3. Operacions d'adobatge

Adobament

L'adobament té la finalitat de proporcionar estabilització a la pell, al temps que una major resistència a la temperatura. Els productes més utilitzats són les sals de crom i alumini, i els extractes vegetals, encara que també s'utilitzen altres productes.

En l'adobament amb sals de crom i alumini, es pot fer un tractament amb fungicides al final del procés per poder guardar i comercialitzar les pells en aquest estat (anomenat wet-blue si s'han adobat amb crom o wet-white si s'han adobat amb alumini).

1.3.4. Post-adobatge i operacions d'acabat

Escorriment i rebaixatge

Una vegada adobat i reposat el cuir es pot dividir i rebaixar. S'escorre per eliminar bany residual d'entre les fibres. El rebaixatge regula i iguala la diferència de gruix d'una part a una altra del cuir (Morera i Marí 2000).

Neutralització

Després de l'adobatge comencen unes operacions que variaran l'aspecte final del cuir (tacte, suavitat, aspecte flor).

L'objectiu de la neutralització és eliminar les rebaixadures, sals, sals de crom no fixat i els àcids forts que conté el cuir (Morera i Marí 2000).

Readobament

El cuir es tracta amb substàncies adobants amb la finalitat de proporcionar-li certes propietats (Morera i Marí 2000).

Tintura i greixatge

Tintura: Es tenyeix el cuir. A més de colorants s'utilitzen productes per regular el pH, la correcta distribució i la intensitat de color.

Greixatge: És una operació per lubricar les fibres de cuir i així evitar que es trenqui a l'assecar-lo. S'utilitzen greixos modificats per fer-los solubles en aigua, o engreixos sintètics de tipus tensioactius o emulsionants (Morera i Marí 2000).

Estirat i assecat

El cuir s'estira en una màquina que permet allisar el gra de la flor i recuperar la superfície.

L'assecat del cuir permet evaporar l'excés d'aigua, per controlar-ne la humitat final (Morera i Marí 2000).

Operacions d'acabat en sec

Processos mecànics:

Són una sèrie d'operacions per millorar l'aparença i propietats del cuir. Es divideix en 2 parts: processos mecànics i aplicació d'un acabat superficial.

Els processos mecànics poden ser per exemple condicionat, estovat (dóna flexibilitat), esmerilat (per dissimular els defectes de flor), desempolsat, batanat, setinat, polit, planxat (Morera i Marí 2000).

Acabat superficial:

És un tractament superficial del cuir amb la finalitat de protegir i embellir. S'influeix sobre l'aspecte visual, el tacte i sobre les propietats de solidesa del cuir. Per exemple es protegeix contra taques, es canvia el color, i en definitiva s'acaba el producte a gust del consumidor (European Commission 2003).

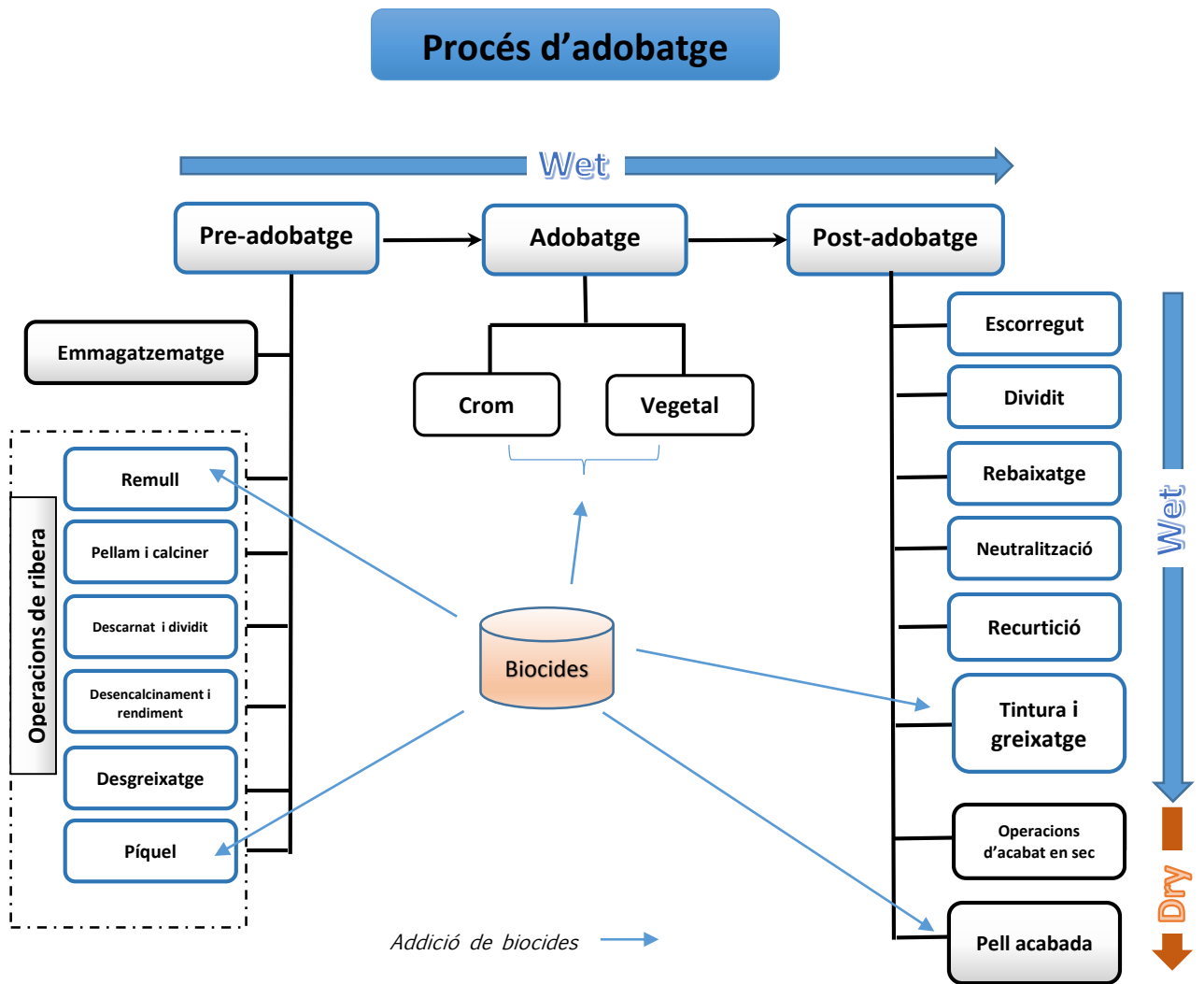


Fig. 2. Procés general d'adobatge. s'han indicat les etapes habituals d'adició de biocides

1.4. El paper dels biocides en el procés d'adobatge

Els biocides s'apliquen a diferents etapes del procés d'adobament de la pell per protegir-la contra l'atac microbià (veure la figura 2).

És habitual addicionar-los a les etapes de: conservació, remull, píquel, adobatge, tintura i acabat. Les més crítiques són les etapes prèvies a l'emmagatzematge o el transport.

Els biocides s'apliquen en bombo a les etapes de remull, píquel, adobatge i tintura. A l'etapa d'acabat l'aplicació pot ser en forma de esprai i/o màquina de rodets. També es troben incorporats a les fórmules dels productes líquids utilitzats, per exemple colorants, licors d'engreix, i acabats caseínics (Joint-Research-Centre 2013).

Els biocides utilitzats en adoberia es divideixen en dues categories: **bactericides** i **fungicides**.

Els bactericides s'utilitzen principalment al principi del procés de d'adobatge, quan les pells són més vulnerables a l'atac bacterià.

Els fungicides s'utilitzen a partir de l'etapa de píquel/adobatge. A la figura 2 s'han indicat les etapes on la pell té un alt contingut d'humitat (*wet*), i per tant és susceptible a l'atac dels fongs.

1.4.1. Fungicides utilitzats en el procés d'adobatge

Les pells després de l'adobatge al crom o vegetal, o inclús una vegada acabades, són medis idonis pel desenvolupament de fongs. La raó és que constitueixen un excel·lent substrat pel seu creixement degut a la presència de sals d'amoni, fosfats, tensioactius, agents d'engreix i altres compostos orgànics (Orlita 2004).

Els fungicides s'utilitzen des de l'etapa de píquel fins a l'etapa d'assecatge, per les condicions d'humitat i pH en què es troba la pell.

- Les pells en **píquel** s'han de tractar amb fungicides durant el transport i emmagatzematge.
- És habitual també comercialitzar pells només adobades, en **wet-blue** o **wet-white**, sense haver finalitzat el procés. En aquest cas també s'utilitzen fungicides per conservar durant períodes prolongats o transportar llargues distàncies.

- Les pells **acabades** també es tracten amb fungicides per prevenir un assecatge inadequat o si s'emmagatzemen en condicions d'humitat.

Segons l'últim document redactat de Les Millors Tècniques Disponibles del sector de l'adoberia (en anglès *BAT Tanning, Best Techniques Available*) els 4 fungicides més utilitzats en adoberia són (Joint-Research-Centre 2013):

Fungicides més utilitzats en adoberia:		
Fenòlics:	PCMC	p-cloro-m-cresol
	OPP	o-fenilfenol
Heterocíclics:	TCMTB	2-tiocianometiltiobenzotiazol
	OIT	2-octilisotiazolinona

Taula 1. Fungicides més utilitzats en adoberia (*BAT Tanning 2013*)

Altres fungicides utilitzats segons altres fonts (Orlita 2004; Bryant, Hurlow i Whittemore 2011) són:

Altres fungicides:		
Altres:	IPBC	3-iodo-2-propinil butil carbamat
	DIMPTS	diiodometil-p-tolilsulfona
Heterocíclics:	MBT	2-mercaptobenzotiazol
	BMC	2-benzimidazolil-metilcarbamat (<i>Carbendazim</i>)
	P	Piritiona sòdica

Taula 2. Altres fungicides de la indústria del cuir (Orlita 2004; Bryant, Hurlow i Whittemore 2011)

El TCMTB s'utilitza des de la dècada de 1970 (Orlita 2004), i actualment és encara el més utilitzat.

Un acurat estudi d'A. Orlita (2004) va identificar diferents soques de fongs associades a etapes de l'adobatge (Orlita 2004):

Procés	Tipus fongs	Tipus dany
Adobatge al crom	Paecilomyces ehrlichii P. acuelatum P. purpurogenum P. roseopurpureum	Taques vermelles
Assecat pell	P. Ochraceus A. wentii P. rugulosum P. funiculosus P. variotii V. glaucum	Taques verdes, groc-marró, marró fosc, gris i verd fosc
Cuir acabats	P. chrysogenum P. luteum, i altres penicillium A. niger, i altres aspergilliums Rhizopus nigricans S. Brevicaulis i T. Viride.	Taques i olor a florit en general

Taula 3. Classificació de fongs segons l'etapa d'adobatge (Orlita 2004)

Per aconseguir una major eficàcia contra les diferents soques, sovint s'utilitza la combinació de dos o més fungicides.

1.4.2. Concentració efectiva dels fungicides

Segons les dades publicades al document *BAT Tanning del 2013* (Joint-Research-Centre 2013) les concentracions efectives, per conservació de wet-blue, de cada un dels fungicides serien les següents:

Font: <i>BAT Tanning, 2013</i>	PCMC (mg/kg)	OPP (mg/kg)	OIT (mg/kg)	TCMTB (mg/kg)
<i>Wet-blue</i>	580	280	80	<i>Sense dades</i>
<i>Wet-white</i>	>1500	>1200	400-500 (no efectiu)	>600

Taula 4. Concentracions de fungicides, per conservació de wet-blue (BAT Tanning 2013)

(Les concentracions ombrejades indiquen que s'apliquen combinades).

Per altra banda, l'ecoetiqueta alemanya "Der Blaue Engel" (l'àngel blau), fa recomanacions sobre els límits màxims admissibles en cuir per aquests fungicides (Page 2010; «Der Blaue Engel»):

<i>Segons ecoetiqueta alemanya, 2010</i>	PCMC (mg/kg)	OPP (mg/kg)	OIT (mg/kg)	TCMTB (mg/kg)
<i>Cuir acabat</i>	300	500	100	500

Taula 5. Límits admissibles de fungicides, segons l'ecoetiqueta alemanya "Der Blaue Engel (Page 2010)"

A la literatura s'han trobat diferents estudis comparatius sobre l'eficàcia d'aquests fungicides.

Hauber i Germann (1997) comparen la mínima concentració efectiva del TCMTB (250 ppm) en relació a la barreja PCMC/OPP (580/280 ppm) i OIT (80 ppm) en wet blue. El mateix treball exposa la diferent absorció que tenen aquests fungicides segons la zona de la pell i la capa (flor, carn o interior) (Hauber i Germann 1997).

<i>Font: Hauber i Germann, 1997</i>	PCMC/OPP (mg/kg)	OIT (mg/kg)	TCMTB (mg/kg)
<i>Wet-blue</i>	580/280	80	250

Taula 6 Comparació concentracions efectives envers TCMTB

Orlita (2004) estableix que el TCMTB aplicat al 0.2% (sobre pes tripa) en pells wet-blue protegeix durant 3-4 mesos.

Adminis i Huynh (2001) comparen l'efectivitat del TCMTB, 4-6 setmanes a 30°C (aplicat al 0.1-0.15% en wet-blue), envers la mescla MBT (0.2%)/MBC (Carbendazim 0.02%) que és efectiu fins a 12 setmanes en iguals condicions. De la mateixa manera, es compara la major eficàcia del TCP (2,4,6-triclorofenol) o la barreja PCMC/OPP/P envers el TCMTB (Adminis, Huynh i Money 2001).

<i>Font: Adminis i Huynh, 2001</i>	MBT/MBC	TCP	PCMC/P	TCMTB
<i>% oferta</i>	0.2/0.02			0.1-0.15
<i>Efectivitat (wet-blue)</i>	++	++	++	+

Taula 7 Comparació concentracions efectives envers TCMTB, en wet-blue

Adminis i Huynh (2001) també exposen els problemes que presenta el TCMTB en presència d'altres compostos, i que redueixen la seva efectivitat. Així per exemple, el TCMTB reacciona amb el sulfur i bisulfit descomponent-se en MBT, un fungicida menys actiu. O s'inactiva en presència d'àlcalis, pel què es pot veure afectat durant la basificació. I per últim, exposa que el TCMTB s'absorbeix preferentment en els greixos, la qual cosa disminueix la seva concentració.

D'altres fonts (Hauber i Germann 1997; Ramadori 2010) parlen de la utilització d'altres fungicides o combinacions, com TCMTB amb MBT, i TCMTB amb OIT. En aquests casos, la protecció contra fongs era millor que la proporcionada pel TCMTB sol, però la toxicitat de les aigües de procés resultava elevada.

Cuadros et al. (2013) va comparar l'efectivitat dels fungicides TBZ (tiabendazol), DIMPTS i IPBC envers TCTMB. L'estudi es va realitzar en diferents etapes: sobre wet-blue en l'etapa d'adobatge, sobre pell vegetal durant greixatge, i en píquel de conservació. Els resultats varen demostrar que tant el DIMPTS com l'IPBC tenen molt bona capacitat antifúngica, enfront TCMTB. A igual quantitat oferta, el DIMPTS i l'IPBC van demostrar millor resposta davant 5 soques¹ de fongs testades, mentre que TBZ i TCMTB només protegien contra una d'elles. La toxicitat dels banys va donar en ordre creixent IPBC < DIMPTS < TCMTB.

<i>Font: Sara et al., 2013</i>	TBZ	DIMPTS	IPBC	TCMTB
<i>Wet-blue</i>	-	+++	+++	+
<i>Vegetal</i>		+++	+++	+
<i>Toxicitat</i>		++	+	+++

Taula 8. Efectivitat dels fungicides i toxicitat dels banys envers TCMTB

¹ Soques seleccionades en fàbriques reals, per tant més resistents en condicions de treball normal.

1.4.3. Consideracions sobre el TCMTB

Com s'ha mencionat el TCMTB és el fungicida més utilitzat des de la dècada dels 80 no només en el procés de fabricació del cuir. S'utilitza com a conservant de pintures, fluids de la indústria metal·lúrgica, pasta de paper no alimentari, coles d'empaperar. També a la indústria de la fusta (vernissos, mobles, marcs) i en agricultura.

Per a aquesta raó també és un dels fungicides més investigats.

L'Agència de Protecció Ambiental Americana (EPA) (EPA 2006) va dur a terme un estudi exhaustiu sobre la toxicitat del TCMTB. En concret, l'estudi del risc mediambiental recull les següents consideracions:

- El TCMTB es degrada en condicions biòtiques (la que ocorre deguda a l'acció d'organismes vius), produint metabòlits com per exemple l'àcid 2-benzotiazolsulfònic (BTSA) i MBT. Ambdós metabòlits són menys tòxics que el TCMTB.
- S'hidrolitza en condicions abiòtiques (condicions físic-químiques del medi) en funció del pH: a pH 5 és estable i a pH 7 es degrada lentament. En condicions alcalines es degrada més ràpidament (vida mitja 1.8-2.1 dies).
- Es degrada per acció de la llum a pH 5 en solució aquosa, amb una vida mitja de 1.5 hores.

Degut a la seva biodegradació en aigua i sòls l'EPA va considerar que el TCMTB no constitueix un contaminant preocupant per les aigües superficials i subterrànies.

El mateix estudi va demostrar que exposicions del nivell de 8-10 ppb podrien posar en perill la supervivència de peixos d'aigua dolça.

Alguns d'aquests aspectes ja són tinguts en compte pels fabricants/subministradors de fungicides en base TCMTB, que faciliten la següent informació per optimitzar el seu ús:

- Els oxidants (clor i peròxids) i reductors (sulfurs i bisulfurs) poden descompondre la molècula.
- Perd efectivitat en condicions alcalines (pH superiors a 8). És estable a pH 5 i es degrada lentament a pH 7, especialment en presència de sulfurs. Per aquesta raó s'ha d'utilitzar:
 - o Durant el píquel
 - o Durant adobatge: després adició del crom.
- Els banys d'adobatge amb un alt contingut en greix (banys reutilitzats) poden reduir la concentració de TCMTB en el cuir, perquè la molècula té molta afinitat pel greix.



No s'han trobat referències sobre les quantitats de fungicides que queden als banys després de la seva aplicació: aquest és un tema important per valorar la toxicitat de les aigües. Només s'ha trobat un article sobre un mètode de determinació de TCMTB en banys de crom (Hinojosa Reyes, Wróbel i Wróbel 2002) però sense fer cap al·lusió a la procedència de les mostres analitzades.

Els resultats exposats en els diferents estudis, estan referits a % de producte aplicat sobre pes (escorregut o tripa) de pell. En cap cas es nombra la quantitat real de fungicida absorbit a la pell. Hauber i Germann (Hauber i Germann 1997) són els únics autors trobats que parlen de fungicida absorbit en pells wet-blue, però ho fan referit al percentatge de la quantitat oferta, sense fer cap referència al mètode d'anàlisi. Això sí, proposa unes concentracions mínimes en wet blue per a una adequada protecció, la qual cosa suposa un punt de referència.

1.5. Legislació dels fungicides

Els biocides son substàncies químiques utilitzades per eliminar organismes nocius per l'ésser humà, animals i per evitar danys en materials. Precisament degut a aquestes propietats, els seu ús pot posar en risc la salut dels humans i/o animals i el medi ambient.

Estan regulats pel Reglament sobre Biocides: *Reglamento (EU) n° 528/2012, conegut en anglès com BPR (Biocidal Products Regulation)*, restant derogada l'antiga Directiva 98/8/EC.

Tots els biocides requereixen autorització per ser comercialitzats en l'àmbit de la Unió Europea (UE), i les substàncies actives que contenen els biocides han de ser prèviament avaluades i aprovades. L'autorització té validesa pels Estats membres de la UE.

Els fungicides utilitzats en la indústria del cuir estan subjectes al Reglament de Biocides.

Estan classificats dins el grup 2 com a conservants amb el tipus de producte TP 9:

Número	Tipo de producto	Descripción
Grupo principal 2: Conservantes		
Salvo que se indique lo contrario, este tipo de productos solo abarca los destinados a prevenir el crecimiento de microbios y algas.		
TP 9	Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados	Empleados para la conservación de materiales fibrosos o polimerizados, como cuero, caucho o papel, o productos textiles mediante el control del deterioro microbiano. Este tipo de producto incluye los biocidas que impiden el depósito de microorganismos en la superficie de los materiales y, por consiguiente, inhiben o impiden la aparición de malos olores o presentan ventajas de otro tipo.

Taula 9 Classificació dels fungicides segons Reglament (EU) 528/2012

(Font: <http://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>)

Substàncies prohibides o restringides

Tradicionalment s'havia utilitzat el paranitrophenol (PNP) i el pentaclorofenol (PCP) pel seu baix cost i alta efectivitat. Es van deixar d'utilitzar degut a la seva elevada toxicitat. El PCP genera dioxines per combustió les quals són conegudes com a contaminants orgànics persistents (COP) en l'ésser humà, el medi ambient i els animals. Va ser prohibit per la Directiva 91/173/CEE. (Hauber i Germann 1997) (Adminis, Huynh i Money 2001).



El dimetilfumarat (DMF) és una altre biocida prohibit per la Unió Europea per la Directiva 2009/251/CE. Causa seriosos problemes per contacte amb la pell, d'entre els quals dermatitis de difícil tractament (Cuadros et al. 2010; Širvaitytė et al. 2012)

La directiva BPR inclou una llista actualitzada de substàncies d'ús restringit a l'Annex XVII del reglament REACH. Aquesta llista es pot trobar a l'enllaç:

<http://echa.europa.eu/web/guest/addressing-chemicals-of-concern/restrictions/list-of-restrictions/list-of-restrictions-table>.

Substàncies preocupants (SVHC)

Tanmateix, aquesta directiva proporciona una llista de substàncies considerades extremadament preocupants (en anglès SVHC, Substances Very High Concern). Són substàncies que poden tenir efectes greus sobre la salut i el medi ambient. De confirmar-se com a tals, es votarà per la seva substitució o seran substàncies que necessitaran autorització. Aquesta llista es fa pública a fi d'oferir informació a la indústria per avançat. Es pot consultar al següent enllaç:

<http://echa.europa.eu/es/candidate-list-table>

En aquest sentit, és habitual trobar llistes de substàncies restringides (en anglès RSL), editades per productors internacionals, grans marques d'articles de consum i altres associacions. Aquestes especificacions sovint són més restrictives, respecte a substàncies indesitjables en els articles, que moltes de les regulacions com el REACH. Així diferents documents recullen, com a substàncies restringides, fungicides com el TeCP (tetraclorophenol) i el TCP (triclorophenol) (Castell 2011; ECCO 2014). La Comissió de la *International Union of Environment* (IUE) de la *International Union of Leather Technologists and Chemists Societies* (IULTCS), en el document IUE-10 sobre productes restringits en adoberia, cita el TCP pendent de discussió per incloure'l a la llista de restringits.

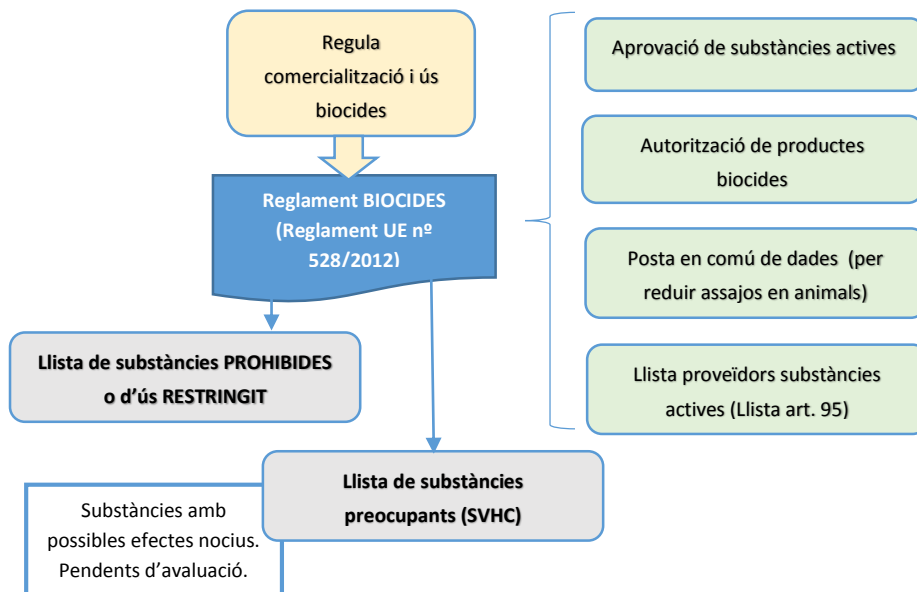


Fig. 3. Esquema Reglament Biocides



1.6. Biocides a les aigües de procés

Un dels principis de la Directiva Marc de l'Aigua 2000/60/CE és la prevenció i reducció de la càrrega contaminant. És a dir, el nivell de càrrega generada s'ha de reduir en algun moment abans del seu abocament.

La Comissió Europea ha regulat la descàrrega d'alguns biocides i plaguicides (DDT, hexaclorhexà, aldrin i dieldrin) a través de la Directiva CE 2006/11/CE relativa a la contaminació causada per determinades substàncies perilloses abocades en el mitjà aquàtic de la Comunitat (Joint-Research-Centre 2013).

Algunes substàncies prohibides, en particular els compostos organoclorats, són prou estables per sobreviure processos de tractament d'aigües residuals.

Tenint tot això en compte, caldrà controlar els efluents dels processos on s'addicionen biocides.

Capítol 2. Fonaments de la determinació de fungicides en pell

2.1. Selecció dels fungicides investigats

Tal com s'ha esmentat a la introducció, aquest treball ha participat en el Projecte Nacional 'Tecnologías limpias en tenería: Aplicación de nuevos compuestos fungicidas medioambientalmente sostenibles', basat en la cerca i viabilitat de nous fungicides en la fabricació del cuir.

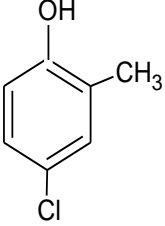
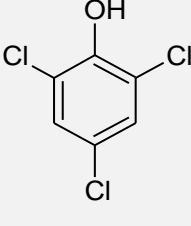
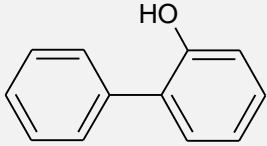
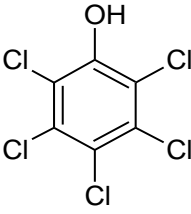
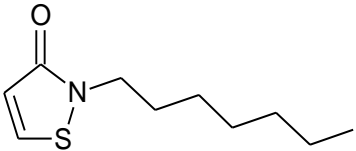
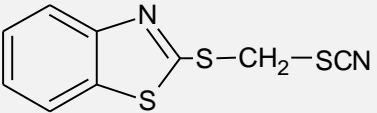
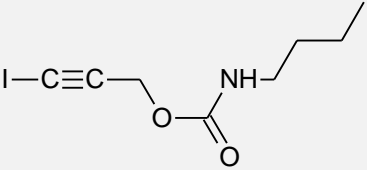
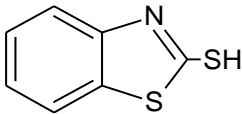
Tenint en compte els fungicides mes utilitzats en el sector adober (veure capítol 1) i les proves efectuades amb altres compostos (Cuadros et al. 2013) se n'han seleccionat els següents:

Sigles	Nom IUPAC (Nom EC)	Fórmula química	Pes molec.	Núm. CAS (Núm. EC)	Família química
Fenòlics:					
PCMC	4-cloro-3-metilfenol (p-cloro-m-cresol) (Chlorocresol)	C ₇ H ₇ ClO	142,6	59-50-7 (200-431-6)	Fenol
OPP	2-fenilfenol (o-fenilfenol) (Biphenyl-2-ol)	C ₁₂ H ₁₀ O	170,1	90-43-7 (201-993-5)	Fenol
TCP	2,4,6-triclorofenol (2,4,6-trichlorophenol)	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,6	88-06-2 (201-795-9)	Fenol
PCP	Pentaclorofenol (Pentachlorophenol)	C ₆ HCl ₅ O	266,6	87-86-5 (201-778-6)	Fenol
Heterocíclics:					
OIT	2-octil-1,2-tiazol-3-(2H)-ona (2-octyl-2H-isothiazol-3-one)	C ₁₁ H ₁₉ NOS	213,2	26530-20-1 (247-761-7)	Tiazolina
TCMTB	2-tiocianometiltio benzotiazol (benzothiazol-2-ylthio)methyl thiocyanate)	C ₉ H ₆ N ₂ S ₃	238,3	21564-17-0 (244-445-0)	Benzotiazol
MBT	2-mercaptobenzotiazol (Benzothiazole-2-thiol)	C ₇ H ₅ NS ₂	167,2	149-30-4 (205-736-8)	Benzotiazol
Altres:					
IPBC	3-iodo-2-propinil butil carbamat (3-iodo-2-propynyl butylcarbamate)	C ₈ H ₁₂ INO ₂	281,0	55406-53-6 (259-627-5)	Carbamat

Taula 10. Fungicides analitzats

Els biocides que estan prohibits a Europa poden ser importats en cuirs i pells procedents de països en què el seu ús continua. Per aquesta raó s'ha inclòs el fungicida pentaclorofenol (PCP), malgrat la seva prohibició a la Comunitat Europea des de 1991, a fi de poder detectar la seva presència en cuirs procedents de països no sotmesos a la normativa europea.

A la *Taula 11* es presenta l'estructura química dels fungicides estudiats.

<p>4-chloro-3-metilphenol (PCMC)</p> 	<p>2,4,6-trichlorophenol (TCP)</p> 
<p>O-phenyl-phenol (OPP)</p> 	<p>2,3,4,5,6-pentachlorophenol (PCP)</p> 
<p>2-octil-1,2-thiazol-3-(2H)-ona (OIT)</p> 	<p>2-thiocyanomethylthio benzothiazole (TCMTB)</p> 
<p>3-Iodo-2-propynyl N-butylcarbamate (IPBC)</p> 	<p>2-mercaptobenzothiazol (MBT)</p> 

Taula 11. Estructura química dels fungicides analitzats

2.2. Mètodes d'anàlisi de fungicides. Revisió bibliogràfica.

2.2.1. Extracció dels fungicides de la pell

En aquest apartat es presenta una cerca bibliogràfica que mostra com ha anat evolucionant el mètode d'extracció de fungicides en pell.

Els primers assajos de determinació de TCMTB en pell s'havien realitzat en wet blue amb extracció Soxhlet durant 8 hores, amb diclormetà el 1978 (Van Deren 1978). Les recuperacions eren de l'ordre del 50%.

Fowler et al. (1987) van proposar una combinació d'ultrasons i Soxhlet també amb diclormetà (Fowler W. 1987). L'eficàcia de l'extracció augmentava en disminuir el contingut en humitat de les mostres. Les determinacions cromatogràfiques es duien a terme amb un eluent no polar (en fase normal), com hexà i diclormetà amb obtenció de molt baixes recuperacions. Aquesta tècnica cromatogràfica està en desús des dels anys setanta (Skoog et al. 2005).

2.2.2. Tècniques instrumentals

De forma anàloga a l'apartat anterior, s'ha fet un recorregut per la literatura científica per obtenir informació sobre les tècniques instrumentals utilitzades, segons la família química a què pertanyen els fungicides seleccionats.

Fenols i clorofenols

Les tècniques analítiques més comunament utilitzades per la determinació de fenols són l'electroforesi capil·lar (CE) i la cromatografia líquida (HPLC), en combinació amb detecció ultraviolada (UV), detecció electroquímica o d'espectrometria de masses (MS) (Mahugo Santana et al. 2009).

Una altra tècnica és la cromatografia de gasos (GC), amb diferents mètodes de detecció, com la detecció per ionització de flama (FID), de captura d'electrons (ECD) o d'espectrometria de masses (MS). No obstant, per utilitzar aquesta tècnica cal fer prèviament una derivatització per obtenir bones resolucions cromatogràfiques (Mahugo Santana et al. 2009), (Wu, Hu i Hou 2008), (Higashi i Fujii 2009).

Benzotiazols i carbamats

Tant el TCMTB com el IPBC són inestables a altes temperatures. L'IPBC descompon a 100°C, però és estable a la hidròlisi i a la degradació a pH 5.

La cromatografia de gasos no és la millor tècnica per l'anàlisi de TCMTB ja que aquest no és estable a altes temperatures (Nawrocki et al. 2005; Muthusubramanian et al. 1998). La cromatografia líquida, en canvi, no necessita modificar l'estat ni la temperatura de la mostra.

Shustina i Lesser (1984) van analitzar MBT per cromatografia líquida de fase reversa utilitzant l'eluent acetonitril/aigua.

Tomaselli i Cozzolino (1991) analitzaren TCMTB per cromatografia líquida de fase reversa amb una fase mòbil d'acetonitril/aigua acidificada amb 0.1% H₃PO₄.

La norma ISO 13365 (recordem que no estava en vigor durant l'elaboració d'aquest treball) efectua l'extracció amb acetonitril (ACN) en un bany d'ultrasons i la determinació per cromatografia líquida amb detecció ultraviolada.

2.3. Modificacions respecte a la norma ISO 13365:2011

2.3.1. Instrumentació i material

- Bany d'ultrasons (Selecta Ultrasons-HD) amb regulació de temps i temperatura.
- Cromatògraf líquid d'alta resolució (Waters Alliance 2695) amb bomba quaternària, desgasificador, columna termostatitzada.
- Detector de fotodíodes (Waters PDA detector 2996).
- La gestió de les dades es duu a terme amb el software Empower.
- Columna C₁₈ Mediterranea Sea 18 Teknokroma (150 mm x 4,6 mm d.i., 3 µm de mida de partícula).
- Filtres de membrana de nylon de 0.45 µm (Micron Analítica)
-

2.3.2. Reactius

- Acetonitril de qualitat gradient per HPLC, de Panreac.
- Aigua ultrapura de qualitat Milli-Q, de Millipore.
- Àcid fòrmic suprapur, de Fluka.
- Fungicides:

Fungicida	Nom comercial/Proveïdor	Riquesa
PCMC	Sharlau F.E.R.O.S.A.	99.5%
OPP	Sharlau F.E.R.O.S.A.	99.9%
TCP	Fluka	99.3%
PCP	Fluka	99%
OIT	Sigma Aldrich	99.9%
TCMBT	Laboratoris Miret S.A. (Lamirsa)	30%
MBT	Laboratoris Miret S.A. (Lamirsa)	99.3%
IPBC	Preventol MP100 BAYER	99%

Taula 12. Productes fungicides utilitzats

Els analits són eluïts a 0.9 mL/min amb aigua (acidificada al 0.1% amb acid formic) i ACN (acidificat al 0.1% amb acid fòrmic) al 40 i 60 % respectivament durant els 7 primers minuts, i augment lineal fins a 95 % d'ACN fins a 11 min.

La columna és termostatitzada a 30 °C.

A la següent taula es detallen les condicions cromatogràfiques recomanades a la norma i els canvis adoptats en aquest treball.

	Condicions cromatogràfiques recomanades a ISO 13365	Condicions cromatogràfiques ADOPTADES
Columna	CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 HD amb pre-columna	Mediterranea Sea 18 TR-010043, 15 x 0,46 cm, 3µm
Flux	0,8 mL/min	0,9 mL/min
Fase mòbil	Aigua (A) / Acetonitril (B)	Aigua al 0.1% àc. Fòrmic (A) / Acetonitril al 0.1% àc. Fòrmic (B)
Gradient	60% B 6 min isocràtic, lineal a 95% B en 9 min.	60% B 7 min isocràtic, lineal a 95% B fins a 11 min.
Temperatura columna	30°C	30°C
Detecció UV	275 nm	Detector de fotodíodes. Escombrat entre 190 i 380 nm, amb els següents canals: 324 nm (MBT), 201.4 nm (PCMC i OPP), 193.4 nm (IPBC), 279 nm (OIT), 223 nm (TCMTB), 203 i 290 nm (TCP), 214.3 nm (PCP)
Volum injecció	20 µL	20 µL

Taula 13. Comparació de les condicions cromatogràfiques de la norma ISO 13365 i la nova proposta

Les variacions més destacables respecte a les recomanades a la norma, han estat en la fase mòbil i sobretot en el mètode de detecció UV. El flux també s'ha modificat per poder obtenir una bona separació de les 8 molècules, no oblidem que les condicions de la norma està prevista per a 4 fungicides.

La variació efectuada en la fase mòbil ha estat l'acidificació.

S'ha adoptat la mateixa composició que a la norma, però acidificada, ja que el TCMTB és més estable en medi àcid (Padoan 2006). Estudis previs de fungicides (Planas 2004) (Vázquez 2004) (Bautista 2006) realitzats a l'EEl, entre els que s'analitzava el TCMTB, posaven de manifest una major reproductibilitat cromatogràfica quan la fase mòbil era lleugerament més àcida.

L'acidificació de la fase mòbil contribueix també a controlar la ionització d'espècies com per exemple els fenols i clorofenols. Un compost ionitzat presenta major polaritat (menor hidrofobicitat) respecte a la seva forma no ionitzada, la qual cosa es tradueix en una variació del temps de retenció (Loo et al. 2008).

A més, el pH de la solució d'extracció és lleugerament àcid degut al pH de la pell, i per tant s'afavoreix la reproductibilitat si durant l'elució cromatogràfica el pH es manté estable.

Així, amb les condicions cromatogràfiques adoptades segons la *Taula 13*, es poden analitzar tots els fungicides simultàniament. Tal com mostra la següent imatge, s'obté una bona separació cromatogràfica:

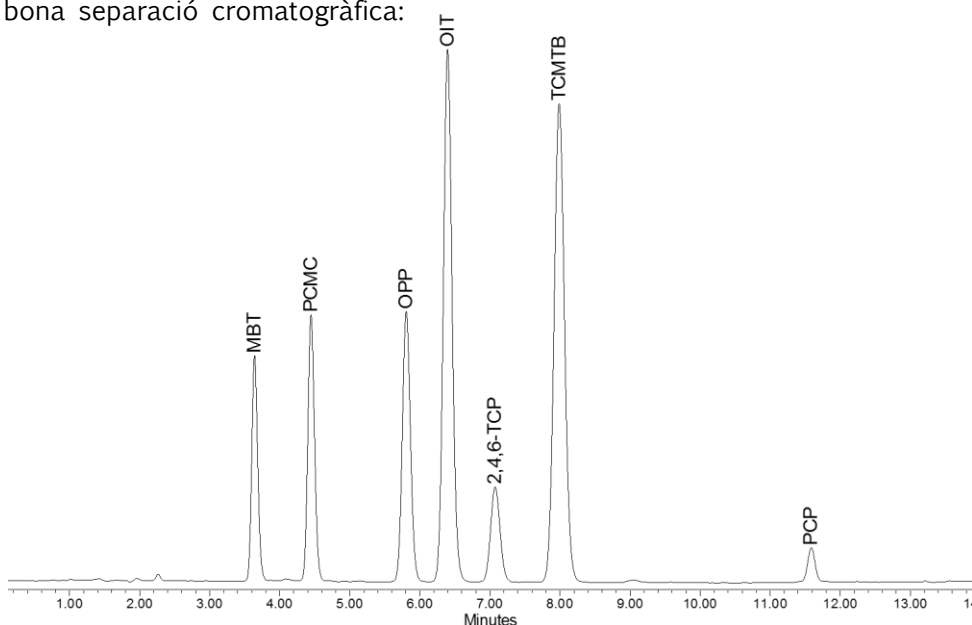


Fig. 4. Cromatograma d'HPLC dels 7 dels fungicides a concentracions de 5 a 10 mg/L. Longitud d'ona de detecció a 270 nm.

En quant al mètode de detecció, la norma contempla la detecció conjunta a una mateixa longitud d'ona, 275 nm. En aquest treball s'ha tingut en compte la longitud d'ona òptima per a cada fungicida, segons les absortivitats obtingudes.

2.3.3. Detector PDA (photodiode array)

Una de les diferències importants respecte a la norma ISO 13365 és la utilització d'un detector PDA acoblat al cromatògraf líquid. Aquest detector permet identificar una substància pel seu espectre ultraviolat. La màxima resposta cromatogràfica s'obté quan l'adquisició cromatogràfica s'efectua a una longitud d'ona característica per aquella substància. Aquesta longitud d'ona correspon al màxim (o un dels màxims) d'absorbància de l'espectre ultraviolat i proporciona la màxima sensibilitat en la detecció de cada fungicida.

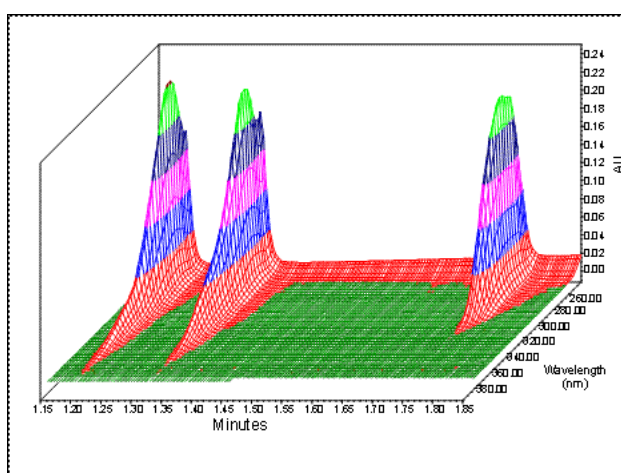


Fig. 5. Cromatograma en 3D obtingut amb un detector PDA

Un detector PDA permet recopilar l'espectre UV de cada pic obtingut, de forma simultània.

L'espectre 3D presenta intensitat, temps i longitud d'ona en el mateix gràfic.

Una eina molt útil que acompanya el software d'aquest detector, és la possibilitat d'enregistrar els espectres en una llibreria, a partir de substàncies patró. Aquesta base de dades és utilitzada durant l'anàlisi cromatogràfic permetent la identificació in situ de les substàncies d'interès.

És a dir, la identificació de cada un dels fungicides està basada en dos tipus d'informacions:

- El **temps de retenció (Tr)**, verificat per l'anàlisi en iguals condicions cromatogràfiques d'un patró. Si bé, per si sola, aquesta informació podria no ser

concloent en la identificació d'una substància, sobretot quan es tracta de barreges complexes (Skoog et al. 2005).

- **L'espectre ultraviolat (UV).** Amb el detector de fotodíodes es pot visualitzar l'espectre UV de cada pic obtingut, permetent així la identificació per comparació amb l'espectre d'un patró enregistrat prèviament. La similitud o coincidència dels espectres UV es determina per un algoritme de comparació incorporat en el mateix *software*, establint la puresa de pic (en anglès *purity angle*). A la Fig. 6 es pot veure gràficament aquesta comparació d'espectres.

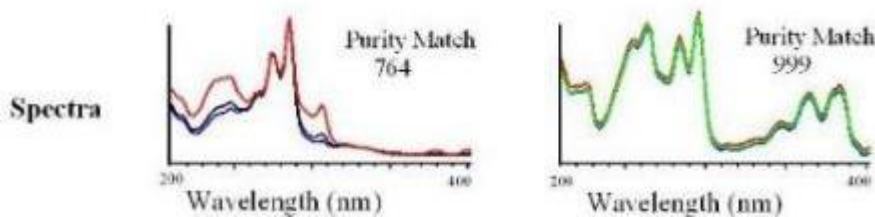


Fig. 6. Comparació d'espectres UV en la identificació d'un pic cromatogràfic (Font: www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx (Huber 2009))

Per il·lustrar la funcionalitat del detector de fotodíodes, a les següents figures es pot observar l'aspecte tan diferent que presenten els pics. Parem atenció a la detecció del MBT i PCP.

Per exemple a 214 nm el cromatograma té aquest aspecte.

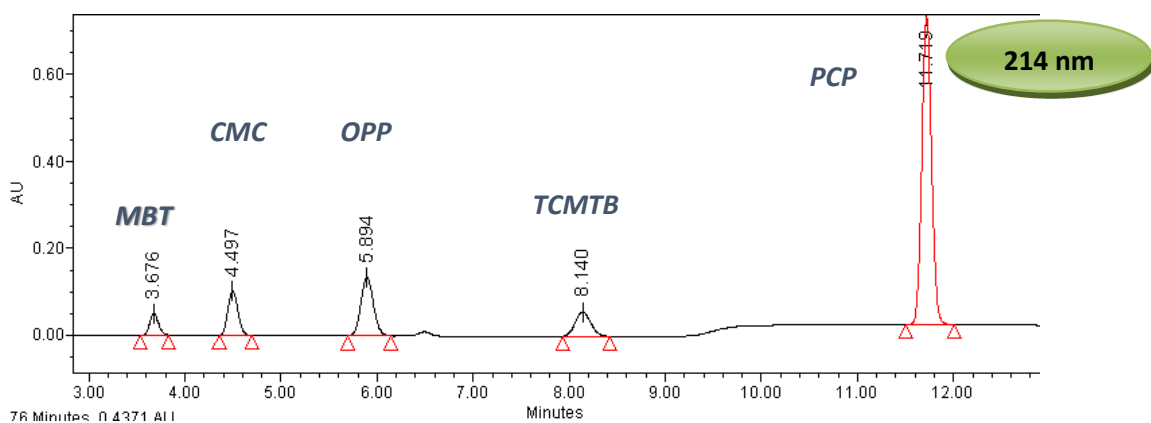


Fig. 7. Cromatograma obtingut a 214 nm

Mentre que a 324 nm té aquest altre aspecte, la qual cosa posa de manifest l'especificitat en la identificació d'una substància, si se selecciona la seva longitud d'ona característica.

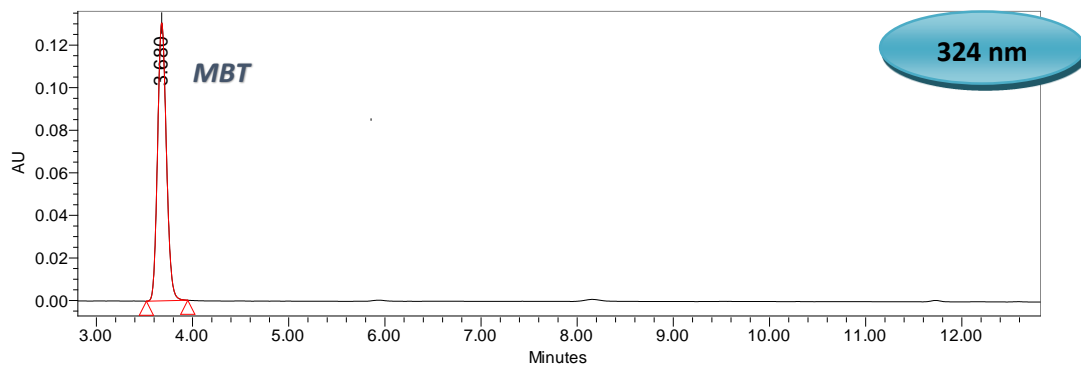


Fig. 8. Cromatograma obtingut a 324 nm

L'explicació la trobem en els seus espectres UV, observem la *Fig. 9*.

