

Óscar Castro Serrano

**ESTUDI DE BIOACCESSIBILITAT DE FRAGÀNCIES
SINTÈTIQUES EN MOSTRES DE PEIX**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per la Dra. Eva Pocurull Aixalà

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2017

Índex

Abstract	1
1. Introducció	2
2. Objectius.....	8
3. Part experimental.....	8
3.1. Reactius i estàndards	8
3.2. Neteja del material	8
3.3. Mostreig i pretractament de mostra	9
3.3.1 Mostres de peix.....	9
3.3.2 Mostres líquides	10
3.3.3 Preparació de mostra adicionada	10
3.4. Procés de digestió humana <i>in vitro</i>	10
3.5. Extracció amb QuEChERS.....	12
3.6. Extracció per HS-SPME.....	14
3.7. Anàlisi per GC-IT-MS/MS	14
4. Resultats i discussió	17
4.1. Compostos i separació cromatogràfica	17
4.2. Estudi de bioaccessibilitat.....	18
4.3. Efecte del cuinat sobre la concentració de galaxolide	24
5. Conclusions	31
6. Continuïtat de l'estudi	32
7. Referències	33

Abstract

Galaxolide (HHCB) is one of the most common synthetic musk fragrances. Due to their widespread use in personal care products such as cosmetics, cleaning products and soaps, among others; they have been considered as emerging organic contaminants (EOCs) because they are introduced continuously in the environment by different pathways. Usually, they are flushed down into sewer systems and due to their partial removal during sewage treatment, they reach superficial waters and accumulate in fish and shellfish which can cause direct exposure to humans.

In the present investigation, a bioaccessibility study of HHCB in fish samples has been performed. Raw hake spiked samples were *in vitro* digested and aliquots of each fraction of the digestion process were analysed. HHCB was quantitatively present in the bioaccessible fraction. Therefore, the effect of fish cooking on HHCB was evaluated in cod, mackerel and sardine samples. Results demonstrate that steaming and grilling fish samples led to a loss of between 50 and 70% of its HHCB content.

For liquid samples, head-space solid phase micro extraction (HS-SPME) method was adapted from a previous study and for solid samples QuEChERS extraction was performed as described in a recent method developed for extraction of musks in fish samples. All extracts were analysed by gas chromatography-tandem mass spectrometry with ion trap analyser (GC-IT-MS/MS).

This study provides new data that can lead to a more accurate food safety risk assessment studies.

1. Introducció

La necessitat de millorar la qualitat de vida, l'augment de la demanda de certs productes i la voluntat de reduir els costos en grans processos industrials són alguns dels causants de la producció desmesurada de productes químics que vivim actualment. A falta d'una regulació degut al gran augment de famílies de compostos que han sorgit, cada cop ens trobem amb més casos de pol·lució emergent.

Els EOCs, de l'anglès *Emerging Organic Contaminants*, recullen tots aquests compostos contaminants. Encara que porten temps presents al nostre entorn, hem començat a prendre consciència del seu impacte en el medi ambient en els últims 20 anys [1]. Aquests poden trobar-se en qualsevol lloc, tant en ecosistemes com en productes fabricats, i degut a la seva emissió constant poden comprometre la salut de les espècies que hi habiten com la de les persones que utilitzen els productes. Els EOCs són una gran família d'on es poden destacar entre d'altres els productes farmacèutics, els additius tant industrials com alimentaris i els productes d'higiene personal [2]. De tots ells, l'últim és un dels grups amb més interès actual.

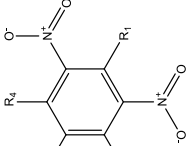
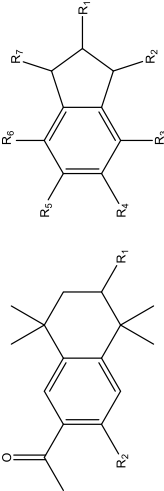
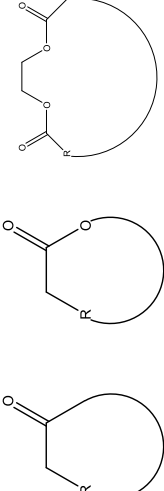
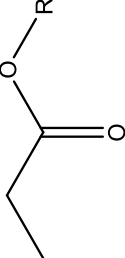
Els productes d'higiene personal PCPs (*Personal Care Products*) inclouen els agents repel·lents d'insectes, antisèptics, antioxidants, filtres UV i fragàncies sintètiques, entre d'altres. Aquestes últimes generen un gran interès degut al seu extens ús. Les fragàncies sintètiques (*synthetic musks*) es troben principalment en cosmètics, productes de neteja, sabons, olis corporals, pastes de dents, etc., és a dir que estan molt presents en el dia a dia [3]. Aquestes són les responsables de l'olor distintiva i persistent dels productes.

Existeixen 4 grups de fragàncies sintètiques diferenciats per la seva estructura i que es van anar originant a partir de les discussions en quant a la toxicitat d'aquestes durant la història. L'any 1888, Albert Baur estudiava com aconseguir nous explosius quan per accident va descobrir la que seria la primera fragància sintètica, el *musk* Baur [4]. Amb una base de nitrobenzè, les investigacions van avançar en la direcció d'aconseguir més fragàncies sintètiques per poder substituir les naturals. És llavors quan va aparèixer el primer grup, les *nitro musks* (NMs), de les quals destaquen la *musk xylene* o la *musk ketone*. Les propietats mutagèniques, cancerígenes i toxicològiques van fer que a finals

dels anys 90 a Europa es crees una directiva que en prohibia el seu ús en productes cosmètics. A partir del 1960 van començar a aparèixer les fragàncies policíclics (*Polycyclic musks* PCMs) com el galaxolide (HHCB) o el tonalide (AHTN). El grup es caracteritza per presentar quiralitat, responsable de la seva olor característica, ja que no tots els estereoisòmers presenten característiques olfactives. El fet es veu molt ben representat al Galaxolide, del qual els isòmers 4S (4S,7R i 4S,7S) són els que tenen l'olor característic, fet estudiat per Freter et al. [5]. Les seves propietats lipofíliques i la seva baixa biodegradació poden portar a la bioacumulació d'aquests compostos. Això va fer que a partir del 1990 la seva producció disminuís i provoqués l'aparició dels musks macrocíclics (*Macrocyclic musks* MCMs). Malgrat el seu elevat cost econòmic a l'hora de sintetitzar-los, es creu que en un futur podran substituir els policíclics degut a la seva aparent baixa contaminació. Aquests compostos estan formats per grans macrocicles amb lactones o cetones dels quals en podem destacar el *musk NN* o l'*Exeltolide*. Finalment cal mencionar els musks alicíclics (*Alicyclic musks*, ACMs), coneguts també com èsters cicloalquílics o musks lineals. Tot i ser sintetitzats per BASF al 1975, no van poder competir amb els musks policíclics com el galaxolide, fet que va propiciar la seva desaparició. Avui dia es presenten com una opció econòmicament més viable i més tolerant amb el medi ambient degut a la seva elevada biodegradabilitat. Encara això, el seu ús es troba molt limitat al sector dels productes d'higiene personal [1,6]. A la Taula 1 es troben recollides les estructures base de cadascun dels grups com també algunes de les fragàncies més representatives.

A més a més dels 4 grups principals, cal també tenir en compte els metabòlits i els productes de degradació de les pròpies substàncies, que poden arribar a ser fins i tot més tòxics que els propis compostos. Aquesta transformació es pot produir mitjançant processos biòtics o abiòtics, degradació fotoquímica, reaccions enzimàtiques, etc. i pot donar-se en plantes de tractament d'aigües residuals, ecosistemes marins o en organismes superiors. Alguns exemples de productes de transformació són el *4-amino musk xylene* i el *2-amino musk* provinents de la reducció del grup nitro del *musk xylene* i per altra banda el *galaxolidone (HHCB-lactone)*, principal producte de degradació del *galaxolide* [1,6].

Taula 1. Principals grups de fragàncies sintètiques, estructura base i compostos característics [1].

Fragàncies	Compostos característics	Estructura base de cada grup
Nitro musks (NMs)	- Musk xylene (MX) - Musk ketone (MK) - Musk moskene (MM) - Musk tibetene (MT)	 $R_1 - R_4 =$ grups alquil, cetona i metoxi
Musks Policíclics (PCMs)	- Galaxolide (HHCB) - Tonalide (AHTN) - Cashmeran (DPMII) - Celestoide (ADBI)	 $R_1 - R_7 =$ grups alquil i acetilat
Musks Macrocíclics (MCMs)	- Exaltolide (EXA) - Muscone - Musk NN - Cervolide	 $R = 10 - 15$ carbonis
Musks Alicíclics (AMs)	- Cyclomusk - Helvetolide - Romandolide	 $R =$ cicloalquil

L'ús de les fragàncies sintètiques en productes de la vida quotidiana fa que aquests arribin directament a l'aigua residual. És per això que els efluent de les cases són la principal font de contaminació. Aquests efluent van a parar a les estacions de depuració d'aigües residuals (EDAR), que encara que estan dissenyades per eliminar agents patògens i substàncies orgàniques i inorgàniques, no estan dissenyades per a l'eliminació total d'aquestes fragàncies de l'aigua. Estudis com els de Homem et al. [3] o Vallecillos et al. [7] demostren que els efluent de les EDAR encara presenten nivells de ng L^{-1} de fragàncies, fet que demostra la baixa efectivitat d'aquestes a l'hora de tractar-les. Els llots resultat de la depuració de les aigües, que també contenen les fragàncies tal com han demostrat estudis com els de Llompart et al. [8], passen normalment a ser utilitzats com a fertilitzants en l'agricultura. D'altra banda, les aigües de l'efluent continuen el seu recorregut carregades de fragàncies sintètiques, que en arribar al medi aquàtic, en poden produir la seva contaminació.