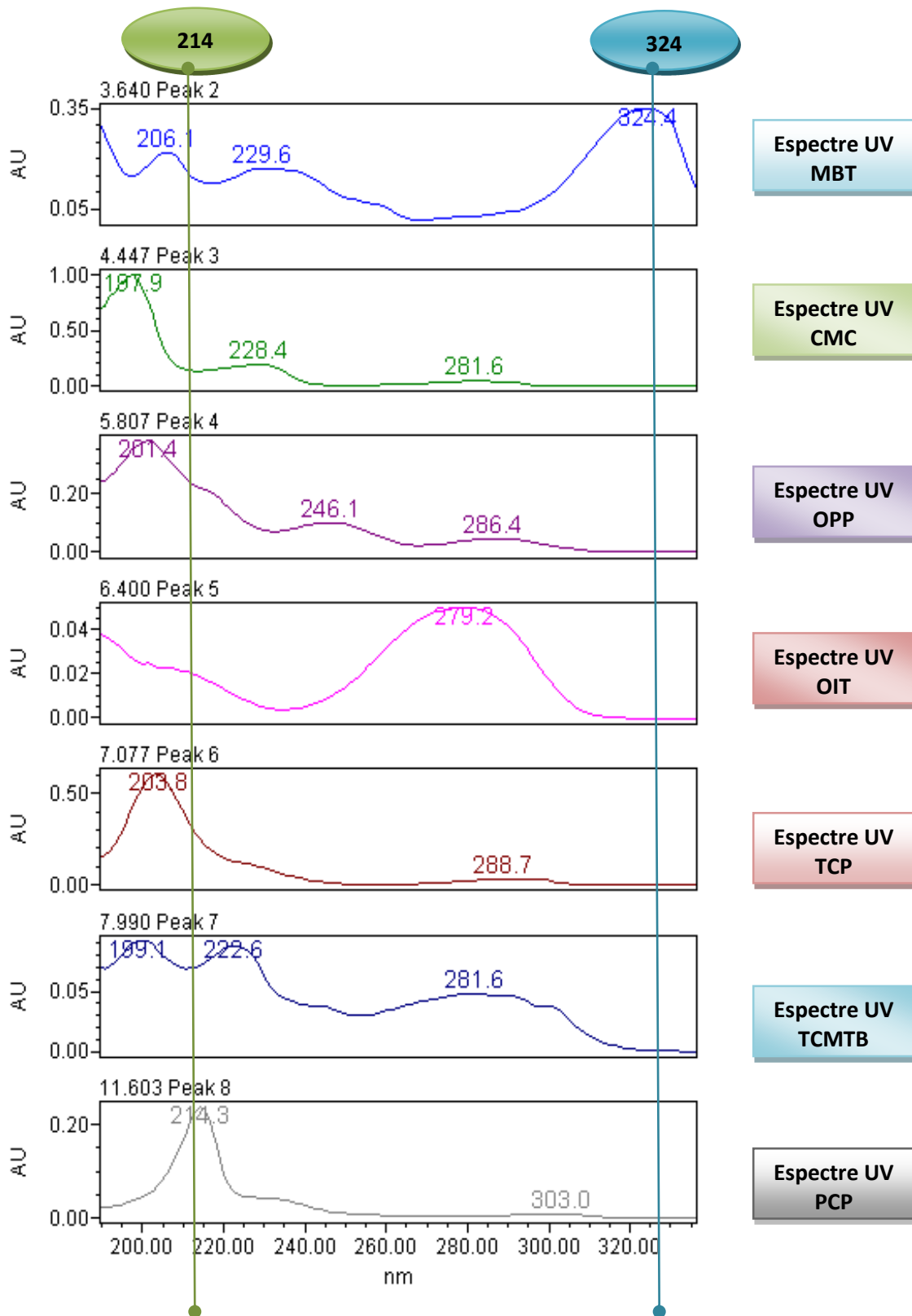


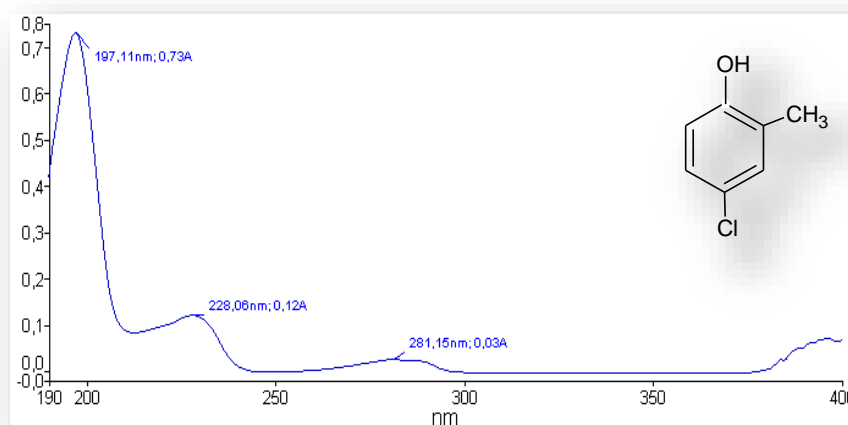
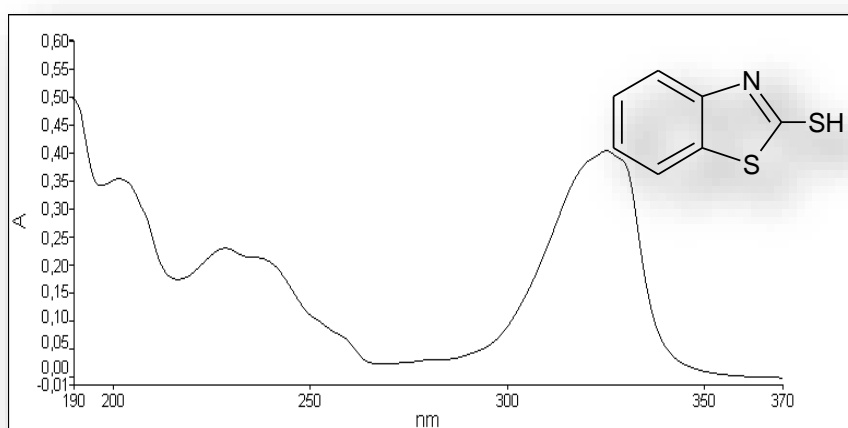
Fig. 9. Espectres UV dels fungicides. S'observa una gran diferència en la sensibilitat segons la longitud d'ona a què es quantifica, per exemple a 214 nm o 324 nm.

Així a 214 nm l'espectre que presenta major intensitat correspon al del PCP: aquesta és la longitud d'ona característica pel PCP.

En canvi a 324 nm l'únic fungicida que presenta senyal en el ultraviolat és el MBT. És per això que un cromatograma obtingut a 324 nm, com el que hem vist, només presenta un pic, el del MBT.

Per tal de conèixer prèviament l'espectre UV de cada fungicida, abans d'obtenir-lo per cromatografia, es van enregistrar en un espectrofotòmetre UV-VIS Perkin Elmer model Lambda 25, els espectres de cada un d'ells.

Els espectres obtinguts són els següents:



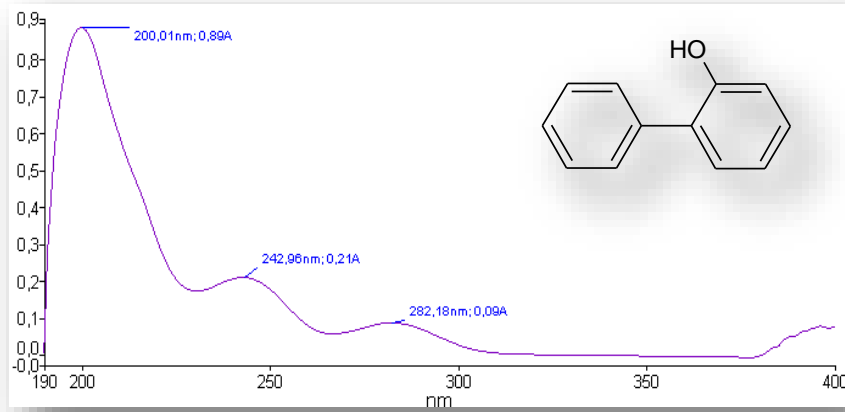


Fig. 13. Espectre de OPP

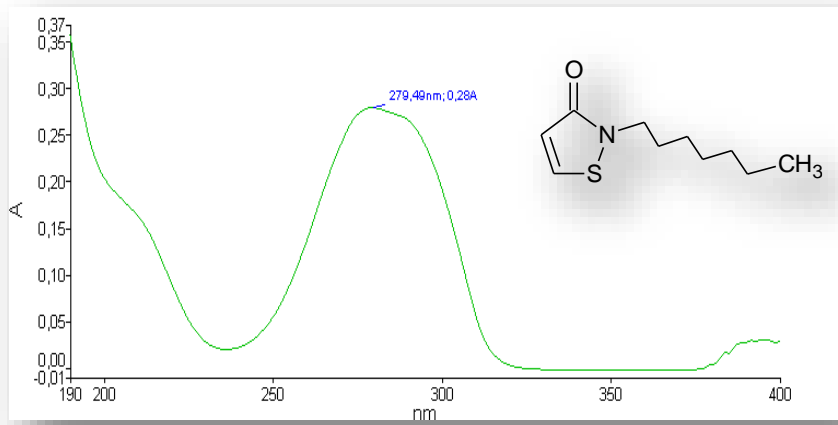


Fig. 14. Espectre de OIT

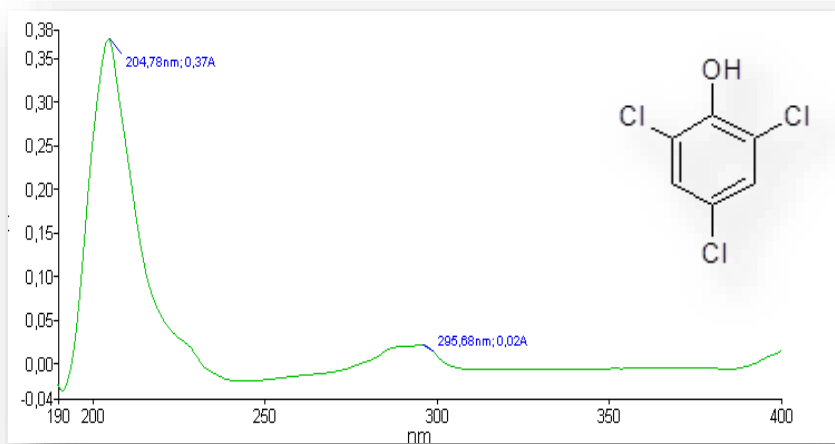


Fig. 15. Espectre de TCP

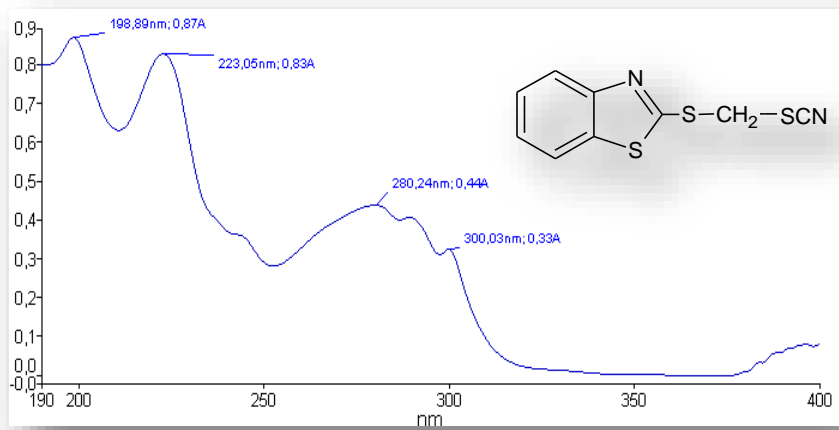


Fig. 16. Espectre UV de TCMTB

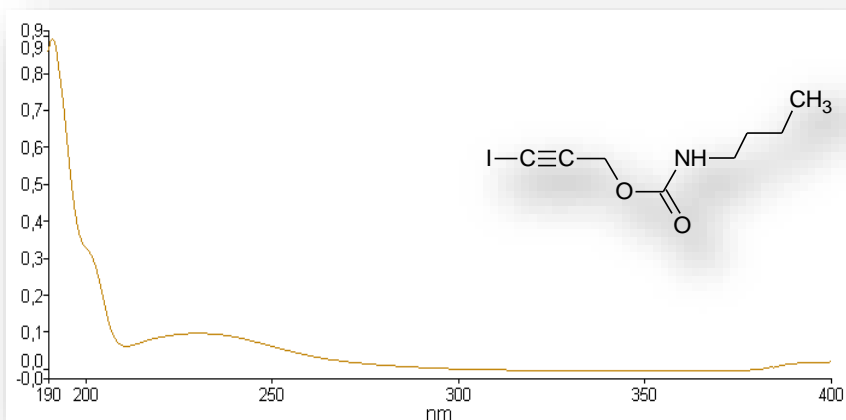


Fig. 17. Espectre de IPBC

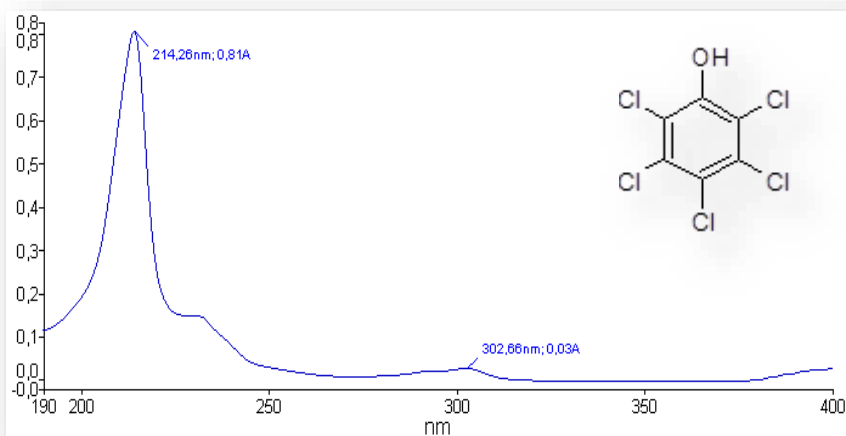


Fig. 18. Espectre de PCP

A la *Taula 14* s'han destacat els màxims (o màxim) d'absorció obtinguts, per ordre d'intensitat, per a cada fungicida. S'han representat els valors d'absortivitat molar per a cada màxim, ja que és una constant característica de cada substància a una longitud d'ona determinada.

L'absortivitat molar (ϵ) prové de la Llei de Beer que relaciona l'absorbància (A) d'un analit i la seva concentració (c) mitjançant l'expressió $A = \epsilon bc$, essent b l'amplada de la cubeta de mesura (1 cm).

Com més gran és el valor de l'absortivitat major és la seva sensibilitat a aquella longitud d'ona.

Fungicides	Màxims d'absorció UV (per ordre descendent d'intensitat)			Absortivitat molar, ϵ ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	
PCMC	197,1 nm	228,1 nm		$\epsilon_{197}: 6,84 \cdot 10^4$	$\epsilon_{228}: 1,14 \cdot 10^4$
OPP	200,0 nm		243,0 nm	$\epsilon_{201}: 2,52 \cdot 10^4$	$\epsilon_{243}: 5,96 \cdot 10^3$
OIT	279,5 nm			$\epsilon_{279}: 5,97 \cdot 10^3$	
IPBC	193,4 nm			$\epsilon_{193}: 4,41 \cdot 10^3$	
TCMTB	198,9 nm	223,1 nm	280,2 nm	$\epsilon_{223}: 2,83 \cdot 10^4$	$\epsilon_{280}: 1,50 \cdot 10^4$
MBT	325,4 nm	201,5 nm	228,7 nm	$\epsilon_{324}: 3,34 \cdot 10^4$	
TCP	204,8 nm			$\epsilon_{204}: 2,44 \cdot 10^4$	
PCP	214,3 nm			$\epsilon_{214}: 1,20 \cdot 10^5$	

Taula 14. Màxims d'absorció i absortivitats dels fungicides estudiats

El criteri per seleccionar la longitud d'ona òptima en el detector de fotodíodes, no ha estat només el valor de l'absortivitat (un valor alt indica més sensibilitat a aquella longitud d'ona). Hi ha una altra característica: la forma del pic d'absorció.

Un pic d'absorció molt estret pot suposar un augment de la dispersió en la lectura de la concentració o resposta cromatogràfica, si hi ha petits desplaçaments del màxim d'absorció obtingut respecte a la longitud d'ona de referència. En canvi, amb un pic d'absorció més ample o més suau, la dispersió en les lectures o respostes queden minimitzades o anul·lades al romandre constant l'absorbància en un interval més ampli al voltant de la longitud d'ona de referència (veure la *Fig. 19*).

Aquests detalls són tinguts en compte en l'estudi de la validació del mètode. Després de valorar els resultats es decidirà quina longitud d'ona serà l'òptima per a cada substància, en el cas d'haver-ne dues o més a estudi.

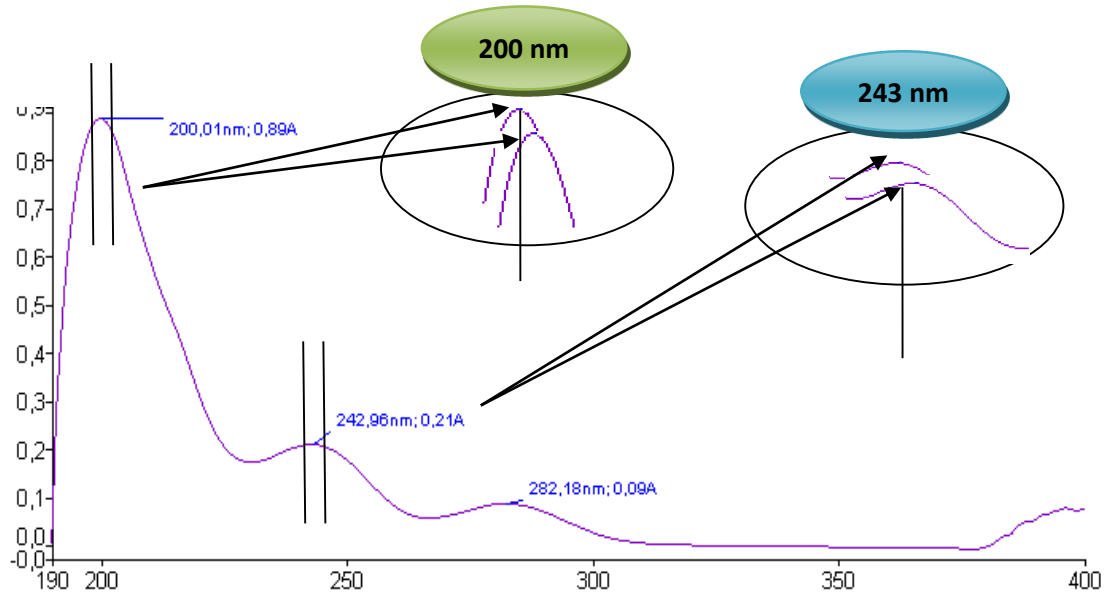


Fig. 19. A la figura es pot observar la dispersió en les lectures d'absorbàncies en un pic estret i en un pic ample. En el primer, un petit desplaçament del pic pot suposar una dispersió important, mentre que en un pic ample la variació és mínima.

Capítol 3. Validació del mètode d'anàlisi de fungicides en pell

3.1. Criteris de validació d'un mètode analític

Per a la validació del mètode s'ha seguit la metodologia de la *Asociación Española de Farmacéuticos de Industria* (A.E.F.I. (Asociación Española de Farmacéuticos de Industria). 2001).

Encara que aquest mètode permet analitzar simultàniament els 8 fungicides en una única injecció cromatogràfica, la validació s'ha hagut de preparar independentment per a cada un dels fungicides: el calibratge, les recuperacions i el límit de detecció.

En el cas del fungicida PCP, s'ha preparat el calibratge però no s'ha estudiat la seva recuperació, ja que, com es menciona en capítols anteriors, és un fungicida prohibit a la Comunitat Europea. i no és gens probable trobar-lo en mostres aquoses provinents del procés de la pell.

El mateix criteri s'ha optat pel TCP que, encara que no està prohibit, està inclòs en algunes llistes de substàncies restringides (Castell 2011) (ECCO 2014), raó per la qual no és un fungicida d'ús habitual.

Els criteris fonamentals de la validació comprenen els següents conceptes: selectivitat, linealitat i rang, precisió, exactitud i límit de detecció. Es comentem a continuació.

3.2. Definicions

Validació: és verificar documentalment que un mètode o procediment analític conduirà, amb un alt grau de seguretat, a l'obtenció de resultats precisos i exactes.

Selectivitat: és la capacitat d'un mètode analític per identificar separadament els analits d'interès.

Linealitat: és la capacitat del mètode per oferir resultats directament proporcionals a la concentració de l'analit dins un rang establert.

Rang: interval de concentracions per les quals és vàlid el mètode.

Precisió: és la capacitat d'un mètode per proporcionar resultats pròxims entre sí. La precisió d'un mètode s'expressa generalment com el coeficient de variació (CV):

$$CV (\%) = \frac{s}{x} \cdot 100$$

essent s la desviació estàndard i x la mitja aritmètica dels resultats.

Estan relacionats els conceptes de repetibilitat i reproductibilitat.

Repetibilitat: estudia la variabilitat del mètode efectuant una sèrie d'anàlisis sobre la mateixa mostra en les mateixes condicions operatives (mateix analista, mateixos aparells i reactius).

Reproductibilitat: estudia la variabilitat del mètode efectuant una sèrie d'anàlisis sobre la mateixa mostra però en condicions operatives diferents (diferents analistes, aparells i dies).

Exactitud: expressa la proximitat entre el valor vertader i el valor trobat experimentalment.

Límit de detecció: es defineix com la quantitat mínima d'analit que pot ser detectat (no necessàriament quantificat amb precisió i exactitud).

Incertesa: estimació que caracteritza l'interval on se situa, generalment amb una alta probabilitat, el valor verdader d'una mesura (UNE-EN 30012-1, 3.7)

3.3. Selectivitat

La selectivitat ha estat àmpliament argumentada al capítol 2, a l'apartat 2.3.3 dedicat a la detecció PDA. En aquest apartat s'argumenta la selectivitat del mètode cromatogràfic tenint en compte dos paràmetres: el temps de retenció i l'espectre ultraviolat per a cada substància.

La selectivitat és una característica del mètode d'anàlisi que s'ha de determinar en l'etapa de posta a punt del mètode per tal de conèixer en quin grau la resposta obtinguda és deguda a l'analit estudiat.

3.4. Linealitat i rang. Calibratge

L'estudi de la linealitat i rang s'utilitzarà per a obtenir la recta de calibratge.

Per a cada fungicida s'han preparat, per duplicat, 5 patrons de concentracions diferents.

L'interval de concentracions de patrons (rang) ha estat dissenyat en funció de la quantitat de fungicida que es podria trobar a la pell,

- bé per dades bibliogràfiques,
- bé per resultats obtinguts recentment, per algun dels fungicides, en estudis sobre MIC (mínima concentració d'inhibició) duts a terme pel CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Cuadros et al. 2013).
- En el cas de l'IPBC es va fer una suposició, a l'espera de dades reals d'aplicació en pells.

A partir de les dades orientatives de concentració en pell d'alguns fungicides s'ha dissenyat un calibratge per un interval ampli de concentracions.

Així, a la taula següent s'exposen, a la primera columna, els intervals de concentracions amb què s'ha realitzat el calibratge, i a la segona columna es pot veure el rang de concentracions que equivaldria si es trobés present en una mostra de pell, efectuant l'extracció en les condicions de la norma ISO 13365.

Fungicida	Interval de concentracions de patrons (rang)	Concentració a la pell
PCMC	2,6 - 47 mg/L	52 - 940 mg/kg
OPP	2,4 - 35 mg/L	48 - 700 mg/kg
OIT	1,2 - 37 mg/L	24 - 740 mg/kg
IPBC	7 - 45 mg/L	140 - 900 mg/kg
TCMTB	1,3 - 22 mg/L	28 - 460 mg/kg
MBT	0,58 - 18 mg/L	12 - 380 mg/kg
TCP	5,4 - 39 mg/L	108 - 780 mg/kg
PCP	3,6 - 26 mg/L	72 - 520 mg/kg

Taula 15. Rang dels calibratges i rang equivalent a la pell

A la Taula 16 es poden consultar les corbes de calibratge obtingudes per a cada un dels fungicides, a partir de 5 patrons duplicats, i el coeficient de correlació obtingut pel conjunt integrat pels 10 patrons totals, a les longitud d'ona principals.

Pel PCMC i l'OPP, l'estudi a la longitud d'ona principal de 197 i 200 nm, respectivament, s'ha simplificat a 201 nm per ambdós fungicides.

A la següent taula es representen els resultats les rectes de calibratge. Com a mesura de la bondat de l'ajust s'ha determinat, per a cada un dels fungicides:

- el coeficient de determinació (R^2)
- el contrast F de l'anàlisi ANOVA, verificant-se que el valor crític de F obtingut a la taula ANOVA és molt inferior al valor F. O el que és equivalent, el valor $F_{exp} > F_{taules}$. Els detalls dels càlculs es poden consultar a l'annex 1.

Analit	Longitud d'ona (nm)	Rang (mg/L)	Equació calibratge	Coefficient de determinació (R^2)	ANOVA (contrast F)
PCMC	201	2,6- 47	$y = 137214x + 84683$	0,9991	$F_{exp} > F_t$
PCMC	228	2,6- 47	$y = 33870x + 5390$	0,9996	$F_{exp} > F_t$
OPP	201	2,4 - 35	$y = 90553x + 5264$	0,9997	$F_{exp} > F_t$
OPP	246	2,4 - 35	$y = 24247x + 559,5$	0,9994	$F_{exp} > F_t$
OIT	279	1,2 - 37	$y = 21819x + 3955$	0,9993	$F_{exp} > F_t$
IPBC	193	7 - 45	$y = 10473x + 999$	0,9992	$F_{exp} > F_t$
TCMTB	223	1,3 - 22	$y = 51749x + 2336$	0,9998	$F_{exp} > F_t$
MBT	324	0,6 - 18	$y = 107886x + 1373$	0,9999	$F_{exp} > F_t$
TCP	203	5,4 - 39	$y = 138979x + 68476$	0,9992	$F_{exp} > F_t$
PCP	214	3,6 - 26	$y = 159718x + 72119$	0,9990	$F_{exp} > F_t$

Taula 16. Equacions de calibratge i estudi linealitat

3.5. Precisió

Per analitzar la precisió de mètode, s'han realitzat dos tipus d'estudis: repetibilitat i reproductibilitat (definicions a l'apartat 3.2).

La mostra problema s'ha preparat agafant una superfície equivalent en 10 falde de pell bovina, de la mateixa zona. A continuació s'ha desfibrat i homogeneïtzat detingudament.

Les 10 falde de pell bovina són d'adobatge vegetal, i se'ls han aplicat els fungicides en el procés de greixatge. S'ha aprofitat un procés estàndard de fàbrica, per la qual cosa aquest estudi s'ha realitzat només pels fungicides TCMTB, OPP i PCMC. Després d'assecar la pell durant 48 hores en condicions ambientals controlades ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ i $40 \pm 4\%$ d'humitat relativa), s'ha desfibrat segons ISO 4044, obtenint-se una mostra de pell en pols homogènia, i representativa d'un lot de 10 falde.

- **Estudi de repetibilitat.** S'ha analitzat el contingut en fungicides seguint el mètode ISO 13365, repetint l'anàlisi 8 vegades de forma consecutiva. De la sèrie de resultats es calcula el coeficient de variació (CV).
- **Estudi de reproductibilitat.** S'estudiarà la variabilitat del mètode efectuant l'anàlisi amb 3 analistes diferents, i en temps d'assaig transcorreguts diferents (dies diferents). L'anàlisi es fa per duplicat, i cada analista el realitza amb un interval de temps, respecte a l'anterior, de 20 dies.

3.5.1. Estudi de repetibilitat

Fungicides	Mitjana (mg/kg s.m.r.)	Desviació estàndard (s)	% CV
PCMC (201 nm)	633	$\pm 7,67$	$\pm 1,21$
PCMC (228 nm)	687	$\pm 4,03$	$\pm 0,59$
OPP (201 nm)	473	$\pm 18,0$	$\pm 3,80$
OPP (246 nm)	482	$\pm 7,16$	$\pm 1,48$
TCMTB (223 nm)	248	$\pm 2,36$	$\pm 0,95$

Taula 17. Estudi repetibilitat: mitjanes, desviacions estàndard i CV

Pel PCMC la menor dispersió de resultats s'ha obtingut a 228 nm, i per l' OPP a 246 nm, malgrat ser més sensible la resposta a 201 nm per ambdós fungicides.

Quan s'ha parlat amb anterioritat de sensibilitat, s'ha fet en termes d'absortivitats (Taula 14). A les següents taules es pot constatar la major sensibilitat obtinguda a 201 nm en termes de resposta cromatogràfica, és a dir, per les àrees dels pics obtinguts, dels patrons més baixos del calibratge.

mg/L PCMC en ACN	Àrees 201 nm	Àrees 228 nm
2,62	405714	92118
3,07	499929	114824

Taula 18. Comparació d'àrees obtingudes a 201 nm i 228 nm, pel PCMC

mg/L OPP en H ₂ O	Àrees 201 nm	Àrees 246 nm
2,41	226499	59389
2,39	224615	59089

Taula 19. Comparació d'àrees obtingudes a 201 nm i 246 nm, per l'OPP

La major dispersió obtinguda a 201 nm es pot explicar pel fet que al voltant d'aquesta longitud d'ona moltes substàncies orgàniques tenen absorció, de manera que petites quantitats de restes orgàniques extretes de la pell estarien distorsionant la resposta cromatogràfica (Allinger, Cava i Jongh 1988).

De totes maneres, els CV obtinguts són inferiors al 3,8%. Treballs consultats a la literatura han obtingut valors típics de CV al voltant del 5% (Higashi i Fujii 2009), i en l'àmbit farmacèutic inferiors al 2% (A.E.F.I. 2001).

S'ha consultat a la literatura els valors obtinguts en altres treballs, realitzats també per HPLC-PDA, trobant fluctuacions en els CV en alguns casos superiors al 5 %, depenent de les característiques de la mostra i tipus d'extracció. En qualsevol cas, s'han trobat valors típics inferiors al 5% de CV (Higashi i Fujii 2009).

Per tant aquestes longituds d'ona, 228 nm pel PCMC i 246 nm pel OPP, sembla que poden ser les òptimes pel treball d'anàlisi de rutina, sempre que es treballi en concentracions a la pell que corresponguin a l'interval del calibratge (Taula 16). En

canvi, si en alguna anàlisi es necessités tenir més sensibilitat, tot i perdent en precisió, es pot recórrer a treballar a 201 nm.

Però encara hi ha un punt a tractar. Es tracta de saber quin valor dels obtinguts per a cada longitud d'ona és el correcte. Aquesta part es tractarà en l'estudi sobre l'exactitud, a l'apartat 3.6.

A continuació s'estudiarà un altre paràmetre de la precisió, la reproductibilitat.

3.5.2. Estudi de reproductibilitat. Estudi global

Estudi de reproductibilitat (analistes diferents, dies diferents)			
Fungicides	Mitjana (mg/kg s.m.r.)	Desviació estàndard (s)	% CV
PCMC (201 nm)	645	± 23,4	± 3,63
PCMC (228 nm)	672	± 29,0	± 4,31
OPP (201 nm)	466	± 18,5	± 3,98
OPP (246 nm)	470	± 20,0	± 4,24
TCMTB (223 nm)	239,3	± 9,82	± 4,10

Taula 20. Estudi reproductibilitat global: mitjanes, desviacions estàndard i CV

En l'estudi de reproductibilitat, els CV se situen al voltant del 4,5%. Existeix per tant, una clara influència dels factors que s'han variat respecte a la repetibilitat, però no es coneix en quin grau ha influït cada un. Recordem que els factors han estat:

- Analistes diferents
- Anàlisis efectuats en dies diferents, amb un interval de 20 dies. Per tant aquí hi ha inclòs un factor d'estabilitat o conservació de la mostra.

Precisament per tenir més dades sobre l'estabilitat o conservació de la mostra, s'han presentat els diferents resultats per dies.

3.5.3. Estudi de reproductibilitat. Resultats per dies i per analista

PCMC (201 nm)	Dia 1 – Analista 1	Dia 20 – Analista 2	Dia 40 – Analista 3
Mitjana (mg/kg s.m.r.)	633	666	640
% CV	± 1,21	± 3,39	± 4,02
PCMC (228 nm)	Dia 1 – Analista 1	Dia 20 – Analista 2	Dia 40 – Analista 3
Mitjana (mg/kg s.m.r.)	686	683	647
% CV	± 0,60	± 0,70	± 6,46

Taula 21. Estudi de reproductibilitat pel PCMC. Anàlisi per dies i analista

OPP (201 nm)	Dia 1 – Analista 1	Dia 20 – Analista 2	Dia 40 – Analista 3
Mitjana (mg/kg s.m.r.)	460	481	457
% CV	± 3,53	± 1,32	± 4,94
OPP (246 nm)	Dia 1 – Analista 1	Dia 20 – Analista 2	Dia 40 – Analista 3
Mitjana (mg/kg s.m.r.)	478	480	452
% CV	± 0,68	± 0,68	± 6,24

Taula 22. Estudi de reproductibilitat per l'OPP. Anàlisi per dies i analista

TCMTB (223 nm)	Dia 1 – Analista 1	Dia 20 – Analista 2	Dia 40 – Analista 3
Mitjana (mg/kg s.m.r.)	247	244	233
% CV	± 0,84	± 0,80	± 4,23

Taula 23. Estudi de reproductibilitat pel TCMTB. Anàlisi per dies i analista

En termes generals, amb una excepció pel PCMC a 201 nm, hi ha una disminució del contingut en qualsevol dels fungicides al llarg del temps, cosa que explicaria els elevats valors de CV de l'estudi de reproductibilitat global, respecte als de l'estudi de repetibilitat.

Aquesta dada és molt interessant des del punt de vista de la prioritat en la realització d'aquest tipus d'anàlisi, així com per tenir en compte en estudis paral·lels que s'estan duent a terme a l'EEl sobre fungicides, i com a aportació en la investigació del Projecte del Plan Nacional I+D+I sobre fungicides. En aquest estudi es torna a posar en evidència un punt important a tenir en compte, ja comentat: saber quin resultat dels obtinguts per a cada longitud d'ona és més fiable. Aquesta part s'estudia al següent apartat.

3.6. Exactitud

Per poder efectuar l'estudi de l'exactitud del mètode, necessitaríem disposar de mostres de pell de les quals sabéssim la concentració real de fungicides. Això no és possible des de dos punts de vista:

- En el moment en què es realitzava aquesta tesi no existia un mètode validat (encara) que proporcionés un resultat fiable del contingut real de fungicides en mostres de pell.
- No es poden “fabricar” mostres de concentració coneguda, ja que no hi ha cap fórmula que permeti saber quina fracció o percentatge de la quantitat de fungicida afegit inicialment, és absorbida per la pell. En aquesta línia, cal mencionar la diferent distribució dels fungicides al llarg de la seva secció: segons Hauber i Germann (1997) en una pell bovina la capa flor conté un 60-70%, la capa intermitja un 10-20% i la capa carn pot absorbir un 25-30% de fungicida.

Així doncs, al no poder disposar de mostres de pell amb un contingut real de fungicides, per poder avaluar l'exactitud del mètode s'ha de recórrer al mètode de l'adició de patró. És a dir, sobre una matriu de pols de pell sense fungicides, s'han afegit quantitats conegudes de patrons de cada un dels fungicides, a dos nivells de concentració diferents.

Es va partir d'una pell wet-blue adobada al laboratori i sense aplicar fungicides. Una vegada assecada (en condicions ambientals controlades: $23 \pm 2^\circ\text{C}$ i $40 \pm 4\%$ d'humitat relativa) i desfibrada es va analitzar per verificar l'absència de fungicides, abans de començar l'estudi de recuperació.

PCMC a 201 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana recup. (%)	s	CV (%)
Nivell alt	653	644	98,6	98,4	$\pm 1,07$	$\pm 1,09$
	646	628	97,2			
	621	566	99,3			
Nivell baix	73,2	66,6	91,0	91,0	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$
	78,0	71,0	91,0			
	79,0	71,9	91,0			

Taula 24. Recuperacions per PCMC a 201 nm

PCMC a 228 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana recup. (%)	s	CV (%)
Nivell alt	653	630	96,4	96,2	± 0,24	± 0,25
	646	621	96,0			
	621	419	96,0			
Nivell baix	73,2	68,5	93,6	93,2	± 0,42	± 0,45
	78,0	72,6	93,2			
	79,0	73,3	92,8			

Taula 25. Recuperacions per PCMC a 228 nm

OPP a 201 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana recup. (%)	s	CV (%)
Nivell alt	469	451	96,1	96,1	± 0,72	± 0,75
	466	451	96,8			
	447	427	95,4			
Nivell baix	54,3	50,4	92,8	92,2	± 0,77	± 0,84
	56,0	51,8	92,5			
	57,0	52,1	91,3			

Taula 26. Recuperacions per OPP a 201 nm

OPP a 246 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana (%)	s	CV (%)
Nivell alt	469,17	448,80	95,7	96,1	± 0,38	± 0,39
	465,63	448,82	96,4			
	447,14	430,09	96,2			
Nivell baix	54,27	51,62	95,1	94,9	± 0,24	± 0,25
	55,98	53,16	95,0			
	57,03	53,97	94,6			

Taula 27. Recuperacions per OPP a 246 nm

OIT a 279 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana recup. (%)	s	CV (%)
Nivell alt	382	330	86,5	91,1	± 4,16	± 4,57
	327	310	94,6			
	368	340	92,2			
Nivell baix	27,1	22,7	83,9	84,1	± 1,42	± 1,68
	30,3	25,1	82,7			
	30,8	26,3	85,5			

Taula 28. Recuperacions per OIT a 279 nm

IPBC a 193.4 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana recup. (%)	s	CV (%)
Nivell alt	292	248	85,0	88,3	± 3,04	± 3,45
	282	250	88,7			
	280	255	91,1			
Nivell baix	136	126	92,3	97,8	± 4,92	± 5,03
	140	139	99,4			
	134	136	101			

Taula 29. Recuperacions per IPBC a 193 nm

TCMTB a 223 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana (%)	s	CV (%)
Nivell alt	296	295	99,7	98,8	± 0,55	± 0,56
	307	303	98,8			
	303	298	98,4			
	310	305	98,6			
	295	290	98,4			
Nivell baix	30,0	29,1	97,0	93,6	± 4,79	± 5,11
	29,1	26,3	90,3			
	31,2	26,7	85,7			

Taula 30. Recuperacions per TCMTB a 223 nm

El rang pel qual està comprovada la linealitat de la recta de calibratge està comprès entre 28 i 460 mg/kg en pell, pel TCMTB. En la recuperació del nivell baix, dos dels tres replicats estan per sota d'aquest rang. Tot i que en el següent apartat es valorarà

el límit de detecció, quan els valors freguen o estan propers al límit de detecció la dispersió dels resultats és superior als valors en concentracions superiors.

MBT a 324 nm	Conc. Teòrica (mg/kg)	Conc. Trobada (mg/kg)	Recuperació (%)	Mitjana	s	CV (%)
Nivell alt	205,39	178,27	86,8	88,2	± 1,37	± 1,56
	253,80	223,96	88,2			
	209,84	187,90	89,5			
Nivell baix	16,42	14,58	88,8	87,8	± 1,61	± 1,84
	22,20	19,68	88,7			
	18,05	15,51	85,9			

Taula 31. Recuperacions per MBT a 324 nm

A continuació es presenta un resum de les recuperacions globals obtingudes, agrupant els nivells alt i baix:

Recuperacions obtingudes			
Fungicides	Mitjana Recuperació (%)	Desviació estàndard (s)	% CV
PCMC a 201 nm	95	± 4,1	± 4,3
PCMC a 228 nm	95	± 1,6	± 1,7
OPP a 201 nm	94	± 2,2	± 2,4
OPP a 246 nm	96	± 0,7	± 0,80
OIT a 279 nm	88	± 4,8	± 5,4
IPBC a 193.4 nm	93	± 6,4	± 6,9
TCMTB a 223 nm	96	± 0,87	± 0,90
MBT a 324 nm	88	± 1,4	± 1,6

Taula 32. Resum de recuperacions obtingudes

Comparant els resultats obtinguts amb treballs de la literatura, tal com s'ha fet per la repetibilitat, s'han trobat valors de recuperació habituals entre 85 i 105 % (Bourgin et al. 2009; Sheng-shan et al. 2010). La AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) accepta un interval entre 80-110% de recuperació pel rang de concentracions d'analit (AOAC International 2012). En aquest estudi les recuperacions han oscil·lat entre 88 i 96 %. Per tant les recuperacions obtingudes són molt satisfactòries.

Cal destacar l'alta dispersió obtinguda pel fungicida IPBC. El fet d'haver d'efectuar la quantificació a una longitud d'ona bastant inespecífica com és la zona entre 190 i 200 nm, tal com s'ha comentat amb anterioritat, explicaria aquests valors.

A l'apartat anterior es plantejava el dubte de amb quina longitud d'ona s'obtenen els resultats més fiables, pels fungicides PCMC i OPP.

Els resultats obtinguts en aquest estudi de recuperació estan d'acord amb els obtinguts en l'estudi de repetibilitat. Els resultats de la reproductibilitat els hem de valorar apart, ja que s'ha vist un possible deteriorament dels analits.

Per tant, a la següent taula es presenten les longituds d'ona de treball per l'anàlisi de rutina, per a cada fungicida. Això sense descartar la possibilitat, com s'ha comentat en apartats anteriors, de decidir treballar amb la longitud d'ona alternativa en cas de necessitar més sensibilitat.

Fungicida	Longitud d'ona de treball
PCMC	228 nm
OPP	246 nm
OIT	279 nm
IPBC	193 nm
TCMTB	223 nm
MBT	324 nm
TCP	203 nm
PCP	214 nm

Taula 33. Longituds d'ona de treball, en anàlisi de rutina

3.7. Límit de detecció (LD)

El límit de detecció es pot entendre segons la International Union of Pure and Applied Chemists (IUPAC) [20], com la mesura més petita d'una resposta Y_L (absorbància, àrea o alçada d'un pic) que pot ser detectada amb una certesa raonable en un procediment analític. L'expressió matemàtica és la següent:

$$Y_L = Y_B + 3 \cdot S_{n-1}, \text{ essent}$$

Y_B = la mitjana de les mesures de blancs

S_{n-1} = desviació estàndard de les mesures dels blancs

No obstant, en anàlisi instrumental, es pot establir de forma teòrica el límit de detecció a partir de la relació senyal/soroll (s/n), com aquella relació que proporcioni un senyal 3 vegades superior a la del soroll [21], és a dir:

$$L_D = \text{conc} \cdot 3/s,n$$

On:

Conc = és la concentració de l'analit a la que s'obté el senyal respecte al soroll

s,n = és la relació senyal/soroll obtinguda per a una concentració donada d'analit

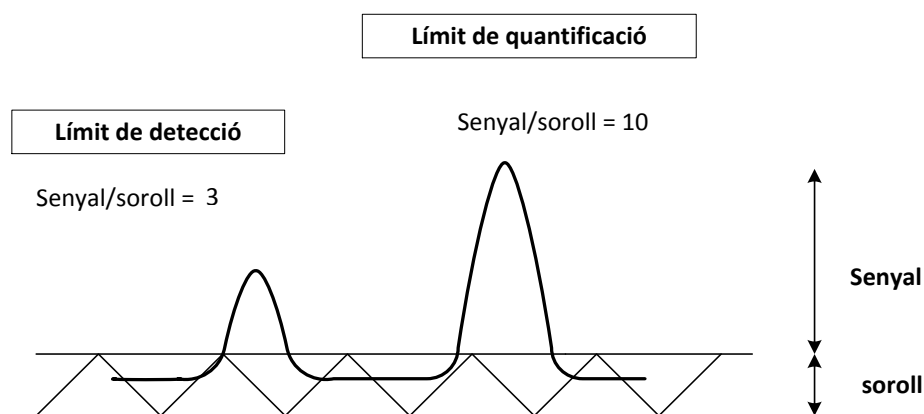


Fig. 20. Representació gràfica de la relació senyal/soroll

Així, per a cada un dels fungicides, s'ha calculat el límit de detecció per a una longitud d'ona determinada i per a un volum d'injecció de 20 μL . Amb fons blau es destaquen els límits de detecció a 275 nm, que és la longitud d'ona recomanada a la norma ISO 13365.

Com era d'esperar, els límits de detecció milloren a les longituds d'ona corresponents als màxims d'absorció per a cada fungicida, amb l'excepció del TCMTB.

Fungicida	Límits de detecció (mg/kg)	Fungicida	Límits de detecció (mg/kg)
PCMC 197.0 nm	0,71	IPBC 193,5 nm	17
PCMC 201. nm	1,3	IPBC 275 nm	91
PCMC 228 nm	2,0	TCMTB 223 nm	1,7
PCMC 275 nm	3,4	TCMTB 275 nm	1,2
OPP 201 nm	2,2	MBT 324 nm	0,06
OPP 246 nm	1,7	MBT 275 nm	1,2
OPP 275 nm	3,4	TCP 203 nm	1,7
OIT 279 nm	0,46	TCP 275 nm	3,80
OIT 275 nm	0,87	PCP 214 nm	0,39
		PCP 275 nm	11

Taula 34. Límits de detecció per a cada longitud d'ona

El LD és un paràmetre que depèn, com s'ha mencionat, de la relació entre la resposta de l'anàlit i la del soroll. En el cas del TCMTB s'ha pogut comprovar que el senyal del soroll és superior a 223 nm que a 275 nm, la qual cosa repercuteix en una relació senyal/soroll més petita a 223 nm que a 275 nm, tot i obtenint-se més resposta a aquella longitud d'ona.

L'augment del soroll a 223 nm s'explica pel fet que en les proximitats dels 200 nm de l'ultraviolat moltes substàncies orgàniques (en aquest cas provinents de l'extracció de la pell) presenten absorció, la qual cosa contribuirien a obtenir una línia de base més inestable. Aquest efecte es redueix en la mesura que la detecció es fa a longituds d'ona més llargues, com per exemple a 275 nm.

De totes maneres aquest paràmetre (el LD) no és l'únic criteri decisor, ja que, com s'ha vist en els estudis anteriors, s'ha de tenir en compte la precisió i l'exactitud per a cada longitud d'ona.

3.8. Càlcul de la incertesa del mètode

3.8.1. Introducció

En aquest apartat no s'entrarà al detall sobre consideracions estadístiques, ja que escaparia de l'abast d'aquest treball. S'exposen només d'una manera simple els conceptes emprats.

La incertesa és un valor estimat que acompanya un resultat analític, i que expressa l'interval de valors on se situa el valor verdader (UNE-ISO-3534-1 2013).

Resultat \pm Incertesa

És un paràmetre que proporciona una idea del grau de confiança dels resultats, és a dir, que reflexa quant pot allunyar-se un resultat analític del valor considerat verdader (Maroto et al. 2000).

Una mesura acompanyada del valor de la incertesa aporta una informació més realista (veure Fig. 22).

A les figures següents es pot veure les formes d'expressar un resultat analític.

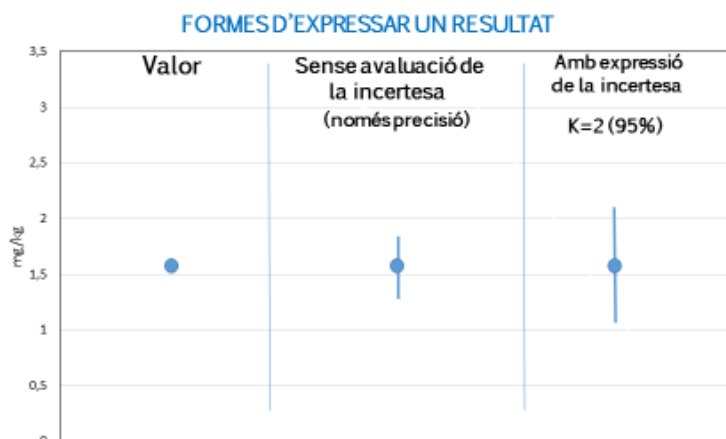


Fig. 21. Formes d'expressar un resultat (Valverde 2009)



Fig. 22. Un resultat amb i sense mesura de la incertesa (Valverde 2009).

3.8.2. Components de la incertesa

La incertesa d'un resultat analític consta generalment de diverses components, cada una associada a una font d'origen. Per exemple, diferents fonts que podrien aportar (o aporten) incertesa serien:

- una suposició imprecisa de la forma exacta de l'analít que es determina,
- un mostreig poc representatiu de l'analít a la mostra,

- una extracció incompleta,
- els efectes de la matriu,
- una contaminació de la mostra,
- desviacions en la lectura d'instruments analògics (biaix segons analista),
- i altres.

Es podria prendre cada font d'incertesa i tractar-la de forma separada, de manera que cada contribució individual correspondria a una component de la incertesa. L'expressió com a desviació estàndard de cada component es coneix com a **incertesa estàndard (u)**.

Es recorda que:

- L'expressió d'una incertesa (u) té la fórmula general:

($u = \frac{s}{\sqrt{n}}$), essent s la desviació estàndard i n el número de dades considerades.

És freqüent, però, avaluar l'efecte combinat de diverses components, la qual cosa redueix l'esforç involucrat. Per exemple en un procés analític sempre tindrem dos components de la incertesa inherents a les característiques del propi mètode, com són:

- associada a la precisió del mètode (u_{proc})
- associada a l'exactitud ($u_{traçabilitat}$)

Es coneix com a **incertesa estàndard combinada (U_{comb})** l'arrel quadrada de la suma dels quadrats de cada una de les components:

$$U_{comb} = \sqrt{u_{proc}^2 + u_{traç}^2 + u_{altres}^2} \quad \text{Equació 1}$$

Per a la majoria dels propòsits en química analítica, s'utilitza la **incertesa expandida (U_{exp} o simplement U)**.

$$U_{exp} = k \times \sqrt{u_{proc}^2 + u_{traç}^2 + u_{altres}^2} \quad \text{Equació 2}$$

Essent k = factor de cobertura.

La incertesa expandida proporciona un interval en el qual es creu es troba el valor real, amb un nivell de confiança particular. El valor del factor k dona el nivell de confiança.

Els valors típics de k es troben entre 2 i 3. Un valor de k=2 representa un interval amb un nivell de confiança del 95%, i k=3 un nivell del 99% (Jcgm 2008) (Alsina 2013).

3.8.3. Fórmules de càlcul emprades

Com que no es disposa de material de referència, el càlcul de la component de la incertesa associada a l'exactitud s'obté a partir de l'estudi de recuperacions. La fórmula és la següent:

$$u_{traç} = \frac{1}{R} x \sqrt{u(c_{tro})^2 + (c_{cor} * u(R))^2} \quad \text{Equació 3}$$

Essent R= recuperació en tant per u

La definició de recuperació (R) té la següent expressió, a partir de la qual es pot obtenir la concentració corregida:

$$R = \frac{Conc_{trobadada}}{Conc_{teòrica}} \quad \longrightarrow \quad Conc_{cor} = \frac{Conc_{tro}}{R}$$

$Conc_{tro}$ = concentració trobada a l'assaig de recuperació

$Conc_{cor}$ = concentració corregida, a partir del resultat de recuperació

En aquest cas, la component de l'exactitud U(traç) té en compte la incertesa de la precisió del mètode en obtenir les dades de recuperació U(c_{enc}), i també la incertesa o variabilitat en les dades pròpiament dites de recuperació U(R). Les fórmules són les següents:

Si la precisió no varia amb la concentració:

$$u(c_{tro}) = \frac{s_p}{\sqrt{N}}; \quad u(R) = \frac{s(R)}{\sqrt{n}}$$

Si la precisió varia amb la concentració:

$$u(c_{tro}) = \frac{s(R) * c_{cor}}{\sqrt{N}}; \quad u(R) = \frac{s(R)}{\sqrt{n}}$$

essent s_p la desviació estàndard de l'estudi de precisió (en tant per u), i **N** el número de rèpliques de les mostres de rutina.

Finalment s'aplicaran les equacions 1 i 2, ja presentades.

$$U_{comb} = \sqrt{u_{proc}^2 + u_{traç}^2 + u_{altres}^2} \quad U_{exp} = 2 x \sqrt{u_{proc}^2 + u_{traç}^2 + u_{altres}^2}$$

On $u_{proc} = \frac{s(R)}{\sqrt{N}}$, essent $s(R)$ la desviació estàndard de l'estudi de precisió, en condicions de reproductibilitat, expressada en tant per u (Alsina 2013).

3.8.4. Resultats

A la següent taula (*Taula 35*) s'exposen els valors de les incerteses obtingudes per a cada un dels fungicides. Es donen els valors de la incertesa expandida (U_{exp}) en %, i l'expressió en valor absolut sobre un resultat concret, per exemple 180 mg/kg.

Fungicida	Incertesa % U_{exp}	Exemple mg/kg	Incertesa (U_{exp})	Expressió
PCMC a 201 nm	15,9	180	29	180 ± 29
PCMC a 228 m	16,8	180	30	180 ± 30
OPP a 201 nm	14,8	180	27	180 ± 27
OPP a 246 nm	18,4	180	33	180 ± 33
OIT a 279 nm	11,8	180	21	180 ± 21
IPBC a 193.4 nm	7,4	180	13	180 ± 13
TCMTB a 223 nm	8,6	180	16	180 ± 16
MBT a 324 nm	14,2	180	26	180 ± 26

Taula 35. Estimació de la incertesa en l'anàlisi de fungicides en pell

3.8.5. Conclusions

Les incerteses obtingudes, com era d'esperar, són valors superiors als coeficients de variació obtinguts a l'estudi de precisió, ja que inclouen un interval amb un 95% de probabilitat de trobar el valor verdader. De totes maneres es troben en consonància amb aquells.

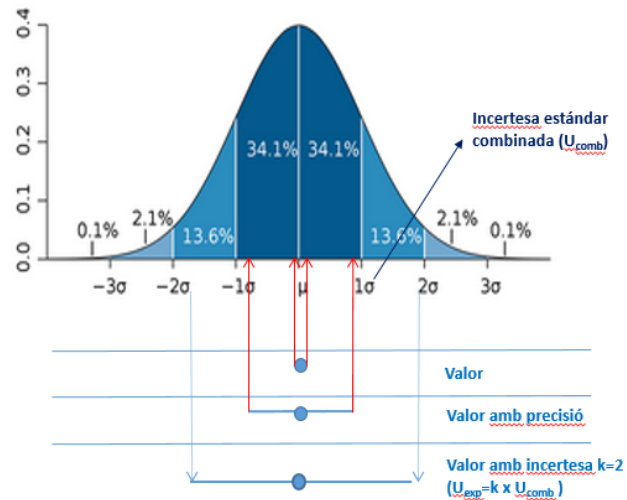


Fig. 23. Distribució normal dels resultats d'una mesura (Valverde 2009)



Resum paràmetres validació						
Fungicides	Rang	Linealitat (R ²)	% Mitjana Recup. - (%CV)	CV (%) repetibilitat	CV (%) reproductibilitat	% Uexp Incertesa
PCMC a 201 nm	52 - 940 mg/kg	0,9991	95 - (4,3)	1,2	3,6	15,9
PCMC a 228 nm	52 - 940 mg/kg	0,9996	95 - (1,7)	0,59	4,3	16,8
OPP a 201 nm	48 - 700 mg/kg	0,9997	94 - (2,4)	3,8	4,0	14,8
OPP a 246 nm	48 - 700 mg/kg	0,9994	96 - (0,80)	1,5	4,6	18,4
OIT a 279 nm	24 - 740 mg/kg	0,9993	88 - (5,4)	-	-	11,8
IPBC a 193.4 nm	140 - 900 mg/kg	0,9992	93 - (6,9)	-	-	7,4
TCMTB a 223 nm	28 - 460 mg/kg	0,9998	96 - (0,90)	0,95	4,1	8,6
MBT a 324 nm	12 - 380 mg/kg	0,9999	88 - (1,6)	-	-	14,2
TCP a 203 nm	108 - 780 mg/kg	0,9992	-	-	-	
PCP a 214 nm	72 - 520 mg/kg	0,9990	-	-	-	

Taula 36. Resum dels resultats obtinguts en l'estudi de validació

3.9. Anàlisi de mostres reals

A les següents taules es presenten els resultats de la determinació de fungicides que s'ha realitzat en unes 40 mostres comercials de diferents adobatges i orígens: Índia, Rússia, Alemanya i Espanya. A les mostres on no s'ha indicat és perquè es desconeixien aquestes dades.

Mostra (origen)	TCMTB (mg/kg)	PCMC (mg/kg)	OPP (mg/kg)	MBT (mg/kg)	OIT (mg/kg)
Alemanya (vacú crom), Reutlingen	145	22	140		
Alemanya (vacú crom), Reutlingen		66	200		121
Alemanya (vacú crom), Reutlingen		321	8		230
Cabra per confecció (Índia)	26	8			
Crust 1 (Vacú Rússia)	50	11			
Crust 2 (Vacú Rússia)	227				
Crust 3 (Vacú Rússia)	264	57			
Crust 4 (Vacú Rússia)	273				
Crust 5 (Vacú Rússia)	248				
Crust 6 (Vacú Rússia)	66				
Crust 7 (Vacú Rússia)	21				
Crust 8 (Vacú Rússia)	152				
Guants florits pell crom (Índia)	10				
Napa xai (Índia)		28			
Napalán xai (Espanya)	35				
Novillo wet-blue (Catalunya)	130			154	
Vacú acabat, adobatge wet-white (Igalada, Espanya)	171	48	15		44
Vacú crom acabat per marroquineria (Espanya)		193	284		
Vacú al crom per calçat (Igalada, Espanya)	14		39	4	
Vacú al crom readobat al vegetal	98				
Vacú crom crust	34	45	8		
Vacú crom crust		279	102		
Vacú vegetal prim	81				

Taula 37. Continguts de fungicides en mostres comercials (I)

Mostra (origen)	TCMTB (mg/kg)	PCMC (mg/kg)	OPP (mg/kg)	MBT (mg/kg)	OIT (mg/kg)
Vaquetilla acabada (Espanya)	12	148			
Vaquetilla per sandàlia 1,	248				
Vaquetilla per sandàlia 2,		687	482		
Vaquetilla	202	128	80		
Vegetal gruixut cavalleria	236				
Wet-blue	243				
Wet-blue	270				
Wet-blue 1	294				
Wet-blue 2	354				
Wet-blue (Espanya)	296			18	
Wet-blue II per llarga conservació	540				
Wet-blue llarga conservació	465				
Wet-blue llarga conservació	440				

Taula 38. Continguts de fungicides en mostres comercials (II)

Aquestes mostres no corresponen a cap investigació determinada. Simplement es presenten a mode d'escaneig dels tipus de fungicides utilitzats a la indústria adobera.

A la figura següent es pot comprovar que:

- El fungicida més àmpliament utilitzat és el TCMTB.
- A prop del 20% de les mostres combinen altres fungicides (PCMC-OPP-OIT) en substitució del TCMTB.
- Destaca que la mostra amb més baix contingut en fungicida trobat, correspon a una mostra que havia desenvolupat fongs.

CONTINGUT EN FUNGICIDES EN CUIRS COMERCIALS

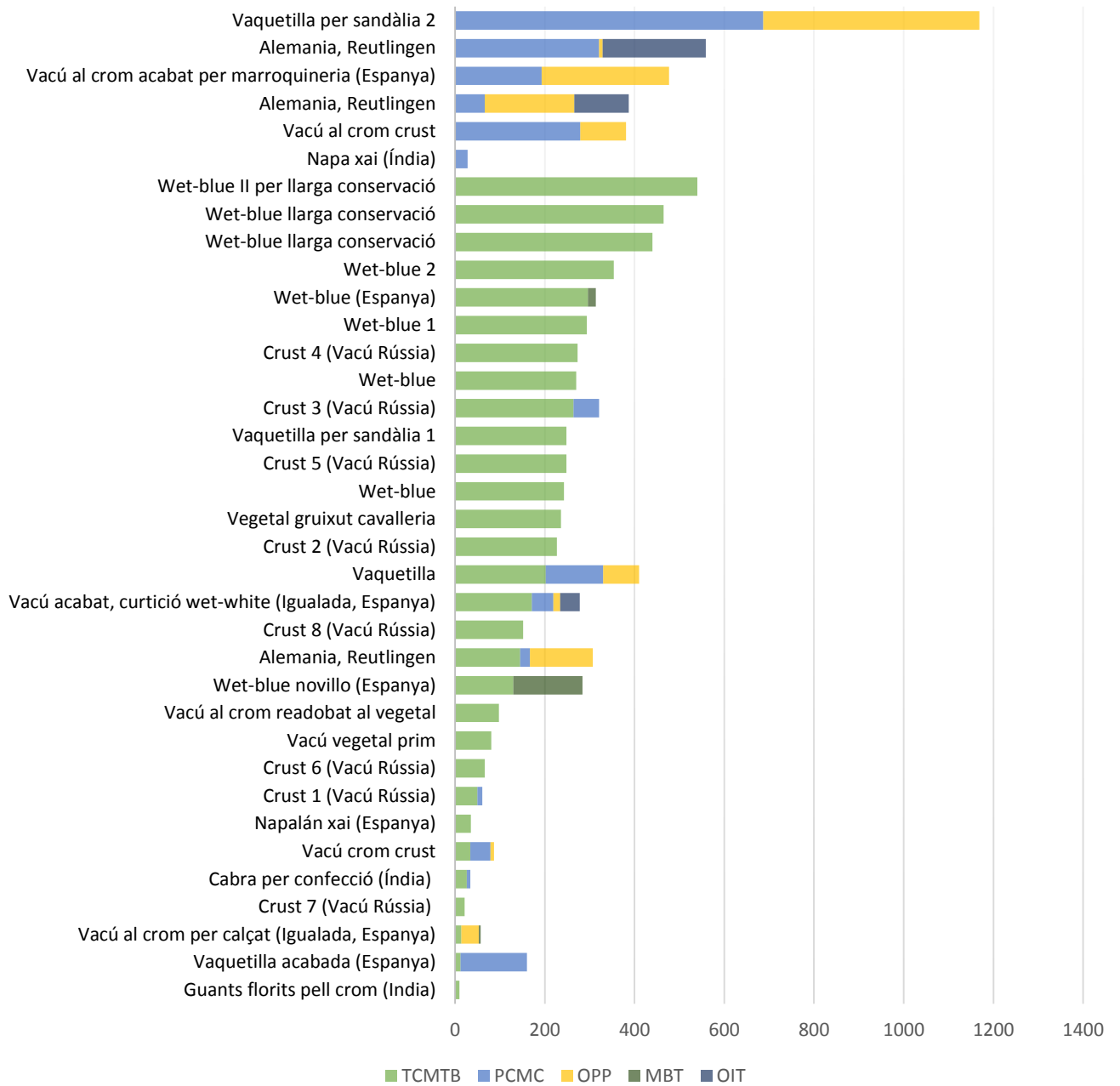


Fig. 24. Contingut en fungicides en cuirs comercials

3.10. Conclusions

1. S'ha aconseguit un dels objectius principals: posar a punt i validar un mètode d'anàlisi de fungicides en pell.

Tot i partir d'un mètode pendent d'aprovació com a norma ISO en el moment de l'elaboració de la Tesi,

2. S'ha millorat l'adquisició cromatogràfica per tal de poder analitzar simultàniament 4 fungicides més dels inclosos a la norma. Entre aquests s'ha inclòs un fungicida ja prohibit a Europa, però no en d'altres països, amb la qual cosa es disposa d'una eina de control al laboratori per detectar-lo.

3. També s'ha millorat l'especificitat del mètode i els límits de detecció establint una longitud d'ona més adequada per a cada tipus de molècula, enlloc d'una única com proposarà la norma ISO. Conseqüència d'això és que s'han incorporat a la base de dades del programa cromatogràfic els espectres UV de tots els fungicides.

4. El mètode s'ha validat. No es tenien dades sobre la validació del mètode, ja que es partia d'un document en estat *draft*.

L'estudi de repetibilitat i reproductibilitat, només s'ha realitzat en aquesta etapa del Treball, per a tres fungicides, ja que, per tal d'aconseguir mostres amb una uniformitat el més semblant possible a pells reals, l'aplicació es va fer en bombos de fàbrica i amb productes comercials contenint els tres fungicides. Això va limitar la disponibilitat de mostres pels altres fungicides, per qüestions tècniques. La resta de paràmetres de la validació, han sigut analitzats per a tots els fungicides. El resum dels resultats obtinguts es presenten a la Taula 36.

- A la segona columna es presenta el rang en el què és lineal el calibratge, expressat sobre el contingut de fungicida a la pell.
- A la tercera columna es mostren els coeficients de correlació (R^2) obtinguts en els respectius calibratges.
- A la quarta columna es poden veure les mitjanes del estudi de recuperació, amb els valors els coeficients de variació (CV) entre parèntesi. Els valors trobats oscil·len entre 88 i 96 %.
- A la cinquena i sisena columna es mostren els valors dels CV dels estudis de repetibilitat i reproductibilitat, respectivament. Són valors molt satisfactoris, inferiors en conjunt al 5%.

- La última columna mostra el valor de la incertesa del mètode analític per a cada un dels fungicides, obtinguda de l'estudi de validació.
5. A partir de l'estudi de reproductibilitat s'ha pogut obtenir informació sobre l'estabilitat dels fungicides sobre la pell, al llarg del temps.

En termes generals, amb l'excepció del PCMC a 201 nm, hi ha una disminució del contingut en qualsevol dels fungicides al llarg del temps. Aquesta dada és molt interessant des del punt de vista de la prioritat en la realització d'aquest tipus d'anàlisi, així com també es va tenir en compte en estudis paral·lels que s'estaven duent a terme a l'EEI sobre fungicides, i com a aportació en la investigació del Projecte del Plan Nacional I+D+I sobre fungicides.

Durant el desenvolupament d'aquesta Tesi el document ISO de referència es trobava en l'últim estadi de desenvolupament de la norma. En els dies previs a finalitzar aquesta part de la Tesi, es va publicar com a norma definitiva, essent la seva denominació ISO 13365:2011 *Determination of the preservative (TCMTB, PCMC, OPP, OIT) content in leather by liquid chromatography*.

Els resultats obtinguts en el desenvolupament d'aquest mètode es van publicar a la revista *American Leather Chemists Association (JALCA)* al novembre del 2011, amb l'article titulat **Determination of TCMTB and other fungicides in leather** (autors: J. Font; M. Reyes; S. Cuadros; A. Bacardit i A. Marsal). A l'annex 3 es pot consultar.

Capítol 4. Fonaments de la determinació de fungicides en mostres aquoses

4.1. Tècniques de preparació de mostra

En el procés analític es poden diferenciar les següents etapes (veure Fig. 26):

- el mostreig (recol·lecció d'una quantitat de mostra reduïda i representativa)
- la preparació de la mostra (tractament de la mostra per extreure, **netejar** i **concentrar** l'analit o analits d'interès).
- l'anàlisi pròpiament dit (part del procés on s'obtenen uns resultats)
- maneig de les dades (processat i interpretació de les dades)

La preparació de la mostra és l'etapa on, generalment, s'inverteix més temps en un anàlisi químic. L'objectiu d'aquesta etapa és millorar dos aspectes: la selectivitat i la sensibilitat del mètode (Skoog et al. 2005; Karger, Snyder i Horvath 1973).

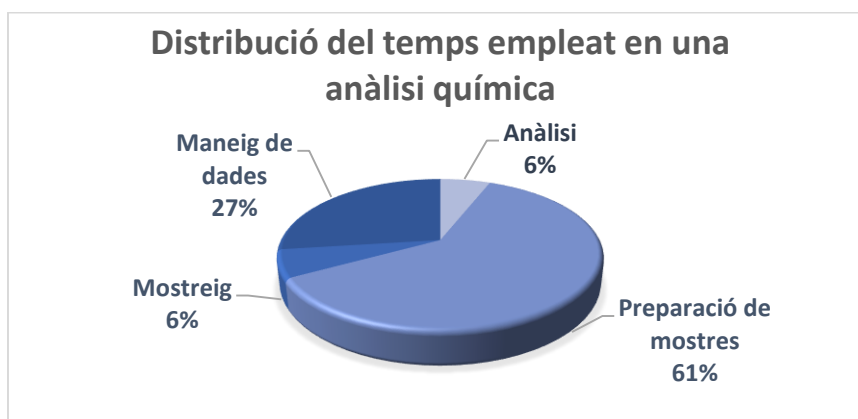


Fig. 26. Temps estimat en cada etapa del procés analític

L'esquema estàndard d'anàlisi d'una mostra aquosa per a la determinació de contaminants podria ser el següent:

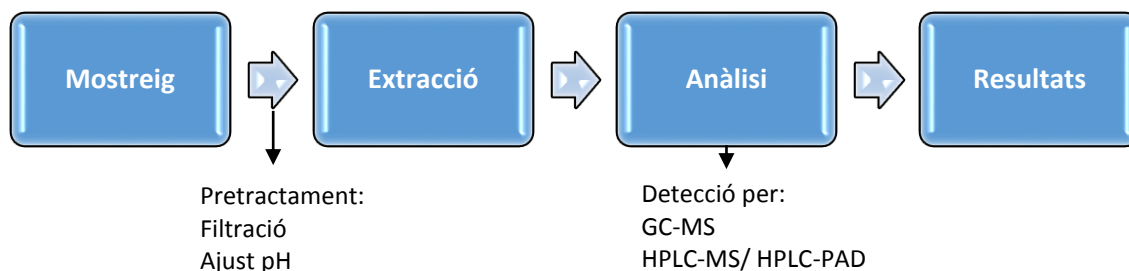


Fig. 27. Esquema d'anàlisi de contaminants d'una mostra aquosa

En l'anàlisi de compostos orgànics en mostres aquoses, l'extracció és un punt crític de l'anàlisi. Minimitzar el número de passos és molt important per reduir no només les fonts d'error, sinó també el temps i el cost. En molts casos l'etapa d'extracció comporta un consum elevat de dissolvents orgànics indesitjables per la seva toxicitat.

No existeix una tècnica de preparació universal per a tot tipus de mostres. Dependrà de la naturalesa dels analits, de la matriu i de la tècnica final seleccionada.

Els mètodes d'extracció utilitzats en mostres aquoses són:

Extracció líquid-líquid (LLE): aquesta tècnica se sol aplicar per l'anàlisi d'analits no polars o semi polars. Es porta a terme utilitzant un embut de decantació i necessita volums relativament grans de dissolvents orgànics, la manipulació dels quals no és saludable. A més requereix una inversió en temps considerable (Robles et al. 2010).

Extracció sòlid-líquid (SPE): és una tècnica preparativa prèvia a l'anàlisi cromatogràfic amb l'objectiu de netejar la mostra, "*clean up*", concentrar l'analit i fer possible el canvi de dissolvent (per exemple d'aquós a orgànic). La mostra interacciona amb una fase estacionària. Es comercialitza un ampli ventall de fases SPE segons el tipus de mostra i analit. L'eficiència del procés SPE depèn de la capacitat de l'absorbent i de la retenció dels analits (Robles et al. 2010). Els cartutxos SPE no són reutilitzables: cada extracció necessita un nou cartutx.

Microextracció única gota (SDME): (en anglès *single drop microextraction*): tècnica basada en l'extracció a partir d'una gota d'un solvent orgànic no miscible en aigua, suspesa a l'extrem d'una xeringa, que és submergida dins una solució aquosa. Presenta inconvenients com mantenir la gota del solvent orgànic estable, formació de bombolles d'aire i un temps per assolir l'equilibri d'extracció molt prolongat (Tankiewicz, Morrison i Biziuk 2013).

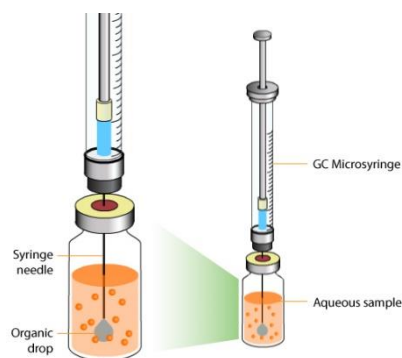


Fig. 28. Microextracció per única gota (SDME)
(Font: <http://chromacademy.com>)

Microextracció líquid-líquid dispersiva (DLLME): (en anglès *dispersive liquid-liquid microextraction*): Tècnica introduïda per Assadi (Rezaee et al. 2006), semblant a una LLE a escala reduïda. Una mescla apropiada d'un dissolvent extractor i un dissolvent dispersant, miscible a la vegada en medi orgànic i aquós, s'injecta a la mostra formant-se una suspensió de fines gotes. A continuació es centrifuga quedant al fons del tub cònic, d'on s'extreuen per a l'anàlisi instrumental (Cheng et al. 2010).

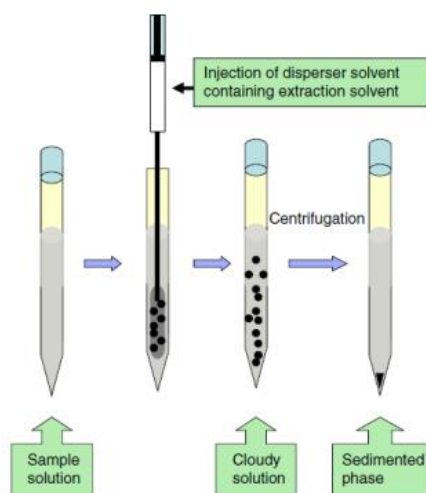


Fig. 29. Microextracció líquid-líquid dispersiva (DLLME)

Microextracció en fase sòlida (SPME): (en anglès *solid phase microextraction*): és una tècnica apta per una àmplia varietat de compostos orgànics. No requereix l'ús de solvents orgànics. Consta d'una fibra de sílice recoberta d'un material adsorbent que es troba a l'interior d'un tub buit (una espècie de xeringa) de forma que es pot treure o retreure per ser exposada a la mostra (Pawliszyn 2009). La mateixa fibra es pot reutilitzar diverses vegades.

L'apartat 4.3 amplia aquesta tècnica.

A la Fig. 30 s'ha representat el volum d'articles trobats a 3 bases de dades, en relació a cada tècnica d'extracció. Només s'han inclòs les tècniques específiques: SDME, DLLME, SPME i SPE. Es comprova que la SPME és la tècnica més utilitzada en l'àmbit analític, després de la SPE.

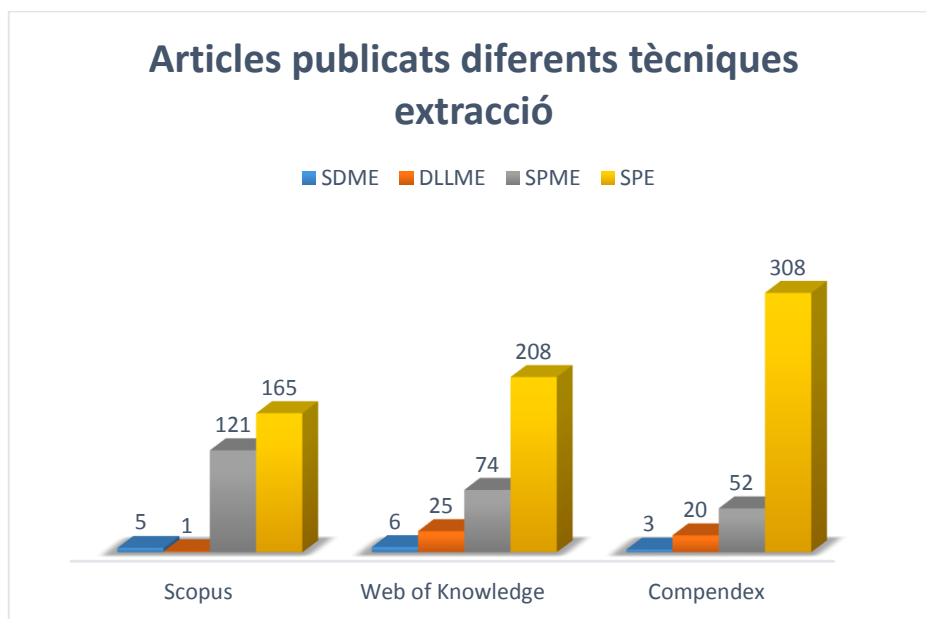


Fig. 30. Publicacions de cada tècnica: SDME, DLLME, SPME i SPE

A la Taula 39 s'esquematitza la seqüència de passos pels mètodes LLE, SPE i SPME (Alpendurada 2000).

LLE	SPE	SPME
- adició de dissolvents orgànics a la mostra.	- condicionament dels cartutxos o membranes.	- exposició de la mostra a la fibra SPME.
- agitació en un embut de decantació.	- elució de solvent per eliminar interferències i desorció de l'analit.	- desorció dels analits
- separació de les fases aquosa i orgànica.	- evaporació/concentració de la fases orgànica.	- injecció en aparell instrumental
- eliminació de la fase orgànica.	- injecció en aparell instrumental.	
- evaporació/concentració de la fases orgànica.		
- injecció en aparell instrumental.		

Taula 39. Protocol de treball per mètodes d'extracció LLE, SPE i SPME (Alpendurada 2000)

4.2. Mètodes d'extracció de fungicides en mostres aquoses: Revisió bibliogràfica

En aquest apartat es presenta una cerca bibliogràfica sobre l'anàlisi de fungicides en mostres aquoses.

De Almeida Azevedo et al. (2000) analitza compostos organoclorats, fenòlics i amines en aigües de riu tractant les mostres amb cartutxos SPE de divinilbenzè-n-vinilpirrolidona (OASIS). Utilitza acetonitril i diclormetà que posteriorment elimina per evaporació. Combina amb les tècniques GC i HPLC-APCI-MS segons l'estabilitat tèrmica i polaritat dels compostos.

Fattahi et al. (2007) combina les tècniques SPE-DLLME i posterior GC en l'anàlisi de clorofenols en aigües. Els cartutxos SPE són de polímers orgànics del tipus divinilbenzè-poliestirè (XAD)

Ferrer i Thurman (2007) utilitza la cromatografia líquida amb *electrospray* i extracció SPE *offline*, per 101 pesticides en mostres aquoses (cap coincident amb els fungicides estudiats en aquesta Tesi).

Bester et al. (2010) determina OIT, IPBC i TCMTB en mostres aquoses procedents d'aigües d'escorrentia per HPLC-UV comparant diferents cartutxos d'extracció SPE. Les recuperacions obtingudes serien millorables, segons els autors, optimitzant els valors de pH.

Singer et al. (2010) analitzen, entre d'altres biocides, IPBC i OIT en aigües residuals urbanes i superficials per cromatografia líquida (LC-ESI-MS) i extracció SPE-*online*. Aquest és un sistema automatitzat connectat a l'HPLC on la fase mòbil elueix a través del cartutx i s'injecta en columna directament.

Mahugo Santana et al. (2009) presenta un resum on es mencionen diversos treballs sobre compostos fenòlics amb extracció SPE, i exposa certes limitacions que aquesta tècnica presenta pels compostos fenòlics degut a les diferents polaritats i acidesa que presenten.

La literatura publicada en relació a la tècnica SPME-HPLC es àmplia, com es pot observar en la Fig. 31, corresponent als resultats d'articles trobats a les 3 bases de dades indicades. La cerca inicial sobre SPME-HPLC s'ha anat acotant seqüencialment sobre mostres aquoses, fungicides en general, i compostos fenòlics.

- Tot i el nombre de treballs publicats sobre fungicides no s'ha trobat, fins a la data, cap treball sobre determinació dels fungicides utilitzats en adoberia en mostres aquoses. Només algun treball conté algun dels fungicides estudiats, però per SPE, com per exemple l'OIT, IPBC i TCMTB (Bestler i Lamani 2010; Singer et al. 2010).
- En canvi, els compostos fenòlics són dels que s'han trobat més treballs a la literatura.

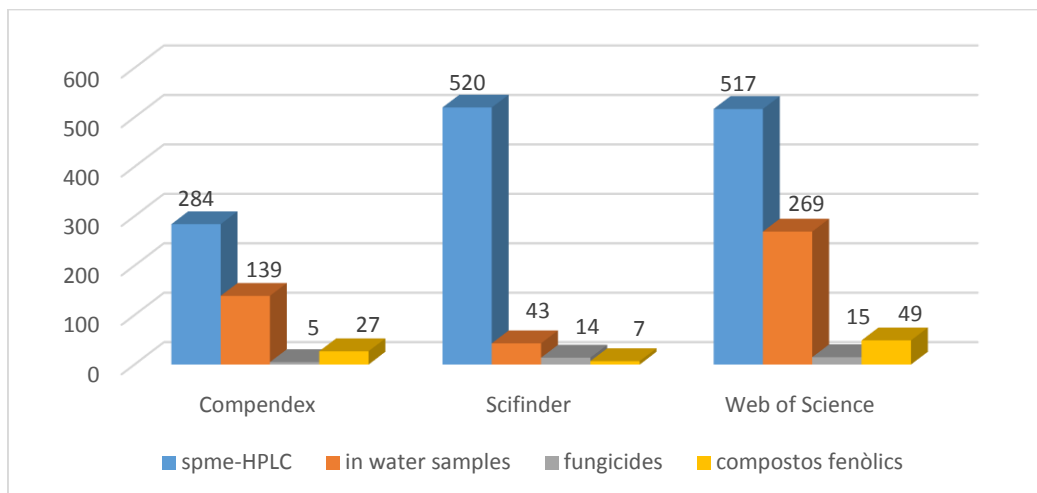


Fig. 31. Volum de publicacions trobades a la literatura sobre SPME-HPLC (en blau). Refinament seqüencial: mostres aquoses (taronja), fungicides (gris) i compostos fenòlics (groc)

Al següents apartats es comenta amb detall la informació trobada en relació a les publicacions sobre fungicides no fenòlics i fenòlics.

4.2.1. Determinació de fungicides no fenòlics per SPME

En aquest apartat i el següent es comenten les publicacions trobades a la bibliografia, relacionades amb la determinació de fungicides de la mateixa família química que els fungicides d'interès en aquesta tesi.

López Monzón (2007) va estudiar l'extracció de 4 fungicides de la família dels benzimidazols en aigua (controls mediambientals) per SPME, i posterior anàlisi per HPLC amb detector per fluorescència.

Va provar les fibres Carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) 75 µm, polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) 65 µm i polyacrylate (PA) 85 µm.

Els millors resultats els va obtenir amb la fibra Carboxen- polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) 75 µm.

Les condicions òptimes d'extracció trobades van ser de 40 min i 60 °C, amb una concentració de NaCl del 15% (p/v).

La desorció es va fer amb metanol durant 10 min *offline* (en un vial de vidre) (López Monzón et al. 2007).

Hu (2008) va optimitzar l'extracció de 2 fungicides de tipus benzimidazole (coincidents amb els estudiats per López Monzón (2007) en extractes aquosos de pomes.

Va provar les fibres 70 µm Carbowax /divinylbenzene (CW/DVB), PDMS-DVB 60 µm i PA 85 µm.

Els millors resultats els va obtenir amb la fibra PDMS-DVB 65 µm.

Les condicions òptimes d'extracció trobades van ser a un temps de 35 min a temperatura ambient, però la resposta millora augmentant el temps.

En quant a les condicions de desorció, la barreja metanol/aigua (50:50, v/v) (fase mòbil en l'HPLC) va ser el millor solvent, en un temps de desorció de 8 minuts, amb una interfase SPME-HPLC (Hu et al. 2008).

4.2.2. Determinació de fungicides fenòlics per SPME

S'han trobat molts treballs a la literatura sobre anàlisi de compostos fenòlics per SPME-HPLC.

Els primers assajos amb fibres SPME per compostos fenòlics comparaven fibres de PDMS (polydimethylsiloxane) i de PA (polyacrylate). Les proves efectuades amb la fibra PDMS no van ser satisfactòries degut a la seva naturalesa poc polar. La fibra PA és molt adequada per fenols, però no allibera totalment els compostos fenòlics en l'etapa de desorció (Möder et al. 1997; Lee et al. 1998; Llompart, Blanco i Cela 2000).

González-Toledo, Prat i Alpendurada (2001) van analitzar per primera vegada compostos fenòlics per SPME-HPLC en mostres de riu comparant dos tipus de fibres polars: 50 µm CW-TPR (Carbowax-Templated Resin) i 60 µm PDMS-DVB (polydimethylsiloxane-divinylbenzene). Una de les conclusions de l'estudi va ser que s'obtenien millors recuperacions amb la fibra més polar: CW-TPR.

Peñalver et al. (2002) va determinar 11 compostos fenòlics en mostres aquoses amb una fibra 85 µm PA, comparant dos modes de desorció per SPME-HPLC: estàtic i dinàmic. En mode estàtic la fibra roman en una cambra de desorció contenint el solvent orgànic o la fase mòbil. En mode dinàmic, els analits són desorbitats mentre flueix la fase mòbil. Ambdós procediments s'anomenen desorció *on-line*. Els millors resultats es van obtenir en mode estàtic.

Existeixen a la literatura altres treballs relacionats amb l'anàlisi de compostos fenòlics en mostres aquoses, per SPME, on s'han utilitzat variants molt específiques. Per exemple,

- (Liu et al. 2007) analitza set compostos fenòlics en mostres aquoses per SPME-HPLC, comparant fibres comercials i no comercials, preparant un recobriments a base de carbó, conegut com a *multiwalled carbon nanotubes* (MWCNTs).

- Wu, Hu i Hou (2008) compara dos mètodes d'extracció anomenats *single drop microextraction by headspace* (HS-SDME) i *hollow fiber liquid phase microextraction* (HS-HF-LPME).

- Higashi i Fujii (2009) analitzen fenol i clorofenols en mostres d'aigua mineral i potable, per derivatització amb un agent i quantificant a 380 nm per HPLC-UV.

4.3. Introducció a la tècnica SPME

La tècnica de microextracció en fase sòlida (SPME) va ser introduïda per Pawliszyn i Arthur el 1990 (Pawliszyn 2009) i comercialitzada per Supelco (Zhang, Yang i Pawliszyn 1994). És una tècnica de preparació de mostra que permet extreure, aïllar i concentrar els analits en una única etapa. En comparació amb l'extracció en fase sòlida (SPE), que requereix l'ús de dissolvents, la SPME és una tècnica lliure de solvents orgànics.

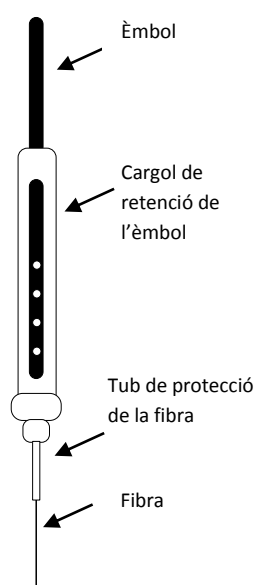


Fig. 32. Parts d'una fibra SPME

L'extracció es realitza amb una fibra recoberta d'un material que té afinitat pels analits d'interès. Es tracta d'una fibra de sílice fosa recoberta amb diferents polímers, continguda a l'agulla d'una xeringa. La diferent naturalesa d'aquest recobriment confereix unes característiques més afins a un tipus de molècules o altres.

El funcionament de la fibra es basa en un equilibri entre la concentració de l'analit a la mostra i el recobriment de la fibra.

La preparació de mostra per SPME consta de dues etapes: una d'extracció dels analits d'interès de la mostra i una altra de desorció.

Etapa d'extracció

Existeixen dos modes bàsics d'extracció: per immersió directa de la fibra en la mostra aquosa: per compostos no volàtils o termolàbils (fig. 33 a), i exposició de la fibra a l'espai de cap o *headspace*: per captar compostos volàtils (fig. 33 b).

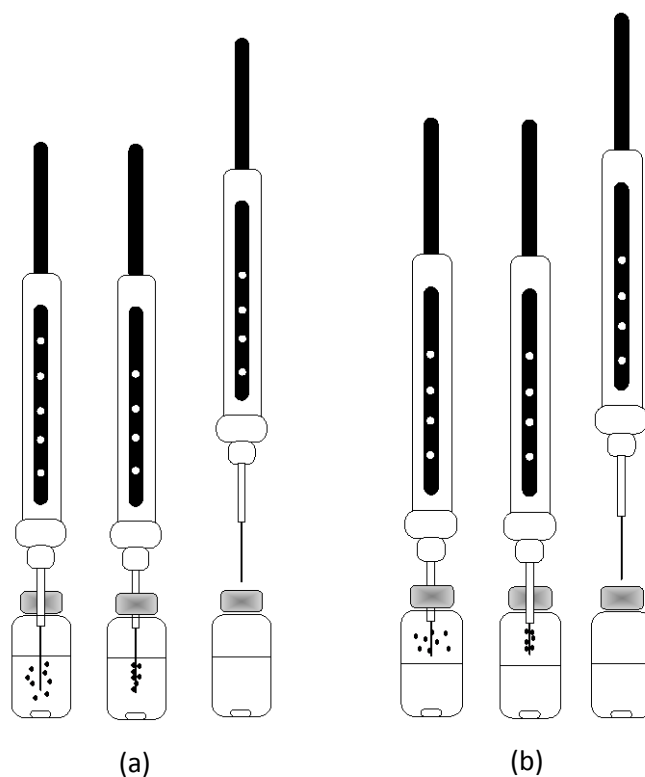


Fig. 33. Esquema d'extracció SPME. (a) Immersió directa. (b) Espai de cap (headspace).

Etapa de desorció

A l'etapa de desorció els analits són desorbts de la fibra i introduïts en una columna de separació. En l'anàlisi per HPLC la desorció dels analits es pot fer:

- *On-line* en una cambra de desorció (mode estàtic) -en un solvent orgànic de la fase mòbil- o en una interface SPME-HPLC (mode dinàmic) -desorbint en la fase mòbil.
- *Off-line*, efectuant la desorció en un vial contenint el solvent orgànic (veure figura)

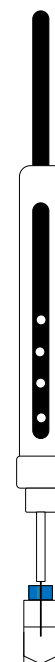


Fig. 34. Fibra en desorció

4.4. Mecanisme d'extracció d'una fibra SPME

Per entendre com funciona el mecanisme pel qual una fibra SPME extreu els analits d'una mostra, cal considerar els dos agents que intervenen: la fibra i la mostra.

Els aspectes a tenir en compte de cada un són:

- De la fibra: el tipus de recobriment.
- De la mostra: la massa o mida de l'analit, la polaritat, el nivell de concentració i la complexitat de la matriu de la mostra.

4.4.1. Tipus de recobriments SPME

Es comercialitzen diversos tipus de fibres segons els diferents recobriments.

El tipus de recobriment determina la polaritat i la selectivitat d'una fibra. Caldrà seleccionar el més adequat al tipus d'analit. Els recobriments de tipus apolar seran eficaços per extreure analits apolars, i els recobriments polars per extreure analits polars.

Les diferents polaritats proporcionen unes avantatges:

- Extracció selectiva de l'analit d'interès
- Reducció de la possibilitat d'extreure interferències
- Permet recuperar analits polars d'una matriu orgànica

Així tenim que les fibres de polyacrilate (PA) són polars i les de polydimethylsiloxane (PDMS) apolars.

Existeixen fibres formades per una combinació de materials polimèrics. Per exemple, en base a la polaritat requerida, es barreja polímer de divinylbenzene (DVB) amb PDMS o Carbowax® (CW), constituint una fibra de polaritat moderada (Venkatachalam 1999).

El gruix del recobriment (indicat per les micres) determina la capacitat de retenció de la fibra, i també el temps requerit per assolir l'equilibri. Es triga més a assolir l'equilibri amb una fibra de més gruix (Pawliszyn 2009).

Les fibres comercials de cada tipus es presenten a la Taula 40.

Tipus de recobrint	Mecanisme d'extracció	Polaritat
85µm polyacrilate (PA)	Absorbent	Polar
7µm polydimethylsiloxane PDMS	Absorbent	No polar
30µm polydimethylsiloxane PDMS	Absorbent	No polar
100µm polydimethylsiloxane PDMS	Absorbent	No polar
65 µm PDMS-DVB	Adsorbent	Bipolar
75 µm Carboxen-PDMS	Adsorbent	Bipolar
65 µm Carbowax-divinylbenzene (CW-DVB)	Adsorbent	Bipolar
50 µm CW-Templated resin (CW-TPR)	Adsorbent	Bipolar

Taula 40. Classificació de les fibres comercials (Pawliszyn 2009)

4.4.2. Fibres adsorbents o absorbents

L'extracció amb una fibra SPME implica la transferència de l'analit entre dues fases: la mostra i la fase polimèrica. Aquesta transferència pot ser un procés d'adsorció, on les molècules de l'analit són atrapades a la superfície del polímer, o un procés d'absorció, on les molècules es mouen cap endins i cap enfora del polímer, com si fos un líquid.

Existeixen, per tant, fibres de tipus **adsorbent** i de tipus **absorbent**.

En les fibres **adsorbents** els analits són retinguts en els porus. El mecanisme de retenció es basa en interaccions del tipus Van der Waals, per enllaços π - π o per enllaços d'hidrogen. La capacitat adsorbent depèn de la superfície total, la quantitat de porus, i la mida dels porus.

Els porus es defineixen en 3 categories: macro, meso o micro:

Els macroporus, amb diàmetres superiors a 500Å, es troben normalment a la superfície del material. Els mesoporus tenen obertures dins el rang 20-500Å i els microporus, de 2-20 Å.

Per exemple el DVB és bàsicament mesoporós (20-500Å) amb alguns macroporus (>500Å) i microporus (2-20Å). La presència de porus en les parts polimèriques retenen físicament els analits, produint una forta retenció en l'interior dels porus. Aquesta característica fa que les fibres SPME que contenen materials porosos siguin idònies per anàlisi de traces. El DVB combinat amb PDMS reté analits més petits que una fibra únicament de PDMS. Aquesta combinació la fa més afí pels analits polars.

La retenció dependrà tant de la mida de l'analit com del diàmetre del porus. La capacitat d'un material adsorbent es determina segons la mida de les molècules que pot retenir, i es inversament proporcional a la mida de l'analit.

Per analits d'un pes molecular aproximat menor a 125, un recobriment adsorbent és millor opció que un absorbent.

En les fibres **absorbents** la capacitat per retenir o alliberar l'analit és deguda al coeficient de repartiment dels analits. Els analits migren dins i fora de la fibra, en un efecte tipus "esponja". Els factors que intervenen en la retenció i atracció dels analits són el gruix del recobriment i la polaritat. Com que els analits petits es mouen més ràpidament que els grans és més difícil retenir-los, per això cal utilitzar fases de gruixos més prims.