Un cop al medi aquàtic les fragàncies poden entrar en la cadena tròfica dels éssers vius que habiten l'ecosistema, essent els peixos un dels organismes amb més exposició. Estudis com els de Fussel et al. [9] o Vallecillos et al. [10] demostren la bioacumulació d'aquestes fragàncies en diferents espècies de peixos i musclos. Així doncs, encara que la via cutània és la principal via d'exposició, també hem de tenir en compte que aquests peixos poden ser ingerits, fent de la dieta una via d'exposició alternativa, encara que a nivells més reduïts. Això fa que la ruta d'aquests compostos formi un cicle tancat com el representat a la Figura 1.

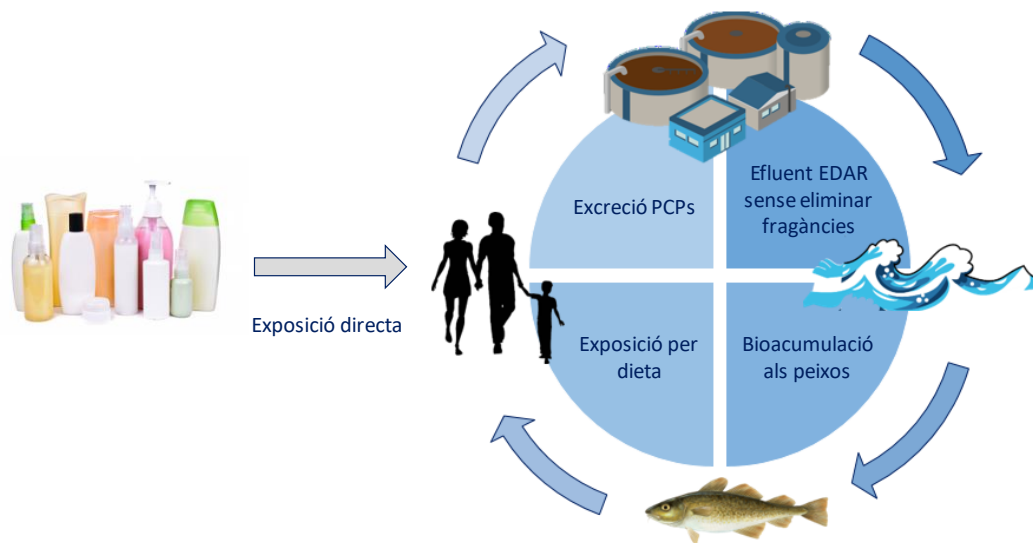


Figura 1. Cicle contaminant dels PCPs.

La importància de la determinació d'aquests compostos en peixos i l'anàlisi del risc d'exposició de les persones a aquests és un tema de molta rellevància actualment degut a que la legislació europea no descriu unes concentracions màximes permeses. Encara que els seus efectes sobre les persones no es coneixen en profunditat, les fragàncies han estat catalogades com possibles disruptors endocrins, a més a més de les propietats cancerígenes i tòxiques inherents a alguns dels compostos. És per això que la comunitat científica s'ha estat concentrant darrerament en el desenvolupament de mètodes per a la determinació de fragàncies en organismes aquàtics com els peixos.

Les metodologies aplicades en la determinació de fragàncies en peixos difereixen principalment en la tècnica d'extracció emprada. D'una banda s'han desenvolupat mètodes amb extracció per Soxhlet [11], *Solid-Phase Micro Extraction (SPME)* [12], *Microwave Assisted Extraction (MAE)* [13], *Focused-Ultrasound Solid-Liquid Extraction (FUSLE)* [13], *Pressurized liquid extraction (PLE)* [14] i QuEChERS [15]. Els principals inconvenients són el gran volum de solvent orgànic utilitzat (Soxhlet) o la necessitat d'instrumentació específica per dur a terme l'extracció (MAE, FUSLE, PLE). Degut a això, es van desenvolupar mètodes a partir dels QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), tècnica que es feia servir en l'extracció de pesticides en mostres d'aliments.

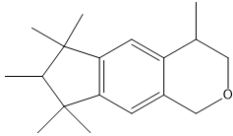
La matriu de les mostres de peix sol ser complexa degut al seu alt contingut lipídic i proteic, fet que pot comportar problemes a l'hora d'analitzar-la. Per tant es necessari afegir un pas de neteja o *clean-up*. La majoria de mètodes desenvolupats fan servir *Gel Permeation Chromatography (GPC)*, *Solid-Phase Extraction (SPE)* o *Dispersive Solid-Phase Extraction (dSPE)*, essent la última la més econòmica [1].

Pel que fa la determinació cromatogràfica, degut a la volatilitat de les fragàncies sintètiques, aquestes són determinades per cromatografia de gasos (GC). La cromatografia líquida també ha estat utilitzada, encara que existeixen molts pocs articles on se'n faci ús. D'altra banda l'electroforesis capil·lar és capaç de separar efectivament enantiòmers, però el ventall d'anàlits que es poden determinar és molt petit. Per aquests motius, la cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses, ja sigui simple o en tàndem, és la tècnica més adient avui dia [1].

Tot i això, els nivells de contaminants que es troben al organismes marins no reflecteixen realment la quantitat que serà bioaccessible per a les persones un cop ingerits. A més a més la majoria de proves es realitzen sobre mostres de peix cru que, en excepció del sushi, no és la manera més habitual d'ingerir-lo.

Aquest estudi pretén determinar la bioaccessibilitat de les fragàncies tenint en compte el procés de digestió gastro-intestinal mitjançant el seguiment dels fluids més importants del procés i a més a més veure com influeix l'efecte del cuinat sobre la presència de les fragàncies en peixos. En concret s'estudiarà la presència de la fragància policíclica galaxolide (HHCB) una de les més produïdes a nivell mundial i present en gran varietat de productes d'higiene personal [1]. A la Taula 2 es troben les principals característiques del compost.

Taula 2. Característiques principals del galaxolide [6].

Nom	P.M. (g/mol)	Nº CAS	Estructura
1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta-[g]-2-benzopirà (HHCB, galaxolide)	258.4	1222-05-5	

L'estudi s'ha desenvolupat al grup de recerca de Cromatografia, Aplicacions Mediambientals (CROMA) en col·laboració amb l'Institut Portuguès del Mar i l'Atmosfera (IPMA).

2. Objectius

Aquest treball té com a principals objectius:

- Dur a terme un estudi sobre la bioaccessibilitat de les fragàncies sintètiques en peix, en concret del galaxolide (HHCB), mitjançant un procés de digestió *in vitro*.
- Avaluar l'efecte que pot tenir el tipus de cuinat sobre la concentració de la fragància sintètica galaxolide (HHCB) en mostres de peix.

3. Part experimental

3.1. Reactius i estàndards

La fragància policíclica 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta-[g]-2-benzopirà (HHCB, galaxolide) va ser proveïda per Promochem Iberia (Barcelona, Espanya). El compost utilitzat com patró intern, musk-xilè d15, es va obtenir com a solució de 100 µg mL⁻¹ en acetona a Symta (Madrid, Espanya).

L'estàndard individual de galaxolide es va preparar en acetona amb una concentració de 4000 µg mL⁻¹. Es van preparar les dilucions estàndard de treball a 100 µg mL⁻¹ i 1 µg mL⁻¹ en acetat d'etil. L'acetona, l'acetat d'etil i l'acetonitril eren de grau GC amb puresa superior al 99.9%. Acetona proveïda per Prolabo (VWR, Llinars del Vallès, Barcelona, Espanya) i acetat d'etil i acetonitril proveïts per J.T. Baker (Teugseweg, Deventer, Netherlands). L'aigua ultrapura es va obtenir d'un sistema de purificació d'aigua de Veolia Water (Sant Cugat del Vallès).

3.2. Neteja del material

La neteja del material és un factor molt important a tenir en compte durant el procés experimental ja que netejar el material amb sabó podria provocar la contaminació d'aquest amb fragàncies sintètiques presents al sabó. Per tant, a l'hora de netejar el material s'ha de seguir un protocol. Aquest protocol indica que tot el material s'ha de netejar inicialment amb aigua a pressió, seguit d'una neteja amb aigua ultrapura a l'ultrasons durant aproximadament 20 min. Finalment s'ha de deixar en un bany d'isopropanol durant 30 min a l'ultrasons.

3.3. Mostreig i pretractament de mostra

3.3.1 Mostres de peix

L'estudi de bioaccessibilitat inicial es va dur a terme amb mostra de lluç (*Merluccius merluccius*) comprat a Portugal. D'altra banda l'estudi de l'efecte del cuinat es va realitzar a partir de mostres de bacallà (*Gadus morhua*), verat (*Scomber scombrus*) i sardina (*Sardina pilchardus*) que es van comprar en diferents comerços de Portugal.