Per analits amb pesos moleculars alts les fibres absorbents són la millor opció (Shirey 2010).

Les característiques resumides de cada una són:

Fibres de tipus adsorbent	Fibres de tipus absorbent
<ul style="list-style-type: none"> • Atrapen físicament els analits o hi reaccionen químicament per enllaços, degut a: <ul style="list-style-type: none"> - material porós - elevada àrea superficial • Els analits competeixen pels espais • Les fibres tenen una capacitat limitada 	<ul style="list-style-type: none"> • Els analits s'extreuen segons el seu coeficient de repartiment entre: <ul style="list-style-type: none"> - La fase líquida - el gruix de recobriment • Els analits no competeixen pels espais • Les fibres tenen alta capacitat

Taula 41. Característiques de les fibres adsorbents i absorbents (Shirey i Mindrup 1999)

4.4.3. Relació entre el recobriment i la mida de l'analit

El gruix del recobriment influeix en la velocitat de difusió i desorció dels analits. El pes molecular de l'analit determina la velocitat amb què es mou dins i fora de la fibra, i a través de la mostra:

- Els analits petits es mouen més ràpidament i és més difícil que siguin retinguts per la fibra. Una fibra de 100 μm serà més adequada que una de 7 μm per retenir les molècules petites.
- Els analits grans migren més lentament per la mostra i cap a la fibra, dificultant l'assoliment de l'equilibri. En general, el temps d'equilibri és superior amb una fibra de 100 μm que amb una de 30 μm , per les molècules grans.

La idoneïtat de la fibra en funció del pes molecular de l'analit es pot veure a la *Fig. 35*

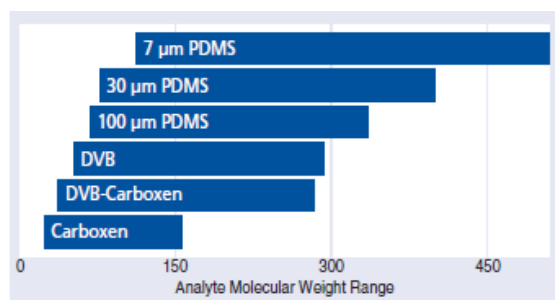


Fig. 35. Interval de pes molecular per recobriments de fibres SPME (Shirey 2010)

La mida i forma de la molècula també són importants.

La molècula de mida més petita d'una estructura hidrocarbonada d'un mateix pes molecular, tindrà una eficiència d'extracció similar a una de 30 unitats de massa inferior. Aquest valor és orientatiu i dependrà del grau de substitució.

Una estructura plana sense grups substituents interacciona amb una fibra adsorbent a través d'interaccions π - π . Exemples d'aquests analits són els hidrocarburs aromàtics policíclics, i les molècules de cadena llarga amb dobles enllaços múltiples. Això equivaldria a una molècula unes 30-50 una més gran. Tanmateix, la presència de substituents electronegatius actuen en la molècula com si reduïssin la seva mida (Shirey 2010).

4.4.4. Efecte de la concentració de la mostra

En un estudi realitzat en mostres aquoses sobre extracció d'analits volàtils en diferents concentracions i amb diferents fibres (Shirey 2009), es van arribar a les següents conclusions:

- Les fibres que extreuen per adsorció tenen una capacitat limitada comparat amb les fibres absorbents de gruix similar. Caldrà determinar, doncs, el rang lineal per a cada analit.
- Les fibres adsorbents ofereixen millor resposta per nivells baixos de concentració, en relació a les fibres absorbents.
- Les fibres absorbents van resultar millor en mostres complexes amb concentracions diferents.
- En mostres amb múltiples analits pot haver competició pels espais d'una fibra adsorbent. Un component a alta concentració, o amb més afinitat, pot desplaçar un component en menor concentració, o de menor afinitat (Shirey 2010).

4.5. Variables que afecten al procés SPME

El tipus de fibra, el temps, la temperatura d'absorció, el pH i la força iònica són paràmetres que afecten a una extracció eficient dels analits d'interès, així com l'agitació, que ajuda a aconseguir un equilibri més ràpid, ja que millora la difusió dels analits cap a la fibra (Alpendurada 2000).

La temperatura d'extracció té dos efectes oposats en la tècnica SPME. Incrementant la temperatura millora el coeficient de difusió dels analits, però, d'altra banda, com que l'adsorció és un procés exotèrmic, l'augment de temperatura redueix la constant de distribució de l'analit (Alpendurada 2000).

L'addició de clorur sòdic o un canvi de pH abans de l'extracció pot incrementar la força iònica de la solució, i condicionar la solubilitat d'alguns analits.

L'addició de sal és una pràctica comuna per millorar l'extracció de substàncies orgàniques, depenent de la substància i de la concentració salina empleada. A més la presència de concentracions elevades de sal (al voltant de la saturació) normalitza la mostra, minimitzant l'efecte matriu (Pawliszyn 2009).

En quant a la influència del pH, cal indicar que el recobriment de la fibra només reté les formes no dissociades dels compostos àcids. Per tant, per a una millor sensibilitat el pH ha de ser inferior al pK de la substància (Yang i Peppard 1995).

En l'etapa de desorció es important tenir en compte el temps de desorció dels analits i el tipus de solvent utilitzat.

4.6. Aspectes teòrics de la SPME

El procés d'extracció de SPME segueix generalment el perfil de la *Fig. 36* (Ouyang i Pawliszyn 2008). Quan el temps d'extracció és superior a t_{95} , l'extracció està a prop de l'equilibri. Si és menor de t_{95} , l'extracció és un procés cinètic. El procés és pràcticament lineal quan el temps d'extracció es menor de t_{50} .

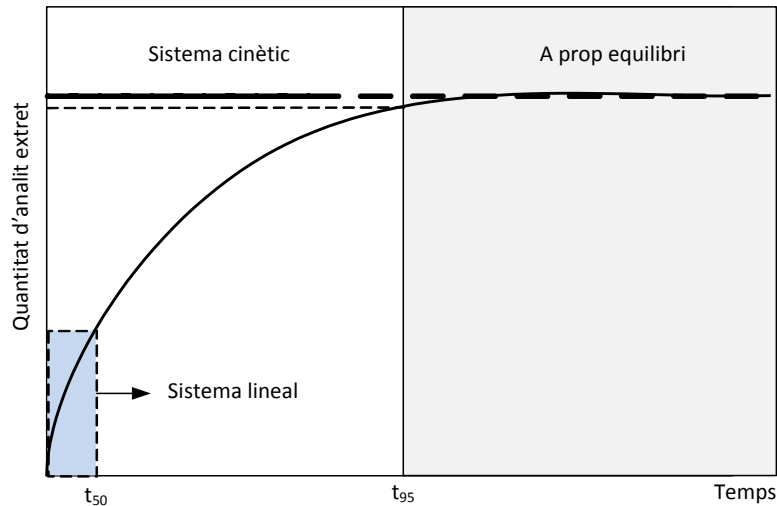


Fig. 36. Perfil d'extracció en SPME

Segons el temps d'extracció en relació a la quantitat d'analit extret de la mostra, es pot parlar de:

- extracció a l'equilibri
- extracció exhaustiva
- extracció per difusió

4.6.1. Extracció d'equilibri

Es el mètode més comú utilitzat en SPME per quantificar. Consisteix en exposar la fibra en una mostra fins a assolir l'equilibri. Les condicions d'equilibri es detallen en la següent equació, d'acord a la llei de conservació de la massa (Pawliszyn 2009):

$$n = \frac{K_{fs}V_fV_s}{K_{fs}V_f+V_s}C_0 \quad (\text{Equació 1})$$

On n és el número de mols extrets d'analit a l'equilibri, C_0 és la concentració inicial de l'analit a la mostra, V_s és el volum de mostra, V_f és el volum de recobriment de la fibra, i K_{fs} és el coeficient de distribució dels analits entre el recobriment de la fibra i la mostra.

A l'equació es pot veure que la quantitat d'analit extret en el recobriment (n) és proporcional a la concentració de l'analit a la mostra (C_0). Aquesta és l'equació fonamental usada per la quantificació en SPME, per processos basats en **absorció** (apartat 4.4.2).

Quan el volum de mostra és molt gran (mostreig de camp), l'equació 1 es pot simplificar així:

$$n = K_{fs}V_fC_0 \quad (\text{Equació 2})$$

A l'equació 2 es pot observar que la quantitat d'analit extret és independent del volum de mostra. La quantitat de mostra extreta correspondrà directament a la concentració en la mostra, amb independència del volum pres.

Es pot deduir que la concentració dels analits es pot calcular a partir de la quantitat d'analits a la fibra, sota condicions d'equilibri, si es coneixen els coeficients de distribució (Pawliszyn 2009).

El mètode d'extracció a l'equilibri és el més usat en mostres d'aire i aquoses. El mostreig en mostres d'aire es pot fer en mode dinàmic i estàtic. En dinàmic es pot utilitzar una bomba d'aire per incrementar la relació d'extracció.

El temps d'extracció en l'equilibri per mostres aquoses és superior que en mostres d'aire. **A vegades requereix setmanes** (Ouyang i Pawliszyn 2008). Es per aquesta raó que en molts casos la quantificació s'ha de realitzar en condicions de no-equilibri (apartat 4.7).

En processos basats en **adsorció**, la dependència a l'equilibri entre la concentració de l'analit i la fibra ve donada per la isoterma d'adsorció de Langmuir. En el model de Langmuir, se suposa que (1) la molècula adsorbida roman immòbil, (2) tots els espais són equivalents, (3) cada espai pot contenir com a màxim una molècula, (4) no hi ha interaccions entre molècules adsorbides adjacents. Per tant, l'equació 2, quedaria de la següent manera:

$$n = \frac{K_A C_0 V_f V_s (C_{fmax} - C_{fA}^{\infty})}{K_A V_f (C_{fmax} - C_{fA}^{\infty}) + V_s} \quad (\text{Equació 3})$$

On n és el número de mols extrets a l'equilibri, K_A és la constant d'equilibri d'**adsorció** de l'analit al recobriment de la fibra, C_0 és la concentració inicial de l'analit a la mostra, V_f és el volum de recobriment de la fibra, V_s és el volum de mostra, C_{fmax} és la concentració d'espais lliures a la fibra, C_{fA} concentració de l'analit a la fibra (Górecki, Yu i Pawliszyn 1999).

L'extracció a l'equilibri no és la millor opció en processos basats en adsorció, degut precisament a l'efecte desplaçament d'analits a altes concentracions. Per aquesta raó l'extracció es pot aturar i analitzar la fibra abans d'assolir l'equilibri. Aquesta modalitat és viable quan la sensibilitat no es la màxima prioritat de l'anàlisi.

La cinètica d'absorció dels analits, en aquest cas, és la següent:

$$n = (1 - e^{-at}) \frac{K_{fs} V_f V_s}{K_{fs} V_f + V_s} C_0 \quad (\text{equació 4})$$

On t és el temps d'extracció, a seria el temps total d'extracció (constant) . L'equació 4 indicaria la relació lineal entre la quantitat d'analit extreta (n) i la concentració d'analit (C_0) a la mostra proveïda d'agitació, a un temps determinat, i a una temperatura d'extracció constant (Ouyang i Pawliszyn 2007).

4.6.2. Extracció exhaustiva

SPME es majoritàriament un mètode d'extracció en equilibri més que un mètode d'extracció exhaustiu, perquè en la majoria de casos, els analits no són completament extrets (Ouyang i Pawliszyn 2008).

A l'equació 1 si el coeficient de distribució (K_{fs}) és molt elevat, el terme $K_{fs} V_f$ pot ser molt més gran que V_s ($V_s \ll K_{fs} V_f$) i es pot escriure:

$$n \approx V_s C_0 \quad (\text{Equació 4})$$

El calibratge per extracció exhaustiva no és usual en SPME perquè només és aplicable per coeficients de distribució molt grans i petits volums de mostra. Existeixen, però, treballs publicats que utilitzen aquest mètode amb dispositius especials (Ouyang i Pawliszyn 2008).

4.6.3. Extracció per difusió

L'extracció per difusió es realitza amb uns dispositius SPME on la fibra es retrau una distància coneguda dins el seu tub protector, i es posa en contacte amb la mostra (ja sigui d'aire o aquosa). La captació dels analits d'interès té lloc per difusió, no per contacte directe amb la mostra.

S'han desenvolupat diferents mètodes de calibratge basats en el procés de difusió on són importants variables com el temps de mostreig, la longitud de la via de difusió, el coeficient de difusió de l'analit considerat (a través de l'aire o aigua) i la secció de l'àrea de la fibra, per exemple.

Aquest tipus de mostreig és utilitzat en anàlisis ambientals de monitoratge prolongat (Ouyang i Pawliszyn 2008).

4.7. Calibratge en SPME

Per quantificar en SPME es poden utilitzar els mètodes tradicionals de calibratge, com el calibratge extern, patró intern o addició de patró (Ouyang i Pawliszyn 2008).

Aquests mètodes consideren 2 modalitats d'extracció: a l'**equilibri** i al **pre-equilibri**.

- En el primer cas s'assoleix un equilibri de partició entre la mostra i la fase d'extracció (sorbent).

- En el segon cas, no s'assoleix l'equilibri. L'anàlisi s'efectua en condicions de "no-equilibri". Si el temps d'extracció i les condicions d'agitació es mantenen constants al llarg de tot el procés, no és necessari assolir l'equilibri per poder quantificar. La quantificació es basarà en l'acumulació d'analits acumulats a la fibra en funció del temps (Ai 1997; Ouyang i Pawliszyn 2007).

En situació d'equilibri no és necessari que l'agitació sigui constant, i la sensibilitat és superior que en situació de no-equilibri. Però si el temps d'equilibri es molt llarg, és millor utilitzar l'extracció en no-equilibri.

4.7.1. Calibratge extern

Consisteix en l'obtenció d'una corba de calibració a partir de la relació entre diferents concentracions de l'analit/s d'interès i la seva àrea de resposta. És molt utilitzada en SPME

La calibració externa és útil quan hi ha poca variabilitat en la composició de la matriu de les mostres, o quan les mostres són normalitzades abans de l'extracció, per exemple, afegint una alta concentració de sal.

En el cas de les fibres amb sorbents sòlids, l'equilibri d'extracció amb calibració externa només és factible si la concentració d'analit a la mostra no causa saturació dels punts actius en el sorbent.

Aquest mètode és sobretot utilitzat en aplicacions de mostres gasoses perquè el temps d'equilibri és molt més curt en compostos volàtils (Ouyang i Pawliszyn 2008).

4.7.2. Calibratge per addició de patró

S'utilitza aquest tipus de calibració quan la procedència de les mostres és molt diferent i és difícil obtenir un blanc de matriu idoni per a totes elles. O també quan se'n disposa d'una quantitat limitada i no és possible prendre quantitats addicionals per a la calibració.

Aquest mètode es basa en l'addició de quantitats conegudes d'analit (o analits) a la mostra matriu, que inicialment conté una concentració desconeguda d'analit. De l'anàlisi d'aquestes mostres *fortificades* s'obté un gràfic com el següent. L'extrapolació de la resposta al zero donaria la concentració de la mostra no addicionada (*fortificada*).

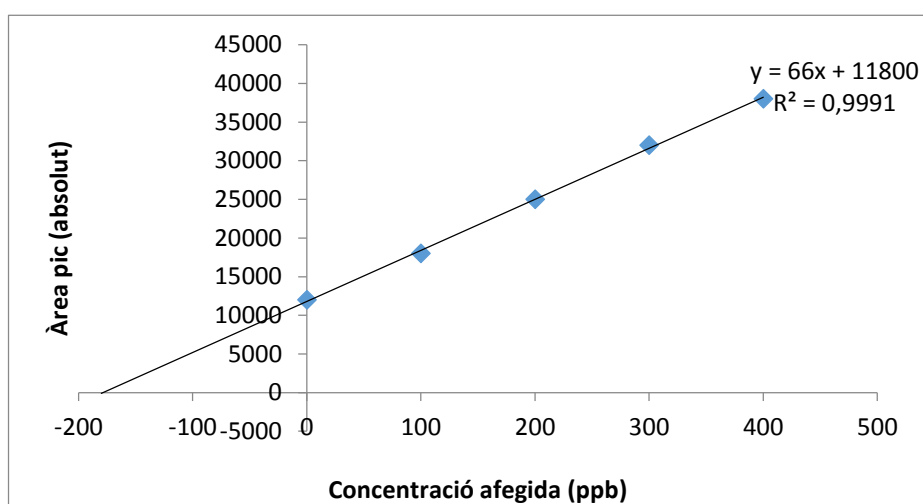


Fig. 37. Calibratge per addició de patró

La concentració de l'analit a la mostra, C_s , es calcularia com

$$C_s = \frac{A_s}{s} \quad (\text{Equació 5})$$

On A_s és l'àrea del pic del analit (o analits), s és el pendent de la corba de calibratge.

El major inconvenient és la quantitat d'addicions que caldria fer per a cada incògnita.

És apropiat per quan el nombre de mostres és reduït i la composició de la mostra desconeguda i complexa.

4.7.3. Calibratge per patró intern (Pi)

Els patrons interns es poden utilitzar per compensar l'efecte de matriu, pèrdues d'analit durant la preparació de mostra, o poca reproducibilitat en alguns paràmetres com podria ser el volum d'injecció en cromatografia de gasos (GC) o cromatografia líquida (HPLC).

Un patró intern adequat ha de ser una substància amb característiques similars a les de l'analit o analits de les solucions patrons i de les mostres, i presentar un comportament similar durant l'extracció. Tanmateix ha de ser suficientment diferent de la resta d'analits, i per tant estar ben resolt en la separació cromatogràfica.

El calibratge amb patró intern s'obté representant el quocient entre l'àrea de l'analit i del Pi enfront al quocient de les seves concentracions (Fig. 38).

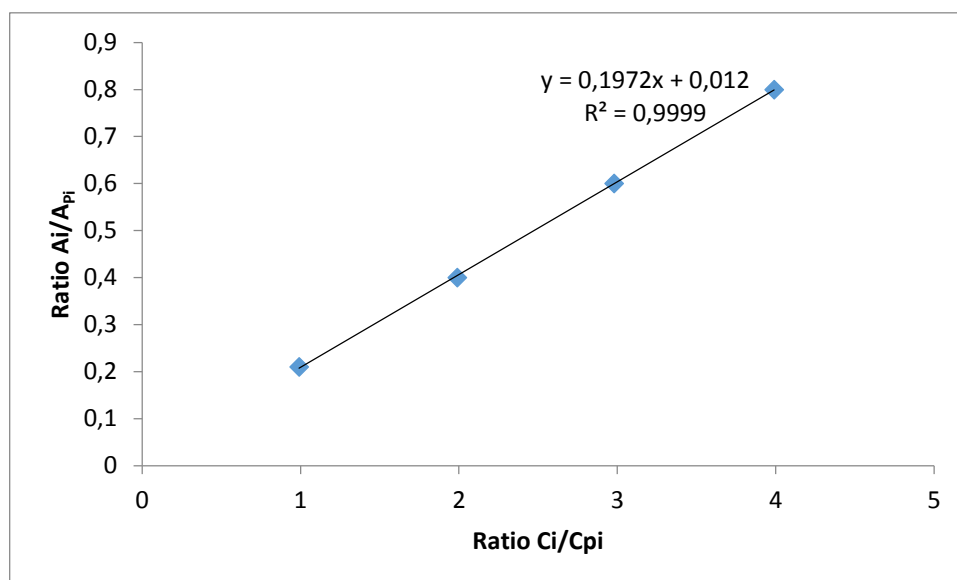


Fig. 38. Calibratge amb patró intern

Aquesta relació entre àrees i concentracions s'utilitzaran durant la determinació de l'analit a la mostra (Pawliszyn 2009).

En termes de coeficient de partició, és important que el patró intern es comporti de manera molt similar a l'analit. Si l'extracció s'efectua a l'equilibri, i el temps no es controla acuradament, es podrien produir importants errors durant l'anàlisi. Això pot ocórrer si el patró intern té un coeficient de partició molt diferent de l'analit d'interès.

Capítol 5 . *Procediment per a la selecció d'una fibra SPME*

Una de les variables que afecten a l'extracció per SPME és el tipus de fibra.

A continuació es descriu el mètode seguit per avaluar amb quina fibra s'obté la millor resposta pel conjunt de fungicides a investigar.

5.1. Selecció de fungicides analitzats

Tal com s'ha comentat en la introducció del treball, en aquesta part del treball es desenvoluparà un mètode d'anàlisi per determinar fungicides en mostres aquoses.

L'estudi s'efectua pels mateixos fungicides estudiats en pell, a excepció del TCP i PCP. En medi aquós no serà probable trobar-los ja que, com s'ha justificat amb anterioritat, el PCP està prohibit a la UE i el TCP es troba inclòs a les llistes de substàncies no desitjables (capítol 1) (Castell 2011; ECCO 2014).

Els fungicides seleccionats per l'estudi són els següents:

Sigles	Nom IUPAC (Nom EC)	Fórmula química	Pes molec.	Núm. CAS (Núm. EC)	Família química
Fenòlics:					
PCMC	4-cloro-3-metilfenol (p-cloro-m-cresol) (Chlorocresol)	C ₇ H ₇ ClO	142,6	59-50-7 (200-431-6)	Fenol
OPP	2-fenilfenol (o-fenilfenol) (Biphenyl-2-ol)	C ₁₂ H ₁₀ O	170,1	90-43-7 (201-993-5)	Fenol
Heterocíclics:					
OIT	2-octil-1,2-tiazol-3-(2H)-ona (2-octyl-2H-isothiazol-3-one)	C ₁₁ H ₁₉ NOS	213,2	26530-20-1 (247-761-7)	Tiazolina
TCMTB	2-tiocianometiltio benzotiazol (benzothiazol-2-ylthio)methyl thiocyanate	C ₉ H ₆ N ₂ S ₃	238,3	21564-17-0 (244-445-0)	Benzotiazol
MBT	2-mercaptobenzotiazol (Benzothiazole-2-thiol)	C ₇ H ₅ NS ₂	167,2	149-30-4 (205-736-8)	Benzotiazol
Altres:					
IPBC	3-iodo-2-propinil butil carbamat (3-iodo-2-propynyl butylcarbamate)	C ₈ H ₁₂ INO ₂	281,0	55406-53-6 (259-627-5)	Carbamat

Taula 42. Fungicides investigats per SPME

5.2. Procediment per a la selecció de la fibra

A partir de les dades obtingudes a la literatura (capítol 4, apartat 4.2) s'extreuen les condicions de partida per a l'anàlisi en mostres aquoses dels fungicides proposats en aquesta Tesi.

Els diferents tipus de fibra trobats a la literatura per l'anàlisi de compostos fenòlics i no fenòlics en mostres aquoses per SPME són els següents:

- 1.- 75 µm Carboxen-PDMS de Supelco
- 2.- 65 µm PDMS-DVB de Supelco
- 3.- 100 µm PDMS de Supelco
- 4.- 50 µm CW-Templated resin (CW-TPR) de Sigma Aldrich

Les fibres 1 i 2 són les que es recomanen per fungicides de tipus benzimidazol, amb certa analogia amb els benzotiazols, família a què pertanyen el TCMTB i MBT.

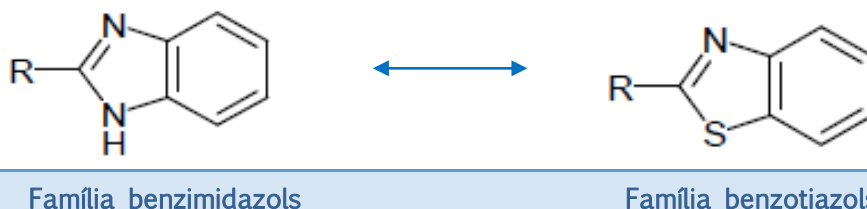


Fig. 39. Molècules famílies benzimidazol i benzotiazols

Les fibres 2 i 4 s'han utilitzat per l'anàlisi de compostos fenòlics. La fibra 4 en el moment de realitzar aquest estudi s'ha deixat de comercialitzar.

Amb la informació recollida a la literatura i amb les orientacions del departament tècnic d'aplicacions de Supelco (subministrador de les fibres SPME), s'ha decidit fer proves amb les fibres 1, 2 i 3.

Cal comentar que en aquest treball no s'agrupa l'anàlisi dels fungicides per família química, sinó que l'objectiu és analitzar-los conjuntament. Per tant la selecció de la fibra dependrà dels millors resultats obtinguts pel conjunt de tots ells.

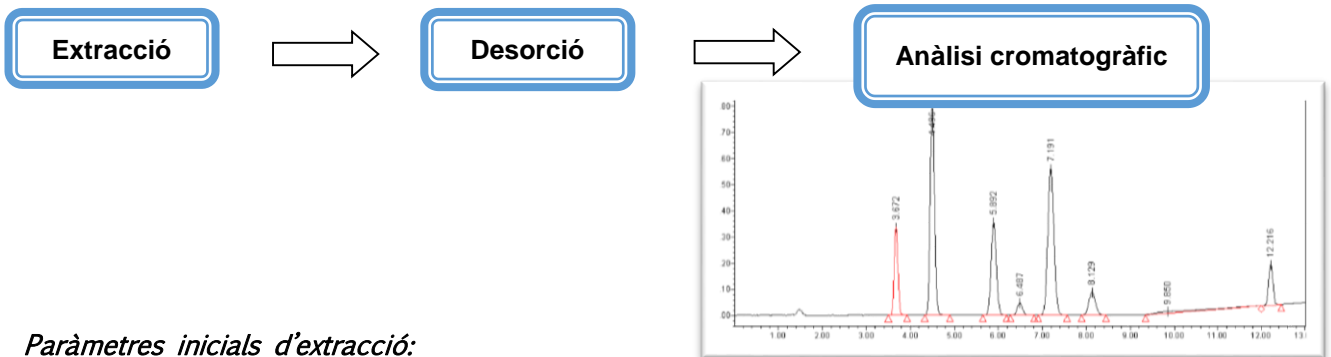
Tal com s'ha explicat al capítol 4 (punt 4.5), l'extracció amb la tècnica SPME es veu afectada per uns determinats paràmetres (temps i temperatura, entre d'altres). Per a l'estudi preliminar cal fixar unes condicions inicials.

5.2.1. Condicions inicials

Per poder avaluar quina fibra presenta major afinitat als fungicides, s'han fixat unes condicions inicials i s'ha estudiat el comportament de cada una de les fibres.

Tots els valors fixats en les etapes d'extracció i desorció han estat extrets dels valors trobats en els articles consultats (capítol 4).

L'esquema del procediment seguit és el següent:



Paràmetres inicials d'extracció:

T ^a Extracció	45°C
Temps	35 min
Concentració sal (força iònica)	10 % NaCl

Taula 43. Paràmetres inicials d'extracció

Paràmetres inicials de desorció:

T ^a Desorció	30 °C
Temps	30 min
Diluent desorció	ACN

Taula 44. Paràmetres inicials de desorció

S'ha preparat una solució d'extracció amb les següents concentracions de fungicides, seguint també l'ordre de magnitud trobat a la literatura.

Tal com s'apuntava al capítol anterior, a l'apartat dedicat a les variables que afecten a l'extracció SPME (punt 4.5), i segons les recomanacions trobades a la bibliografia, s'ha addicionat sal i s'ha acidificat lleugerament la solució analítica sobre la que s'efectua l'extracció amb la fibra SPME.

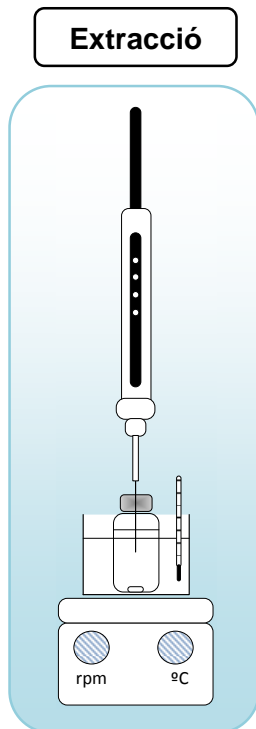
Solució d'extracció:

Fungicides	Conc (mg/L)
MBT	0.42
PCMC	1.34
IPBC	1.46
OPP	1.07
OIT	0.53
TCMTB	1.36

Aquesta solució conté un 10 % NaCl i 0.1 % de HCOOH

Taula 45. Concentracions dels fungicides en la solució d'extracció

5.3. Descripció del mètode

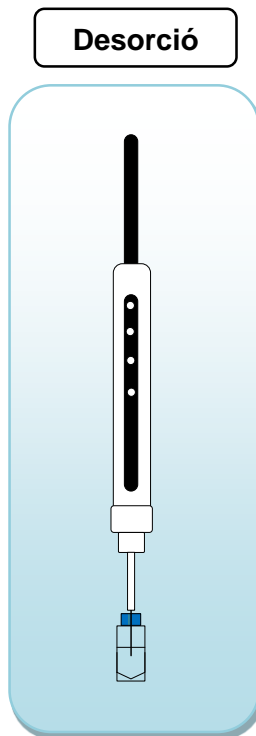


Un vial que conté 8,00 mL de la solució d'extracció es submergeix en un bany maria, la temperatura del qual es manté a 45 °C amb un termòmetre amb sonda.

A l'interior del vial s'introdueix un imant que manté una agitació constant a 900 rpm.

<u>Condicions inicials</u>	
T^a extracció:	45 °C
Temps:	35 min
Concentració sal (força iònica):	10 % NaCl

Fig. 40. Muntatge fibra en extracció



La desorció s'efectua en un vial de vidre amb una forma cònica en el seu interior. La fibra se submergeix i es manté en contacte, estàticament, durant el temps de duració de la desorció.

<u>Condicions inicials</u>	
T^a desorció:	30 °C
Temps:	30 min
Diluent de desorció:	ACN

Injecció a l'HPLC-PDA

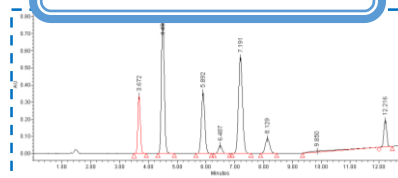


Fig. 41. Muntatge fibra en desorció

5.4. Instrumentació i material utilitzat

5.4.1. Instrumentació

- a. Cromatògraf líquid d'alta resolució (Waters Alliance 2695) equipat amb una bomba quaternària, desgasificador, columna termostatitzada a 30 °C i detector de fotodíodes (Waters detector 2996).
- b. Columna Mediterranea Sea 18 Teknokroma (150 mm x 4,6 mm d.i., 3 µm tamany de partícula).

5.4.2. Reactius i material

- a. Acetonitril de qualitat gradient per HPLC de Panreac.
- b. Aigua ultrapura de qualitat Milli-Q de Millipore.
- c. Àcid fòrmic suprapur de Fluka.
- d. Vials cònics Waters de 0,8 mL, 12 x 32 mm amb sèptum pre-perforat on es realitza la desorció dels analits.
- e. Vials capsulats Teknokroma de 9 mL, 18 x 50 mm amb sèptum on es realitza l'adsorció dels analits.
- f. Placa agitadora amb control de temperatura Agimatic-E de Selecta.
- g. Armari termostatitzat ISCO amb temperatura regulable a 30 °C i 45 °C.
- h. Termòmetre digital portàtil, amb sonda de temperatura TESTO.

5.5. Comparació de les 3 fibres SPME seleccionades

La figura 39 mostra la recuperació dels fungicides obtinguda amb els tres tipus de fibra, expressades en valors absoluts d'àrea.

Amb la fibra 100 μm PDMS només s'han detectat dos dels sis fungicides analitzats, mentre que les altres fibres han mostrat afinitat per tots els analits.

Com a resultat d'aquestes primeres proves es va descartar de l'estudi la fibra 100 μm PDMS.

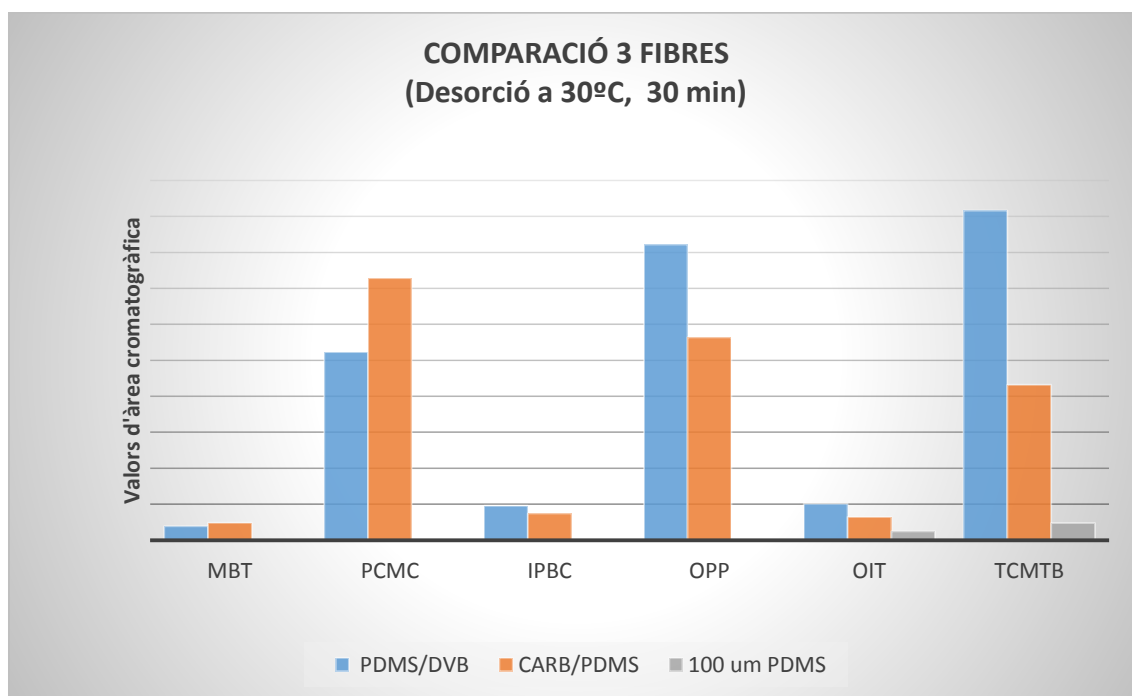


Fig. 42. Recuperació (en valors absoluts) amb 3 fibres diferents

5.6. Comparació de 2 fibres: Carboxen/PDMS i PDMS/DVB

Per comparar les fibres Carboxen/PDMS i PDMS/DVB, es van realitzar proves de desorció variant el temps de 5 a 30 min, en les mateixes condicions inicials (veure apartat 5.2.1).

La desorció s'efectua per immersió de la fibra, en un mateix vial, durant intervals de temps de 5, 10, 15 i 30 min. Després de cada interval, s'analitza el contingut del vial per cromatografia.

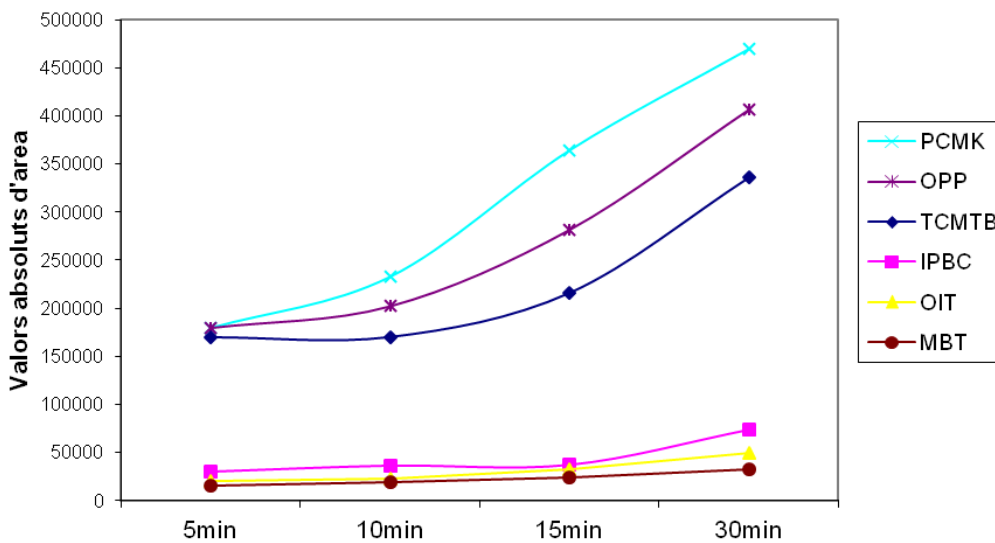


Fig. 43. Fibra Carb/PDMS. Desorció 5 a 30 min, 30°C

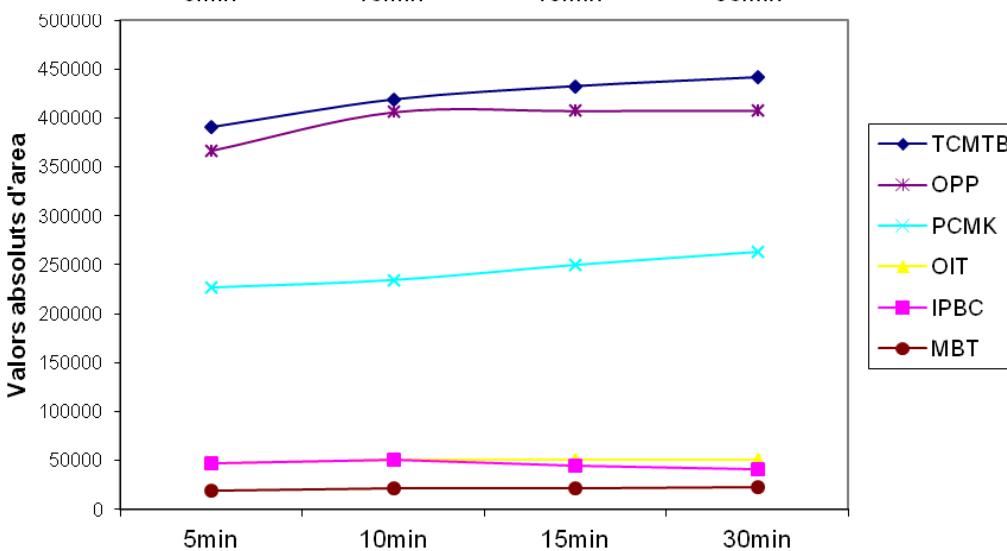


Fig. 44. Fibra PDMS/DVB. Desorció 5 a 30 min, 30°C

S'observa que la fibra PDMS/DVB, al cap de 10 minuts de desorció, ha assolit la concentració màxima alliberada per a cada un dels analits. En canvi, la fibra



Carboxen/PDMS va alliberant-los lentament, a mida que s'incrementa el temps d'immersió en el diluent.

Aquest comportament de la fibra Carboxen/PDMS representa un problema tant des del punt de vista de menor sensibilitat, ja que la fibra té dificultat per desorbir els analits, com per la reutilització de la fibra per a un nou anàlisi.

5.7. Procediment de neteja de les fibres

Fibra carboxen/PDMS

Després de cada extracció es comprova l'estat de neteja de la fibra abans de la següent determinació. Per fer-ho, es desorbeix a 30°C durant 10 min i s'injecta al cromatògraf.

El resultat és que la fibra no es troba lliure de fungicides: cal netejar-la abans de la següent anàlisi. Després de diferents proves de neteja, entre els quals s'ha provat un rentat amb acetona/aigua (3/1), tractament tèrmic de la fibra a 220 °C durant 15 min en un cromatògraf de gasos, el protocol de neteja que resulta més eficaç és el següent:

- rentat de 15 min en aigua i amb agitació (per eliminar restes de clorur sòdic)
- rentat de 15 min en metanol/aigua
- rentat de 15 min en ACN i amb agitació

Aquest procediment afegeix un increment considerable de temps a l'anàlisi, fent poc eficient la utilització d'aquesta fibra.

Fibra PDMS/DVB

Es comprova la neteja per desorció en un vial amb ACN, 10 min a 30°C. No es detecten restes de fungicides.

A la següent figura es pot veure el resultat de comparar l'estat de neteja d'ambdues fibres just després d'una anàlisi.

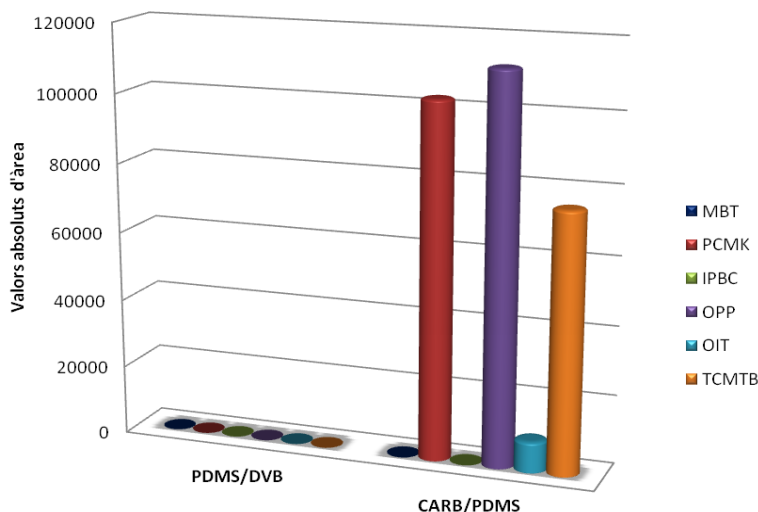


Fig. 45. Restes d'analits a les fibres PDMS/ DVB i Carboxen/PDMS, després d'una anàlisi.

La fibra PDMS/DVB no presenta presència de fungicides una vegada realitzada la desorció, la qual cosa suposa:

- bona capacitat de desorció, ja que no reté els analits una vegada entra en contacte amb l'eluent (alliberació quantitativa dels fungicides)
- no requereix una neteja exhaustiva, permetent rapidesa per a una nova utilització.

5.8. Conclusions proves preliminars

Després d'efectuar les proves preliminars per tal de seleccionar la fibra més adient a aquest estudi, s'ha trobat que la fibra 65 µm PDMS/DVB reuneix les següents característiques:

- presenta molt bona afinitat pel conjunt de molècules estudiades,
- allibera de manera quantitativa els analits durant l'etapa de desorció, i
- no necessita un procés de neteja específic.

Capítulo 6 . *Desenvolupament del procés de desorció*

6.1. *Efecte del pH de l'eluent de desorció*

Tal com s'ha vist en capítols anteriors (apartat 2.3 del capítol 2) la fase mòbil per l'anàlisi cromatogràfic d'aquestes molècules està ajustada a un pH lleugerament àcid (0,1 % d'àcid fòrmic). Per aquesta raó, s'ha comprovat si el pH pot influir en la desorció dels analits.

S'han conduït proves partint de les mateixes condicions inicials per l'extracció que en les proves anteriors, i el mateix per les condicions de desorció. En aquesta etapa s'ha variat el diluent de desorció, comparant ACN(60)/H₂O(40) enfront ACN(60)/H₂O(40) acidificat amb un 0,1 % d'àcid fòrmic.

<u>Solució d'extracció (mg/L)</u>	
MBT	0,40
PCMC	1,30
IPBC	1,50
OPP	1,10
OIT	0,50
TCMTB	1,40

Conté un 10% NaCl i 0.1 % d'àcid fòrmic

Condicions inicials d'extracció

<u>Condicions d'extracció</u>	
T ^a extracció:	45 °C
Temps:	35 min
Concentració sal (força iònica):	10 % NaCl

<u>Condicions de desorció. Efecte del pH</u>	
T ^a desorció:	30 °C
Temps:	30 min
Diluent de desorció:	ACN(60)/H ₂ O(40) i ACN(60)/H ₂ O(40) acidificat

Condicions de desorció

El següent gràfic representa els valors mitjos obtinguts en un duplicat, per a cada un dels analits. Es pot observar que la desorció no millora en medi àcid. Per tant, es decideix no acidificar l'eluent de desorció.

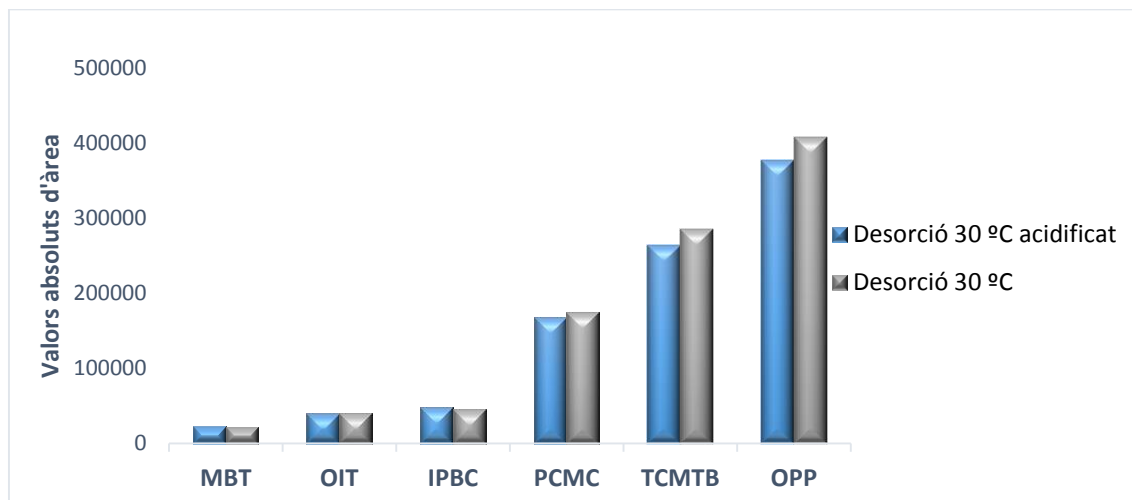


Fig. 46. Influència del pH de l'eluent de desorció. Fibra PDMS/DVB

6.2. Efecte de la temperatura de desorció

S'han conduït proves variant la temperatura de desorció. L'objectiu és buscar si hi ha possibilitat d'augmentar la recuperació dels analits per efecte de la temperatura. Es proven temperatures lleugerament inferior (25°C) i superior (45°C) a la de partida, mantenint les condicions d'extracció. La temperatura superior està limitada per la volatilitat de l'eluent de desorció.

Condicions d'extracció

T^a absorció:	45 °C
Temps:	35 min
Concentració sal (força iònica):	10 % NaCl

Condicions de desorció. Efecte de la temperatura

T^a desorció:	25, 30 i 45 °C
Temps:	30 min
Diluent de desorció:	ACN/H ₂ O (60/40)

El següent gràfic (Fig. 47) representa els valors mitjans obtinguts per duplicat. Es pot veure que a 25°C no s'obté tan bona resposta com a 30 i 45 °C, per la qual cosa aquesta temperatura s'exclou de l'estudi.

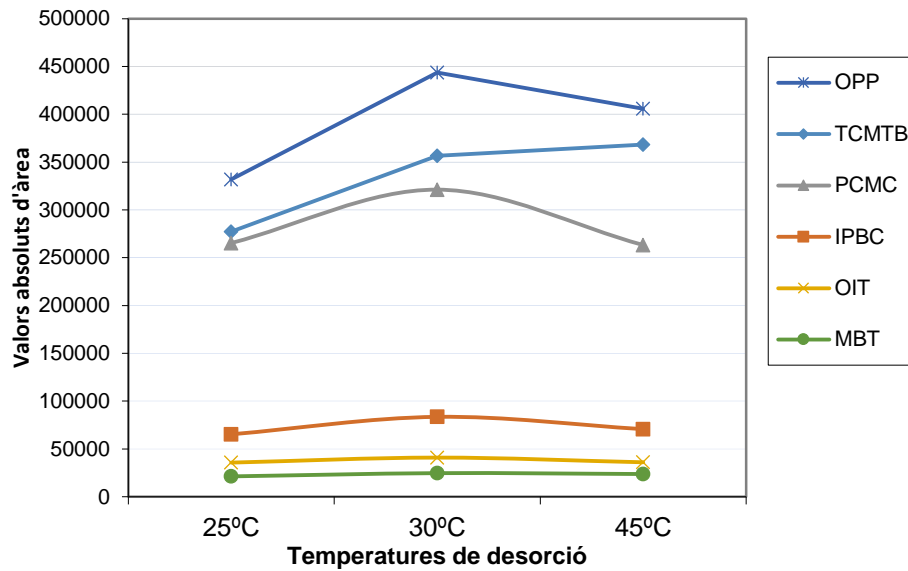


Fig. 47. Recuperació dels analits a diferents temperatures. Fibra PDMS/DVB

Es repeteix l'assaig per a les temperatures de 30 i 45°C (Fig. 48).

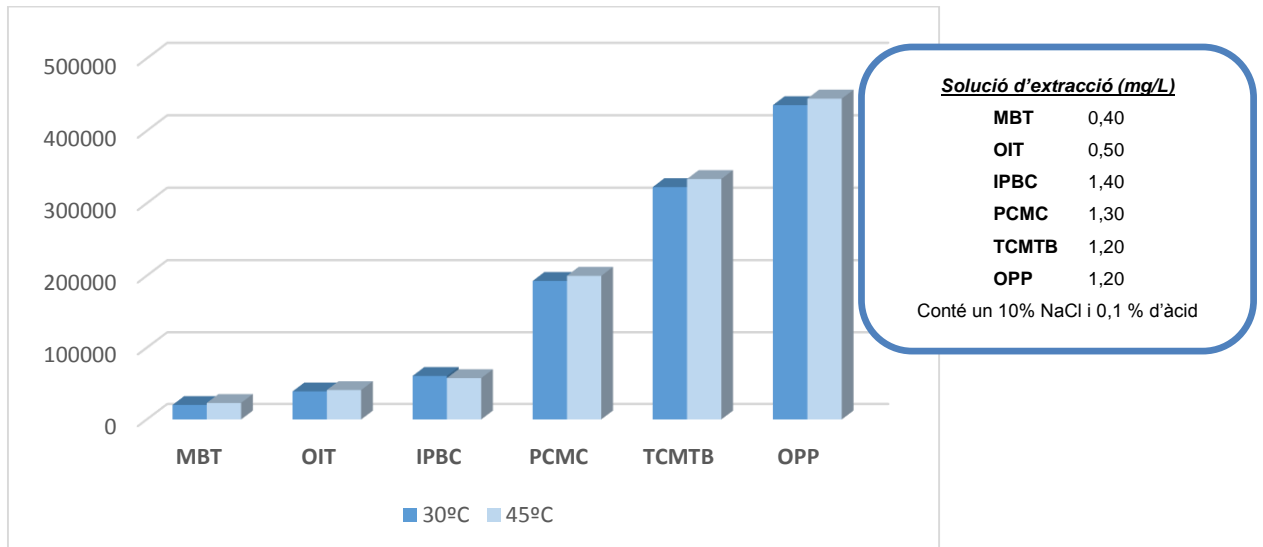


Fig. 48. Temperatures de desorció estudiades. Fibra PDMS/DVB

La millor sensibilitat de resposta per a la majoria de fungicides (a excepció de l'IPBC) ocorre a 45°C, per tant, és la temperatura fixada de desorció.

6.3. Efecte del temps de desorció

En aquest cas s'ha variat el temps de desorció.

Condicions d'extracció

T^a absorció: 45 °C
Temps: 35 min
Concentració sal (força iònica): 10 % NaCl

Condicions de desorció. Efecte del temps

T^a desorció: 45 °C
Temps: 5, 10, 15 i 30 min
Diluent de desorció: ACN/H₂O (60/40)

El següent gràfic representa els valors mitjos obtinguts per triplicat, efectuat en dies diferents. La quantitat recuperada d'analits (expressada com a valors absoluts d'àrea) no s'incrementen substancialment entre 15 i 30 min.

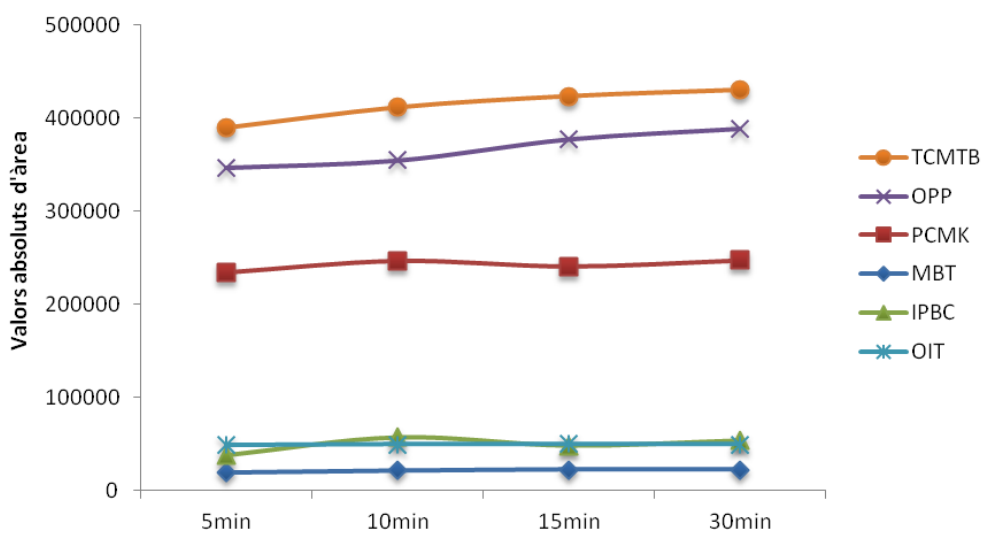


Fig. 49. Temps de desorció estudiats. Fibra PDMS/DVB

Aquest assaig es repeteix per a un interval de temps de 5, 10, 20 i 30 minuts.

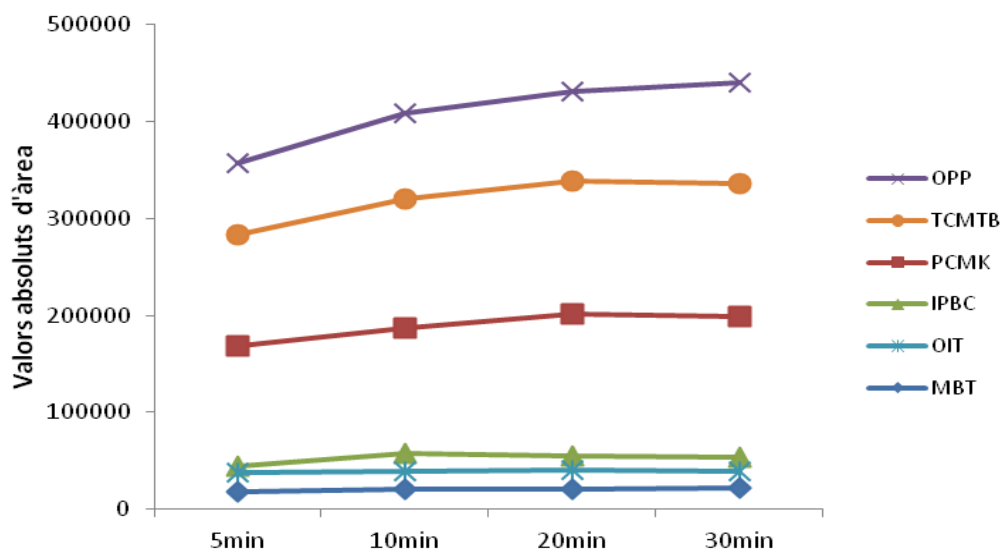


Fig. 50. Temps de desorció estudiats. Fibra PDMS/DVB

La recuperació dels analits en l'eluent de desorció és directament proporcional amb el temps de desorció fins aproximadament uns 20 minuts. Això vol dir que la fibra allibera pràcticament la totalitat dels analits en aquest temps.

6.4. Conclusions

Per tal de no allargar innecessàriament el temps d'anàlisi, s'opta per establir 20 minuts com a temps de desorció. Les condicions de desorció queden fixades així:

T^a desorció: 45 °C
 Temps: 20 min
 Diluent de desorció: ACN/H₂O (60/40)

Capítol 7. Ajustament del procés d'extracció

7.1. Efecte de la força iònica

Al capítol 4 s'han comentat les variables que afecten al procés SPME. D'entre d'altres, una d'aquestes variables és la força iònica de la solució analítica d'extracció, que es modifica per addició de clorur sòdic (es pot consultar el punt 4.5).

En el present capítol s'ha estudiat l'efecte de la concentració de sal en la solució d'extracció. S'han valorat 2 possibles concentracions: 5% i 15% de clorur sòdic (NaCl).

López Monzón et al. (2007) va estudiar concentracions més elevades de NaCl, entre el 15% i 30%, arribant a la conclusió que no millorava substancialment la resposta de l'àrea del pic cromatogràfic i, sobretot, **la fibra es podia danyar**. Per aquesta raó el límit superior s'ha fixat en 15 % de NaCl.

S'han mantingut fixes altres variables com pH i agitació (900 rpm).

Fibra 65 µm PDMS/DVB	
<u>Solució d'extracció (mg/L)</u>	
MBT	0,40
PCMC	1,30
IPBC	1,40
OPP	1,20
OIT	0,50
TCMTB	1,20
Conté un 0.1 % d'àcid fòrmic.	
<u>Condicions d'extracció</u>	
T^a extracció:	40 °C
Temps:	35 min
Concentració sal (força iònica):	5-15 % NaCl
<u>Condicions de desorció</u>	
T^a desorció:	45 °C
Temps:	20 min
Diluent de desorció:	ACN(60)/H ₂ O(40)

A la Fig. 51 es veuen representats els resultats obtinguts.

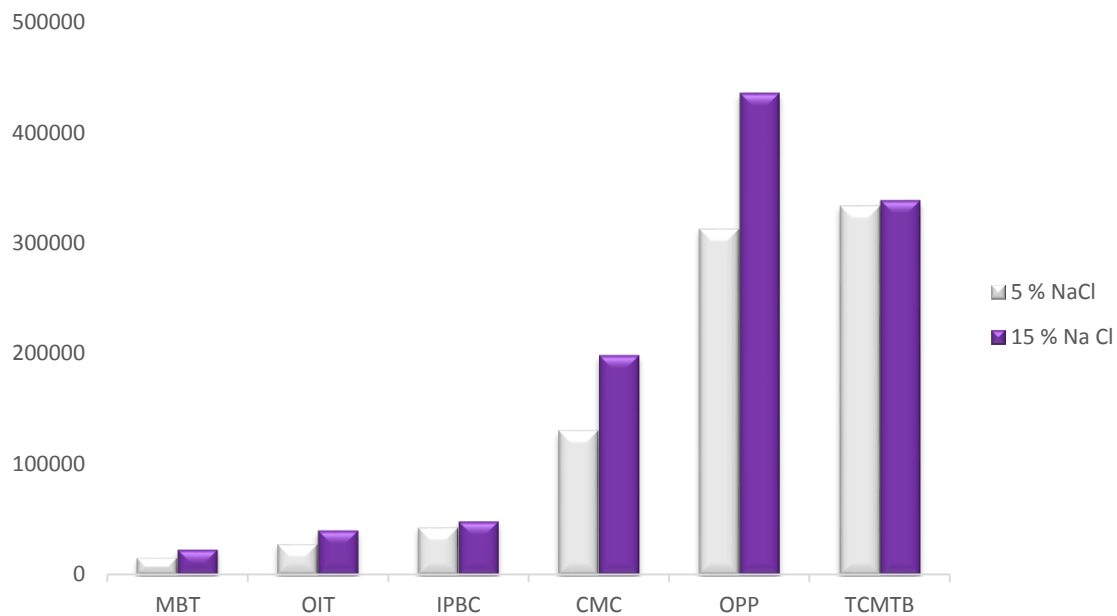


Fig. 51. Influència de la concentració de sal. Fibra PDMS/DVB

Per a tots els analits hi ha una clara influència de la concentració de sal en la solució d'extracció, encara que no sigui tan notable en el cas del TCMTB. Tal com era d'esperar, a major concentració de sal es recupera major quantitat d'analit.

7.2. Efecte de la temperatura d'extracció

S'ha valorat l'efecte de la temperatura d'extracció en la resposta obtinguda en la captació dels analits.

S'ha estudiat l'interval entre 30 i 75 °C, mantenint fixes els altres paràmetres: pH i agitació (900 rpm).

La temperatura s'ha limitat a 75°C per protegir l'estabilitat dels analits, alguns dels quals, com el TCMTB, són termolàbils, i per evitar la formació de bombolles per evaporació que duguin a un canvi en la homogeneïtat de l'estat físic de la mostra.

Fibra 65 µm PDMS/DVB	
Solució d'extracció (mg/L)	
MBT	0,40
PCMC	1,30
IPBC	1,40
OPP	1,20
OIT	0,50
TCMTB	1,20
Conté un 0,1 % d'àcid fòrmic.	
Condicions d'extracció	
T^a extracció:	30 – 75 °C
Temps:	35 min
Concentració sal (força iònica):	15 % NaCl
Condicions de desorció	
T^a desorció:	45 °C
Temps:	20 min
Diluent de desorció:	ACN(60)/H ₂ O(40)

En el següent gràfic es poden veure els resultats obtinguts. Per a tots els analits s'obté millor resposta a 30°C. Es fixarà aquesta temperatura de treball.

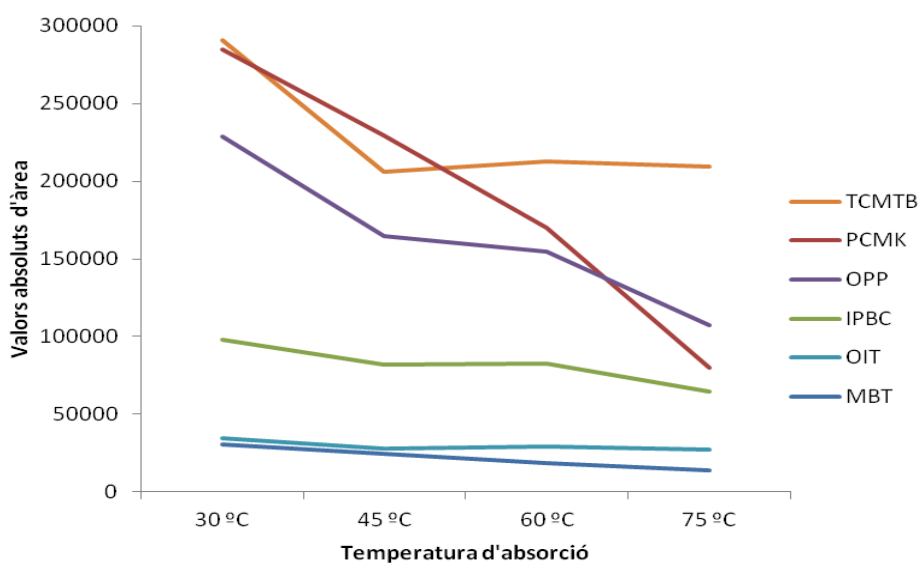


Fig. 52. Influència de la temperatura d'extracció. Fibra PDMS/DVB

7.3. Efecte del temps d'extracció i concentració de treball

Aquests 2 factors, temps d'extracció i concentració, s'estudien junts per la relació que guarden entre sí. Es tracta de trobar el rang de concentracions adequades per treballar, sense saturar la fibra. Al capítol 4, a l'apartat dedicat a explicar el mecanisme d'extracció d'una fibra, es comenten les característiques de les fibres adsorbents i absorbents. En concret la fibra seleccionada, la PDMS/DVB, és una fibra que actua per adsorció.

El funcionament de la fibra recordem que es basa en un equilibri entre la concentració de l'analit a la mostra i el recobriment de la fibra. Per tant, l'objectiu en aquest apartat és comprovar si s'assoleix l'equilibri en un temps no massa prolongat.

S'ha estudiat l'evolució de la resposta obtinguda en un interval de temps d'absorció que va des de 30 a 120 minuts. Això s'ha efectuat per a 3 nivells de concentració: alt, mitjà i baix.

	Nivell ALT ($\mu\text{g/L}$)	Nivell MITJÀ ($\mu\text{g/L}$)	Nivell BAIX ($\mu\text{g/L}$)
TCMTB	992	248	111
MBT	360	90	35
PCMC	752	188	62
IPBC	1840	460	161
OPP	520	130	85
OIT	270	68	35

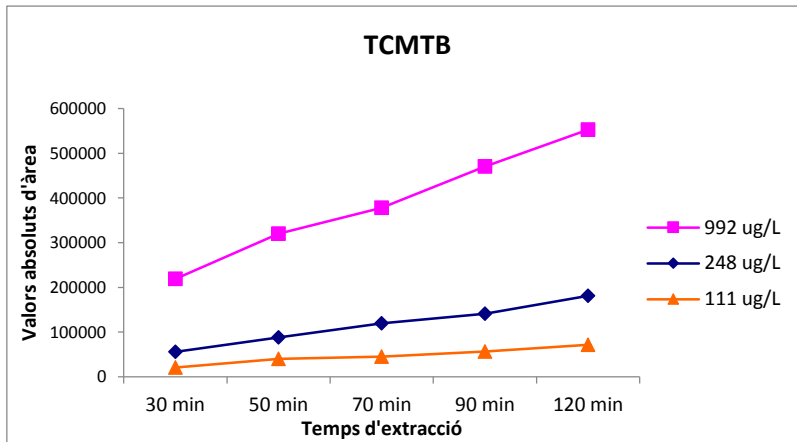
Taula 46. Nivell de concentracions estudiades

Cal recordar que el nivell més alt de concentració s'havia extret dels nivells trobats a la bibliografia, i és el nivell amb què s'han fet totes les proves preliminars.

Les concentracions del nivell mitjà i baix s'han establert tenint en compte la resposta cromatogràfica.

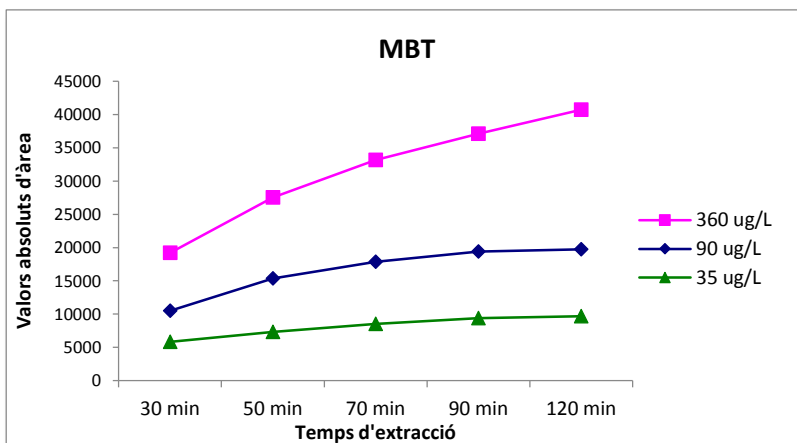
- Així, pel nivell mitjà s'han proposat concentracions de l'ordre d'un 25% respecte a les de nivell alt.
- Pel nivell baix, les concentracions s'han reduït en funció de la sensibilitat per a cada analit. D'aquesta manera han resultat concentracions que en el cas de l'IPBC representa el 65%, respecte al nivell mitjà, i en el cas del PCMC s'ha pogut reduir fins un 33%.

Els resultats obtinguts es poden veure en els següents gràfics. També s'hi han representat les equacions de les línies de tendència per a cada nivell:



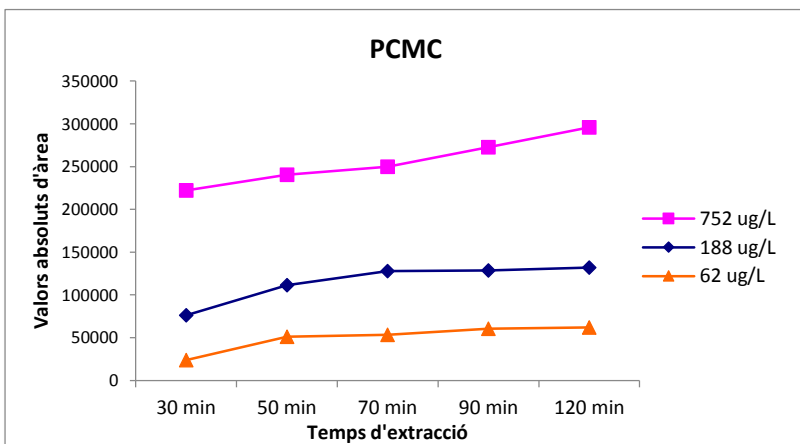
Nivell alt (992 µg/L)	$y=59733x+23758$
Nivell mitjà (248 µg/L)	$y=30055x+27161$
Nivell baix (111 µg/L)	$y=12673x+13842$

Fig. 53. Evolució de l'extracció amb el temps, pel TCMTB a 3 nivells de concentració.



Nivell alt (360 µg/L)	$y=4356x+19375$
Nivell mitjà (90 µg/L)	$y=1172x+13743$
Nivell baix (35 µg/L)	$y=1157x+5161$

Fig. 54. Evolució de l'extracció amb el temps, pel MBT a 3 nivells de concentració.



Nivell alt (752 µg/L)	$y=15820x+216738$
Nivell mitjà (188 µg/L)	$y=6247x+103090$
Nivell baix (62 µg/L)	$y=3066x+46822$

Fig. 55. Evolució de l'extracció amb el temps, pel PCMC a 3 nivells de concentració.

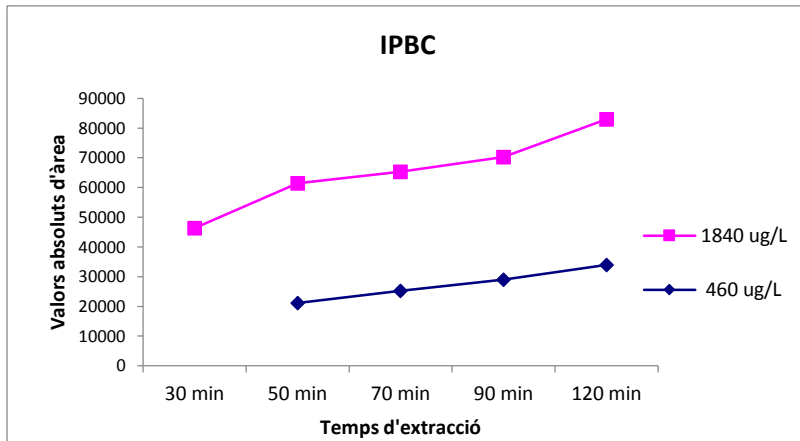


Fig. 56. Evolució de l'extracció amb el temps, pel IPBC a 2 nivells de concentració.

Equacions de les línies de tendència

Nivell alt (1840 µg/L)	$y=8200x+40686$
Nivell mitjà (460 µg/L)	$y=4243x+12482$
Nivell baix (161 µg/L)	-

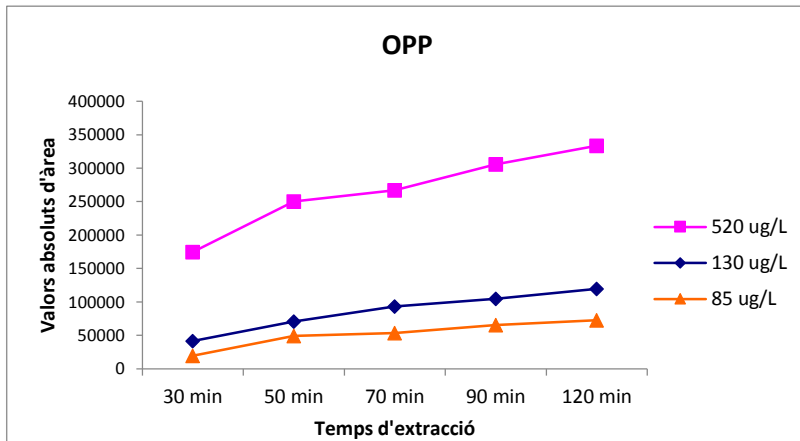


Fig. 57. Evolució de l'extracció amb el temps, pel OPP a 3 nivells de concentració.

Equacions de les línies de tendència

Nivell alt (520 µg/L)	$y=24247x+208085$
Nivell mitjà (130 µg/L)	$y=15826x+41594$
Nivell baix (85 µg/L)	$y=8045x+33910$

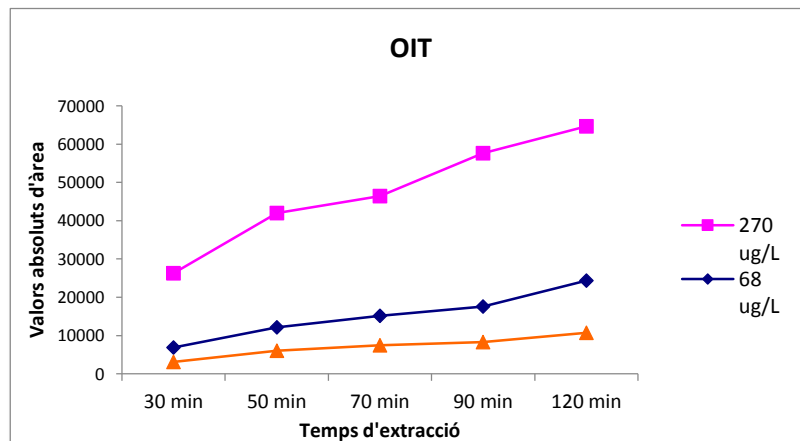


Fig. 58. Evolució de l'extracció amb el temps, pel OIT a 3 nivells de concentració.

Equacions de les línies de tendència

Nivell alt (270 µg/L)	$y=7045x+28736$
Nivell mitjà (68 µg/L)	$y=3897x+3673$
Nivell baix (35 µg/L)	$y=1904x+2099$

Per l'IPBC no s'han pogut obtenir dades pel nivell més baix proposat, així com pel temps més baix del nivell mitjà. La raó és que la concentració resultant està per sota del límit de detecció per aquest analit.

Observant els pendents de les línies de tendència per a cada un dels nivells de concentració es pot veure que el del nivell més baix és el de menor pendent, la qual cosa indica un perfil d'extracció més proper a l'equilibri, d'acord amb la Fig. 35 (apartat 4.6). També es dedueix que, si s'ha de treballar en condicions de no-equilibri, seria la situació més robusta, ja que petits increments en el temps d'extracció portarien a la obtenció de menys error en la quantificació.

Per poder estudiar amb més detall el perfil d'extracció del conjunt de fungicides, s'ha representat en un gràfic (Fig. 59. % de recuperació dels analits, per intervals de temps. Fig. 59) la recuperació obtinguda com a % d'increment de cada interval, sobre el total recuperat en 120 min. El intervals considerats han estat: de 30 a 50 min, de 50 a 70 min, de 70 a 90 min i de 90 a 120 min. S'observa que:

- per a la totalitat dels analits, la major recuperació té lloc en els primers 50 minuts d'extracció.

- per 3 dels 6 fungicides no augmenta la recuperació en l'interval dels 70 a 90 minuts: pels fungicides MBT, IPBC i OIT.

Valorant el comportament de la fibra pel conjunt dels analits, i tenint en compte el temps total necessari per completar una anàlisi, es decideix realitzar **l'extracció a un temps de 70 min.** La quantificació es realitzarà en condicions de no-equilibri, tal com s'expressava en l'apartat 4.6.1 i 4.7.

**Estudi del temps d'absorció.
Incrementos per intervals, expressats en %.**

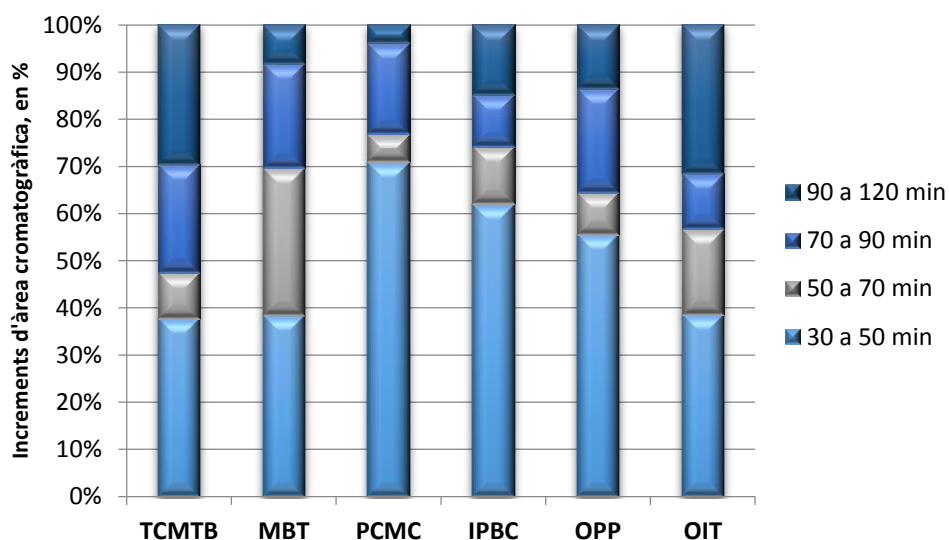


Fig. 59. % de recuperació dels analits, per intervals de temps.

7.4. Rang de concentració lineals

Per a cada un dels fungicides, s'han representat gràficament els 3 nivells de concentració (baix, mitjà, alt) estudiats, per tal de determinar si existeix una correlació lineal que serveixi com a punt de partida per a l'obtenció del rang de treball de les rectes de calibratge.

Es pot observar als gràfics següents que els 3 nivells de concentració estudiats no són lineals. La línia discontinua representada marcaria el rang lineal estimat.

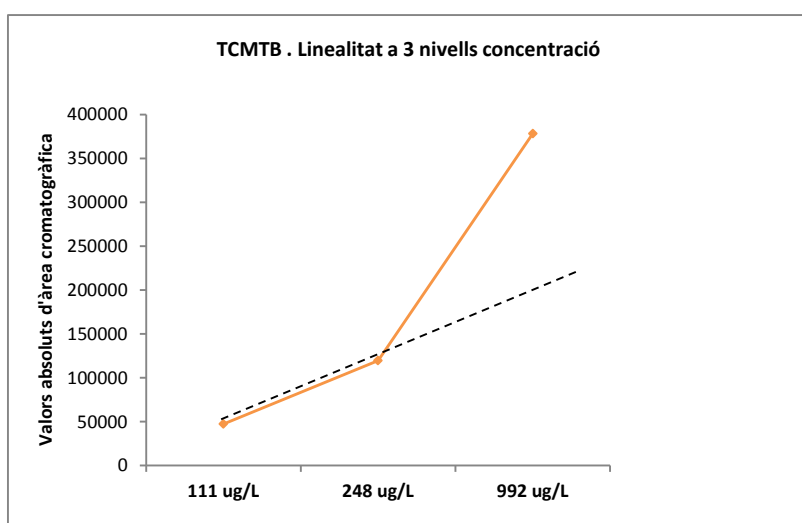


Fig. 60. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, TCMTB.

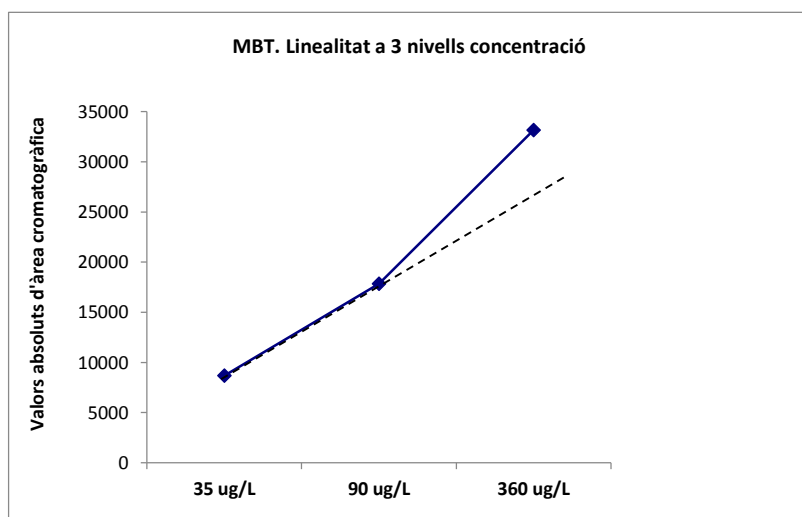


Fig. 61 Linealitat entre els 3 nivells de concentració, MBT.

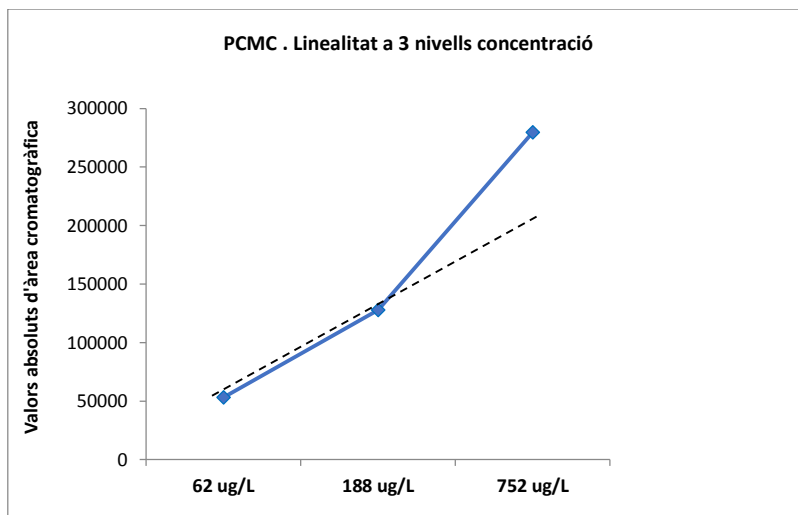


Fig. 62. . Linealitat entre els 3 nivells de concentració, PCMC.

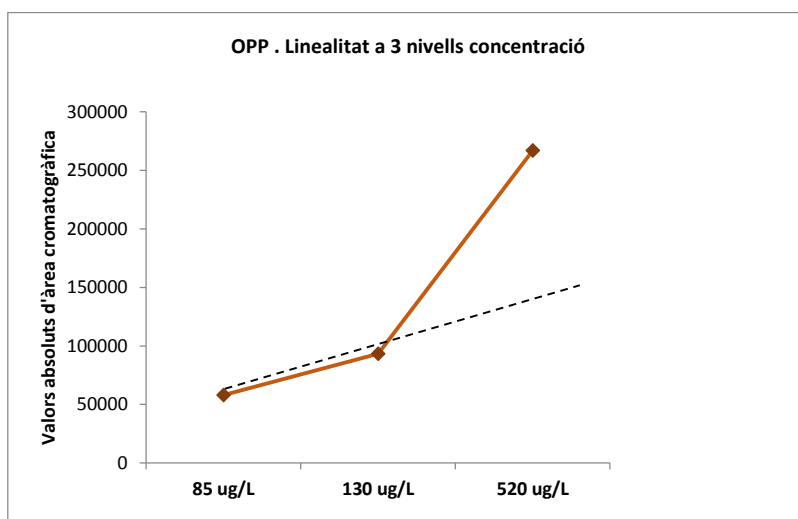


Fig. 63. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, OPP.

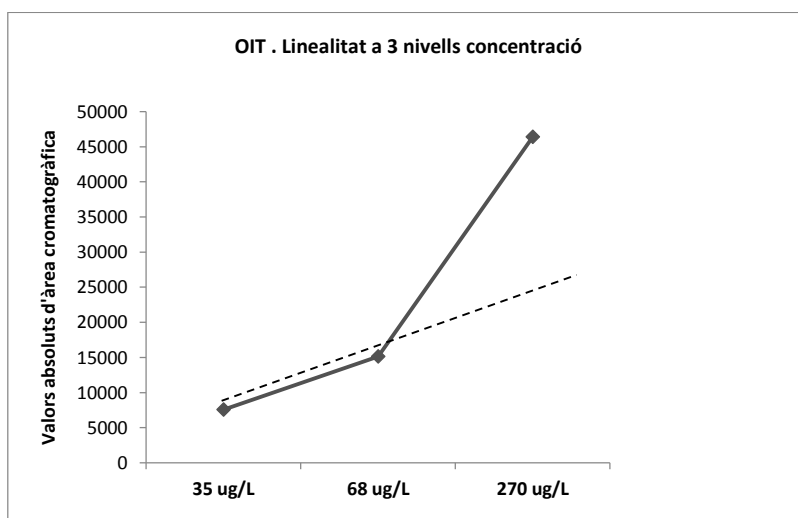


Fig. 64. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, OIT.

Tenint en compte els resultats obtinguts, s'ha obtingut informació suficient per poder proposar un rang de treball lineal.

S'ha considerat oportú treballar amb un rang de concentracions inclús una mica per sota de les concentracions mínimes investigades inicialment, ja que es disposa de suficient sensibilitat cromatogràfica. L'ampliació d'aquesta informació es pot consultar al capítol dedicat al calibratge i validació (capítols 8 i 9, respectivament).

De moment, el rang de concentracions proposat per elaborar un calibratge quedaria de la següent manera:

TCMTB:	40 - 250 µg/L
PCMC:	30 - 120 µg/L
OPP:	30 - 120 µg/L
MBT:	10 - 100 µg/L
OIT:	15 - 100 µg/L
IPBC:	200 - 800 µg/L

7.5. Conclusions

Efecte de la força iònica

- Després de verificar la influència de la força iònica, s'ha pogut fixar la concentració de sal adequada per treballar amb la fibra sense perjudicar-la: 15% de NaCl.

Temperatura d'extracció

- També s'ha fixat la temperatura d'extracció que proporciona la millor resposta en l'anàlisi: 30 °C.

Temps d'extracció i rangs de concentració lineal

S'ha pogut comprovar que l'extracció d'analits, per part de la fibra, augmenta amb el temps de contacte sense arribar a un equilibri.

Aquest augment progressiu en el temps és més suau pels rangs mitjà i baix, mentre que pel rang alt de concentracions aquest augment és força important. Numèricament es pot constatar comparant els pendents de les línies de tendència, per a cada una de les sèries de concentracions.

	Nivell ALT (equació línia tendència)	Nivell MITJÀ (equació línia tendència)	Nivell BAIX (equació línia tendència)
TCMTB	$y=59733x+23758$	$y=30055x+27161$	$y=12673x+13842$
MBT	$y=4356x+19375$	$y=1172x+13743$	$y=1157x+5161$
PCMC	$y=15820x+216738$	$y=6247x+103090$	$y=3066x+46822$
IPBC	$y=8200x+40686$	$y=4243x+12482$	-
OPP	$y=24247x+208085$	$y=15826x+41594$	$y=8045x+33910$
OIT	$y=7045x+28736$	$y=3897x+3673$	$y=1904x+2099$

Taula 47. Pendents de les línies de tendència de cada nivell de concentració

Tal com s'apuntava al capítol 4 (apartats 4.6.1 i 4.7.) dedicat al procés d'extracció en SPME, es pot efectuar un calibratge en condicions de "no-equilibri" quan el temps d'equilibri és massa prolongat. A l'apartat 4.7 dedicat al calibratge en SPME, es cita que es pot quantificar si es mantenen constants el temps d'extracció i les condicions d'agitació en tot el procés.

En resum, la informació obtinguda és la següent :

- després de 120 min d'extracció no s'assoleix l'equilibri. La quantificació s'haurà d'efectuar, doncs, en **condicions de no-equilibri**.
- després d'estudiar la recuperació en diferents intervals de temps, **s'estableix en 70 min el temps d'extracció**, buscant un compromís entre l'obtenció de resultats amb el màxim de sensibilitat pel conjunt dels analits, i una durada total de l'anàlisi en un temps no excessivament prolongat.
- Comparant la linealitat entre els 3 nivells de concentració, s'ha pogut proposar un rang de treball adequat per construir les rectes de calibratge. En els dos propers capítols es poden consultar els detalls referents al calibratge i a la validació del mètode.

Capítol 8. Calibratge

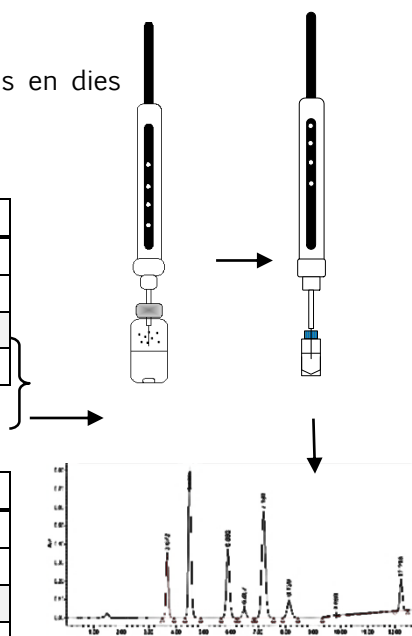
8.1. Patró intern (Pi)

Des dels primers resultats s'havia observat que les àrees obtingudes dels pics cromatogràfics, per a cada un dels fungicides, variaven per a un mateix duplicat, en iguals condicions, i amb la mateixa fibra.

Així, per exemple, pel TCMTB es van obtenir les següents dades en dies diferents:

Patrons TCMTB				
Dia 1	29 µg/L	59 µg/L	88 µg/L	147 µg/L
1a injecc (àrea pic)	16297	24203	48212	70839
2a injecc (àrea pic)	15449	24401	46537	75018
Mitjana àrees	15873	24302	47375	72929
% CV	3,8	0,6	2,5	4,05

Patrons TCMTB				
Dia 7	29 µg/L	59 µg/L	88 µg/L	147 µg/L
1a injecc (àrea pic)	19726	26553	51328	71473
2a injecc àrea pic)	15251	25483	48125	83954
Mitjana àrees	17489	26018	49727	77714
% CV	18,1	2,9	4,6	11,4



Taula 48. Resultats obtinguts per TCMTB en 2 anàlisis independents, en iguals condicions (valors absoluts d'àrea). A la dreta es representa la fibra en extracció, desorció i obtenció de dades cromatogràfiques.

A la vista de la falta de repetibilitat entre injeccions i entre duplicats efectuats en diferents dies, sorgeix la necessitat de treballar amb patró intern (Pi) (apartat 4.7.3.).

El primer candidat com a Pi va ser el 2,4,6-tribromofenol (TBP).

El TBP es un fungicida utilitzat en altres àmbits (fusta) i per tant gens probable trobar-lo en aigües de procés d'adoberia. A més és químicament semblant a la sèrie dels fungicides fenòlics analitzats, la qual cosa indicaria un comportament similar a la dels analits objectiu, a l'entrar en contacte amb la fibra.

Tal com està configurat el gradient de la fase mòbil, en el mètode cromatogràfic, aquest fungicida elueix al final de la sèrie amb un temps de retenció de 9.48 min.

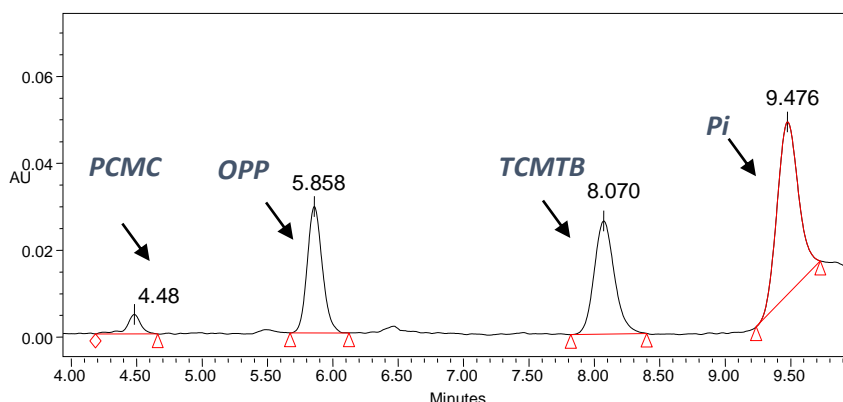


Fig. 65. Cromatograma amb el patró intern TBP

El problema que presenta és que coincideix amb un canvi de gradient i el pic apareix sobre una línia de base inclinada, la qual cosa dificulta una correcta integració. Posposar el canvi de gradient representaria demorar el temps de sortida del TBP, i un augment considerable del temps total de l'anàlisi.

El següent patró intern a provar és el 2,4,6-triclorofenol (TCP).

Aquesta molècula s'ha analitzat amb anterioritat al capítol 2, on ja han quedat establertes les condicions cromatogràfiques per a l'anàlisi simultani de 8 fungicides en cuir, incloent el 2,4,6-TCP. Com que les molècules de fungicides investigades en aquesta part són les mateixes, i també les condicions cromatogràfiques, la separació no presenta cap inconvenient.

Els temps de retenció de totes les molècules de fungicides són els següents:

Fungicides	Tr (min)	Long. d'ona (màxims)
MBT	3.66 ± 0.02	324 nm
PCMC	4.51 ± 0.05	201 nm i 228 nm
IPBC	5.48 ± 0.02	193 nm
OPP	5.90 ± 0.08	201 nm i 246 nm
OIT	6.49 ± 0.04	279 nm
TCMTB	8.08 ± 0.03	223 nm
TCP	7.09 ± 0.01	203 nm i 290 nm

Taula 49. Temps de retenció i longituds d'ona analítics (màxims)

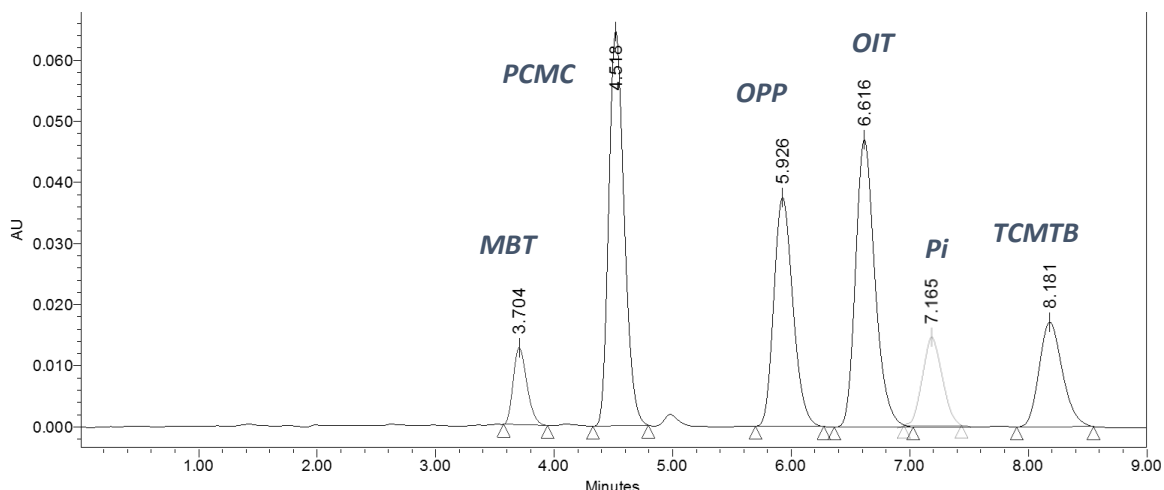


Fig. 66. Cromatograma amb el patró intern (Pi)

Caldrà investigar el comportament conjunt amb la resta de molècules, en relació a la fibra.