Pel que fa les mostres destinades a l'estudi de l'efecte del cuinat, un cop comprades es van dividir en tres grups per cada peix. Cada grup es va tornar a dividir en tres, per tal de cuinar cada subgrup d'una manera diferent. El primer subgrup és immediatament conservat a baixa temperatura i posteriorment liofilitzat. El segon subgrup es cuina al vapor sota condicions controlades. Finalment, el tercer subgrup es cuina a la planxa sota condicions controlades i sense afegir oli. Un cop cuinats es congelen i es liofilitzen. Les condicions de cadascun dels cuinats es troben a la Taula 3.

Taula 3. Condicions de cuinat del peix.

	Verat i Sardina		Bacallà	
	Al vapor	A la planxa	Al vapor	A la planxa
Temps (min)	15	10	15	12
Temperatura (°C)	105	175	105	175

Tots els extractes liofilitzats (el lluç de la bioaccessibilitat inclòs) es trituren amb morter i es conserven en vials. Tot el procés de cuinat i pretractament de les mostres es va dur a terme en els laboratoris de Portugal. Les mostres de cada grup i per cada peix van ser enviades a la Universitat Rovira i Virgili (URV) conjuntament amb un homogeneïtzat dels subgrups format per quantitats iguals de cadascun d'ells.

3.3.2 Mostres líquides

El procés de digestió *in vitro* dona com a resultat mostres en fase líquida corresponents a cadascuna de les fases digestives a analitzar: fase oral, fase estomacal i fase intestinal. Es van enviar mostres des de Portugal de cadascuna de les fases del procés de digestió del lluç en vials de vidre.

3.3.3 Preparació de mostra adicionada

Per les mostres sòlides es pesen 0.5 g de mostra (de cada tipus de peix per cru i cuinat) en un vial de vidre. S'afegeix acetona de qualitat GC de Prolabo (VWR, Llinars del Vallès, Barcelona, Espanya) fins cobrir el sòlid. S'addiciona el volum necessari de solució de galaxolide i s'agita per tal de que el compost entri bé en contacte amb el sòlid. Es deixa evaporar durant tota la nit a la campana. Aquest procés assegura el contacte entre el anàlit i la matriu. Seguidament es realitza el procés d'extracció.

Les mostres líquides es van addicionar directament sobre el líquid amb la solució de treball de galaxolide més adient per aconseguir l'addició desitjada.

3.4. Procés de digestió humana *in vitro*

El mètode seguit per a dur a terme la digestió és el descrit per Braga et al. [16]. El procés es va fer seguint tres fases de la digestió: fase oral, fase gàstrica i fase intestinal. Per fer-ho es van utilitzar fluids simulats: fluid salivar, fluid gàstric, fluid duodenal i bilis. La composició de cadascuna de les fases es troba recollida en les Taules 4 i 5.

Tot el procés de digestió es va dur a terme fent servir un mesclador rotatori de tubs amb disc (LSCI, Portugal) a 25 rpm col·locat en un incubador a 37 °C. En un tub de vidre s'afegeixen entre 1.5 – 2 g de mostra (lluç) i s'addicionen 4 mL de fluid salivar. Es deixen en contacte i amb rotació durant 5 min. Seguidament s'afegeixen 8 mL de fluid gàstric i es continua rotant durant 2 h. Finalment s'aboquen 8 mL de fluid duodenal i 4 mL de bilis i es fa rotar durant 2 h.

El fluid salivar i l'intestinal s'han de mantenir a pH 7, d'altra banda el fluid estomacal s'ha de mantenir a pH 2. Tots ells s'han d'ajustar abans de cada etapa. Per tal de que els

compostos bioactius no es degradin o s'inhibeixin, els fluids s'han de preparar just abans de introduir-los al procés de digestió.

Un cop el procés de digestió ha finalitzat els tubs s'introdueixen en un bany de gel per tal de parar la reacció. Tot seguit es centrifuguen a 2.750x g a 10 °C durant 10 min. Això permet separar la fracció bioaccessible (fase líquida) de la fracció no bioaccessible (fase sòlida).

Tot aquest procés de digestió es va realitzar al laboratoris de l'Institut Portuguès del Mar i l'Atmosfera (IPMA).

Taula 4. Composició de compostos orgànics i inorgànics de les fases.

	Compost (g L ⁻¹)	Fase Oral	Fase gàstrica	Fase intestinal	
		Saliva	Sucs gàstrics	Fluids duodenals	Bilis
		Volum (mL)	Volum (mL)	Volum (mL)	Volum (mL)
Compostos orgànics i inorgànics	KCl (89.6 g L ⁻¹)	2.0	1.8	1.2	0.8
	KSCN (20 g L ⁻¹)	2.0	-	-	-
	NaH ₂ PO ₄ (88.8 g L ⁻¹)	2.0	0.6	-	-
	NaSO ₄ (57 g L ⁻¹)	2.0	-	-	-
	NaCl (175.3 g L ⁻¹)	0.4	3.1	8.0	6.0
	NaHCO ₃ (84.7 g L ⁻¹)	4.0	-	1.33	13.6
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O (22.2 g L ⁻¹)	-	3.6	0.144	0.08
	NH ₄ Cl (30.6 g L ⁻¹)	-	2.0	-	-
	KH ₂ PO ₄ (8 g L ⁻¹)	-	-	2.0	-
	MgCl ₂ (5 g L ⁻¹)	-	-	2.0	-
	Urea (25 g L ⁻¹)	1.6	0.7	0.8	2.0
	Àcid glucorònic (2 g L ⁻¹)	-	2.0	-	-
	Glucosa (65 g L ⁻¹)	-	2.0	-	-
	Hidroclorur de glucosamina (33 g L ⁻¹)	-	2.0	-	-

Taula 5. Composició de compostos bioactius de les fases.

	Compost (g L ⁻¹)	Fase Oral	Fase gàstrica	Fase intestinal	
		Saliva	Sucs gàstrics	Fluids duodenals	Bilis
		Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)
Compostos bioactius	α-amilasa	90	-	-	-
	Àcid úric	3	-	-	-
	Mucina	5	-	-	-
	BSA	-	200	200	360
	Pepsina	-	500	-	-
	Pancreatina	-	600	1800	-
	Lipasa	-	-	300	-
	Tripsina	-	-	3.2	-
	α-quimotripsina	-	-	34.8	-
	bilis	-	-	-	6000

3.5. Extracció amb QuEChERS

El mètode analític per a mostres sòlides té com a primera etapa l'extracció de la fragància mitjançant QuEChERS (Quick, Easy, Effective, Rugged and Safe) previ a la determinació per cromatografia de gasos – espectrometria de masses en tàndem amb trampa d'ions (GC-IT-MS/MS). El mètode seguit és el descrit per Trabalón et al. [17].

El procediment comença amb 0.5g de l'extracte liofilitzat de peix. Es pesa aquesta quantitat dins un tub de centrífuga de 50 mL de Scharlab (Barcelona, Espanya). A continuació s'afegeixen 10 mL d'acetonitril i 10 mL d'aigua ultrapura i es barreja utilitzant un Vortex Genius 3 de IKA (Staufen, Alemanya) durant 1 min. Un cop vortexat s'afegeix un sobre de sals d'extracció (Scharlab). Aquests sobres contenen 4 g de sulfat de magnesi, 1 g de clorur de sodi, 1 g de citrat de sodi i 0.5 g de hidrogencitrat de sodi sesquihidratat. Amb el contingut del sobre dins del tub, aquest es barreja amb el vortex durant 3 min i posteriorment es centrifuga durant 5 min a 7500 rpm (Hettich Universal 32R, Tuttlingen, Alemanya). El líquid sobrenedant, acetonitril, es recull i es traspasa a un tub de 50 mL que conté 2 g de florisil (Sigma-Aldrich) per a dur a terme la extracció dispersiva en fase sòlida (dSPE) que servirà com a clean-up. El tub es barreja amb vortex durant 3 min i posteriorment es centrifuga durant 5 min amb les mateixes condicions que anteriorment. El sobrenedant es recull en un vial i l'extracte s'evapora sota corrent de nitrogen fins a un volum aproximat de 1 mL. S'afegeix el patró intern en una

concentració de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Els extractes es filtren amb un filtre de xeringa PTFE de $0.22 \mu\text{m}$ i es reconstitueix a 2 mL amb acetat d'etil. La Figura 2 esquematitza el procés d'extracció per QuEChERS.

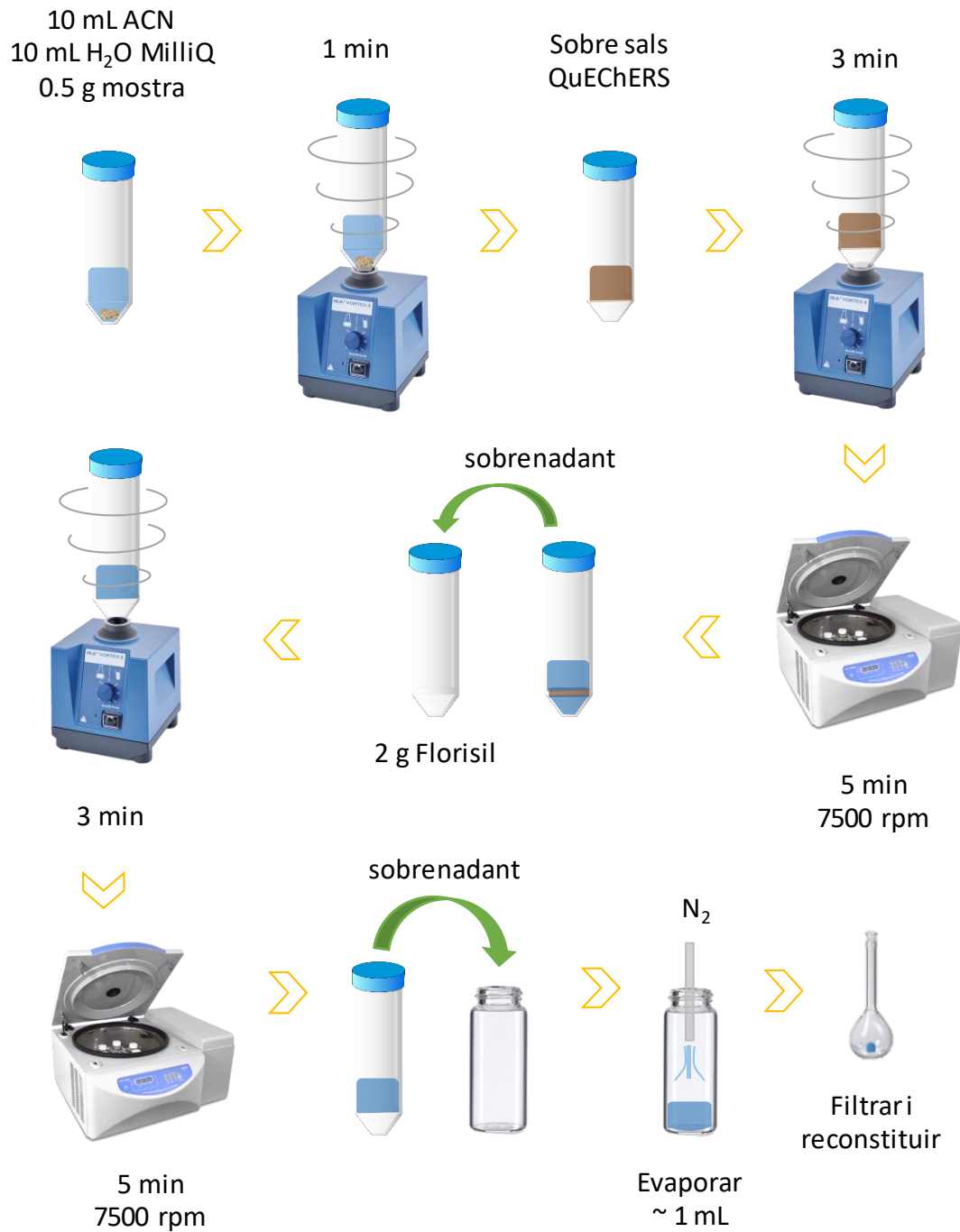


Figura 2. Esquema procediment extracció QuEChERS.

3.6. Extracció per HS-SPME

En el cas de les mostres líquides el procés d'extracció es duu a terme mitjançant el mètode proposat per Vallecillos et al. [18]. S'utilitza un mostrejador automàtic del tipus CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) capaç de realitzar l'extracció per HS-SPME automàticament.

Inicialment es fiquen 10 mL de la mostra líquida en un vial de 20 mL específic per aquest tipus d'anàlisi. El mòdul encarregat d'escalfar arriba a 60 °C i el vial es desplaça automàticament fins allà, on s'estabilitza a aquesta temperatura durant 5 min. Seguidament, la fibra PDMS/DVB de Supelco (Bellefonte, PA, USA) s'introdueix a l'espai de cap del vial. El procés d'extracció dura 30 min a 60 °C amb una agitació magnètica de 750 rpm. Un cop realitzada l'extracció la fibra retorna dins de l'agulla de la xeringa i es dirigeix a l'injector del cromatògraf. La desorció de la fibra es dona durant 3 min a 250 °C. Per evitar que la fibra pugui quedar contaminada es realitza un condicionament d'aquesta durant 10 min a 250 °C abans de cada anàlisi.

3.7. Anàlisi per GC-IT-MS/MS

Les anàlisis cromatogràfiques van ser dutes a terme amb un cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses amb trampa d'ions (Varian, Walnut Creek, CA, USA). Aquest equip està conformat per un cromatògraf de gasos 3800, un detector d'espectrometria de masses amb trampa d'ions 4000 i un injector 1079 PTV (*Programmable Temperature Vaporization*). A més a més porta incorporat un mòdul d'injecció automàtica tipus CombiPal (CTC, Analytics, Zwingen, Switzerland). La xeringa utilitzada és de 10 µL, amb un calibre 23 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

La separació cromatogràfica es va dur a terme mitjançant una columna ZB-50 (Micron Phenomenex, Torrance, CA, USA). Aquesta columna té una fase estacionària del 50% Fenil + 50% Dimetilpolisiloxà, oferint per tant una polaritat mitjana-alta. El seu interval de temperatura òptima oscil·la entre els 40 °C fins a un màxim de 320/340 °C. Les dimensions de la columna són de 30m de llarg, 0.25mm de diàmetre intern i 0.25µm de gruix de fase. L'heli utilitzat com fase mòbil en l'anàlisi cromatogràfica és de puresa del 99.999% (Carbueros Metálicos, Tarragona, Espanya) i el cabal és de 1 mL min⁻¹.

El programa de temperatura utilitzat comença amb una temperatura inicial de 70 °C que es manté durant 3.5 min, seguidament s'augmenta a 50 °C/min fins arribar a 200 °C, i en aquest punt continua ascendint a 5 °C/min fins els 240 °C. Finalment es fa pujar a 20 °C/min fins als 290 °C on es manté durant 3.4 min.

En el cas de l'injecció directa (extracció amb QuEChERS) el volum d'injecció és de 10µL de mostra amb el PTV en mode *large volume injection* (LVI), utilitzant també un liner de 2mm de diàmetre intern recobert de llana de vidre (Agilent). La Taula 6 mostra el programa de temperatura utilitzat a l'injector. Durant la injecció el mode Split es va mantenir a 50 mL/min. Seguidament es va programar el mode splitless durant 2.5 min a la vegada que la temperatura augmentava fins a 300 °C.

Taula 6. Programa de Temperatura PTV.

Temperatura (°C)	Ratio (°C/min)	Temps (min)	Total (min)
70	-	0.50	0.50
300	100	5.00	7.80

D'altra banda, en el cas de la SPME l'injector treballa en mode splitless a 250 °C.

L'espectròmetre de masses va operar en mode de ionització per impacte electrònic (EI) amb un voltatge de 70 eV, controlat pel software Varian MS Workstation v.6.9. La línia de transferència, el col·lector i la temperatura de la rampa es van fixar a 280, 50 i 200 °C respectivament.

Inicialment, abans d'injectar cap mostra o patró al cromatògraf, es van comprovar els paràmetres de l'espectròmetre de masses. Així, es van fer diagnòstics i ajustos del *calibration gas* (CAL gas), la rampa de radiofreqüència (RF ramp) i el nivell d'aire i aigua que hi pugui haver. Tot seguit es fa un *tune* per tal que l'equip s'acabi d'ajustar per una millor resposta.

Tant els ions, les energies de col·lisió com els temps de retenció es troben recollits a la Taula 7. Per les anàlisis quantitatives i qualitatives dels compostos es va fer servir el mode MS/MS de l'espectròmetre de masses.

Taula 7. Temps de retenció i condicions MS/MS.

Compost	Temps de retenció (min)	Ió pare (m/z)	Ions fills ^a (m/z)	Energia de col·lisió (V)	Temps d'escaneig (s/scans)
Galaxolide	8.99	243	171, 213	0.96	0.53
d15 - MX	9.40	295	170, 276 , 295	1.11	0.34

^a Els ions quantificadors es mostren en negreta

4. Resultats i discussió

4.1. Compostos i separació cromatogràfica

Es va decidir que el compost més representatiu de les fragàncies sintètiques a l'hora de seguir tot el procés de digestió era el galaxolide (HHCB) degut que en estudis anteriors realitzats per Trabolón et al. [17] es va observar que aquest compost es trobava en concentracions elevades respecte a les trobades d'altres fragàncies en les diferents espècies de peixos i que a més a més es troba en totes les espècies. A la Taula 8 es troben recollits part dels resultats de l'estudi comentat i es pot observar la diferència de concentracions abans esmentada.

Taula 8. Concentració de fragàncies sintètiques en ng g⁻¹ (pes sec) en espècies de peix blanc i blau [17].

Compost	Peix blanc				Peix blau			
	Lluç (<i>Merluccius merluccius</i>)	Llenguado (<i>Solea solea</i>)	Bacallà (<i>Gadus morhua</i>)	Shrimp (<i>Aristeus antennatus</i>)	Salmó (<i>Salmo solar</i>)	Tonyina (<i>Thunnus thynnus</i>)	Mackerel (<i>Scomber scombrus</i>)	Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)
DPMI	10.2	11.2	9.0	< MQL	n.d.	< MQL	n.d.	<MQL
ATII	6.1	< MQL	< MQL	n.d.	< MQL	< MQL	7.9	n.d.
HHCB	34.3	18.8	146.7	41.6	17.1	38.4	303.9	367.3
AHTN	10.9	6.6	11.8	12.3	< MQL	5.5	16.0	31.3
HHCB lactona	33.8	n.d.	19.8	20.1	n.d.	n.d.	61.2	91.1

El compost galaxolide (HHCB), com s'ha explicat anteriorment, presenta quatre diastereoisòmers degut als seus dos centres quirals. Un cop punxat el patró de 1 µg mL⁻¹, que contenia el HHCB i el patró intern (d15 – musk xilè) s'observa l'aparició de cinc pics al cromatograma. Podem diferenciar el pic del patró intern dels altres quatre a partir de l'ió quantificador. Els altres quatre pics, que pertanyen al HHCB, comparteixen el mateix ió quantificador, dificultant la seva identificació. Per tal de poder assignar cada pic a un dels estereoisòmers es va seguir l'ordre d'elució proposat per Vallecillos et al. [19] i Gatermann et al. [20] després dels seus estudis de separació quiral d'aquest compost. Tal com es mostra a la Figura 2, els dos primers diastereoisòmers en eluir són el (4S, 7S) i el (4S, 7R) amb una diferència elevada respecte al (4R, 7S) i (4R, 7R) en quant a senyal. Aquesta diferència concorda amb el fet descrit a la introducció que relaciona aquests isòmers amb l'olor més característica del

galaxolide. Durant l'estudi només s'utilitzen les àrees dels dos primers pics per monitoritzar el compost.