8.1.1. Concentració de treball del Pi

Seguint el mateix criteri de treball que per la resta dels analits (capítol 7), s'ha estudiat el perfil d'extracció en un interval de temps d'extracció que va des de 30 a 120 minuts. S'ha efectuat per a 3 nivells de concentració: alt, mitjà i baix, d'un ordre similar al dels analits estudiats.

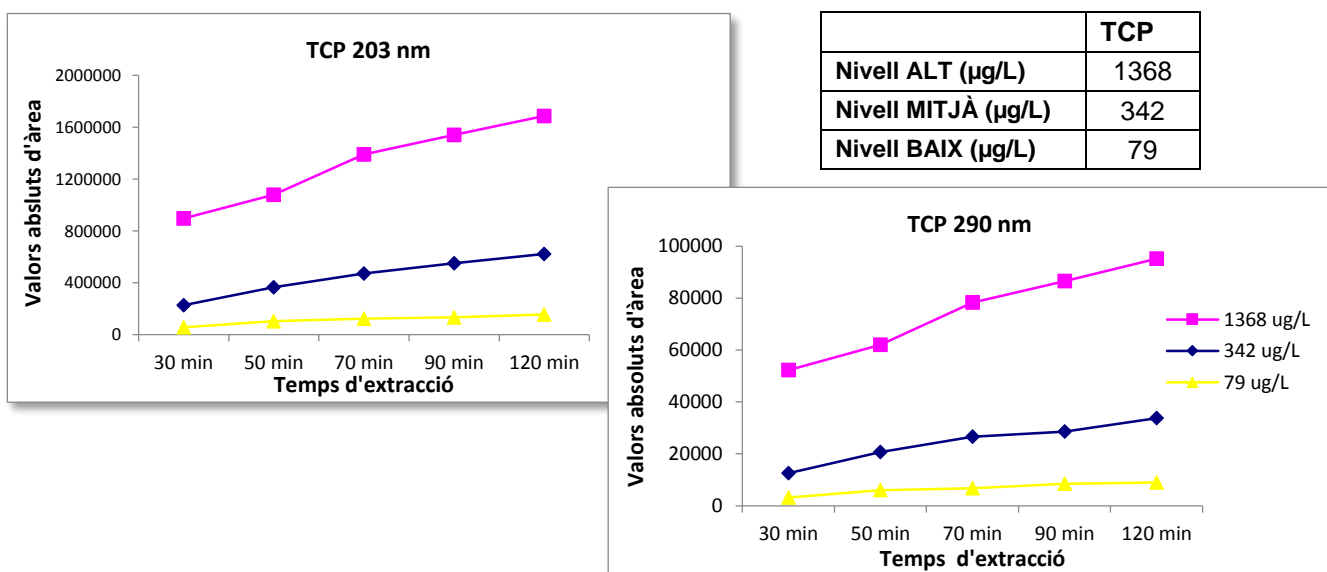


Fig. 67. Perfil d'extracció del TCP, a 3 nivells de concentració. Àrees a 2 longituds d'ona.

El perfil d'extracció del TCP segueix la mateixa línia que la resta de fungicides (cap. 7, apartat 7.3). En resum:

- La recuperació d'analit augmenta amb el temps de contacte de la fibra, sense arribar a un equilibri.
- Aquest augment progressiu és més suau pels rangs mitjà i baix.

8.1.2. Relació del Pi amb la resta d'analits

Per estudiar el comportament del Pi respecte dels altres analits, s'ha representat la proporcionalitat entre les àrees cromatogràfiques del fungicida i la del Pi en l'interval de temps estudiat (Fig. 68). L'objectiu d'aquesta representació és comprovar que hi ha un comportament uniforme del Pi i la resta d'analits en relació a la fibra, descartant una competència aleatòria pels espais lliures de la fibra.

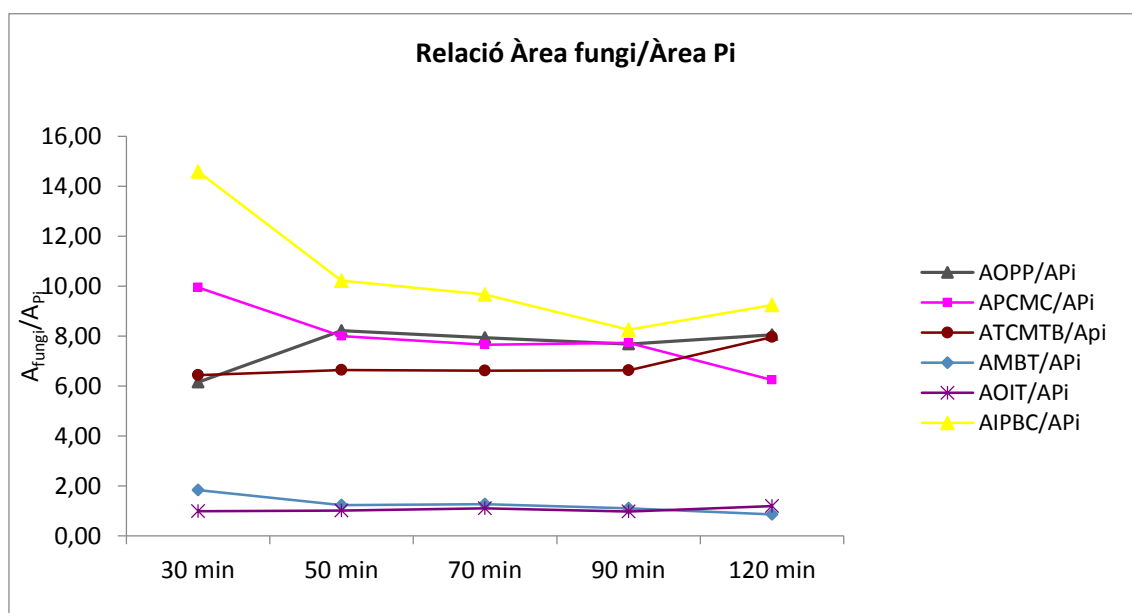


Fig. 68. Relació entre les àrees de cada fungicida i la del Pi, en l'interval d'extracció de 30 a 120 min

Es comprova que la relació entre les àrees dels fungicides i la del Pi es manté constant entre 50 i 90 min, per a la majoria dels fungicides. I més concretament, a l'interval de 70 min \pm 5 min, que és el temps d'extracció establert per a la determinació dels fungicides (veure capítol 7, dedicat a l'ajustament del procés d'extracció).

8.2. Calibratge extern vs calibratge amb patró intern (Pi)

S'ha comparat el calibratge extern amb el calibratge amb patró intern. A la següent taula es presenten els valors de les equacions de les rectes així com els coeficients lineals obtinguts. Les dades han estat obtingudes amb la mitjana de 2 calibratges realitzats en dies diferents.

	Calibratge extern	Coefficient de correlació (R ²)	Calibratge amb Pi	Coefficient de correlació (R ²)
TCMTB	$y = 547x - 317$	0,9978	$y = 6,552x - 0,3052$	0,9984
MBT	$y = 176x - 216$	0,9899	$y = 2,159x - 0,0399$	0,9982
PCMC	$y = 139x + 901$	0,9965	$y = 1,640x + 0,1173$	0,9998
IPBC	$y = 75,9x + 4316$	0,9999	$y = 0,9927x + 0,2859$	0,9984
OPP	$y = 380x - 330$	0,9984	$y = 4,465x - 0,0428$	0,9999
OIT	$y = 145x + 719$	0,9985	$y = 2,046x - 0,0125$	0,9998

Taula 50 . Taula de correlacions entre calibratge extern vs calibratge amb Pi

Tot i que el calibratge extern té una bona correlació lineal, el calibratge amb patró intern soluciona l'inconvenient d'obtenir diferent resposta d'àrees cromatogràfiques per a un mateix duplicat.

Al següent capítol es detallen els resultats de la validació del mètode.

8.3. Conclusions

A la vista de la falta de repetibilitat entre injeccions i entre duplicats efectuats en diferents dies, sorgeix la necessitat de treballar amb patró intern (Pi).

Es decideix utilitzar el 2,4,6-TCP. Es comprova que té un comportament uniforme amb la resta d'analits en relació a la fibra, descartant una competència aleatòria pels espais lliures de la fibra. És uniforme en un ampli interval de temps, però sobretot en l'interval d'absorció: de 70 min \pm 5 min.

S'ha verificat que s'obté una bona correlació en el calibratge amb patró intern.

En el proper capítol es procedeix a validar el mètode.

Capítol 9. Validació del mètode d'anàlisi de fungicides en mostres aquoses

9.1. Criteris de validació d'un mètode analític

La validació d'un mètode és fonamental per assegurar que el mètode sigui fiable. Els criteris fonamentals de la validació comprenen els següents conceptes: selectivitat, linealitat i rang, exactitud, precisió i límit de detecció (A.E.F.I. 2001). Les definicions d'aquests termes es poden consultar al capítol 3.

9.2. Selectivitat

La selectivitat del mètode ja s'ha comentat al capítol 3, a l'apartat 3.3. En aquest apartat s'argumenta la selectivitat del mètode cromatogràfic tenint en compte dos paràmetres: el temps de retenció i l'espectre ultraviolat per a cada substància.

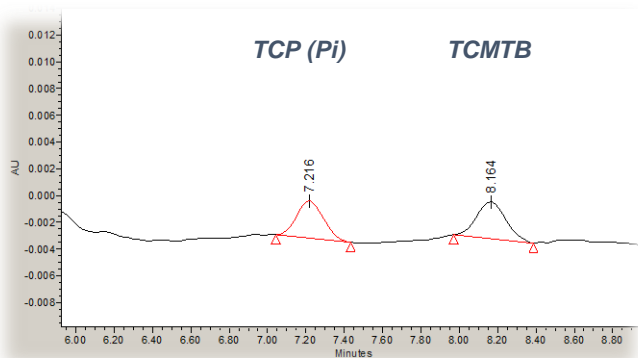


Fig. 69. Cromatograma obtingut a 223 nm

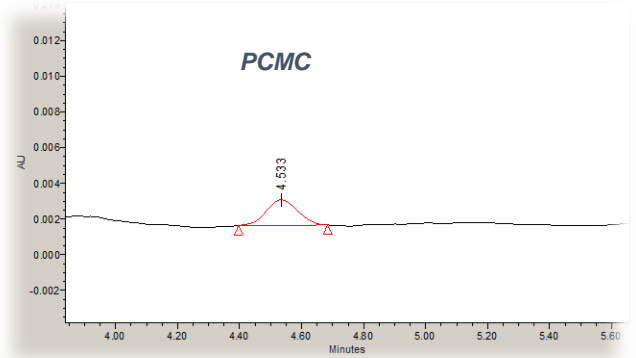


Fig. 70 Cromatograma obtingut a 228 nm

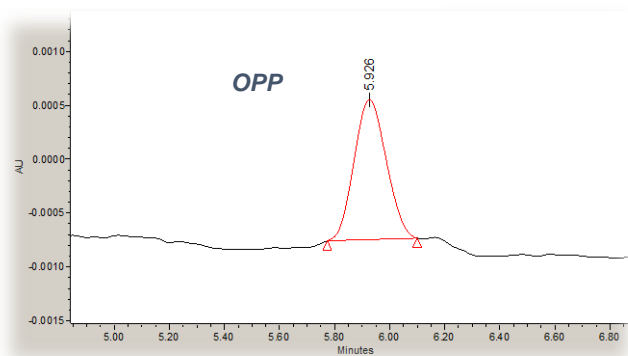


Fig. 72. Cromatograma obtingut a 246 nm

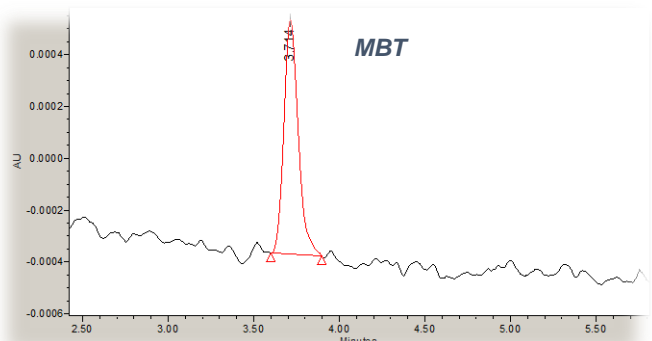


Fig. 71. Cromatograma obtingut a 324 nm

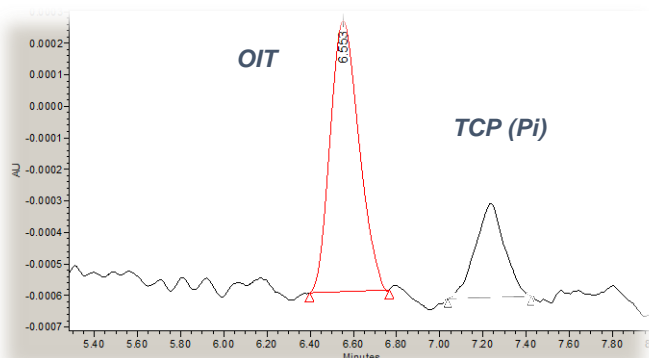


Fig. 73. Cromatograma obtingut a 279 nm

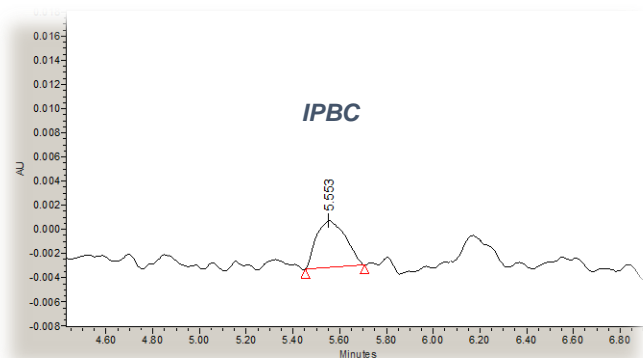


Fig. 74. Cromatograma obtingut a 193 nm

9.3. Linealitat i rang

El rang lineal es va investigar en el capítol 7 (apartat 7.4.) on es va poder acotar l'interval de concentracions de treball.

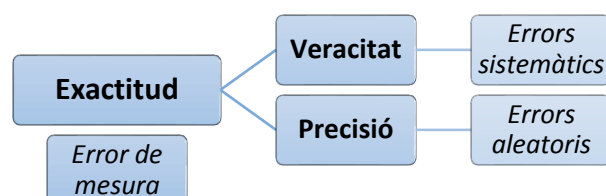
A la següent taula s'expressen les rectes de regressió obtingudes, així com els coeficients de correlació, per a cada un dels fungicides. S'ha comprovat la bondat de l'ajust lineal mitjançant el contrast F de l'anàlisi ANOVA, verificant-se que $F_{exp} > F_{taules}$. Els detalls dels càlculs es poden consultar a l'annex 1.

Analit	Longitud d'ona (nm)	Rang ($\mu\text{g/L}$)	Equació calibratge amb Pi	Coefficient de correlació (r)	ANOVA (contrast F)
TCMTB	223	49 - 244	$y = 6,552x - 0,3052$	0,9992	$F_{exp} > F_t$
MBT	324	18 - 91	$y = 2,159x - 0,0399$	0,9991	$F_{exp} > F_t$
PCMC	228	27 - 136	$y = 1,640x + 0,1173$	0,9999	$F_{exp} > F_t$
IPBC	193	199 - 995	$y = 0,9927x + 0,2859$	0,9992	$F_{exp} > F_t$
OPP	246	14 - 71	$y = 4,465x - 0,0428$	0,9999	$F_{exp} > F_t$
OIT	279	22 - 108	$y = 2,046x - 0,0125$	0,9999	$F_{exp} > F_t$

Taula 51. Linealitat i rang dels calibratges

9.4. Exactitud i veracitat

“**Exactitud**” de mesura: Grau de concordança entre el resultat d'una mesura i el valor de referència acceptat. Quan s'aplica a un conjunt de resultats de mesures implica la combinació d'errors aleatoris i un error sistemàtic o biaix. (ISO 5725-1, ISO 3534-1).



Veracitat: Grau de concordança entre el valor mig obtingut a partir d'una sèrie de resultats i un valor de referència acceptat. (ISO 3534-1).

Per poder realitzar el càlcul de veracitat del mètode a validar cal disposar d'un valor de referència. Aquest valor es pot obtenir:

- a partir d'una referència externa (material de referència certificat o mostra obtinguda a partir d'un programa interlaboratori).
- per comparació de mètodes: comparació interna (mostra analitzada per diferents mètodes al propi laboratori) o comparació externa (participació en un programa interlaboratori).
- mitjançant el **mètode d'adicions i posterior estudi de recuperació**.

9.4.1. Disseny de l'estudi de veracitat

L'estudi de veracitat s'ha dut a terme per determinació de la recuperació, fortificant una matriu blanca, amb cada un dels fungicides, i posterior anàlisi.

La matriu consta de bany de crom, procedent del procés d'adobatge d'una pell lliure de fungicides efectuat en planta pilot (matriu obtinguda durant l'elaboració del *Proyecto del Plan Nacional I+D+i "Aplicación de nuevos compuestos fungicidas mediambientalmente sostenibles (CTQ2009-08347)"* (Cuadros et al. 2013).

Per a la preparació de la solució analítica s'ha seguit el PNT Aq001: Determinació de fungicides en banys per SPME-HPLC.

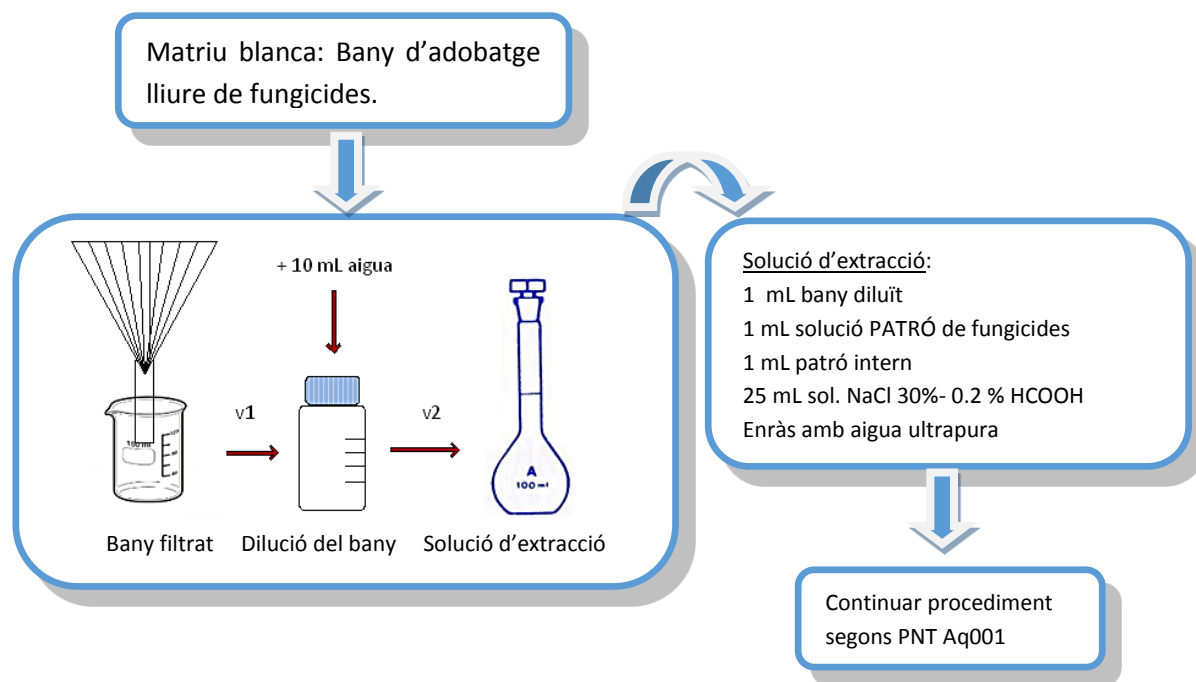


Fig. 75. Preparació de la solució analítica de l'estudi de veracitat

9.4.2. Resultats de l'estudi de veracitat

L'estudi de veracitat s'ha realitzat per quintuplicat. A la Taula 52 es presenten els resultats obtinguts:

- Les recuperacions individuals (Rec_1 a Rec_5). Cada resultat és el promig de 2 injeccions cromatogràfiques.
- El valor mig de les recuperacions ($Rec_{Mitjana}$).
- La desviació estàndard relativa (RSD) obtinguda en les 5 determinacions.

Recordem que la recuperació s'ha obtingut segons la fórmula:

$$\% Rec = \frac{\bar{X}}{\mu} \cdot 100 ,$$

essent \bar{X} el valor d'analit mesurat i μ el valor teòric d'analit addicionat.

El coeficient de variació o desviació estàndard relativa (RSD) s'ha calculat segons la fórmula:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100$$

essent s la desviació estàndard i \bar{X} la mitja aritmètica dels resultats.

<i>Estudi de recuperacions</i>							
Fungicides	% Rec ₁	% Rec ₂	% Rec ₃	% Rec ₄	% Rec ₅	% Rec Promig	% RSD
TCMTB	100	95	94	92	95	95	8,6
PCMC	115	123	121	114	107	116	11,6
OPP	82	96	90	80	91	88	7,7
MBT	73	88	80	94	75	82	11,7
OIT	94	114	85	104	100	99	12,2
IPBC	76	81	88	87	78	85	9,1

Taula 52. Estudi de recuperacions

9.4.3. *Conclusions de l'estudi de veracitat*

Com a criteri d'acceptació pels valors de recuperació es podria utilitzar el criteri d'acceptació de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (AOAC International 2012). En aquest cas cal buscar el valor de concentració esperat de l'analit i veure quin rang teòric de recuperació és acceptable. Per a les concentracions estudiades el rang acceptable se situa entre 80-110%.

Les recuperacions dels fungicides estudiats compleixen el criteri d'acceptació de la AOAC, a excepció del PCMC que resulta lleugerament fora del rang (veure Taula 52). Tot i això, s'han trobat publicacions relacionades amb la tècnica SPME amb recuperacions obtingudes dins el rang 80-120% (López Monzón et al. 2007; Rosero-Moreano, Canellas i Nerín 2014). Tenint això en compte, podem considerar que tots els valors de recuperació, incloent el del PCMC, estan dins el rang normal de treball, i l'estudi de veracitat és del tot satisfactori.

9.5. Precisió

Precisió: Grau de concordança entre assajos independents obtinguts sota unes condicions determinades. La precisió depèn només de la distribució d'errors aleatoris i no té cap relació amb el valor verdader o el valor especificat. (ISO 5725-1, ISO 3534-1).

La precisió es pot estudiar a 3 nivells:

Repetibilitat: precisió obtinguda sota les mateixes condicions operatives (mateix mètode, analista i instrument de mesura) en un interval curt de temps.

Precisió intermèdia o reproductibilitat interna: precisió obtinguda sota les mateixes condicions operatives (mateix mètode, analista i instrument de mesura) però diferent dia.

Reproductibilitat: precisió obtinguda en diferents condicions operatives (mateix mètode però diferents analistes, diferents instruments, etc.).

9.5.1. Disseny de l'estudi de precisió

Estudi de repetibilitat

L'estudi de repetibilitat s'ha realitzat a partir de solucions de concentració coneguda. S'han preparat 2 nivells de concentracions per a cada analit, i s'han analitzat per quintuplicat el mateix dia. Cada resultat correspon a la mitjana de 2 injeccions cromatogràfiques. Els resultats es poden veure a la Taula 54.

Estudi de precisió intermèdia

Per a l'estudi de reproductibilitat s'han preparat solucions de 3 nivells de concentració i s'han analitzat en 3 dies diferents. Cada resultat correspon a la mitjana de 2 injeccions cromatogràfiques. Els resultats es poden veure a la Taula 55.

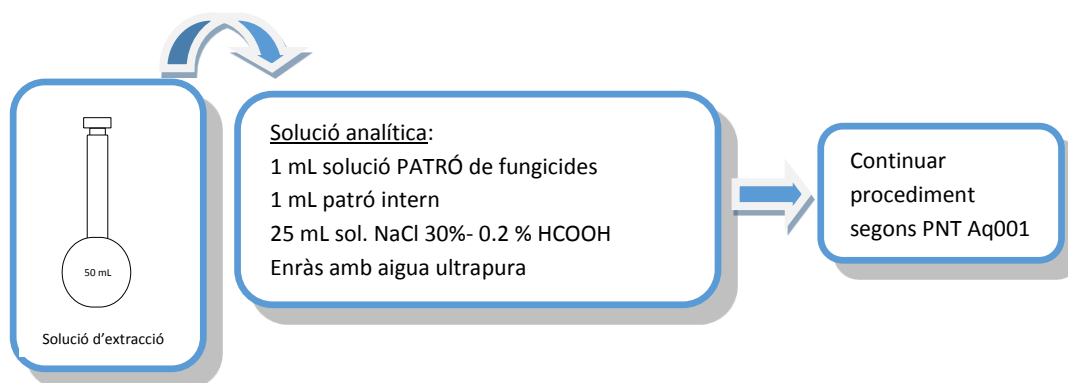


Fig. 76. Esquema de la preparació de la solució analítica de l'estudi de precisió

9.5.2. Resultats de l'estudi de precisió

Per a la valoració dels resultats s'ha emprat el model de precisió de Horwitz (Horwitz 1982), en base a l'equació:

$$RSD_H (\%) = 2^{(1-0,5 \cdot \log C)} \quad (\text{Equació 6})$$

On C és la concentració d'analit en tant per u (o potència de 10). (Consultar la taula 53).

Concentració		% RSD _H
10 ⁻⁶	1 ppm	16,0
10 ⁻⁵	10 ppm	11,3
10 ⁻⁴	100 ppm	8,0
10 ⁻³	0,10 %	5,7
10 ⁻²	1%	4,0
10 ⁻¹	10 %	2,8
1	100 %	2,0

Taula 53. Correspondència entre % RSD Horwitz i la concentració

En anàlisis realitzades en condicions de **repetibilitat (r)**, es recomana² que les RSD siguin inferiors a la meitat del nivell calculat mitjançant l'equació de Horwitz,

$$\% RSD_r < \frac{1}{2} \% RSD_H$$

En anàlisis realitzades en condicions de **reproductibilitat (R)** interna (intralaboratori) o precisió intermèdia, es recomana que les RSD siguin inferiors a 2/3 parts del nivell calculat mitjançant l'equació de Horwitz,

$$\% RSD_R < \frac{2}{3} \% RSD_H$$

El valor de RSD obtingut es compara amb el predit per Horwitz (RSD_H) mitjançant el paràmetre Horrat (Horwitz 1982):

$$r \text{ Horrat} = \frac{RSD}{RSD_H} \quad (\text{Equació 7})$$

Si el valor del paràmetre Horrat es igual o menor a 2 es pot predir que el mètode té valors acceptables (Wood 1999).

A les taules 54 i 55 es poden consultar els resultats obtinguts de l'estudi de precisió, en els seus dos apartats de repetibilitat i reproductibilitat interna (precisió intermèdia).

² Decisió de la Comissió 2002/657/CE- Directiva 96/23 CE *Funcionamiento de métodos*



Estudi de repetibilitat

	Conc (µg/L)	$A_{fun}/A_{pi} (1)$	$A_{fun}/A_{pi} (2)$	$A_{fun}/A_{pi} (3)$	$A_{fun}/A_{pi} (4)$	$A_{fun}/A_{pi} (5)$	$A_{fun}/A_{pi} (mig)$	S	% RSD	% RSD _H (r)	r Horrat
TCMTB	29,5	2,197	1,631	1,765	2,177	1,992	1,95	0,24	12,30	13,60	0,90
	147	9,932	8,127	8,795	9,872	10,619	9,17	0,85	9,24	10,68	0,87
PCMC	27,2	0,602	0,536	0,578	0,531	0,520	0,54	0,04	7,34	13,76	0,53
	136	3,010	2,900	2,681	2,656	2,598	2,77	0,21	7,42	10,80	0,69
OPP	14,1	0,717	0,672	0,697	0,693	0,714	0,70	0,02	3,42	15,19	0,22
	70,6	3,590	3,311	3,367	3,469	3,575	3,46	0,14	4,09	11,92	0,34
MBT	18,4	0,433	0,449	0,499	0,427	0,446	0,45	0,03	6,21	14,60	0,43
	92	2,169	1,795	2,143	2,105	2,228	2,09	0,16	7,88	11,46	0,69
OIT	21,5	0,534	0,483	0,477	0,479	0,481	0,48	0,01	1,85	14,26	0,13
	108	2,427	2,396	2,421	2,408	2,418	2,41	0,06	2,60	11,18	0,23
IPBC	199	2,708	2,092	2,375	2,105	2,180	2,34	0,34	10,01	10,20	0,98
	995	10,38	10,46	9,78	10,53	10,52	10,32	1,47	11,46	8,01	1,43

Taula 54. Resultats de l'estudi de repetibilitat

A_{fun} = àrea cromatogràfica de l'analit	RSD = desviació estàndard relativa	r Horrat = paràmetre de Horrat, en condicions de repetibilitat
S = desviació estàndard	RSD _H (r) = desviació estàndard relativa de Horwitz, en condicions de repetibilitat	

Estudi de reproductibilitat interna

Fungicides	Conc (µg/L)	Dia 1 - fibra 1 A_{fun}/A_{pi}	Dia 2 - fibra 2 A_{fun}/A_{pi}	Dia 3 - fibra 2 A_{fun}/A_{pi}	A_{fun}/A_{pi} (valor mig)	S	% RSD	% RSD _H (R)	R Horrat
TCMTB	29,5	1,816	2,320	2,396	2,177	0,32	14,47	18,13	0,80
	88,4	6,559	6,522	5,935	6,339	0,35	5,53	15,37	0,36
	147	10,556	9,914	10,623	10,364	0,39	3,78	14,24	0,27
PCMC	27,2	0,495	0,676	0,602	0,591	0,09	15,43	18,35	0,84
	81,6	1,89	1,682	1,594	1,723	0,15	8,93	15,55	0,57
	136	2,958	2,724	2,599	2,760	0,18	6,61	14,40	0,46
OPP	14,1	0,654	0,754	0,716	0,708	0,05	7,15	20,26	0,35
	42,2	2,156	2,094	2,083	2,111	0,04	1,85	17,18	0,11
	70,6	3,516	3,372	3,575	3,488	0,10	2,99	15,90	0,19
MBT	18,4	0,523	0,565	0,433	0,507	0,07	13,29	19,46	0,68
	55,2	1,227	1,497	1,262	1,329	0,15	11,05	16,50	0,67
	92,0	2,444	2,562	2,228	2,411	0,17	7,02	15,28	0,46
OIT	21,5	0,534	0,483	0,486	0,501	0,03	5,67	19,01	0,30
	64,6	1,666	1,440	1,432	1,513	0,13	8,78	16,11	0,55
	108	2,558	2,418	2,450	2,475	0,07	2,95	14,91	0,20
IPBC	199	2,074	2,714	2,893	2,560	0,43	16,83	13,60	1,24
	597	7,632	7,125	6,341	7,033	0,65	9,25	11,53	0,80
	995	11,022	10,901	10,525	10,816	0,26	2,40	10,67	0,22

Taula 55. Resultats de l'estudi de reproductibilitat

A_{fun} = àrea cromatogràfica de l'analit	RSD = desviació estàndard relativa	R Horrat = paràmetre de Horrat, en condicions de reproductibilitat
S = desviació estàndard	RSD _H (R) = desviació estàndard relativa de Horwitz, en condicions de reproductibilitat	

9.5.3. Conclusions de l'estudi de precisió

L'estudi de precisió compleix el criteri d'acceptabilitat establert, segons el model de precisió de Horwitz.

Les desviacions estàndard obtingudes són acceptables, tenint en compte el conjunt de variables que afecten al procés.

9.6. Càlcul de la incertesa del mètode

Al capítol dedicat a l'anàlisi de fungicides en pell, a l'apartat 3.8 s'explica el mètode de càlcul per a la incertesa. En aquest capítol s'ha aplicat el mateix mètode de càlcul.

9.6.1. Resultats

A la Taula 56 es presenten els valors estimats de les incerteses per a cada un dels fungicides. L'estimació s'ha obtingut a partir de l'equació de Horwitz (Codex Committee on Pesticide Residues 2011):

$$u' = 2^{(1-0,5 \cdot \log C)}$$

On u' = és la desviació estàndard relativa en condicions de reproductibilitat.

C = és la concentració d'analits (en tant per u).

La incertesa expandida U_{exp} (al nivell de 95% de confiança) serà $U_{exp}=2u'$. A la següent taula s'expressa la incertesa expandida (U_{exp}) en %, i l'expressió en valor absolut sobre un resultat concret.

Fungicida	Incertesa U_{exp} (%)	Exemple mg/L	Incertesa expandida (U_{exp})	Expressió
PCMC a 228 nm	20,8	17,5	3,6	18 ± 4
OPP a 246 nm	23,9	7,0	1,67	$7,0 \pm 1,7$
OIT a 279 nm	20,9	16,8	3,5	17 ± 4
IPBC a 193 nm	15,3	135	21	135 ± 21
TCMTB a 223 nm	21,2	15,6	3,3	16 ± 3
MBT a 324 nm	20,0	22,5	4,5	23 ± 5

Taula 56. Estimació de la incertesa en l'anàlisi de fungicides en mostres aquoses

Robustesa del mètode

Per tal d'avaluar la robustesa del mètode s'ha realitzat una anàlisi estadística entre les corbes de calibratge obtingudes en un període de diferència de 4 mesos.

La comparació dels pendents és un indicador de la robustesa del mètode, ja que involucra diversos factors de variació com l'envelliment de la fibra, preparació de nous reactius, o diferències en la velocitat d'agitació o en el control del temps.

Al següent gràfic s'han representat les variables detectades en cada etapa del mètode:

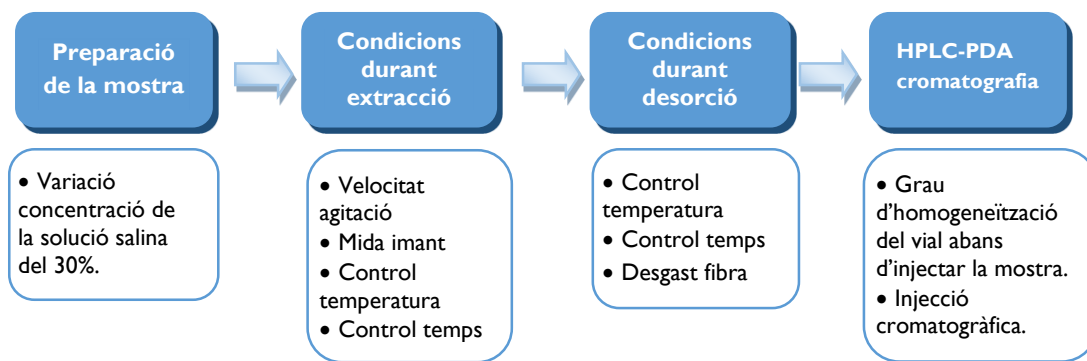


Fig. 77. Variables introduïdes en cada etapa del procés.

Per tal d'avaluar el model lineal de la corba de calibratge, s'utilitza com a indicador la prova *t-Student* (Blanco, Cerdà i Universitat de les Illes Balears. Servei de Publicacions i Intercanvi Científic 2007):

1- Es comprova primer, utilitzant una prova F, que les desviacions estàndard dels residuals ($S_{y/x}$) de cada una de les rectes no difereixen significativament. Això indicarà si les dades pertanyen a una mateixa població.

$$F_{exp} = \frac{(S_{y/x})_1^2}{(S_{y/x})_2^2} \quad \text{assumint que } (S_{y/x})_1^2 > (S_{y/x})_2^2$$

El valor calculat es compara amb el de les taules amb (n_1-2) i (n_2-2) graus de llibertat (n_i és el número de punts que conté cada recta de calibratge). Si el valor de $F_{exp} < F_{taules}$ ambdues rectes pertanyen a la mateixa població.

En aquest cas es podrà calcular un valor $(S_{y/x})_0$ mitjà i a partir d'aquest la desviació estàndard de la diferència entre ambdues pendents, $S_{b_1-b_2}$.

$$(S_{y/x})_0 = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)(S_{y/x})_1^2 + (n_2 - 2)(S_{y/x})_2^2}{n_1 + n_2 - 4}}$$

on n_1 i n_2 són, respectivament, els punts de cada corba.

2- La desviació estàndard de la diferència entre els 2 pendents ($S_{b_1-b_2}$) es calcula a partir de l'equació:

$$S_{b_1-b_2} = (S_{y/x})_0 \sqrt{\frac{1}{(S_{xx})_1} + \frac{1}{(S_{xx})_2}}$$

On S_{xx} és el terme "suma de quadrats" per a la variable independent.

3- Es calcula el valor t_{exp} :

$$t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_{b_1-b_2}}$$

4- es compara amb el valor tabulat per a (n_1+n_2-4) graus de llibertat i el nivell de significació escollit. Si $t_{exp} < t_{taules}$ els pendents són iguals, i per tant les rectes són comparables.

A la Taula 57 es presenta un resum dels resultats obtinguts.

<i>Fungicides</i>	<i>Prova F (F_{exp})</i>	<i>F_{taules}</i>	<i>Prova t (t_{exp})</i>	<i>t_{taules} (n₁+n₂-4, 0,05)</i>	<i>Rectes comparables?</i>
TCMTB	3,66	19	1,0127	2,1318	Sí
PCMC	0,04	19	0,0490	2,1318	Sí
OPP	5,65	19	2,0706	2,1318	Sí
MBT	1,04	19	0,6568	2,1318	Sí
OIT	0,97	19	1,6048	2,1318	Sí
IPBC	7,83	19	0,9628	2,1318	Sí

Taula 57. Comparació estadística de les rectes obtingudes en diferents dates

La prova F permet verificar que les variàncies són iguals: $F_{exp} < F_{taules}$ i, per tant, es pot aplicar el test t.

La prova t de Student ha resultat per a tots els casos $t_{\text{exp}} < t_{\text{taules}}$, verificant-ne que les rectes són comparables.

Les dues rectes de calibratge obtingudes després d'un període de temps considerablement ampli, són comparables entre sí. Això demostra que els efectes de totes les possibles variables que intervenen en el mètode, citades a la Fig. 77, no són significatius. Es pot concloure que el mètode és robust, conduint a l'obtenció de resultats fiables.

9.8. Límits

El límit de detecció es pot entendre segons la International Union of Pure and Applied Chemists (IUPAC), com la mesura més petita d'una resposta Y_L (absorbància, àrea o alçada d'un pic) que pot ser detectada amb una certesa raonable en un procediment analític (Skoog et al. 2005). L'expressió matemàtica és la següent:

$$Y_L = Y_B + 3 \cdot S_{n-1}, \text{ essent}$$

Y_B = la mitjana de les mesures de blancs

S_{n-1} = desviació estàndard de les mesures dels blancs

No obstant, en anàlisi instrumental, es pot establir de forma teòrica el límit de detecció a partir de la relació senyal/soroll (s/n), com aquella relació que proporcioni un senyal 3 vegades superior a la del soroll (Huber 2009), és a dir:

$$L_D = \text{conc} \cdot 3/s/n$$

On:

Conc = és la concentració de l'analit a la que s'obté el senyal respecte al soroll

s/n = és la relació senyal/soroll obtinguda per a una concentració donada d'analit

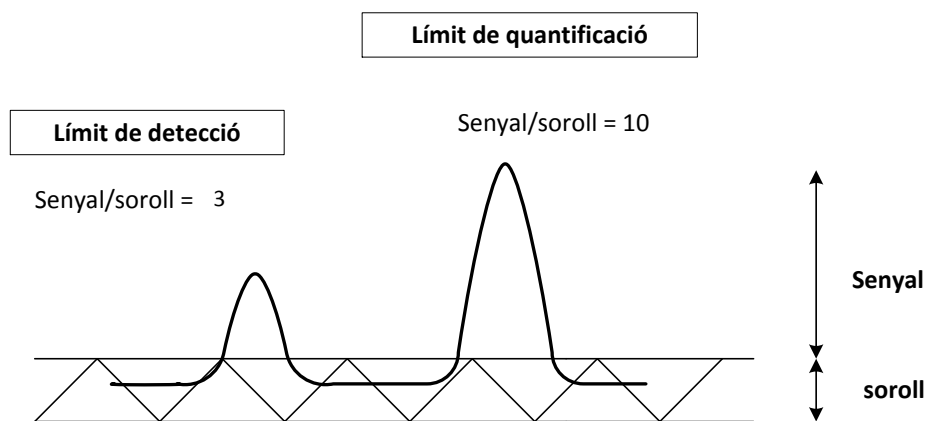


Fig. 78. Representació gràfica de la relació senyal/soroll

Així, per a cada un del fungicides, s'ha calculat el límit de detecció per a una longitud d'ona determinada i per a un volum d'injecció de 50 μ L.

Fungicides	Long. d'ona (nm)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
TCMTB	223	0,25	0,83
PCMC	228	0,14	0,47
OPP	246	0,06	0,20
MBT	324	0,05	0,17
OIT	279	0,07	0,25
IPBC	193	6	17

Taula 58. Límits de detecció i quantificació, a les longituds d'ona de detecció

9.9. *Altres consideracions del mètode*

9.9.1. *Influència de la matriu del bany*

Una qüestió que s'ha valorat és la de la possible influència de la matriu.

Es va analitzar el contingut en crom d'alguns dels banys analitzats i de la matriu blanca utilitzada per a l'estudi de veracitat (recuperacions). Després d'efectuar les dilucions establertes al mètode, la concentració final de crom a la solució d'extracció és molt baixa. Els resultats es presenten a la Taula 59.

Tanmateix cal destacar que l'última dilució (la solució d'extracció) se salinitza amb un 15% de NaCl, quantitat considerablement elevada, que redueix la influència d'altres compostos.

Tipus bany	ID bany	TCMTB mg/L	Alíquota mL	V final mL	Aliq. Bany mL	V aigua afegit mL	Conc. Cr Bany g Cr/L	Conc. Cr Solució absorció mg Cr/L
Matriu blanca		No detectat	1	50	1	50	3,8	6,9
Wet blue	Wb-1	79	1	50	1	10	5,08	9,2
Wet blue	Wb-2	78	1	50	1	10	6,84	12,4
Wet blue	Wb-3	47	1	50	1	10	4,64	8,4
Wet blue	Wb-4	19	1	50	1	10	5,32	9,7
Wet blue	Wb-5	20	1	50	1	10	6,28	11,4
Wet blue	Wb-6	92	1	50	1	10	4,22	7,7
Bany wet blue	Wb-7	16	2	50	1	10	5,08	18,5
Bany wet blue	Wb-8	27	2	50	1	10	4,70	17,1
Bany wet blue	Wb-9	19	2	50	1	10	6,84	24,9
Bany wet blue	Wb-10	84	2	50	1	10	3,90	14,2
Bany wet blue	Wb-11	28	2	50	1	10	5,32	19,3
Bany wet blue	Wb-12	63	2	50	1	10	4,20	15,3

Taula 59. Contingut en crom d'alguns banys analitzats

9.9.2. Vida útil de les fibres

Quant de temps es poden utilitzar les fibres?

En les condicions en què s'efectua aquesta anàlisi, una fibra s'ha pogut utilitzar per unes 50-60 immersions.

Com es detecta que una fibra ha arribat al final de la seva vida útil?

En aquest treball s'ha pogut analitzar amb bona sensibilitat fins a unes 50-60 immersions amb la mateixa fibra. Com que en cada sessió de treball s'analitza almenys un patró, aquest és l'indicador de l'òptima resposta de la fibra.

A la Taula 60 s'ha representat la variabilitat de resposta de diferents fibres per a un mateix fungicida, en forma d'àrea absoluta cromatogràfica.

Com a exemple, es presenten les àrees de 3 dels fungicides estudiats per a 2 fibres diferents (del mateix tipus) en diferents dates i a la mateixa concentració. S'han representat com a 1 i 2 per distingir-les.

Es pot observar que inclús 2 fibres diferents tenen la mateixa capacitat d'extracció (àrees comparables).

S'ha representat també la desviació d'àrees respecte de la primera fibra. Com a criteri d'acceptació es podria acceptar fins a un 30 % de desviació entre dies i fibres. El motiu d'ampliar tant aquest marge és que l'anàlisi es fa amb patró intern.

Apart d'això, és convenient observar la fibra a l'inici i durant la determinació, assegurant-se que no està trencada (disminució de la seva longitud). Igualment es detectaria per una disminució dràstica de l'àrea cromatogràfica, però evitaria realitzar una anàlisi infructuosa.

Fungicida (Concentració)	Fibra	Data	Àrees absolutes	% desviació
TCMTB 146 ug/L	1	06/06/2011	79190	-
	2	21/06/2011	78546	0,8
	2	24/10/2011	69790	11,9
PCMC 82 ug/L	1	02/06/2011	13839	-
	2	14/06/2011	13358	3,5
	2	24/10/2011	11531	16,7
OIT 103 ug/L	1	02/06/2011	16025	-
	2	21/06/2011	17927	11,9
	2	24/10/2011	17510	9,3

Taula 60. Taula resposta fibra

9.10. Anàlisi de mostres reals

3 empreses han proporcionat mostres de banys i s'han analitzat. Es tracta de diversos banys residuals procedents de diferents etapes del procés d'adobatge. Aquests resultats es van facilitar a les empreses. S'exposen a continuació:

RESULTATS - Empresa 1						
Tipus bany	ID bany	mg/L TCMTB	mg/L PCMC	mg/L OPP	mg/L OIT	mg/L IPBC
Wet blue	Wb-1	79	-	-	-	-
Wet blue	Wb-2	78	-	-	-	-
Wet blue	Wb-3	47	-	-	-	-
Wet blue	Wb-4	19	-	-	-	-
Wet blue	Wb-5	20	-	-	-	-
Wet blue	Wb-6	92	-	-	-	-

Taula 61. Contingut en fungicides en banys (Empresa 1)

RESULTATS - Empresa 2						
Tipus bany	ID bany	mg/L TCMTB	mg/L PCMC	mg/L OPP	mg/L OIT	mg/L IPBC
Readobatge vegetal	Rv-7	5,7	-	-	-	-
Readobatge vegetal	Rv-8	4,7	2,4	-	-	2,1
Readobatge vegetal-9	Rv-9	5,0	2,4	-	-	3,7
Readobatge vegetal	Rv-10	6,0	-	-	-	2,7
Adobatge vegetal	Rv-11	6,0	-	-	-	-
Adobatge vegetal	Rv-12	5,3	-	-	-	-
Adobatge vegetal	Rv-13	7,4	-	-	-	-
Engreix Adobatge vegetal	Rv-14	2,7	-	7	-	2,2

Taula 62. Contingut en fungicides en banys (Empresa2)

RESULTATS - Empresa 3						
Tipus bany	ID bany	mg/L TCMTB	mg/L PCMC	mg/L OPP	mg/L OIT	mg/L IPBC
Wet blue	Wb-7	16	-	-	-	-
Wet blue	Wb-8	27	-	-	-	-
Wet blue	Wb-9	19	-	-	-	-
Wet blue	Wb-10	84	-	-	-	-
Wet blue	Wb-11	28	-	-	-	-
Wet blue	Wb-12	63	-	-	-	-
Wet blue	Wb-13	12	-	-	-	-
Wet blue	Wb-14	46	-	-	-	-
Wet blue	Wb-15	8,8	-	-	-	-
Wet blue	Wb-16	35	-	-	-	-

Taula 63. Contingut en fungicides en banys (Empresa 3)

RESULTATS - banys experimentals						
Tipus bany	ID bany	mg/L TCMTB	mg/L PCMC	mg/L OPP	mg/L OIT	mg/L IPBC
Bany adobatge	Wb-17	28	142	16	-	-
Bany rentat	Rentat28	12	25	6,0	-	-

Taula 64. Contingut en fungicides en banys (banys experimentals)

9.11. Conclusions

S'ha establert l'interval de concentracions en què s'ha validat el mètode.