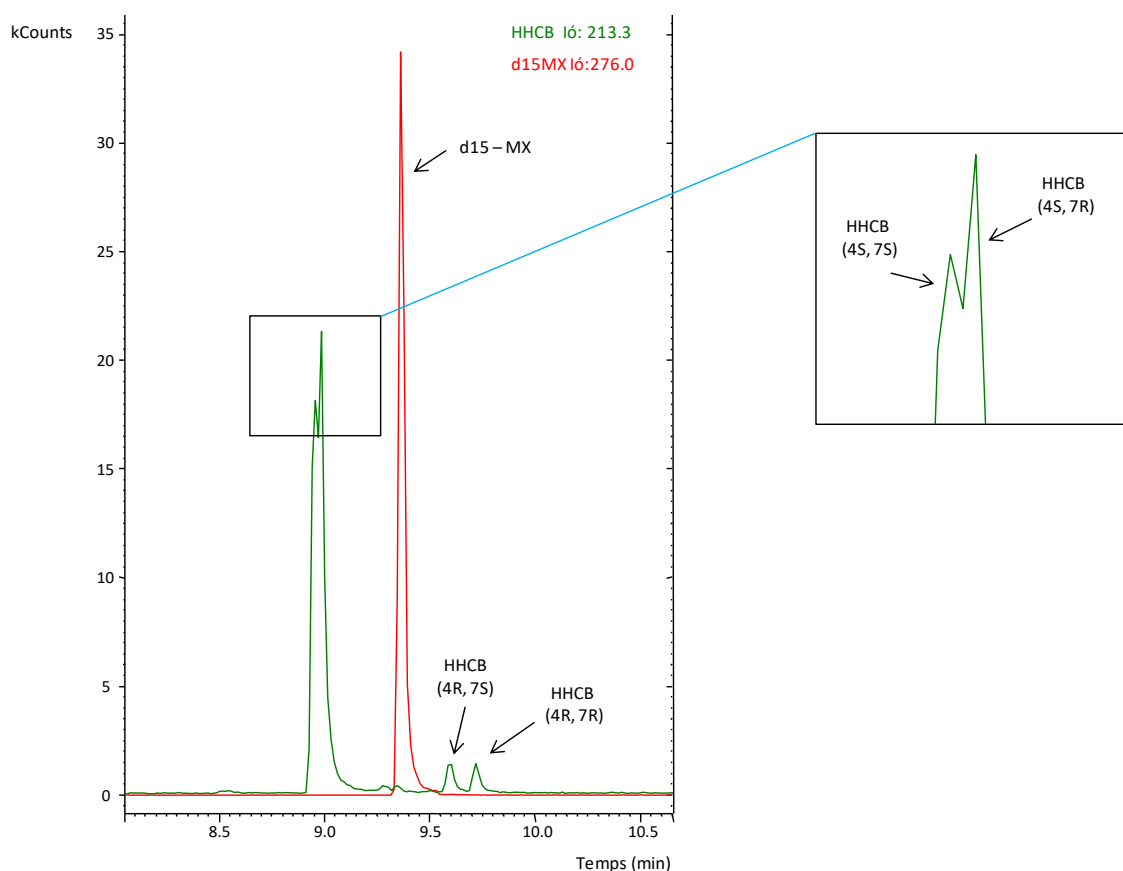


Figura 2. Cromatograma HHCB i MX-d15 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en acetat d'etil).

4.2. Estudi de bioaccessibilitat

La primera part de l'estudi es centra en saber quina és la proporció del compost HHCB que és susceptible de ser absorbida per l'organisme, és a dir, que és bioaccessible. Seguint el mètode abans descrit es pot dur a terme una simulació de la digestió humana per tal de donar resposta a aquesta qüestió.

Inicialment es va tenir en compte el tipus de peix, en aquest cas es va escollir un peix blanc com el lluç (*Merluccius merluccius*). El fet de fer servir un peix blanc es basa principalment en el seu baix contingut lipídic. Una baixa proporció de greixos a la matriu facilita el procés d'extracció de les fragàncies i per tant s'aconsegueix una millor determinació.

Degut a les baixes concentracions d'aquests tipus de compostos en les mostres es va decidir que tot el procés de digestió es duria a terme amb una mostra addicionada del peix. Per tal de que la concentració real del peix no afectés l'anàlisi i que es trobés per sobre dels límits de quantificació del mètode es va addicionar una quantitat molt superior a la trobada anteriorment en mostres reals. Aquesta concentració va ser de 10 mg kg^{-1} (concentració teòrica) i es va dur a terme amb el procés descrit a la part experimental per mostres sòlides addicionades.

Tot el procés de digestió descrit a continuació es va dur a terme als laboratoris de l'IPMA.

Com es pot observar a la Figura 3 el procés és per etapes, és a dir que per cada fase que es vol analitzar s'ha de parar el procés i tornar a començar. Per tant per poder analitzar tota la digestió es van haver de fer diferents digestions independents. Un grup es va parar en la fase oral i l'altre es va parar a la fase estomacal, fent servir 0.5 g de mostra per cada digestió i repetint el procés per triplicat. D'altra banda es va fer servir la resta de la mostra addicionada per arribar fins al final de la digestió. Degut a que la part sòlida que queda al final del procés (pellet) és mínima, es van fer un total de 12 repeticions per obtenir els 0.5 g mínims per poder aplicar el mètode.

Per tant, des dels laboratoris de l'IPMA es van enviar a la URV les següents mostres:

- Lluç amb una addició de 10 mg kg^{-1}
- Lluç sense addicionar
- Fase oral (líquida)
- Fase estomacal (líquida)
- Fase intestinal (líquida)
- Pellet (sòlid)
- Fluid salivar per fer recta de calibratge
- Fluid estomacal per fer recta de calibratge
- Fluid intestinal (duodenal:biliar) per fer recta de calibratge

Les anàlisis de totes les mostres es van dur a terme a la Universitat Rovira i Virgili.

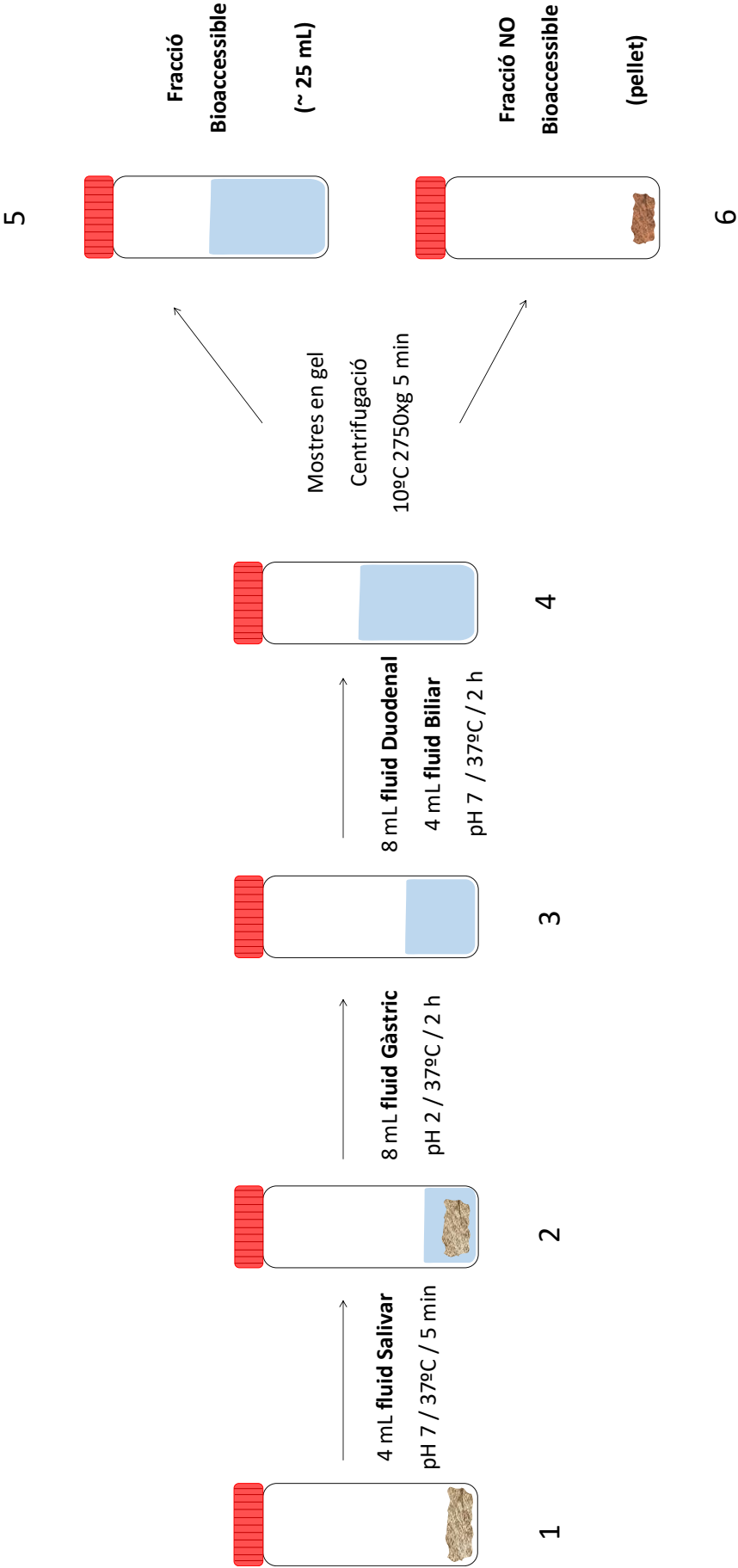


Figura 3. Esquema procés de digestió.

Les mostres líquides referents a cada fase es van analitzar per HS-SPME-GC-IT-MS/MS com s'ha comentat a la part experimental. Per tal de poder quantificar es van construir rectes del tipus *matrix-matched*. Es va escollir aquest tipus de recta ja que la matriu dels peixos és molt complexa i la resposta del HHCB depèn molt de la matriu. Per tant, els punts de la recta es van fer addicionant una concentració coneguda de HHCB al fluid simulat de cada fase. Així per cada fase es van fer els punts corresponents de la recta i un blanc per tal de restar la resposta i conèixer la relació resposta-concentració real del HHCB en cada matriu. Els fluids destinats a fer recta no contenen els components bioactius per evitar la possible degradació o inhibició d'aquests. Les mostres sòlides es van analitzar pel mètode QuEChERS-GC-IT-MS/MS.

La mitjana de les concentracions en ng g^{-1} (en pes sec) de HHCB en peix es troben a la Taula 9.

Taula 9. Concentracions en ng g^{-1} de HHCB en mostres de peix amb i sense addició.

Mostra	HHCB		
	ng g^{-1} (pes sec)	ng en mostra	%RSD (n=3)
Blanc Peix	22.2	11.1	22
Addició	11899.4	5953.0	9

Si comparem els resultats obtinguts per la mostra sense addicionar amb els trobats a l'estudi comentat anteriorment (Taula 8) veiem que els nivells de concentració concorden. Pel que fa l'addició, el resultat s'apropa al valor teòric amb es que es va addicionar la mostra (10000 ng g^{-1}). Els %RSD són acceptables ja que es troben per sota del 25%, que és un valor adequat tenint en compte la complexitat de la matriu de la mostra i el mètode.

La Taula 10 recull els valors de concentració de les fases de la digestió, tant dels blancs de fluid com del procés de la digestió de la mostra.

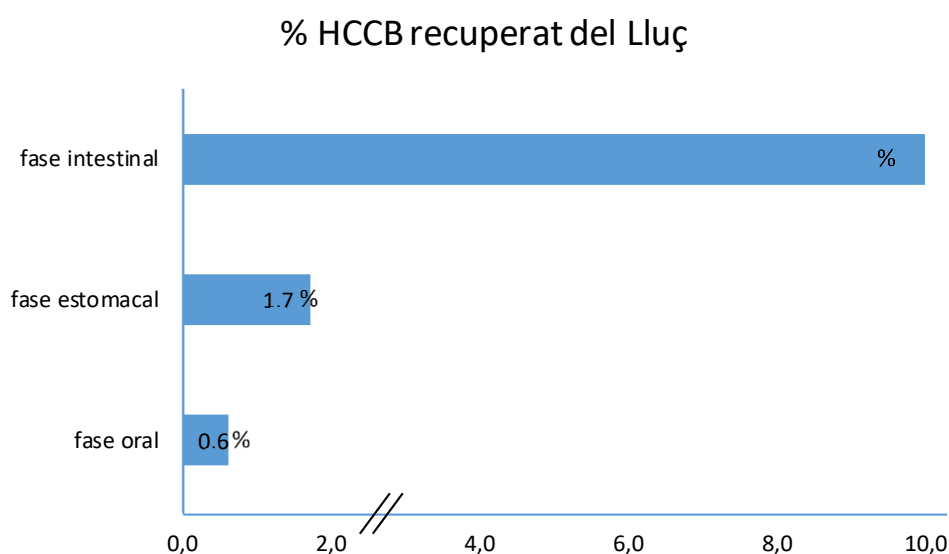
Taula 10. Concentració de HHCB en les mostres de la digestió.

Fase	Mostra	HHCB	
		ng en mostra	%RSD
ORAL	Blanc fluid salival (n=1)	5.1	-
	Digestió fase oral (n=3)	37.6	15
ESTOMACAL	Blanc Fluid estomacal (n=1)	n.d.	-
	Digestió fase estomacal (n=3)	103.0	9
INTESTINAL	Blanc Fluid duodenal i bilis (n=1)	n.d.	-
	Digestió fase intestinal (n=12)	6845.9	20
	Pellet (resultat de 12 digestions) (n=1)	10859.4	-
	Pellet (estimació 1 digestió)	90.8	-

*n.d.= no determinat

Tenint en compte que inicialment teníem un total de 5953.0 g de galaxolide en mostra, podem buscar quin és el percentatge que és bioaccessible per cadascuna de les fases.

Si observem el percentatge de galaxolide disponible a les diferents fases de la digestió (Figura 4) podem observar que de les tres fraccions, la fracció intestinal, com s'ha comentat abans, és la que presenta una concentració de HHCB més elevada.

**Figura 4.** Percentatge de HHCB a les fases de la digestió

Amb aquests resultats podem dir que d'una mostra amb galaxolide, el 0.6% passaria a la fase líquida a la primera fase de la digestió, és a dir a la boca. Tot seguit el galaxolide arribaria a l'estómac on fins uns 1.7 % passaria també a la fase líquida. Finalment en arribar als intestins la major part de compost (al voltant del 100%), que s'ha ingerit amb el peix arribaria a la fase líquida, expulsant només una petita part amb el sòlid.

La Figura 5 representa gràficament el percentatge de galaxolide trobat a la fase intestinal després de separar la part líquida (fracció bioaccessible – BIO) de la part sòlida (fracció no bioaccessible – NBIO).

Com es pot observar al gràfic, la major part de galaxolide es troba a la fracció bioaccessible, és a dir que gairebé el 100% del galaxolide amb el que es va addicionar al peix inicialment ha passat tot el procés de digestió fins arribar als fluids duodenals i la bilis, on s'ha quedat retingut. Això indica que la fragància pot ser absorbida per l'organisme al final de la digestió.

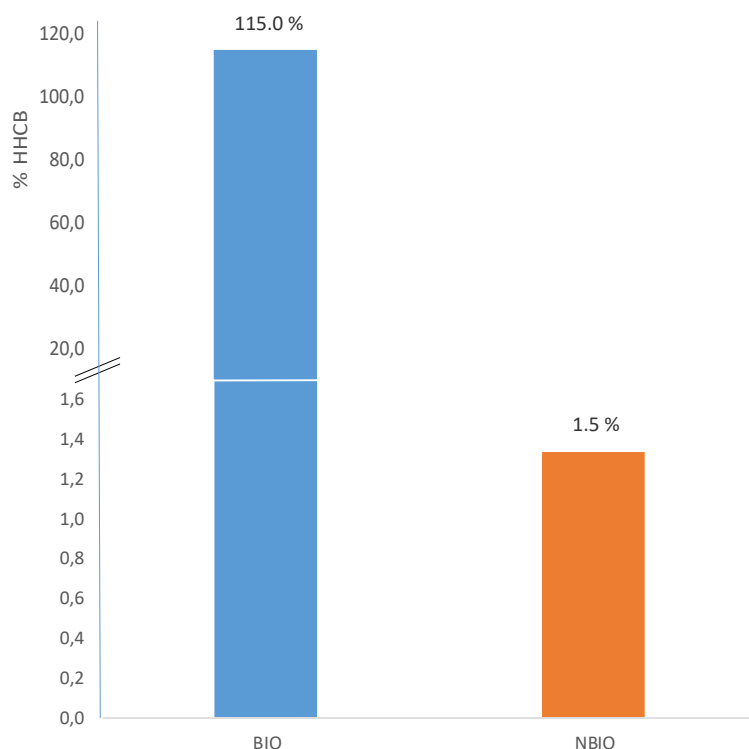


Figura 5. Proporció de %HHCB en la fracció bioaccessible (BIO) i la fracció no bioaccessible (NBIO).

Un cop coneguda la bioaccessibilitat del galaxolide es va proposar el següent pas de l'estudi. El peix no s'acostuma a menjar cru, per tant el procés de cuinat podria afectar d'alguna manera al procés de bioaccessibilitat del galaxolide. Per comprovar aquesta hipòtesi es va dur a terme la segona part de l'estudi, determinar la fragància en mostres de peix cru i cuinat i observar si existeixen diferències.