S'han presentat les equacions de calibratge i la verificació de l'ajust lineal mitjançant el contrast F de l'anàlisi ANOVA.

S'ha realitzat l'estudi de la veracitat del mètode per determinació de les recuperacions. Els resultats de les recuperacions es troben dins el rang 80-120%, del mateix ordre que altres publicacions relacionades amb la tècnica.

L'estudi de precisió compleix el criteri d'acceptabilitat establert, segons el model de precisió de Horwitz.

Les rectes de calibratge obtingudes en períodes de temps diferents són comparables entre sí, segons el test *t de Student*.

S'han calculat els límits de detecció i de quantificació per a cada un dels fungicides.

S'ha estimat la incertesa del mètode per a cada fungicida.

Tot i el conjunt de variables que afecten al procés d'absorció, s'ha aconseguit un mètode validat per analitzar fungicides en mostres aquoses.

Els resultats obtinguts en el desenvolupament d'aquest mètode es van publicar a la revista *American Leather Chemists Association* (JALCA) al febrer del 2013, amb l'article titulat **Determination of fungicides in residual tanning floats using Solid Phase Micro Extraction** (autors: J. Font; M. Reyes; S. Cuadros; A. Bacardit; Ll. Ollé i A. Marsal). A l'annex 3 es pot consultar.

Capítol 10. Conclusions finals

Determinació de fungicides en pell

1. S'ha aconseguit l'objectiu principal: posar a punt i validar un mètode d'anàlisi de fungicides en pell.

Tot i partir d'un mètode pendent d'aprovació com a norma ISO en el moment de l'elaboració de la Tesi,

2. S'ha millorat l'adquisició cromatogràfica per tal de poder analitzar simultàniament 4 fungicides més dels inclosos a la norma. Entre aquests s'ha inclòs un fungicida ja prohibit a Europa, però no en d'altres països, amb la qual cosa es disposa d'una eina de control al laboratori per detectar-lo.

3. També s'ha millorat l'especificitat del mètode i els límits de detecció establint una longitud d'ona més adequada per a cada tipus de molècula, enlloc d'una única com proposarà la norma ISO. Conseqüència d'això és que s'han incorporat a la base de dades del programa cromatogràfic els espectres UV de tots els fungicides.

4. El mètode s'ha validat. D'aquesta manera s'aporten dades que no hi són a la norma. El resum dels resultats obtinguts es presenten a la Taula 36.

5. A partir de l'estudi de reproductibilitat s'ha pogut obtenir informació sobre l'estabilitat dels fungicides sobre la pell, al llarg del temps.

En termes generals, amb l'excepció del PCMC a 201 nm, hi ha una disminució del contingut en qualsevol dels fungicides al llarg del temps. Aquesta dada és molt interessant des del punt de vista de la prioritat en la realització d'aquest tipus d'anàlisi, així com també es va tenir en compte en estudis que s'estaven duent a terme a l'EI sobre fungicides, i com a aportació en la investigació del Projecte del Plan Nacional I+D+i sobre fungicides.

Determinació de fungicides en mostres aquoses

6. Estudis preliminars han permès seleccionar la fibra SPME més adequada per extreure i analitzar simultàniament 6 fungicides en banys de processos d'adoberia.
7. S'ha investigat el comportament de la fibra envers el conjunt de fungicides estudiats, i això ha permès establir unes condicions d'anàlisi adequades per a l'obtenció d'uns resultats coherents que han estat validats.
8. Aquest procés de validació ha conduït a la definició de:
 - l'interval lineal de concentracions adequades per treballar sense saturar la fibra.
 - les equacions de calibratge i la verificació de l'ajust lineal mitjançant el contrast F de l'anàlisi ANOVA.
 - l'estudi de la veracitat del mètode, mitjançant l'obtenció de les recuperacions.
 - l'estudi de precisió compleix el criteri d'acceptabilitat establert, segons el model de precisió de Horwitz.
 - els límits de detecció i de quantificació per a cada un dels fungicides.
 - la incertesa del mètode per a cada fungicida.

Tot i la complexitat del conjunt de variables que afecten al procés d'extracció, s'ha aconseguit un mètode validat per analitzar fungicides en mostres aquoses.

Aquest mètode deixa una via oberta per a poder investigar amb detall el rendiment sobre la pell tant de productes fungicides, que ha estat l'objectiu d'aquesta tesi, com d'altres productes aplicats en processos d'adoberia.

Després d'analitzar al voltant de 40 mostres de pell de diferents procedències, i banys de processos procedents d'empreses de reconeguda activitat comercial, s'ha pogut comprovar que el TCMTB continua sent el fungicida més utilitzat.

En pell s'han trobat concentracions de TCMTB oscil·lants entre 20 i 350 mg/kg, indistintament entre adobades al crom i vegetal. En articles wet-blue de llarga conservació s'han arribat a trobar concentracions entre 400 i 500 mg/kg,

En banys d'adobatge al crom s'han trobat les concentracions més elevades de fungicida, entre 20 i 90 mg/l de TCMTB. En banys de readobatge i engreix vegetal les concentracions han estat inferiors, entre 3 i 7 mg/L de TCMTB.

Capítol 11. Difusió dels resultats

Els resultats obtinguts en aquesta tesi han generat dues publicacions i una ponència.

- ❖ Determination of TCMTB and other fungicides in leather. J. Font; M. Reyes; S. Cuadros; A. Bacardit i A. Marsal. *The Journal of American Leather Chemists Association*, JALCA **106**, 341-348, 2011.
- ❖ Determination of fungicides in residual tanning floats using Solid Phase Micro Extraction. J. Font; M. Reyes; S. Cuadros; A. Bacardit; Ll. Ollé i A. Marsal. *The Journal of American Leather Chemists Association*, JALCA **108**, 41-47, 2013.
- ❖ Ponència: Determinación de TCMTB y otros fungicides en piel. 61º Congreso de la Asociación Química Española (AQEIC), mayo 2012.

A l'annex 3 es poden consultar les publicacions corresponents.



Referències bibliogràfiques

A.E.F.I. (Asociación Española de Farmacéuticos de Industria), 2001. Validación de Métodos Analíticos (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria). Barcelona: A.E.F.I. Asociación Española de Farmacéuticos de Industria.

Adminis, U., Huynh, C. i Money, C.A., 2001. The need for improved fungicides for wet-blue. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. Society of Leather Technologists and Chemists, Vol. 86, núm. 3, p. 118-121. ISSN 0144-0322.

Ai, J., 1997. Solid Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, Vol. 69, núm. 6, p. 1230-1236. ISSN 0003-2700. DOI 10.1021/ac9609541.

Allinger, N.L., Cava, M.P. i Jongh, D.C., 1988. QUIMICA ORGANICA. *Reverté*. 2^a. Barcelona: REVERTÉ, ISBN 9788429170177.

Alpendurada, M.F., 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of chromatography. A*. Vol. 889, núm. 1-2, p. 3-14. ISSN 0021-9673.

Alsina, I., 2013. Estimació de la Incertesa i control de qualitat. *Seminari Tècnic 6/2013. Departament d'Agricultura Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural*. p. 1-54.

AOAC International., 2012. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. .

Bacardit, A. i Font, J., 2009. La Pell. *Museu de la Ciència i de la Tècnica de Catalunya; Col·lecció Biodiversitat i Tecnodiversitat; 6*. p. 56. DOI ISBN 9788439381679.

Bautista, S., 2006. *Desenvolupament de Metodologia pel Control Analític de Fitosanitaris*. Treball Final de Carrera, UPC, Escola d'Enginyeria d'Igualada.

Bester, K. i Lamani, X., 2010. Determination of biocides as well as some biocide metabolites from facade run-off waters by solid phase extraction and high performance liquid chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., Vol. 1217, núm. 32, p. 5204-5214. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2010.06.020.

Blanco, M., Cerdà, V. i Universitat de les Illes Balears. Servei de Publicacions i Intercanvi Científic., 2007. *Temas avanzados de quimiometría*. ISBN 987-84-8384-006-1.

Bourgin, M. et al., 2009. Development of a rapid determination of pesticides in coated seeds using a high-performance liquid chromatography-UV detection system. *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol. 57, núm. 21, p. 10032-10037. ISSN 1520-5118. DOI 10.1021/jf902316x.

Bryant, S.D., Hurlow, E.L. i Whittemore, M.S., 2011. A new antifungal agent for the leather industry: s-hexyl-s-chloromethyl-cyanodithiocarbamate (CHED). *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. Society of Leather Technologists and Chemists, Vol. 95, núm. 1, p. 7-10. ISSN 0144-0322.

Castell, J.-C., 2011. Normas, recomendaciones y regulaciones en piel y cuero. *Acolcur*.

Cheng, J. et al., 2010. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples. *International journal of environmental analytical chemistry*. Vol. 90, núm. 11, p. 845-855. ISSN 0306-7319. DOI 10.1080/03067310903180468.

Codex Committee on Pesticide Residues., 2011. Directrices Sobre La Estimación De La Incertidumbre De Los Resultados. [en línia]. Disponible a: www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../cxg_059s.pdf.

Cuadros, R.M. et al., 2010. Determination of Dimethylfumarate in leather and footwear by solid-phase micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of American Leather Chemists Association*. Vol. 105, núm. 12, p. 395-400.

Cuadros, S. et al., 2013. Alternative Fungicides for the Leather Industry : *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. Vol. 96, p. 225-233.

De Almeida Azevedo, D. et al., 2000. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 879, núm. 1, p. 13-26. ISSN 00219673. DOI 10.1016/S0021-9673(00)00372-1.

Der Blaue Engel. [en línia]. [Consulta: 18 maig 2015]. Disponible a: <https://www.blauer-engel.de/>.

ECCO., 2014. ECCO Restricted Chemical Substances List (RCS). [en línia]. Disponible a: [www.eccoimg.com/-/.../ECCO RCS List](http://www.eccoimg.com/-/.../ECCO_RCS_List).

EPA., 2006. Reregistration Eligibility Decision for 2-(Thiocyanomethylthio)-benzothiazole (TCMTB). [en línia]. United States Environmental Protection Agency: Disponible a: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/tcmtb_red.pdf.

European Commission., 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment. Part IV. *Institute for Health and Consumer Protection*.

Fattahi, N. et al., 2007. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples. *Journal of chromatography. A*. Vol. 1169, núm. 1-2, p. 63-9. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2007.09.002.

Ferrer, I. i Thurman, E.M., 2007. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography / time-of-



flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1175, p. 24-37. DOI 10.1016/j.chroma.2007.09.092.

Fowler W., 1987. The Extraction and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Determination of TCMTB Samples of treated wet blue. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. Vol. 71, núm. 4, p. 100-107.

González-Toledo, E., Prat, M.D. i Alpendurada, M.F., 2001. Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water. *Journal of chromatography. A*. Vol. 923, núm. 1-2, p. 45-52. ISSN 0021-9673.

Górecki, T., Yu, X. i Pawliszyn, J., 1999. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres†. *The Analyst*. Vol. 124, p. 643-649. ISSN 00032654. DOI 10.1039/a808487d.

Hauber, C. i Germann, H.-P., 1997. The addition of fungicides and their Penetration. *World Leather*. p. 75-82.

Higashi, Y. i Fujii, Y., 2009. HPLC-UV Analysis of Phenol and Chlorophenols in Water After Precolumn Derivatization with 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 32, núm. 16, p. 2372-2383. DOI 10.1080/10826070903188013.

Hinojosa Reyes, L., Wróbel, Katarzyna i Wróbel, Kazimierz., 2002. Indirect extraction-spectrophotometric determination of 2-(thiocyanomethylthiol)benzothiazole in chrome tanning liquors after its breakdown to 2-mercaptobenzothiazole. *Talanta*. Vol. 56, núm. 3, p. 515–521. ISSN 0039-9140.

Horwitz, W., 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*. Vol. 54, p. 67A-76A.

Hu, Y. et al., 2008. A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. Vol. 25, núm. 3, p. 314-9. ISSN 1944-0057. DOI 10.1080/02652030701581864.

Huber, L., 2009. Analytical Instrument Qualification and System Validation. *Agilent Technologies* [en línia]. Disponible a: <https://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-3288EN.pdf>.

Jcgm., 2008. Evaluación de datos de medición. Guía para la expresión de la incertidumbre de medida. [en línia]. Disponible a: www.cem.es/sites/default/files/gum20digital1202010.pdf .

Joint-Research-Centre., 2013. Best Available Techniques for the Tanning of Hides and Skins. .

Karger, B.L., Snyder, L.R. i Horvath, C., 1973. *An Introduction to Separation Science*. ISBN 0471458600.

- Landau, L., 1937. Biocides in leather. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*.
- Lee, M.-R. et al., 1998. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determining chlorophenols from landfill leaches and soil. *Journal of Chromatography A*. Vol. 806, núm. 2, p. 317-324. ISSN 00219673. DOI 10.1016/S0021-9673(98)00075-2.
- Liu, X. et al., 2007. Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of phenols in aqueous samples. *Journal of chromatography. A*. Vol. 1165, núm. 1-2, p. 10-17. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2007.07.057.
- Llompарт, M., Blanco, B. i Cela, R., 2000. Determination of phenols in soils by in situ acetylation headspace solid-phase microextraction. *Journal of Microcolumn Separations*. Vol. 12, núm. 1, p. 25-32. ISSN 1040-7685. DOI 10.1002/(SICI)1520-667X(2000)12:1<25::AID-MCS4>3.0.CO;2-U.
- Loo, L. et al., 2008. Using pH-LC™ to Control Selectivity of Acidic and Basic Compounds on Gemini® -NX. *Phenomenex* [en línia]. Disponible a: <https://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/>.
- López Monzón, a et al., 2007. Solid-phase microextraction of benzimidazole fungicides in environmental liquid samples and HPLC-fluorescence determination. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Vol. 387, núm. 6, p. 1957-63. ISSN 1618-2642. DOI 10.1007/s00216-006-1083-0.
- Mahugo Santana, C. et al., 2009. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*. Vol. 14, núm. 1, p. 298-320. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules14010298.
- Maroto, A. et al., 2000. Incertidumbre y precisión. *Universidad Rovira i Virgili. Departament de Química Analítica y Química Orgànica*.
- Möder, M. et al., 1997. Determination of phenolic compounds in waste water by solid-phase micro extraction. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 357, núm. 3, p. 326-332. ISSN 0937-0633. DOI 10.1007/s002160050162.
- Morera, J. i Marí, P., 2000. *Química técnica de curtición*. Igualada: Consorci Escola Tècnica d'Igualada. ISBN 9788493183707.
- Muthusubramanian, L. et al., 1998. Convenient synthesis of (thiocyanomethyl)-thio heteroaromatics as antifungal agents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd., Vol. 72, núm. 2, p. 164-168. ISSN 1097-4660. DOI 10.1002/(SICI)1097-4660(199806)72:2<164::AID-JCTB875>3.0.CO;2-F.
- Nawrocki, S.T. et al., 2005. Comparative aquatic toxicity evaluation of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and selected degradation products using *Ceriodaphnia dubia*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. Vol. 48, núm. 3, p. 344-50. ISSN 0090-4341. DOI 10.1007/s00244-004-0105-1.



- Orlita, A., 2004. Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 53, núm. 3, p. 157-163. ISSN 09648305. DOI 10.1016/S0964-8305(03)00089-1.
- Ouyang, G. i Pawliszyn, J., 2007. Configurations and calibration methods for passive sampling techniques. *Journal of chromatography. A*. Vol. 1168, núm. 1-2, p. 226-35; discussion 225. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2007.01.133.
- Ouyang, G. i Pawliszyn, J., 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica chimica acta*. Vol. 627, p. 184-197. ISSN 00032670. DOI 10.1016/j.aca.2008.08.015.
- Padoan, K., 2006. New generation of fungicides for leather preservation. *Proceedings del II Eurocongress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (IULTCS)*. Estambul:
- Page, C., 2010. TFL Eco Guidelines. Restricted Substances Leather. *TFL* [en línia]. Disponible a: http://www.tfl.com/web/files/ECO_GL3_small.pdf.
- Pawliszyn, J., 2009. Handbook of Solid Phase Microextraction. . Beijing 100011: Chemical Industry Press, p. 406. ISBN 9780124160170.
- Peñalver, a et al., 2002. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *Journal of chromatography. A*. Vol. 953, núm. 1-2, p. 79-87. ISSN 0021-9673.
- Planas, X., 2004. *Determinació de TCMTB i altres fungicides en pells*. Treball Final de Carrera, UPC, Escola d'Enginyeria d'Igualada.
- Ramadori, L., 2010. New generation of fungicides for leather preservation. *Cuoio, Pelli, Matière Concianti*. Vol. 86, núm. 1, p. 19-23.
- Rezaee, M. et al., 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of chromatography. A*. Vol. 1116, p. 1-9. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- Robles, J. et al., 2010. Protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas. *Ministerio Economía y Competitividad* [en línia]. Disponible a: http://www.consoliderragua.com/documentos/protocolo_muestreo_analisis.pdf.
- Rosero-Moreano, M., Canellas, E. i Nerín, C., 2014. Three-phase hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with HPLC-UV for the determination of isothiazolinone biocides in adhesives used for food packaging materials. *Journal of Separation Science*. Vol. 37, núm. 3, p. 272-280. ISSN 16159306. DOI 10.1002/jssc.201300840.
- Sheng-shan, D.O.U. et al., 2010. Qualitative and Quantitative Analysis for the Quality Control of Rhizoma Coptidis by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Chemical Research in Chinese Universities*. Vol. 26, núm. 30725045, p. 735-741. ISSN 10059040.

Shirey, R., 2009. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. *Handbook of solid Phase Microextraction*. 2009. Beijing 100011: Chemical Industry Press, p. 86. ISBN 9780124160170.

Shirey, R., 2010. Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating –Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity | Sigma-Aldrich. *Reporter Supelco* [en línia]. [Consulta: 1 febrer 2015]. Disponible a: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-eu/selecting-the-appropriate.html>.

Shirey, R. i Mindrup, R., 1999. SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber is Best for Your Application? *SUPELCO Technical Presentation* [en línia]. Disponible a: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/The_Reporter/7943.pdf.

Shustina, R. i Lesser, J.H., 1984. The Determination of Methylene Bis-Thiocyanate by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. Vol. 7, núm. 13, p. 2653-2658. DOI 10.1080/01483918408067032.

Singer, H. et al., 2010. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, Vol. 158, núm. 10, p. 3054-3064. ISSN 0269-7491. DOI 10.1016/j.envpol.2010.06.013.

Širvaitytė, J. et al., 2012. Application of essential oils of thyme as a natural preservative in leather tanning. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. Vol. 61, núm. 3, p. 220. ISSN 1736-6046. DOI 10.3176/proc.2012.3.12.

Skoog, D.A. et al., 2005. *Fundamentos de Química Analítica*. 8th ed. Mexico: Thomson. ISBN 970-686-369-9.

Tankiewicz, M., Morrison, C. i Biziuk, M., 2013. Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI-SPME coupled with GC-MS. *Talanta* [en línia]. [Consulta: 28 gener 2015]. Disponible a: <https://vpn.upc.edu/>.

Tomaselli, M. i Cozzolino, A., 1991. I pesticidi nell'industria del cuoio. Parte II:determinazione quantitativa. *Pelli, Materie Concianti*. Vol. 67, núm. 221.

UNE-ISO-3534-1., 2013. Norma UNE-ISO 3534-1:2013. [en línia]. [Consulta: 18 febrer 2015]. Disponible a: <http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0051704#.VOTeGvmG9ps>.

Valverde, A., 2009. Evaluación de la Incertidumbre en el Análisis de Residuos de Plaguicidas. *Validación de métodos, control de calidad y estimación de la incertidumbre de medición aplicable al análisis multiresiduos de plaguicidas* [en línia]. Buenos Aires: Disponible a: <https://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/seminario/Valverde.pdf>.

Van Deren, J., 1978. Controlling fungal growth on leather: correlation of TCMTB resistance. *Journal of the American Leather Chemists Association*. Vol. 73, núm. 11, p. 498-507.



Vázquez, A.M., 2004. *Implantació de noves aplicacions cromatogràfiques al laboratori de l'EUETII.*

Venkatachalam, M., 1999. Properties of commercial SPME coatings. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Royal Society of Chemistry, p. 57. ISBN 0854045252.

Wood, R., 1999. How to validate analytical methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 18, p. 624-632. ISSN 01659936. DOI 10.1016/S0165-9936(99)00150-8.

Wu, Y., Hu, B. i Hou, Y., 2008. Headspace single drop and hollow fiber liquid phase microextractions for HPLC determination of phenols. *Journal of Separation Science*. WILEY-VCH Verlag, Vol. 31, núm. 21, p. 3772-3781. ISSN 1615-9314. DOI 10.1002/jssc.200800365.

Yang, X. i Peppard, T., 1995. Solid Phase Microextraction of Flavour Compounds. *LC-GC*. Vol. 13, p. 882-886.

Zhang, Z., Yang, M.J. i Pawliszyn, J., 1994. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.* Vol. 66, p. 844A-854A. ISSN 0003-2700. DOI 10.1021/ac00089a001.

Índex de Taules

Taula 1. Fungicides més utilitzats en adoberia (BAT Tanning 2013).....	12
Taula 2. Altres fungicides de la indústria del cuir (Orlita 2004; Bryant, Hurlow 2011).....	12
Taula 3. Classificació de fongs segons l'etapa d'adobatge (Orlita 2004).....	13
Taula 4 .Concentracions de fungicides , per conservació de wet-blue (BAT Tanning 2013).....	13
Taula 5. Límits admissibles de fungicides, segons l'ecoetiqueta alemanya "Der Blaue Engel"	14
Taula 6 Comparació concentracions efectives envers TCMTB	14
Taula 7 Comparació concentracions efectives envers TCMTB, en wet-blue.....	14
Taula 8. Efectivitat dels fungicides i toxicitat dels banys envers TCMTB.....	15
Taula 9 Classificació dels fungicides segons Reglament (EU) 528/2012.....	18
Taula 10. Fungicides analitzats.....	23
Taula 11. Estructura química dels fungicides analitzats.....	24
Taula 12. Productes fungicides utilitzats.....	27
Taula 13. Comparació de les condicions cromatogràfiques de la norma ISO 13365 i la nova proposta.....	28
Taula 14. Màxims d'absorció i absortivitats dels fungicides estudiats.....	37
Taula 15. Rang dels calibratges i rang equivalent a la pell.....	41
Taula 16. Equacions de calibratge i estudi linealitat	42
Taula 17. Estudi repetibilitat: mitjanes, desviacions estàndard i CV.....	43
Taula 18.Comparació d'àrees obtingudes a 201 nm i 228 nm, pel PCMC.....	44
Taula 19.Comparació d'àrees obtingudes a 201 nm i 246 nm, per l'OPP.....	44
Taula 20. Estudi reproductibilitat global: mitjanes, desviacions estàndard i CV.....	45
Taula 21. Estudi de reproductibilitat pel PCMC. Anàlisi per dies i analista.....	46
Taula 22. Estudi de reproductibilitat per l'OPP. Anàlisi per dies i analista.....	46
Taula 23. Estudi de reproductibilitat pel TCMTB. Anàlisi per dies i analista.....	46
Taula 24.Recuperacions per PCMC a 201 nm.....	47
Taula 25. Recuperacions per PCMC a 228 nm.....	48
Taula 26.Recuperacions per OPP a 201 nm.....	48
Taula 27.Recuperacions per OPP a 246 nm.....	48
Taula 28. Recuperacions per OIT a 279 nm.....	49
Taula 29.Recuperacions per IPBC a 193 nm.....	49
Taula 30. Recuperacions per TCMTB a 223 nm.....	49
Taula 31.Recuperacions per MBT a 324 nm.....	50
Taula 32.Resum de recuperacions obtingudes.....	50
Taula 33. Longituds d'ona de treball, en anàlisi de rutina.....	51
Taula 34. Límits de detecció per a cada longitud d'ona	53
Taula 35. Estimació de la incertesa en l'anàlisi de fungicides en pell.....	57
Taula 36.Resum dels resultats obtinguts en l'estudi de validació.....	59
Taula 37. Continguts de fungicides en mostres comercials (I).....	61
Taula 38. Continguts de fungicides en mostres comercials (II).....	62
Taula 39. Protocol de treball per mètodes d'extracció LLE, SPE i SPME (Alpendurada 2000).....	70
Taula 40. Classificació de les fibres comercials (Pawliszyn 2009).....	78
Taula 41. Característiques de les fibres adsorbents i absorbents (Shirey i Mindrup 1999).....	79

Taula 42. Fungicides investigats per SPME	89
Taula 43. Paràmetres inicials d'extracció	91
Taula 44. Paràmetres inicials de desorció	91
Taula 45. Concentracions dels fungicides en la solució d'extracció.....	92
Taula 46. Nivell de concentracions estudiades.....	108
Taula 47. Pendants de les línies de tendència de cada nivell de concentració.....	115
Taula 48. Resultats obtinguts per TCMTB en 2 anàlisis independents, en iguals condicions (valors absoluts d'àrea).....	117
Taula 49. Temps de retenció i longituds d'ona analítics (màxims).....	118
Taula 50 . Taula de correlacions entre calibratge extern vs calibratge amb Pi	121
Taula 51. Linealitat i rang dels calibratges.....	124
Taula 52. Estudi de recuperacions	127
Taula 53. Correspondència entre % RSD Horwitz i la concentració	129
Taula 54. Resultats de l'estudi de repetibilitat.....	131
Taula 55. Resultats de l'estudi de reproductibilitat.....	132
Taula 56. Estimació de la incertesa en l'anàlisi de fungicides en mostres aquoses.....	133
Taula 57. Comparació estadística de les rectes obtingudes en diferents dates.....	135
Taula 58. Límits de detecció i quantificació, a les longituds d'ona de detecció.....	138
Taula 59. Contingut en crom d'alguns banys analitzats.....	139
Taula 60. Taula resposta fibra.....	140
Taula 61. Contingut en fungicides en banys (Empresa 1).....	141
Taula 62. Contingut en fungicides en banys (Empresa2).....	141
Taula 63. Contingut en fungicides en banys (Empresa 3).....	142
Taula 64. Contingut en fungicides en banys (banys experimentals).....	142

Índex de Figures

Fig. 1. Esquema de la pell.....	5
Fig. 2. Procés general d'adobatge. s'han indicat les etapes habituals d'adició de biocides.....	10
Fig. 3. Esquema Reglament Biocides.....	20
Fig. 4. Cromatograma d'HPLC dels 7dels fungicides a concentracions de 5 a 10 mg/L.....	29
Fig. 5. Cromatograma en 3D obtingut amb un detector PDA.....	30
Fig. 6. Comparació d'espectres UV en la identificació d'un pic cromatogràfic (Font: www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx (Huber 2009).....	31
Fig. 7. Cromatograma obtingut a 214 nm.....	31
Fig. 8. Cromatograma obtingut a 324 nm.....	32
Fig. 9. Espectres UV dels fungicides. S'observa una gran diferència en la sensibilitat segons la longitud d'ona a què es quantifica, per exemple a 214 nm o 324 nm.....	33
Fig. 10. Espectre de OPP.....	34
Fig. 11. Espectre de MBT.....	34
Fig. 12. Espectre de PCMC.....	34
Fig. 13. Espectre de OPP.....	35
Fig. 14. Espectre de OIT.....	35
Fig. 15. Espectre de TCP.....	35
Fig. 16. Espectre UV de TCMTB.....	36
Fig. 17. Espectre de IPBC.....	36
Fig. 18. Espectre de PCP.....	36
Fig. 19. A la figura es pot observar la dispersió en les lectures d'absorbàncies en un pic estret i en un pic ample. En el primer, un petit desplaçament del pic pot suposar una dispersió important, mentre que en un pic ample la variació és mínima.....	38
Fig. 20. Representació gràfica de la relació senyal/soroll.....	52
Fig. 21. Formes d'expressar un resultat (Valverde 2009).....	54
Fig. 22. Un resultat amb i sense mesura de la incertesa (Valverde 2009).....	54
Fig. 23. Distribució normal dels resultats d'una mesura (Valverde 2009).....	58
Fig. 24. Contingut en fungicides en cuirs comercials.....	63
Fig. 25. Contingut de fungicides en mostres comercials (en mg/kg sobre massa real de cuir).....	63
Fig. 26. Temps estimat en cada etapa del procés analític.....	67
Fig. 27. Esquema d'anàlisi de contaminants d'una mostra aquosa.....	67
Fig. 28. Microextracció per única gota (SDME).....	68
Fig. 29. Microextracció líquid-líquid dispersiva (DLLME).....	69
Fig. 30. Publicacions de cada tècnica: SDME, DLLME, SPME i SPE.....	70
Fig. 31. Volum de publicacions trobades a la literatura sobre SPME-HPLC (en blau). Refinament.....	72
Fig. 32. Parts d'una fibra SPME.....	75
Fig. 33. Esquema d'extracció SPME. (a) Immersió directa. (b) Espai de cap (headspace).....	76
Fig. 34. Fibra en desorció.....	76
Fig. 35. Interval de pes molecular per recobriments de fibres SPME (Shirey 2010).....	80

Fig. 36. Perfil d'extracció en SPME.....	82
Fig. 37. Calibratge per addició de patró.....	87
Fig. 38. Calibratge amb patró intern.....	88
Fig. 39. Molècules famílies benzimidazol i benzotiazols.....	90
Fig. 40. Muntatge fibra en extracció.....	93
Fig. 41. Muntatge fibra en desorció.....	93
Fig. 42. Recuperació (en valors absoluts) amb 3 fibres diferents.....	95
Fig. 43. Fibra Carb/PDMS. Desorció 5 a 30 min, 30°C.....	96
Fig. 44. Fibra PDMS/DVB. Desorció 5 a 30 min, 30°C.....	96
Fig. 45. Restes d'analits a les fibres PDMS/ DVB i Carboxen/PDMS, després d'una anàlisi.....	98
Fig. 46. Influència del pH de l'eluent de desorció. Fibra PDMS/DVB.....	100
Fig. 47. Recuperació dels analits a diferents temperatures. Fibra PDMS/DVB.....	101
Fig. 48. Temperatures de desorció estudiades. Fibra PDMS/DVB.....	101
Fig. 49. Temps de desorció estudiats. Fibra PDMS/DVB.....	102
Fig. 50. Temps de desorció estudiats. Fibra PDMS/DVB.....	103
Fig. 51. Influència de la concentració de sal. Fibra PDMS/DVB.....	106
Fig. 52. Influència de la temperatura d'extracció. Fibra PDMS/DVB.....	107
Fig. 53. Evolució de l'extracció amb el temps, pel TCMTB a 3 nivells de concentració.....	109
Fig. 54. Evolució de l'extracció amb el temps, pel MBT a 3 nivells de concentració.....	109
Fig. 55. Evolució de l'extracció amb el temps, pel PCMC a 3 nivells de concentració.....	109
Fig. 56. Evolució de l'extracció amb el temps, pel IPBC a 2 nivells de concentració.....	110
Fig. 57. Evolució de l'extracció amb el temps, pel OPP a 3 nivells de concentració.....	110
Fig. 58. Evolució de l'extracció amb el temps, pel OIT a 3 nivells de concentració.....	110
Fig. 59. % de recuperació dels analits, per intervals de temps.....	111
Fig. 60. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, TCMTB.....	112
Fig. 61. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, MBT.....	112
Fig. 62. . Linealitat entre els 3 nivells de concentració, PCMC.....	113
Fig. 63. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, OPP.....	113
Fig. 64. Linealitat entre els 3 nivells de concentració, OIT.....	113
Fig. 65. Cromatograma amb el patró intern TBP.....	118
Fig. 66. Cromatograma amb el patró intern (Pi).....	119
Fig. 67. Perfil d'extracció del TCP, a 3 nivells de concentració. Àrees a 2 longituds d'ona.....	119
Fig. 68. Relació entre les àrees de cada fungicida i la del Pi, en l'interval d'extracció de 30 a 120 min.....	120
Fig. 69. Cromatograma obtingut a 223 nm.....	123
Fig. 70. Cromatograma obtingut a 228 nm.....	123
Fig. 71. Cromatograma obtingut a 324 nm.....	123
Fig. 72. Cromatograma obtingut a 246 nm.....	123
Fig. 73. Cromatograma obtingut a 279 nm.....	124
Fig. 74. Cromatograma obtingut a 193 nm.....	124
Fig. 75. Preparació de la solució analítica de l'estudi de veracitat.....	126
Fig. 76. Esquema de la preparació de la solució analítica de l'estudi de precisió.....	128
Fig. 77. Variables introduïdes en cada etapa del procés.....	134
Fig. 78. Representació gràfica de la relació senyal/soroll.....	137
Fig. 79. Etapa d'absorció.....	175
Fig. 80. Etapa de desorció.....	175

Abreviatures

ANOVA	Anàlisi de la variància
CAR-PDMS	Carboxen-polydimethylsiloxane.
CAS	Chemical Abstracts Service. El número CAS és un número d'identificació per a cada substància química assignat per l'Associació Americana de Química.
CE	Electroforesi capil·lar.
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas.
CV	Coefficient de variació.
d.i.	Diàmetre interior.
DVB	Divinylbenzene.
ECD	Detector de captura d'electrons.
ECHA	European chemicals agency
EEL	Escola d'Enginyeria d'Igualada.
EPA	Agència de Protecció ambiental d'Estats Units
Falda	Zona del cuir corresponent al ventre i part superior de les potes de l'animal.
FID	Detector d'ionització de flama.
GC	Cromatografia de gasos.
HPLC-PDA	Cromatografia líquida d'alta resolució am detector diode array (High pressure liquid chromatography-Photodiode Array Detector).
IPBC	3-iodoprop-2-ynyl butylcarbamate.
IPBC	3-iodo-2-propinil butil carbat
ISO/FDIS	International Organization for Standardization / Final Draft International Standard.
IULTCS	International Union of Leather Technologists and Chemists Societies.
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. La Nomenclatura IUPAC és un sistema de nomenclatura de compostos químic.
LD	Límit de detecció. És la quantitat més petita d'un analit que pot ser detectada (absorbància, àrea o alçada d'un pic) amb una certesa raonable en un procediment analític.
LLE	Extracció líquid-líquid.

MBT	2-mercaptobenzotiazol
MS	Espectrometria de masses (detector acoblat a GC, HPLC o altres).
nm	Nanòmetres
OIT	2-n-octylisothiazolin-3-ona
OIT	2-octilisotiazolinona
OPP	o-phenyl-phenol
OPP	o-fenilfenol
P	Piritiona
PCMC	p-cloro-meta-cresol
PCMC	p-cloro-m-cresol
PCP	Pentaclorofenol.
PCP	Pentaclorofenol
PDMS	Polydimethylsiloxane
Pi	Patró intern
R²	Coeficient de correlació. Índex que mesura relació lineal entre dues variables.
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microextraction
TBZ	Tiabendazol
TCMTB	2-thiocyanomethylthio benzothiazole
TCMTB	2-tiocianometiltio benzotiazol
TCP	2,4,6-trichlorophenol
TCP	2,4,6-triclorofenol
UV-VIS	Ultraviolat-visible

Glossari

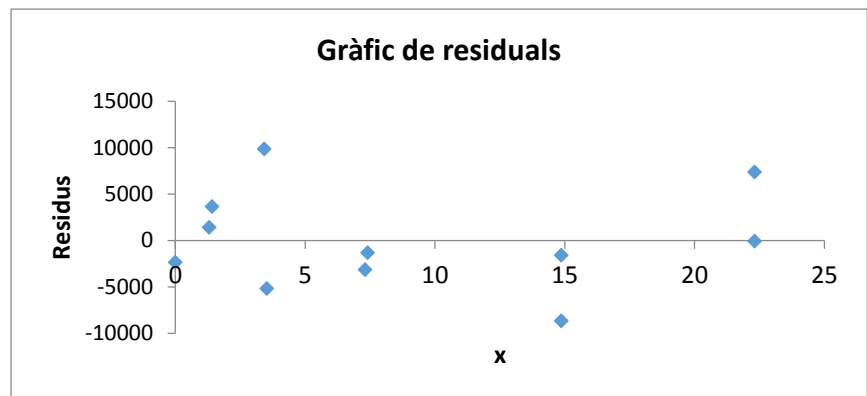
Absortivitat molar (ϵ)	Prové de la Llei de Beer que relaciona l'absorbància (A) d'un analit i la seva concentració (c) mitjançant l'expressió $A = \epsilon bc$, essent b l'amplada de la cubeta de mesura.
Adobatge	Tractament que es fa a la pell amb l'objectiu d'estabilitzar-la i evitar la seva putrefacció.
Analits	Substància d'interès per l'anàlisi continguda a la mostra.
Biocida	Substància o mescla composta per substàncies actives que serveix per contrarestar, minimitzar, reduir o impedir l'acció d'un organisme nociu, per mitjans químics o biològics (<i>REGLAMENT (UE) No 528/2012 relatiu a Biocides</i>). Entre d'altres substàncies, hi estan inclosos els fungicides.
Fungicida	Substància utilitzada per prevenir o eliminar fongs (veure biocida). <i>REGLAMENT (UE) No 528/2012 relatiu a biocides</i> .
Gradient	En cromatografia líquida, variació de la proporció dels eluents.
Nom EC	Nom amb què s'inclou a l'inventari de substàncies químiques de la Unió Europea
Núm. CAS	Número de registre assignat per l'associació americana CAS (Chemical Abstract Society).
Núm. EC	Número amb què s'inclou a l'inventari de substàncies químiques de la Unió Europea
Pell crust	Són aquelles pells simplement adobades, assecades després de la neutralització i engreix, sense tintura ni acabat.
Recuperació	És l'eficàcia en el rescat de l'analit de la matriu. És un paràmetre que s'ha d'estudiar en el desenvolupament del mètode analític.
Relació senyal-soroll	En sistemes instrumentals, és la relació entre el senyal de l'analit i el senyal de fons registrat sense analit.
Substància activa	Substància o microorganisme que exerceix una acció sobre o contra organismes nocius.
Substància persistent	Les substàncies que resisteixen el procés natural de descomposició per un llarg període de temps.
Substància restringida	Substància que ha d'estar absent en un producte final o, present a limitades concentracions.
Validació	Obtenció de proves documentades de què un mètode analític és el suficientment fiable per produir resultats dintre els intervals establerts.

Annex 1. Anàlisi ANOVA de la regressió

1. Fungicides en Pell

Es mostra un exemple de l'anàlisi de regressió realitzat pel TCMTB, com a verificació de la bondat de l'ajust lineal, dins el procés de validació del mètode d'anàlisi de fungicides.

Conc TCMTB (mg/L)	Àrees cromatograma
0	0
1,31	71528
1,41	78948
3,42	189203
3,52	179318
7,31	377476
7,41	384479
14,87	770262
14,87	763167
22,31	1164225
22,31	1156763



Resum

Estadístiques de la regressió

Coefficient de correlació múltiple	0,99992154
Coefficient de determinació R ²	0,99984309
R ² ajustat	0,99982566
Error típic	5665,97001
Observacions	11

Anàlisi de la variància (Taula ANOVA)

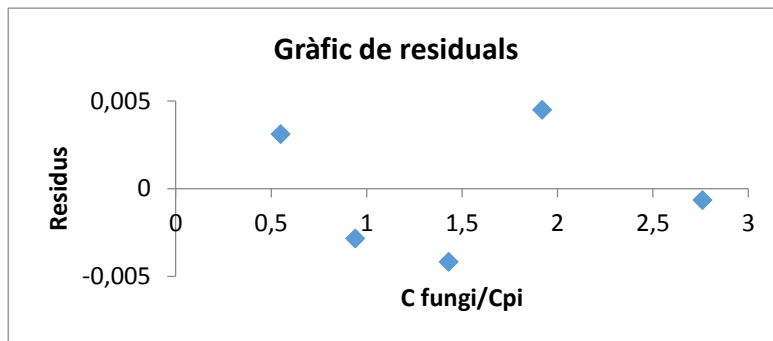
	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana dels quadrats	F	Valor crític de F
Regressió	1	1,8411E+12	1,84112E+12	57350	1,9644E-18
Residus	9	288928946	32103216		
Total	10	1,8414E+12			

$F_{exp} > F_{taules(0,05, 1, n-2)}$. Essent $F_{taules} = 5,11$. Indica que la correlació lineal és significativa.

2. Fungicides en banys de procés

Es mostra un exemple de l'anàlisi de regressió realitzat pel TCMTB, com a verificació de la bondat de l'ajust lineal, dins el procés de validació del mètode d'anàlisi de fungicides.

C _{TCMTB/Cpi}	A _{TCMTB/pi}
0,55	3,30
0,94	5,85
1,43	9,06
1,92	12,28
2,76	17,78



Resum

<i>Estadístiques de la regressió</i>	
Coeficient de correlació múltiple	0,9999998
Coeficiente de determinación R ²	0,9999996
R ² ajustado	0,9999994
Error típico	0,0043137
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F</i>	<i>Valor crític de F</i>
Regressió	1	128,1242642	128,1242642	6885563	1,22057E-10
Residus	3	5,5823E-05	1,86077E-05		
Total	4	128,12432			

$F_{exp} > F_{taules(0,05, 1, n-2)}$. Essent $F_{taules} = 18,5$. Indica que la correlació lineal és significativa.

Annex 2.

**PNT Determinació fungicides en mostres
aquoses**



1. PRINCIPI DEL MÈTODE

El mètode està basat en la captació dels analits per medi d'una fibra de microextracció en fase sòlida (SPME), i posterior anàlisi per cromatografia líquida. La quantificació s'efectua a partir d'un calibratge amb patró intern de 2,4,6-triclorofenol.

Aquest mètode s'ha dissenyat per banys d'adobatge al crom, vegetal i alumini, així com de readobatge vegetal i posterior greixatge.

2. REACTIUS

2.1. Aigua ultrapura

2.2. Clorur sòdic (NaCl) qualitat anàlisi CAS: 7647-14-5 (p. ex. Panreac PA ref. 121659)

2.3. Àcid fòrmic (HCOOH) suprapur CAS: 64-18-6 (p. Ex. Fluka ref. 94318)

2.3.1. Solució salina al 30% (w/v) de clorur sòdic (NaCl) i 0,2 % (v/v) d'àcid fòrmic (HCOOH)

Afegir a un matràs aforat de 200 mL, 60 g de NaCl amb ajuda d'aigua tèbia (no superior a 30°C) i 0,40 mL de HCOOH. Per ajudar a la completa dissolució, una vegada enrasat, s'introduirà un nucli magnètic i s'agitarà fins a la completa dissolució.

2.4. 2,4,6-Triclorofenol 98% puresa CAS:88-06-2 (p. Ex. Fluka ref. T55301 Aldrich)

2.4.1. Solució mare (2000-2500 mg/kg) de 2,4,6-triclorofenol (patró intern)

En un pot Brand (3.9) preparar una solució pesant entre 0,0800 i 0,1000 g de 2,4,6-triclorofenol, afegint 50,0 mL d'acetonitril (ACN). Anotar el pes dels 50,0 mL afegits. S'obté així una solució d'una concentració entre 2000-2500 mg/kg.

2.4.2. Solució stock (5,0-6,5 mg/L) de 2,4,6-triclorofenol (patró intern)

Es transferiran 0,8 mL de la solució mare (2.3.1) a un matràs de 250 mL. Anotar la pesada per poder calcular la concentració en mg/kg.

2.5. Acetonitril (ACN) qualitat HPLC- gradient (p. Ex Panreac ref. 221881)

2.5.1. Solució de acetonitril (ACN) i aigua en una proporció 60/40 (v/v)

Es pot fer preparar per volum o per pesada, en aquest cas tenint en compte les densitats de cada reactiu. Per exemple:

- Per volum: Es pot mesurar amb una proveta 60 mL d'ACN i 40 mL d'aigua ultrapura. Transferir després a un pot de vidre (3.9).
- Per pesada: Es pot preparar directament al pot de vidre (3.9). Pesar 40 g d'aigua ultrapura i 47 g d'ACN.

La segona opció és la més recomanada en preparacions de dissolucions per cromatografia, ja que evita operacions intermèdies eliminant la possibilitat de contaminacions.

3. MATERIAL I INSTRUMENTS

3.1. Paper de filtre plegat qualitatiu (per exemple Filter-lab ref.)

3.2. Vials capsulats Teknokroma de 9 mL, 18 x 50 mm amb sèptum

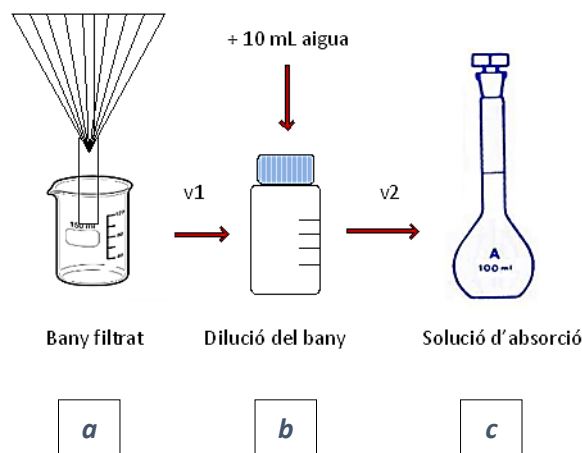
- 3.3. Vials còncics Waters de 0,8 mL, 12 x 32 mm amb sèptum pre-perforat
- 3.4. Fibra SPME de polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) 65 μm , de Supelco ref. 57359-U.
- 3.5. Nucli magnètic de 8x2 mm
- 3.6. Pots de vidre amb tap de rosca hermètics. Per exemple de marca Brand ref. 122538 (100 mL).
- 3.7. Termòmetre digital amb sonda de temperatura (resolució 0,1 $^{\circ}\text{C}$)
- 3.8. Placa agitadora amb control de temperatura Agimatic-E de Selecta
- 3.9. Armari climatitzat ISCO amb temperatura regulable a 30 $^{\circ}\text{C}$ i 45 $^{\circ}\text{C}$
- 3.10. Cromatògraf líquid Waters Alliance 2695 amb detector PDA 2998.
- 3.11. Balança analítica (resolució 0,0001 g)
- 3.12. Pipeta d'èmbol d'1 mL regulable

4. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

- 4.1. Filtrar el bany amb un paper de filtre (3.1)
- 4.2. Preparar una dilució del bany: Agafeu una alíquota V1 (1 o 5 mL) i afegir 10 mL d'aigua ultrapura
- 4.3. Preparar la solució d'absorció.