4.3. Efecte del cuinat sobre la concentració de galaxolide

El procés de cuinat pot produir canvis a la matriu de la mostra, modificant la seva composició i possiblement alliberant part del contingut de galaxolide que el peix cru pot contenir. A partir d'aquesta hipòtesi es va dissenyar un procés d'experimentació que pogués avaluar aquest paràmetre. Aquest procés consistia en agafar una mostra de peix i dividir-la en tres grups. Un grup va quedar cru, el segon es va cuinar al vapor i el tercer es va cuinar a la planxa.

Com en la part inicial de l'estudi, el primer pas va ser escollir el tipus de peix que es faria servir durant l'estudi. En aquest cas es van escollir mostres de bacallà (*Gadus morhua*), verat (*Scomber scombrus*) i sardina (*Sardina pilchardus*). El principal motiu pel qual es van escollir aquestes espècies va ser que el seu contingut de galaxolide trobat per Trabalón et al. [17] era el més elevat d'entre les espècies estudiades. D'altra banda, també ens servien per observar com influeix el percentatge lipídic del peix en el procés d'extracció i en la bioacumulació del galaxolide en el peix. Degut a que no es realitzaria una addició per a comprovar l'efecte del cuinat, era important que els nivells de fragància fossin inicialment elevats per tal de poder determinar-los en mostra cuinada en el cas de que disminuís molt la seva concentració un cop cuinats.

Un cop escollides les espècies es van comprar els exemplars en comerços de Portugal i es van dividir segons l'espècie, i per cada espècie es van fer tres grups. Cadascun d'aquests grups es va cuinar d'una manera diferent (cru, al vapor i a la planxa). Així es tenien un total de 9 grups: bacallà cru, al vapor i a la planxa, verat cru, al vapor i a la planxa i finalment sardina crua, al vapor i a la planxa. Un cop dividits es van cuinar segons les condicions descrites a la part experimental i es van liofilitzar. A més a més de les mostres es va fer una barreja dels extractes de les tres repeticions de cada cuinat i tipus

de peix per tal de construir les rectes de calibratge. Tot aquest procés es va dur a terme als laboratoris de Portugal i un cop preparats els extractes van ser enviats a la URV per la seva posterior anàlisi.

Les mostres es van conservar a la nevera fins al moment del seu anàlisi. Es van preparar rectes de calibratge a partir de la barreja enviada des de Portugal. En aquest cas es van fer servir també rectes del tipus *matrix-matched*. La mostra es va addicionar tal com s'ha descrit a la part experimental per a mostres sòlides i es van extreure seguint el mètode QuEChERS-GC-IT-MS/MS. Degut a que les matrius dels peixos eren diferents inicialment es va decidir fer una recta per peix blanc (bacallà) i una altra per peix blau (verat i sardina) i diferents rectes per cada tipus de cuinat. Tot i això, durant l'anàlisi de les mostres es va observar que l'extracte de la sardina era més greixós, fent que la resposta variés bastant respecte al verat. Degut a això es va decidir construir rectes diferents també per la sardina.

Un cop construïdes les rectes es van analitzar les mostres per triplicat segons el mètode descrit per les mostres sòlides a la part experimental.

Els resultats es troben recollits en taules segons el tipus de peix. A la Taula 11 es troben recollits els resultats de les anàlisis fetes a les mostres de bacallà cru i els dos cuinats. Els resultats estan expressats en ng g^{-1} en pes sec (dry weight d.w.). Per tal de saber com ha disminuït la concentració de galaxolide amb el procés de cuinat s'ha considerat que la concentració al peix cru és el 100% i s'ha buscat la relació de percentatge entre la mostra cuinada i aquest valor (% recuperació).

Taula 11. Concentracions de HHCB en mostres de bacallà cru, al vapor i a la planxa.

	Tipus de cuinat	Mostra	ng g ⁻¹ (d.w.)	%RSD (n=3)	% Recuperació
Bacallà	Cru	M1	78.4	8	
		M2	77.6	5	
		M3	74.7	6	
	Al vapor	M1	47.3	12	60
		M2	41.9	21	54
		M3	35.5	14	48
	A la planxa	M1	39.7	7	51
		M2	33.1	10	43
		M3	39.7	5	53

El bacallà és un peix blanc, per tant el seu percentatge lipídic és molt baix. Amb això podem esperar que degut a la lipofília característica de les fragàncies el contingut de galaxolide trobat en aquesta espècie sigui baix. En total s'ha trobat una mitjana de 76.9 ng g⁻¹ de galaxolide en pes sec. La concentració trobada es inferior a la determinada per Trabalón et al. [17] que es pot trobar a la Taula 8 per la mateixa espècie de peix, fet que es podria explicar per la diferència d'origen de les mostres. Les mostres analitzades per Trabalón et al. van ser comprades en mercats de Tarragona, les analitzades en aquest estudi pel contrari, han estat comprades a Portugal. A més a més cal tenir en compte que la concentració pot variar entre organismes. Tot i això la concentració d'ambdues es troba a nivell de baixos ng g⁻¹.

En el cas del bacallà al vapor, s'observa una mitjana de 41.6 ng g⁻¹. Aquest valor representa una recuperació respecte al contingut en cru d'aproximadament el 54%. Això vol dir que un cop el bacallà es cuina al vapor prop del 46% del seu contingut en galaxolide s'elimina, ja sigui evaporant-se, amb el suc que es desprèn durant el cuinat o per degradació. Els %RSD de les recuperacions es troba en el 12%, que és un valor acceptable pel que fa a la complexitat del mètode i la matriu.

Per últim, un cop el bacallà és cuinat a la planxa es determina que hi ha present una concentració mitjana de 37.5 ng g⁻¹ de galaxolide. Podem dir llavors que hem recuperat el 49% de galaxolide inicial i que per tant el 51% s'ha eliminat com en el cas anterior.

Amb aquests resultats podem concloure que en el cas del bacallà l'efecte del cuinat redueix aproximadament en un 50% el contingut de galaxolide present a la mostra. Tot i això no es veu una diferència significant en quant a com afecten els dos tipus de cuinats diferents en aquesta reducció.

Els resultats obtinguts després d'analitzar les mostres de verat cru i cuinat es troben recollits a la Taula 12.

Taula 12. Concentracions de HHCb en mostres de verat cru, al vapor i a la planxa.

	Tipus de cuinat	Mostra	ng g ⁻¹ (d.w.)	%RSD (n=3)	% Recuperació
Verat	Cru	M1	98.7	16	
		M2	107.9	21	
		M3	104.4	17	
	Al vapor	M1	23.8	19	24
		M2	31.6	18	29
		M3	30.9	17	29
	A la planxa	M1	28.8	15	29
		M2	36.7	15	34
		M3	30.12	20	29

En el cas del verat, la concentració mitjana determinada pel peix cru és de 103.7 ng g⁻¹. Com en el bacallà, si comparem resultats amb els de la taula 8 la concentració determinada a les mostres de l'estudi és més baixa. Tot i això es compleix que el verat, en ser un peix blau (és a dir que té un percentatge lipídic més elevat) té una concentració de galaxolide més elevada.

Cuinat al vapor, el verat té una concentració mitjana de 28.8 ng g⁻¹, fet que es tradueix en un 28% de recuperació. Això implica que el 72% del galaxolide s'ha eliminat evaporant-se, amb el líquid excretat degut al cuinat o s'ha degradat.

Si ens fixem en els resultats del cuinat a la planxa, s'observa que la concentració mitjana és de 31.9 ng g⁻¹ amb una recuperació del 31%, és a dir que s'ha eliminat el 69% del galaxolide inicial.

En aquest cas les %RSD són una mica més elevades, fet que es podria relacionar a que la matriu, que ja és complexa, té un percentatge de lípids elevat.

Podem dir per tant, que en el verat, el fet de cuinar el peix disminueix la concentració de galaxolide en aproximadament un 70%. Com en el cas del bacallà, no s'aprecien diferències entre els dos tipus de cuinat.

Per últim cal comentar els resultats extrets de l'anàlisi de les mostres de sardina. A la Taula 13 es troben les concentracions de les mostres.

Taula 13. Concentracions de HHCB en mostres de sardina crua, al vapor i a la planxa.

	Tipus de cuinat	Mostra	ng g ⁻¹ (d.w.)	%RSD (n=3)	% Recuperació
Sardina	Cru	M1	65.9	15	
		M2	31.1	16	
		M3	35.1	12	
	Al vapor	M1	40.6	6	62
		M2	33.1	12	106
		M3	33.1	9	94
	A la planxa	M1	23.9	21	36
		M2	35.1	9	113
		M3	20.4	11	58

En el cas de la sardina els resultats no són els esperats inicialment ja que en ser un peix blau s'espera que el contingut de galaxolide sigui més elevat degut a la lipofília però tal com s'observa els valors de concentració són molt més baixos. D'altra banda existeixen diferències entre els valors de les concentracions en peix cru. Aquesta diferència podria ser deguda a alguna possible contaminació del vial on es trobava guardada la mostra, ja que dels 3 subgrups (M1, M2, M3) només un dóna un valor que no sembla concordar amb la resta. D'altra banda també podria ser que un dels peixos dins del grup estigués contaminat amb galaxolide, provocant aquest augment de la concentració determinada.

Tant en el peix cuinat al vapor com el cuinat a la planxa no podem extreure resultats ja que per la mostra 2 (M2) sembla que no disminueixi el percentatge de galaxolide, en canvi la mostra 1 (M1) perd un 38% al vapor i un 64% a la planxa i la mostra 3 (M3) perd

un 6% al vapor i un 42% a la planxa. Com es pot veure, amb els valors esmentats no es pot arribar a una conclusió que confirmi la pèrdua de la fragància en ser cuinat.

Com s'ha comentat anteriorment, la matriu de la sardina sembla ser la més greixosa de les tres espècies escollides per realitzar l'estudi. L'extracte final del bacallà i el verat és transparent i sense color, en canvi el de la sardina té un color groc i durant l'evaporació s'observa l'aparició d'un precipitat blanc que deixa l'extracte amb una certa terbolesa. Això podria haver afectat al procés d'extracció, fent que la determinació del galaxolide es fes de manera errònia. Aquesta hipòtesi explicaria perquè els resultats obtinguts no tenen una interpretació clara.

Un cop comentats els resultats per cadascuna de les espècies de peix podem extreure una conclusió global pel que fa a l'efecte del cuinat. Tal com mostra la Figura 6 es compleix que els peixos amb un contingut de lípids més elevat com el verat tenen nivells de fragància més elevats. Tot i això, un cop el peix es cuina s'observa que el percentatge que es perd es troba entre el 50-70%, essent els peixos blaus els que perden un percentatge més elevat. D'altra banda es pot veure que els resultats de la sardina no concorden amb els trobats pels altres dos peixos, fet que podria ser explicat per una extracció no efectiva dels anàlits de la matriu degut a l'elevat contingut de greixos d'aquesta.

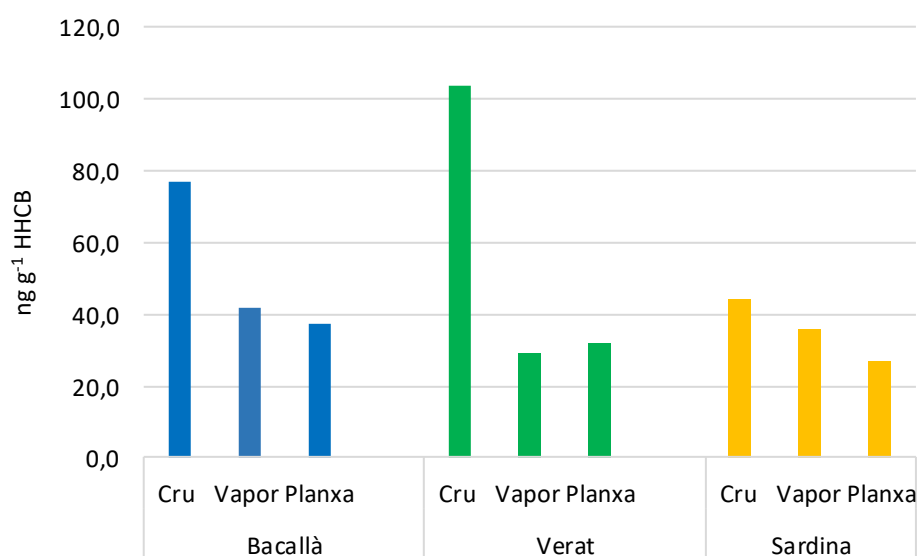


Figura 6. Comparació de la concentració de HHCB en les tres espècies de peixos i pels 3 tipus de cuinat.

Si pensem en on va a parar el galaxolide que es perd durant el cuinat, podríem plantejar la via de l'evaporació degut a que es un compost volàtil, el fet que marxi amb el líquid que es desprèn del peix una vegada cuinat o fins i tot la possible degradació del galaxolide al seu principal producte de degradació, la lactona HHCB.

5. Conclusions

1. QuEChERS and HS-SPME sample extraction procedures combined with gas chromatography – tandem mass spectrometry with ion trap analyser (GC-IT-MS/MS) were successfully applied to determine musk in fish.
2. Among the different digestion phases, intestinal phase showed the highest concentration of HHCB, while oral and stomach phases showed insignificant concentrations.
3. The synthetic musk galaxolide (HHCB) demonstrated being around 100% bioaccessible in *in vitro* digestion procedures for fish samples.
4. Steaming and grilling caused galaxolide content to decrease between 50 and 70% in cod and mackerel samples respectively.
5. Effect of cooking on HHCB concentration in sardine samples could not be estimated probably due to its high lipid content. Further research in method development for high lipid content species such as sardine should be taken in order to determine its fragrance content correctly.
6. Exposure assessment and health risk characterization calculations should be performed due to the high bioaccessibility levels demonstrated in this study. Moreover, the study keeps open in order to determine the real bioaccessibility of raw and cooked fish samples at environmental concentrations.

6. Continuïtat de l'estudi

L'estudi ha mostrat que el cuinat del peix té un efecte sobre la concentració de fragàncies sintètiques en el peix, per tant caldria veure com afecta aquest cuinat al procés de digestió. Degut a això, l'estudi es continuarà amb la digestió de les mostres de peix cru i cuinat sense addicionar per tal de saber com afecta aquest paràmetre al procés de bioaccessibilitat. D'altra banda el mètode d'extracció per QuEChERS s'hauria d'optimitzar per mostres com la sardina per intentar fer una neteja de la matriu que eliminés millor els greixos de l'extracte del peix.

7. Referències

- [1] M. Marchal, J. Beltran, Determination of synthetic musk fragrances, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 7319 (2016) 1–34.
- [2] D.J. Lapworth, N. Baran, M.E. Stuart, R.S. Ward, Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence, *Environ. Pollut.* 163 (2012) 287–303.
- [3] V. Homem, J.A. Silva, N. Ratola, L. Santos, A. Alves, Long lasting perfume e A review of synthetic musks in WWTPs, *J. Environ. Manage.* 149 (2015) 168–192.
- [4] A. Baur, Studien über den künstlichen Moschus., *Ber. Dtsch Chem. Ges.* 24 (1890) 2836–2843.
- [5] G. Fráter, U. Müller, P. Kraft, Preparation and olfactory characterization of the enantiomerically pure isomers of the perfumery synthetic Galaxolide, *Helv. Chim. Acta.* 82 (1999) 1656–1665.
- [6] L. Vallecillos, Doctoral Thesis: Applicability of microextraction techniques for the determination of synthetic musk fragrances in environmental samples, Universitat Rovira i Virgili, 2016.
- [7] L. Vallecillos, F. Borrull, E. Pocurull, On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography-mass spectrometry to determine musk fragrances in wastewater, *J. Chromatogr. A.* 1364 (2014) 1–11.
- [8] M. Llompart, C. García-Jares, C. Salgado, M. Polo, R. Cela, Determination of musk compounds in sewage treatment plant sludge samples by solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A.* 999 (2003) 185–193.
- [9] R.J. Fussell, M. Garcia Lopez, D.N. Mortimer, S. Wright, M. Sehnalova, C.J. Sinclair, A. Fernandes, M. Sharman, Investigation into the occurrence in food of veterinary medicines, pharmaceuticals, and chemicals used in personal care products, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 3651–3659.
- [10] L. Vallecillos, E. Pocurull, F. Borrull, Influence of pre-treatment process on matrix effect for the determination of musk fragrances in fish and mussel, *Talanta.* 134

(2015) 690–698.

- [11] I.S. Lee, U.J. Kim, J.E. Oh, M. Choi, D.W. Hwang, Comprehensive monitoring of synthetic musk compounds from freshwater to coastal environments in Korea: With consideration of ecological concerns and bioaccumulation, *Sci. Total Environ.* 470–471 (2014) 1502–1508.
- [12] G. Chen, R. Jiang, J. Qiu, S. Cai, F. Zhu, G. Ouyang, Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: An in vivo study, *Chemosphere*. 138 (2015) 584–591.
- [13] P. Navarro, J. Bustamante, A. Vallejo, A. Prieto, A. Usobiaga, S. Arrasate, E. Anakabe, E. Puy-Azurmendi, O. Zuloaga, Determination of alkylphenols and 17-estradiol in fish homogenate. Extraction and clean-up strategies, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 5890–5895.
- [14] B. Subedi, M.A. Mottaleb, C.K. Chambliss, S. Usenko, Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 6278–6284.
- [15] M. Saraiva, J. Cavaleiro, L. Lanceleur, M. Monperrus, Synthetic musk in seafood products from south Europe using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method, *Food Chem.* 200 (2016) 330–335.
- [16] A.C. Braga, R.N. Alves, A.L. Maulvault, V. Barbosa, A. Marques, P.R. Costa, In vitro bioaccessibility of the marine biotoxin okadaic acid in shellfish, *Food Chem. Toxicol.* 89 (2016) 54–59.
- [17] L. Trabalón, G. Cano-Sancho, E. Pocurull, M. Nadal, J.L. Domingo, F. Borrull, Exposure of the population of Catalonia (Spain) to musk fragrances through seafood consumption: Risk assessment, *Environ. Res.* 143 (2015) 116–122.
- [18] L. Vallecillos, F. Borrull, E. Pocurull, An automated headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry method to determine macrocyclic musk fragrances in wastewater samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9547–9554.

- [19] L. Vallecillos, Y. Sadeh, F. Borrull, E. Pocurull, K. Bester, Degradation of synthetic fragrances by laccase-mediated system, *J. Hazard. Mater.* 334 (2017) 233–243.
- [20] R. Gatermann, S. Biselli, H. Hühnerfuss, G.G. Rimkus, S. Franke, M. Hecker, R. Kallenborn, L. Karbe, W.A. König, Synthetic musks in the environment. Part 2: Enantioselective transformation of the polycyclic musk fragrances HHCB, AHTN, AHDI, and ATII in freshwater fish, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42 (2002) 447–453.