En un matràs de 50 mL, afegiu:

- una alíquota V2 (1 o 5 mL) del bany diluït
- 1 mL de patró intern
- 25 mL de solució salina
- enraseu amb aigua ultrapura



- 4.4. Amb una pipeta d'èmbol agafeu 8 mL de la solució d'absorció i col·loqueu-los en un vial (3.3). Afegiu un nucli magnètic (3.5) i encapsuleu el vial.
- 4.5. Pre-escalfeu un bany maria a 35°C a la placa agitadora (3.8). Col·loqueu el vial i prepareu la fibra just sobre el vial. Ajusteu l'agitació a 900 rpm.
- 4.6. Ajusteu la temperatura a 30 + 2°C i punxeu el vial amb el protector de la fibra. Es farà baixar fins haver travessat el sèptum.
- 4.7. Feu baixar la fibra fins submergir-la dins el vial i manteniu-la aproximadament a 1 cm del fons. **MANTENIU-LA SUBMERGIDA 70 min + 2 min**, controlant la temperatura.

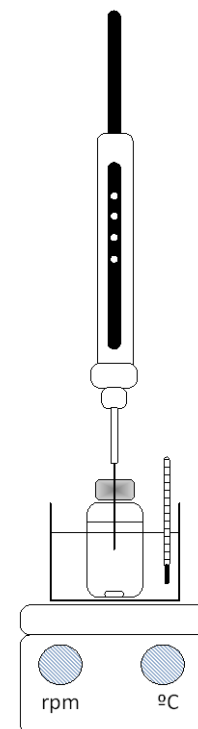


Fig. 79. Etapa d'absorció

Passat el temps d'absorció retireu la fibra de la solució, aixecant primer la fibra, després el protector de la fibra.

- 4.8. Prepareu un vial cònic (3.3) amb 0,40 mL de solució d'ACN/aigua (2.4).
- 4.9. Situeu el vial a l'armari climatitzat a 45°C i introduïu la fibra amb molta cura fins el fons, submergint-la per complet. **MANTENIU-LA SUBMERGIDA 20 min + 2 min**.
- 4.10. Situeu el vial a l'armari climatitzat a 45°C i introduïu la fibra amb molta cura fins el fons, submergint-la per complet.
- 4.11. Transcorregut el temps, homogeneïtzar el vial detingudament i injectar-lo a l'HPLC.

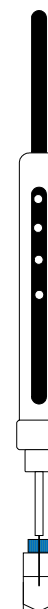


Fig. 80. Etapa de desorció



5. CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

La gestió de les dades cromatogràfiques es fa amb el software EMPOWER.

Per accedir-hi cal anar a la carpeta (*Project*) FUNGICIDES.

Les condicions cromatogràfiques són les següents:

- Columna de fase reversa C18 de Teknokroma, model Mediterranean Sea₁₈ 15 x 0.46 cm 3µm.
- Fase mòbil: aigua amb 0,1% àcid fòrmic (A) i ACN amb 0,1% àcid fòrmic (B)
- Gradient: de 0 a 6 min isocràtic amb un 60% B, i de 6 a 9 min programa lineal fins 95 % B
- Fluxe : 0.9 mL/min
- Temperatura de columna 30°C.

La detecció per a cada fungicida es realitza a una longitud d'ona òptima:

Fungicida	Longitud d'ona (nm)	Fungicida	Longitud d'ona (nm)
IPBC	193	PCMC	228
MBT	324	TCMTB	223
OIT	279	TCP	290
OPP	246		

Seleccionar el "*Method Set*" **Adap ISO 13365_nom fungicida**. Aquest mètode processa un cromatograma per a cada fungicida (els que hi figuren al nom) segons la seva longitud d'ona de detecció. Cal seleccionar l'adequat segons els fungicides a determinar, o bé, seleccionar **Adap ISO 13365** per obtenir els cromatogrames a totes les longituds d'ona.



6. CÀLCULS

Existeixen fulls Excel de recollida de resultats, per a cada fungicida, amb el format següent:

Determinació fungicides en Banyos per SPME-HPLC

Fungicida: **TCMTB**

Calibratge ($y = a + bx$): a= -0,3052 b= 6,5522

Data calib: gener 2012

Concentració Pi:		109,38 µg/L		Matràs absorció				Dilució Bany						
Data Anal.	Analista	Mostra	Àrea	A fung/Api	V injectat µL	C fung/Cpi	C fungi Matràs µg/L	Aliq. Absor. mL	Matràs absorció mL	Conc. Bany diluït µg/L	Aliq. Bany mL	Dilució total Bany mL	C bany mg/L	C bany mitjana mg/L
1-març-2012	Reyes	Bany1-1	39052											
		Pi	10951	3,57	40	0,39	42,30	2,00	50,00	1057,54	1,00	11,00	11,63	
1-març-2012	Reyes	Bany1-2	40425											
		Pi	11017	3,67	40	0,40	43,38	2,00	50,00	1084,47	1,00	11,00	11,93	11,78

Àrea : àrea cromatogràfica obtinguda de cada analit. A la taula s'introdueix l'àrea del fungicida determinat, i el del patró intern.

V injectat: volum d'injecció cromatogràfica (en µL)

C fung matràs: concentració del fungicida analitzat en la solució d'absorció (veure figura c)

Concentració Pi: concentració del patró intern (en µg/L)

Conc. Bany diluït: concentració de fungicida al bany diluït (veure figura b)

Annex 3. Publicacions

Igualada, 11 de abril de 2012

2ª Circular informativa

**61º Congreso de la Asociación Química Española de la
Industria del Cuero**

Igualada, 17 de mayo de 2012

Distinguido Asociado:

Nos place enviarle esta nueva circular informativa sobre nuestro Congreso anual, a celebrar en Igualada (Barcelona), en las instalaciones de la Cátedra A3 in Leather Innovation- AIICA, Av. Pla de la Massa s/n.

Detallamos a continuación el programa técnico de conferencias y su distribución.

Jueves, 17 de mayo

Sesión de mañana

ASAMBLEA DE SOCIOS

- | | |
|----------------------|--|
| 09,30 – 11,15 | Junta General. Lectura del resultado de las votaciones y proclamación de los resultados. |
| 11,15 – 11,30 | Pausa – Café |
| 11,30 – 12,00 | Apertura del congreso. |
| 12,00 – 12,30 | Presentación de la Cátedra A3 in Leather Innovation. |

JORNADA TÉCNICA

- | | |
|----------------------|---|
| 12,30 – 13,00 | AQEIC Lecture. “Curtición vegetal con extracto de semilla de uva” por S. Ramón, A. Bacardit, J. Font, L. Ollé.
<i>Escola d’Enginyeria d’Igualada-Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).</i> |
|----------------------|---|

13,00 – 13,20 “Determinación de TCMTB y otros fungicidas en piel” por M. R. Reyes¹, J. Font¹, A. Bacardit¹, S. Cuadros² y A. Marsal².

¹*Escola d’Enginyeria d’Igualada-Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).*

²*IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*

13,20 – 13,40 “Nuevas aplicaciones de la cromatografía iónica en el sector de curtidos” por C. Pérez, A. Bacardit, L. Ollé, M.R. Reyes y J. Font.

Escola d’Enginyeria d’Igualada-Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

13,40 – 15,30 Almuerzo de trabajo

Sesión de tarde

15,30 – 15,50 “Comportamiento a la compresión de pieles vacunas recurtidas con recurtientes proteínicos en distintas condiciones de humedad” por A. M. Manich, E. Bautista, B. Baena, D. López-Santana, F. Maldonado, J. Cot y A. Marsal.

IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

15,50 – 16,10 “Fungicidas alternativos para la industria de curtidos. Aplicación en diferentes procesos” por S. Cuadros¹, M. A. Manresa³, J. Font², M. E. Bautista¹, R. Puig², A. Marsal¹

¹ *Departamento de Tecnología Química y Tensioactivos, IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*

² *Escola d’Enginyeria d’Igualada - Universitat Politècnica de Catalunya, (UPC).*

³ *Facultat de Farmacia, Departament de Microbiologia, Universidad de Barcelona (UB).*

- 16,10 – 16,30** “Caracterización de pieles curtidas con titanio” por V. Segarra¹, M. V. Galiana², S. Navarro², J. Ferrer¹, M. E. Riquelme¹
¹ *Centro de Innovación y Tecnología (INESCOP).*
² *Industrias del Curtido, S.A. (INCUSA).*
- 16,30 – 16,50** “Piel respetuosa con el medio ambiente curtida con oxazolidina” por V. Segarra, M. Roig, M. A. Martínez, J. Ferrer
Centro de Innovación y Tecnología (INESCOP).
- 16,50 – 17,10** Pausa – Café
- 17,10 – 17,30** “La empresa familiar en el sector curtidos: fortalezas y debilidades” por J. Pérez Gil.
Asesoramiento en Curtidos S.L. (Lorca).
- 17,30 – 18,30** Presentación-Coloquio. “Camino a la cocreación” por M. Cirera.
Munich (Capellades, Barcelona).
- 20,30** Cena clausura Congreso / Entrega Premio AQEIC

Determinación de TCMTB y otros fungicidas en piel

J. Font, M.Reyes, S.Cuadros, A.Bacardit, A.Marsal ^a

Escola d'Enginyeria d'Igualada, Universitat Politècnica de Catalunya, Plaça del Rei 15, 08700 Igualada, Spain

^a IQAC-CSIC, Department of Chemical and Surfactants Technology, J. Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

RESUMEN

La norma ISO 13365:2011 desarrolla un método analítico para la determinación del contenido de los agentes conservantes 2-(tiocianometiltio)-benzotiazol (TCMTB), 4-cloro-3-metilfenol (PCMC), 2-fenilfenol (OPP) y 2-octil-3(2H)-isotiazolona (OIT) en cuero por cromatografía líquida.

La determinación simultánea de los fungicidas TCMTB, PCMC, OPP, OIT, y también de 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y 3-yodo-2-propinil-butilo (IPBC) en muestras de piel se llevó a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC) con detector ultravioleta de fotodiodos (PDA). La preparación de la muestra y el proceso de extracción se realizaron siguiendo la norma ISO 13365. La fase móvil consistió en agua con un 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico (B). En la detección cromatográfica se introdujo un pequeño cambio en relación con la norma. Se utilizó un detector de fotodiodos en lugar de un detector de longitud de onda fija para mejorar la fiabilidad de las identificaciones y la sensibilidad de la cuantificación.

Se ha comprobado que el 2,4,6-triclorofenol (TCP) y el pentaclorofenol (PCP) no interfieren en la determinación.

Las fortificaciones de 30 y 300 mg/kg en cuero produjeron unas recuperaciones medias de TCMTB del 94% y 99%, respectivamente. Las recuperaciones de los otros fungicidas fueron similares. Los fungicidas investigados se determinaron en 40 muestras de cueros del mercado. En el 90% de las muestras se encontraron residuos de TCMTB.

En resumen, la nueva norma ISO 13365:2011 proporciona un método rápido y fiable, no sólo para la determinación de las cuatro moléculas incluidas en el ámbito de aplicación de la norma, sino también para otros fungicidas como el IPBC y el MBT.

Keywords

ISO 13365:2011 - TCMTB – PCMC – OPP – OIT – IPBC – MBT - fungicidas – cromatografía líquida - detección fotodiodos.

Determination of TCMTB and other fungicides in leather

ABSTRACT

The standard ISO 13365:2011 develops a test method for the determination of the content of the preservative agents 2-(thiocyanomethylthio)-benzothiazole (TCMTB), 4-chloro-3-methylphenol (PCMC), 2-phenylphenol (OPP) and 2-Octyl-3(2H)-isothiazolone (OIT) in leather by liquid chromatography.

The simultaneous determination of the fungicides TCMTB, PCMC, OPP, OIT, and also 2-mercaptobenzothiazol (MBT) and 3-iodo-2-propynyl-butylcarbamate (IPBC) in leather samples was carried out by liquid chromatography (HPLC) with diode array ultraviolet detection. The sample preparation and extraction step was performed following the new ISO 13365 Standard. The mobile phase was 0.1% formic acid in water (A) : 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The chromatographic detection introduced only a minor change with respect to the Standard: a photo diode array detector was used instead of a single wavelength ultraviolet one, thereby improving the reliability of the identifications and the sensitivity of the quantification.

It has been ensured that 2,4,6-trichlorophenol (TCP) and pentachlorophenol (PCP) not interfere in the determination.

The leather fortifications of 30 and 300 mg/kg yielded average TCMTB recoveries of 94% and 99%, respectively. The recoveries of the other fungicides were similar. The targeted fungicides were determined in 40 samples of commercial leather. Residues of TCMTB were found in 90% of samples.

In summary, the new ISO 13365:2011 Standard provides a quick and reliable method not only for the determination of the four molecules that are within the scope of the Standard but also for other fungicides such as IPBC and MBT.

Keywords

ISO 13365:2011 - TCMTB – PCMC – OPP – OIT – IPBC – MBT - fungicides - liquid chromatography - photo diode array detection.

1. Introducción

Este estudio forma parte del Proyecto del Plan Nacional I + D + I "Aplicación de nuevos compuestos fungicidas medioambientalmente sostenibles" ⁽¹⁾, con el que se quieren probar fungicidas alternativos para el cuero.

Se han hallado en la literatura datos sobre las concentraciones óptimas de aplicación de fungicidas en el cuero. No obstante, si bien suponen un punto de referencia, difieren de unos autores a otros ya que las condiciones de los ensayos no son exactamente las mismas. Además, no se menciona el método de análisis con el que se obtuvieron, y algunos valores se presentan referidos al % de producto aplicado, con lo que no se dispone del contenido real en el cuero.

Para poder comparar la eficacia y rendimiento de los fungicidas existentes en el mercado con los alternativos, se llevaran a cabo las determinaciones bajo las mismas condiciones de ensayo.

La viabilidad de la aplicación en el cuero de nuevos fungicidas, escapa al alcance de este Trabajo, cuyo objetivo es proporcionar un método validado para el análisis simultáneo de TCMTB y siete fungicidas más aplicados en la piel y el cuero.

1.1. La piel: un material biodegradable ^(2,3)

En la producción y distribución del cuero, pueden ocurrir dos tipos de biodegradación: la debida a bacterias y la debida a hongos. La primera generalmente ocurre en la etapa inicial del proceso, pero la segunda suele aparecer después del proceso de curtición.

Como casi todos los seres vivos, los hongos necesitan ciertas condiciones básicas para crecer y multiplicarse: humedad y nutrientes.

- La piel en wet-blue es una buena fuente de humedad. Y algunos de los productos utilizados pueden actuar como nutrientes (sales amónicas, fosfatos, tensoactivos).

- En la piel acabada el contenido en humedad es mucho más bajo, y el crecimiento de hongos es menor, pero durante el transporte entre diferentes zonas climáticas, o si las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas, el contenido de humedad puede aumentar.

Los hongos se manifiestan visualmente en forma de manchas. Pero, además, la piel sufre una disminución de las propiedades físicas debido a una degradación del colágeno, reduciendo la calidad de la piel.

Se hace necesario, pues, durante el proceso de fabricación de pieles, para evitar pérdidas y deterioros, la adición de sustancias que eviten el ataque de microorganismos tal como bacterias y hongos.

1.2. Los fungicidas en el proceso de curtición ⁽³⁾

Se han identificado diferentes cepas de hongos características de cada proceso de curtición. Así, se han podido aislar diferentes tipos de hongos en cueros curtidos al cromo, en el proceso de secado (si los parámetros de control no se ajustan adecuadamente), y en los cueros acabados.

Para que un fungicida tenga valor en la industria del cuero debe tener las siguientes propiedades:

- a) Alta actividad
- b) Amplio espectro antimicrobiano
- c) Compatibilidad con la piel, con la etapa de píquel, y con los licores de cromo y tánicos.
- d) Estabilidad en la piel
- e) No disminuir el color
- f) Medioambientalmente aceptable
- g) Baja toxicidad en humanos y animales
- h) Coste asumible

Durante décadas los fungicidas utilizados de forma específica a la industria del cuero fueron el paranitrophenol (PNP) y el pentaclorofenol (PCP), pero se dejaron de utilizar debido a su toxicidad y baja biodegradabilidad (prohibición del PCP por la Directiva 91/173/CEE).

Los fungicidas más usados en el proceso de curtición, en los últimos 30 años, son los siguientes:

- De tipo fenólico: CMK (p-cloro-m-cresol), OPP (o-phenyl-Phenol), TCP (2,4,6-trichlorophenol).

- Heterocíclicos: OIT (2-n-octylisothiazolin-3-ona), TCMTB (2-thiocyanomethylthio benzothiazole), siendo este último el más ampliamente utilizado en la actualidad.

También se conoce la aplicación como fungicida en la industria del cuero de MBT (methylene bithiocyanate), aunque no se dispone de datos sobre las concentraciones absorbidas por la piel. Este fungicida se ha incluido también en el desarrollo y optimización del método analítico.

2. Determinación de fungicidas

2.1. Fungicidas estudiados

Con el fin de disponer de un método de análisis práctico para el análisis de fungicidas en el cuero, se ha incluido el fungicida pentaclorofenol (PCP), pese a su prohibición por la Comunidad Europea, a fin de poder detectar su presencia en cueros procedentes de países no sometidos a la normativa europea.

Siglas	Nombre	Fórmula	Núm. CAS
CMK o PCMK	p-cloro-m-cresol ó (p-chlorocresol) ó (4-chloro-3-methylphenol)	C ₇ H ₇ ClO	59-50-7
OPP	o-phenyl-phenol ó (2-phenylphenol)	C ₁₂ H ₁₀ O	90-43-7
OIT	2-n-octylisothiazolin-3-ona	C ₁₁ H ₁₉ NOS	26530-20-1
IPBC	3-iodoprop-2-ynyl butylcarbamate	C ₈ H ₁₂ INO ₂	55406-53-6
TCMTB	2-thiocyanomethylthio benzothiazole	C ₉ H ₆ N ₂ S ₃	64441-45-8
MBT	2-mercaptobenzothiazol o methylene bis thiocyanate	C ₇ H ₅ NS ₂	149-30-4
TCP	2,4,6-trichlorophenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	88-06-2
PCP	pentachlorophenol	C ₆ HCl ₅ O	87-86-5

Taula 1. Fungicidas analizados

2.2. Estructura química y espectros UV de los fungicidas estudiados

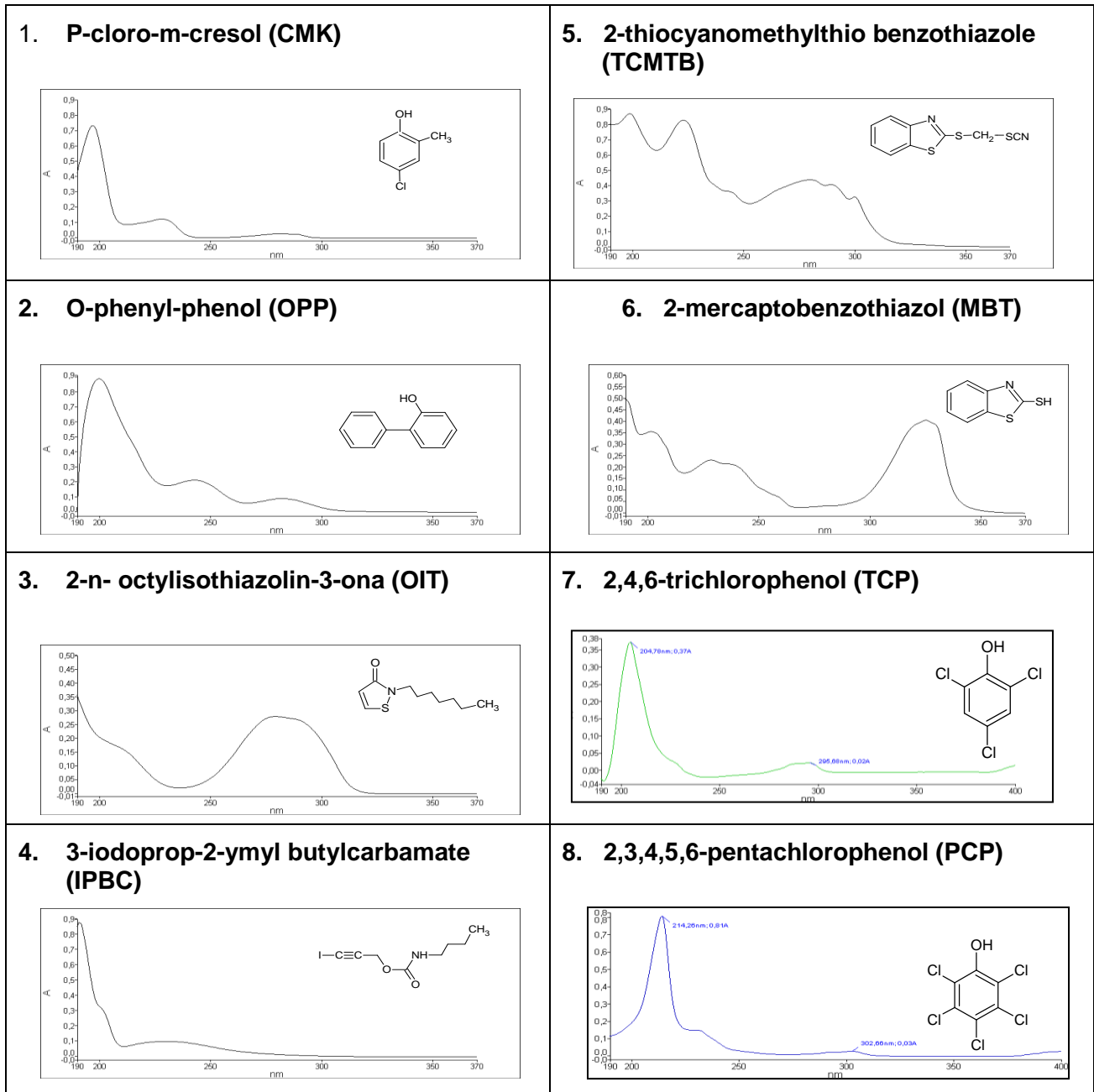


Fig.1. Estructura química y espectros UV de los fungicidas analizados

2.3. Técnica analítica: Cromatografía líquida con detección de fotodiodos (HPLC-PDA)

Para este estudio se adaptó la Norma ISO 13365:2011 *Determination of the preservative (TCMTB, PCMC, OPP, OIT) content in leather by liquid chromatography*, recientemente publicada.

El método descrito en la Norma es adecuado para los cuatro fungicidas más utilizados en la industria del cuero, pero también puede ser empleado para el análisis simultáneo de otras moléculas que están siendo investigadas. La sensibilidad y selectividad del método, con detección UV a una longitud de onda fija, puede ser significativamente mejorada seleccionando una longitud de onda óptima para la detección específica de cada molécula.

El uso de un detector de PDA nos permite obtener tantos cromatogramas (canales) como fungicidas diferentes en estudio para cada muestra inyectada. Cada fungicida se detecta en su propia longitud de onda óptima.

2.4. Extracción de los fungicidas

Las primeras determinaciones de TCMTB en piel se realizaron en 1978 ⁽⁴⁾ sobre wet blue con extracción Soxleht durante 8 horas, con diclorometano. Las recuperaciones fueron del orden del 50%. Fowler et al. en 1987 propusieron una combinación de ultrasonidos y Soxleht también con diclorometano ⁽⁵⁾. La eficacia de la extracción aumentaba al disminuir el contenido en humedad de las muestras. Las determinaciones cromatográficas se llevaron a cabo con un eluyente no polar, como hexano y diclorometano, obteniendo bajas recuperaciones. Tomaselli et al, en 1991 introdujo la cromatografía líquida HPLC de fase reversa para el análisis de productos fungicidas, con acetonitrilo/agua al 0.1% de H₃PO₄ como eluyente⁽⁶⁾.

No se ha encontrado ningún método para la determinación simultánea de más de cuatro fungicidas diferentes en piel. De hecho, se sabe muy poco acerca de los contenidos residuales de fungicidas en pieles y cueros. Hauber y Germann han indicado que el contenido de TCMTB de wet blue debe ser de 250 ppm para el nivel mínimo de protección fungicida, en comparación con 580/280 ppm para PCMC / OPP y 80 ppm para OIT^(7,8).

Estos niveles han servido de punto de partida para este estudio.

Así, siguiendo la norma Norma ISO 13365, se ha efectuado la puesta a punto del método y el estudio de recuperación para todos los fungicidas propuestos.

3. Procedimiento experimental

3.1. Instrumentación

Cromatógrafo HPLC *Waters Alliance 2695* (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) acoplado a un detector PDA *Waters 2998* con intervalo de detección entre 190 nm y 380 nm.

Columna *Mediterranea Sea₁₈* de fase reversa 15 x 46 cm, 3µm (Teknokroma, Barcelona, Spain).

La fase móvil utilizada fue agua con ácido fórmico al 0.1% (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (B). Gradiente 40% (A)/ 60 % (B) durante los 7 primeros minutos, y aumento lineal hasta 95 % de ACN hasta 11 min.

Flujo 0.9 mL/min.

Temperatura columna 30 °C.

Volumen de inyección 20-µL o inferior (10-µL o 15-µL) para muestras con altas concentraciones de fungicidas.

La gestión de los datos cromatográficos se realiza con el software Empower.

3.2. Reactivos y materiales

Acetonitrilo calidad gradiente para HPLC de Panreac. Agua ultrapura calidad Milli-Q de Millipore. Ácido fórmico Suprapur de Fluka.

Los fungicidas PCMCK y OPP son de Sharlau Ferosa. TCMTB y MBT de Lamirsa. OIT de calidad Pestanal de Sigma Aldrich. PCP y TCP son de Fluka y IPBC es de Bayer, comercializado como Preventol MP100.

Filtres de membrana de PVDF de 0.45 µm de Micron Analítica.

3.3. Procedimiento analítico

Se pesa 1.000 ± 0.010 g de piel desfibrada en un frasco con tapa de 50 mL y se añaden 20 mL de acetonitrilo. La muestra se lleva a un baño de ultrasonidos durante 1 hora \pm 5 min a temperatura ambiente. Después se filtra a través de un filtro de membrana de PVDF de 0.45 μ m en un vial. El filtrado se analiza por HPLC.

El pico del analito se identifica por comparación del tiempo de retención con el de los patrones, y además se confirma con el detector PDA, que proporciona el espectro UV de cada pico y lo compara también con el de los patrones registrados.

Los fungicidas detectados se cuantifican con el calibrado preparado previamente a partir de las soluciones patrón de cada fungicida.

3.4. Modificaciones respecto a la norma ISO13365

3.4.1. Condiciones cromatográficas

Com ya se ha dicho con anterioridad, el método cromatográfico desarrollado para las 8 moléculas de fungicidas, está basado en la norma ISO 13365, con algunas variaciones.

	Condiciones cromatográficas de la Norma ISO 13365	Condicions cromatogràfiques MODIFICADAS
Columna	CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 HD with pre-column	Mediterranea Sea 18 TR-010043, 15 x 0,46 cm, 3 μ m
Flujo	0,8 mL/min	0,9 mL/min
Fase móvil	Agua (A) / Acetonitrilo (B)	Agua al 0.1% ác. Fórmico (A) / Acetonitrilo al 0.1% ác. Fórmico (B)
Gradiente	60% B 6 min isocrático, lineal a 95% B en 9 min.	60% B 7 min isocratico, lineal a 95% B hasta 11 min.
Temperatura columna	30°C	30°C
Detección UV	275 nm	Detector PDA. Barrido entre 190 y 380 nm, con los siguientes canales: Para IPBC, 193 nm; MBT, 324 nm; OIT, 279 nm; TCP, 205 nm; PCP, 214 nm; OPP, 201 y 246 nm; PCMC, 201 y 228 nm; y para TCMTB 223 y 280 nm.
Volumen inyección	20 μ L	20 μ L

Taula 2. Comparación de las condiciones cromatográficas de la Norma ISO 13365 y las modificadas en el análisis de los 8 fungicidas.

Las variaciones más destacables respecto a las recomendadas en la norma, han sido la acidificación de la fase móvil y sobretodo el método de detección UV. El flujo también se ha modificado para poder obtener una buena separación de las 8 moléculas (no olvidemos que las condiciones de la norma están previstas para 4 fungicidas).

Estudios sobre fungicidas realizados en la EEI ^(9,10,11) demostraron una mayor reproducibilidad cromatográfica cuando la fase móvil era ligeramente ácida. Además, el TCMTB es más estable en medio ácido y dado que se analiza conjuntamente con fungicidas fenólicos, es recomendable un pH ligeramente ácido.

Con tales modificaciones en las condiciones cromatográficas, se pueden analizar todos los fungicidas simultáneamente, tal como muestra la siguiente imagen:

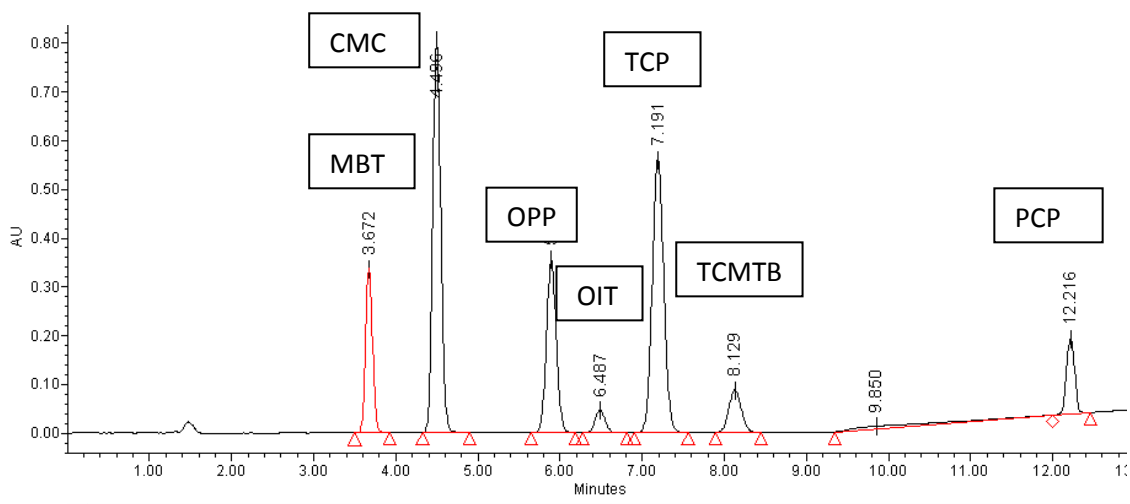


Fig.2. Cromatograma obtenido a 279 nm

3.4.2. Condiciones del método de detección UV

Una de las diferencias importantes respecto a la norma ISO 13365 es la utilización de un detector de fotodiodos acoplado al cromatógrafo líquido. Este detector permite identificar una sustancia por su espectro ultravioleta. Esto permitirá registrar el cromatograma a la longitud de onda óptima para cada fungicida en una misma inyección, proporcionando la máxima sensibilidad en la detección.

En cambio la norma contempla la detección conjunta a una misma longitud de onda, 275 nm.

Una herramienta muy útil que acompaña el *software* de este detector, es la posibilidad de registrar los espectros en una librería, a partir de sustancias patrón. Esta base de datos se utiliza durante el análisis cromatográfico permitiendo la identificación *in situ* de las sustancias de interés.

Para ilustrar la funcionalidad del detector de fotodiodos, observemos los siguientes cromatogramas fijándonos en los fungicidas MBT y PCP.

Por ejemplo a 214 nm el cromatograma tiene este aspecto.

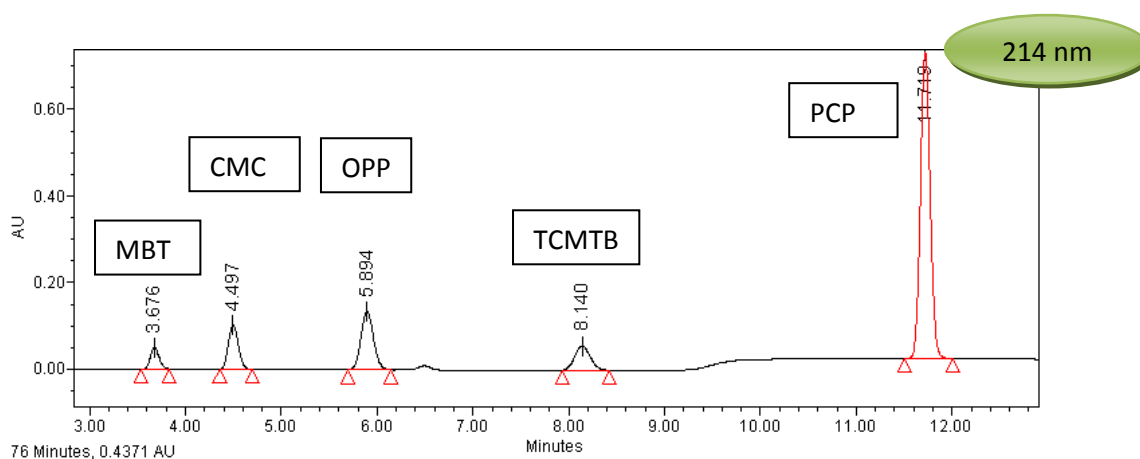


Fig. 4. Cromatograma obtenido a 214 nm

Mientras que a 324 nm tiene este otro:

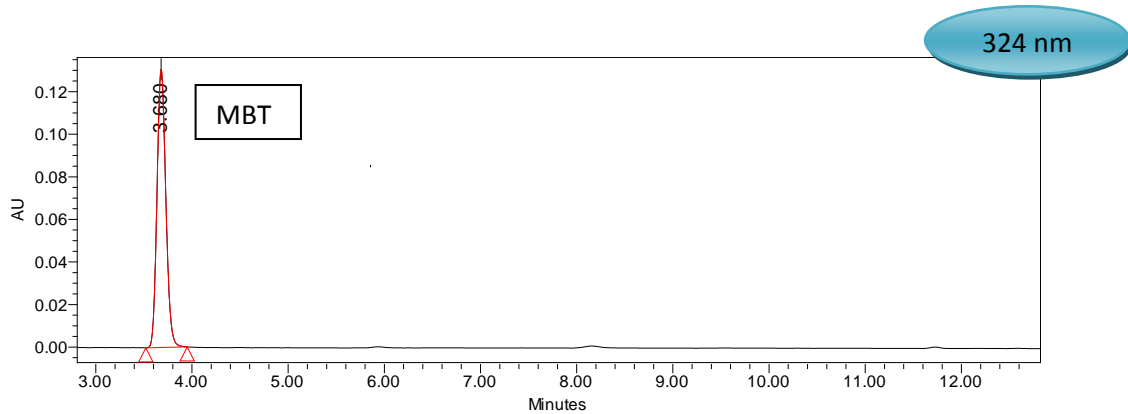
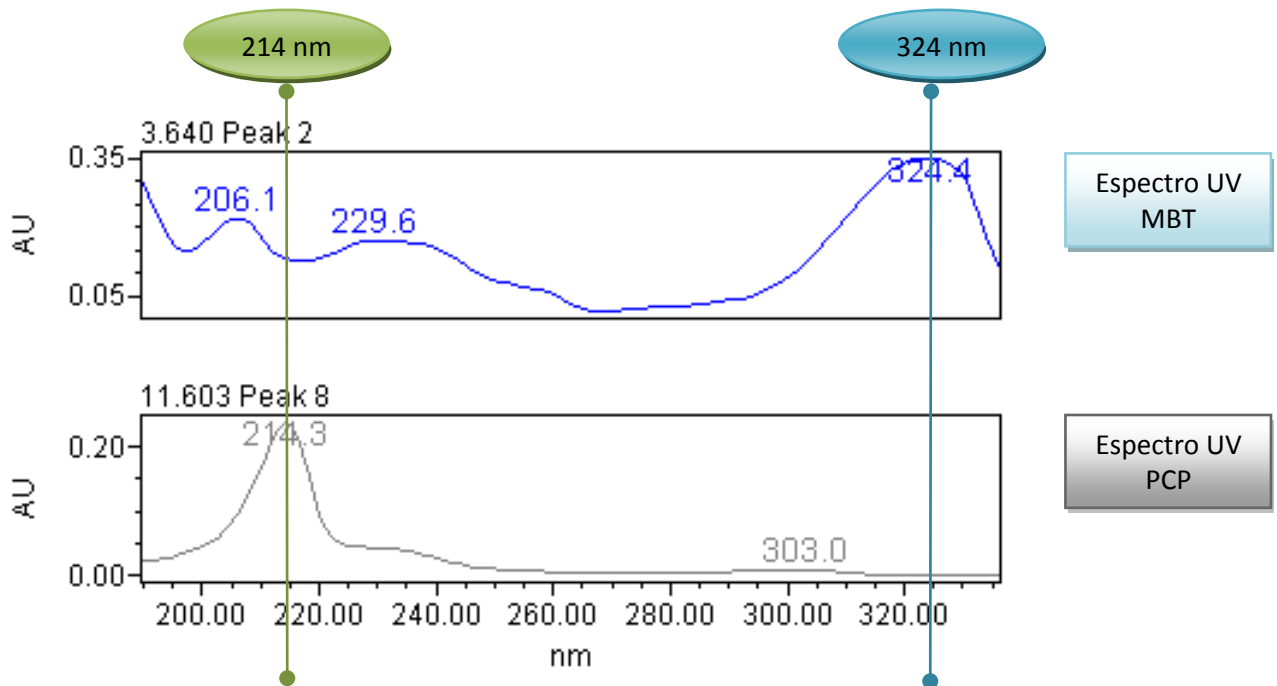


Fig. 5. Cromatograma obtenido a 324 nm

La explicación la encontramos en sus espectros UV.



A 214 nm el espectro que presenta mayor intensidad corresponde al del PCP: ésta es la longitud de onda característica para el PCP.

En cambio a 324 nm el único fungicida que presenta señal en el ultravioleta es el MBT. Por eso un cromatograma obtenido a 324 nm, como el que hemos visto, sólo presenta un pico, el del MBT.

4. Validación del método de análisis

El método ha sido validado en términos de linealidad, precisión, selectividad y recuperación para determinar su fiabilidad y calidad.

Linealidad, recuperación y precisión

Se prepararon cinco patrones dentro del rango 2 a 40 mg/L para OPP, OIT, PCMC, PCP y TCMTB. Para MBT, el rango de los patrones fue de 0.5 – 20 mg/L y para IPBC fue de 5 – 50 mg/L. Se registraron las áreas y se elaboró el análisis de regresión lineal sin forzar la curva por el cero. La linealidad se comprobó en todo el rango, hallándose coeficientes de correlación superiores a 0.999.

El estudio de recuperación se llevó a cabo para cada fungicida a dos niveles de concentración con 3 replicados por nivel. Los niveles fueron seleccionados para reproducir los rangos de concentración encontrados en muestras reales según Hauber y Germann^{10,11}.

Se partió de una muestra de piel fresca de vaca procedente de Cataluña que fue curtida en el laboratorio sin adicionar fungicidas. Posteriormente fue analizada para verificar la ausencia de fungicidas.

Esta muestra de piel wet-blue una vez secada a 25° C y desfibrada fue la matriz utilizada para el estudio de recuperación. Porciones de 1 g fueron transferidas a frascos con tapón de 50 mL donde se adicionaban cantidades conocidas de soluciones patrón en acetonitrilo. El solvente se dejaba evaporar a 23°C durante 24 horas. Posteriormente se realizaba el análisis. El proceso se repitió tres veces para cada fungicida.

La recuperación promedio fue superior al 84% en todos los casos, como muestra la Tabla 2. Para el TCMTB, la recuperación del método fue del 99% en el nivel de concentración de 300 mg/kg.

La precisión del método se evaluó calculando la desviación estándar relativa (RSD) de los replicados (n=3) realizados en la recuperación del método. Los valores RSD fueron inferiores al $\pm 5\%$. Los resultados están incluidos en la Tabla 1.

Fungicide	Wavelength	Level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	% RSD (n=3)
OIT	279 nm	30	84	± 1.7
		350	91	± 4.6
OPP	201 nm	50	92	± 0.8
		450	96	± 0.8
OPP	246 nm	50	95	± 0.4
		450	96	± 0.3
IPBC	193 nm	130	98	± 5.0
		300	88	± 3.5
MBT	324 nm	20	88	± 1.8
		250	88	± 1.6
PCMC	201 nm	70	91	± 0.1
		600	98	± 1.1
PCMC	228 nm	70	93	± 0.5
		600	96	± 0.3
TCMTB	223 nm	30	94	± 5.0
		300	99	± 0.6

Tabla 1. Recuperaciones de 6 fungicidas a dos niveles de concentración

Límites de detección y cuantificación

Se calcularon los límites de detección (LOD) para los diferentes fungicidas, definidos como la relación señal-ruido de 3 (S/N=3). También se calcularon los límites de cuantificación (LOQ), definidos como la relación señal-ruido de 10 (S/N=10). Los LODs de TCMTB, PCMC y OPP fueron medidos a más de una longitud de onda. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Una mayor señal no implica necesariamente mayor sensibilidad, ya que dependerá del ruido de la línea de base. El espectro UV del

TCMTB muestra un máximo de absorción a 223 nm. No obstante, los datos de la Tabla 1 muestran que para el TCMTB la longitud de onda de detección más sensible es 275 nm.

Para el OPP la longitud de onda de detección más sensible es 243 nm. Para PCMC, el LOD a 197 nm resultó ser aproximadamente 3 veces más sensible que a 228 nm. El LOD más bajo se obtuvo para MBT y el más alto para IPBC, como era de esperar.

Los resultados muestran que la sensibilidad del método descrito en este trabajo permite la cuantificación de los fungicidas en el rango de concentraciones utilizados en la industria del cuero.

Fungicide	Wavelength (nm)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
TCMTB	223	1.7	5.7
	275	1.2	4.0
MBT	324	0.06	0.2
	197	0.71	2.4
PCMC	201	1.3	4.3
	228	2.0	6.7
OPP	201	2.2	7.3
	246	1.7	5.7
OIT	279	0.46	1.5
TCP	203	1.7	5.7
PCP	214	0.39	1.3
IPBC	193	17	57

Tabla 2. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 8 fungicidas.

Selección de la longitud de onda de detección

Se deben tener en cuenta tres criterios al elegir la longitud de onda de detección: sensibilidad, precisión, y selectividad. La sensibilidad es mayor a longitudes de onda más cortas, excepto para MBT y OIT. Sin embargo, la precisión de los análisis es mayor a longitudes de onda más largas. Por ejemplo, en el análisis de pieles comerciales, la desviación estándar relativa para el OPP a 201 nm fue $\pm 3.8\%$ mientras que a 246 nm fue de solo $\pm 1.5\%$.

Finalmente, una adecuada selección de la longitud de onda mejora la selectividad de la cromatografía. Los cromatogramas de algunas muestras de cuero acabado son complejos, con más picos que los de las muestras de wet blue. Aparecen picos de sustancias desconocidas en las proximidades de los tiempos de retención de los fungicidas de interés, que pueden interferir, en algunas muestras, siendo difícil una correcta integración de los picos. En estos casos, la selección de una longitud de onda donde la diferencia entre el fungicida y la interferencia sea máxima, mejorará la calidad del cromatograma.

5. Análisis de muestras comerciales

Los seis fungicidas se determinaron en 40 muestras de piel comercializadas. Todas ellas contenían residuos de al menos uno de los fungicidas determinados. El 40% contenían dos o más moléculas diferentes. Entre los residuos de fungicidas identificados, TCMTB se detectó en el 90% de las pieles, PCMC en el 35%, OPP en el 25%, y MBT y OIT en el 8%. Como era de esperar, IPBC no se detectó en ninguna muestra. TCMTB se encontró en 10 pieles wet-blue de origen nacional que fueron analizadas. Una de estas muestras también contenía 154 mg/kg de MBT. Las concentraciones oscilaron entre 440 y 540 mg/kg de TCMTB en pieles wet-blue nacionales en para exportación. En wet-blue para periodos cortos de conservación, las concentraciones de TCMTB oscilaron entre 253 y 354 mg/kg. Todos los valores expresados sobre peso de muestra acondicionada en atmósfera estándar.

La mayoría de muestras que contenían PCMC también contenían OPP. Las concentraciones detectadas de los dos fungicidas variaron de 8 a 680 mg/kg y de 8 a 480 mg/kg, respectivamente. Las concentraciones detectadas de MBT y OIT oscilaron de 4 a 154 mg/kg y de 44 a 230 mg/kg, respectivamente.

6. Conclusiones

HPLC permite una rápida, sensible y altamente específica determinación de los fungicidas como conservantes del cuero. La preparación de la muestra según la norma ISO 13365 es simple: tras una extracción de 1 hora, la muestra se filtra y se inyecta. El espectro UV a partir de la detección PDA permite una confirmación fiable de la identidad del analito.

La selección de la longitud de onda de detección es específica para cada fungicida. El estudio muestra que, generalmente, la precisión de los análisis es mejor a longitudes de onda más largas. Sin embargo, la sensibilidad es mejor a longitudes de onda más cortas, a pesar de que sea habitual la aparición de interferencias.

Los resultados de los análisis de muestras reales muestran que el TCMTB es el fungicida más ampliamente utilizado como protector del cuero contra el ataque de hongos durante el almacenamiento.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Tecnologías Limpias En Tenería: Aplicación De Nuevos Compuestos Fungicidas Medioambientalmente Sostenibles. Referencia: CTQ2009-08347. Proyecto Del Plan Nacional De I+D+I 2008-2011 De Investigación Fundamental.*

(2) Hauber, C. and Germann, H.P. The Addition of Fungicides in Chrome Tannage and their Penetration, Absorption and Distribution in the Wet-Blue. *World Leather*, 1997. pp. 75-82.

(3) Orlita, A. Microbial Biodeterioration of Leather and its Control: A Review. *International Biodeterioration Biodegradation*, 2004, vol. 53, no. 3. pp. 157-163 ISSN 0964-8305.

(4) J.Van Deren, E.F.Weiss. *J.Am.Leather.Chem.As.*, **73**, 498 (1978).

(5) W.M.Fowler, A.E.Russell, I.H.Kruger, S.C.Pinchuck. *J.Soc.Leath.Tech.Ch.*, **71**, 100 (1987).

- (6) M. Tommaselli, A. Cozzolino, *Cuoio Pelli Mat. Concianti*, **67**, 221 (1991).
- (7) C.Hauber, H.P.Germann. *World Leather*, **10**(3), 75 (1997).
- (8) C.Hauber. *Microbicide applications in the leather industry* in *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*. W. Paulus. Springer, 2004, 317-324.
- (9) Bautista, S. *Desenvolupament De Metodologia Pel Control Analític De Fitosanitaris*. , 2006.
- (10) Vázquez, A. *Implantació De Noves Aplicacions Cromatogràfiques Al Laboratori De l'EUETII*. , 2004.
- (11) Planas Viñas, X., Font Vallès, J. and Reyes Ferrera, M.R. *Determinació De TCMTB i Altres Fungicides En Pells*. , 2004.

Atenciój

Les pàgines 215 i següents de la tesi contenen els articles citats a continuació, que es poden consultar a la web de l'editor:

1) **J. Font, M. Reyes, S. Cuadros, A. Bacardit, A. Marsal.** *Determination of TCMTB and other fungicides in leather.* JALCA vol 106, 2011, p. 341-348.

2) **J. Font, M.Reyes, S. Cuadros, A. Bacardit, L.Ollé, A. Marsal** *Determination of fungicides in residual tanning floats using solid phase micro extraction.* JALCA vol 108, 2013, p. 41-47