

## **4.- METODOLOGIA**

### **4.1.- Selecció del grup de participants**

Per l'estudi control (blanc) es van escollir un total de 28 treballadors de la planta, per a ser examinats mitjançant monitors biològics i així obtenir valors de referència. Seleccionarem treballadors relacionats directament amb el procés d'incineració, i també treballadors d'altres àrees, com el laboratori i les oficines. Aquest nombre de treballadors ha variat al llarg dels 2 anys següents. Això va ser degut a la no disponibilitat de alguns treballadors, en concret 5, per continuar amb l'estudi, reduint el número a 23 a l'any 2000. Per poder obtenir altre cop els 28 treballadors, al 2001 vam seleccionar 5 nous candidats, els quals portaven igual que tots els altres, un any treballant en la planta.

A l'hora d'escollir els participants de l'estudi, es van tenir en compte els següents paràmetres:

- a) Edat de l'individu
- b) Treballs desenvolupats anteriorment
- c) Lloc de residència durant els últims cinc anys
- d) Lloc actual de treball a la planta

Així doncs, es van considerar fora de l'estudi les persones més grans, els que haguessin estat potencialment exposats ocupacionalment a qualsevol dels contaminants a mesurar, i aquells que portaven menys de cinc anys vivint a l'àrea d'influència de la planta.

### **4.2.- Recol·lecció d'informació dels participants**

La recollida d'informació es va realitzar mitjançant la realització de dues enquestes (Apostoli i cols. 1997; Baldwin i cols. 1999; Alfvén i cols. 2000) mostrades en les taules 6 i 7.

Taula 6.- Enquesta sobre dades físiques i hàbits dels treballadors

14. ¿Toma alguna medicación?  SI  NO

15. Entero alim

### TEST PARA TRABAJADORES DE IRI

1. Fecha \_\_\_\_\_

2. Número de control \_\_\_\_\_

3. Nombre \_\_\_\_\_

4. Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

5. Peso (kg) \_\_\_\_\_

6. Altura (cm) \_\_\_\_\_ Presión arterial \_\_\_\_\_

7. Lugar de residencia actual \_\_\_\_\_

---

8. Más de 2 años viviendo en la residencia actual  SI  NO

9. Residencia antigua \_\_\_\_\_

- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_

10. Puesto de trabajo actual en la planta \_\_\_\_\_

11. Horas diarias en el puesto de trabajo \_\_\_\_\_

12. Ocupaciones previas y duración de cada una de ellas \_\_\_\_\_

---

13. Hábitos generales:

- ¿Cuántos cigarrillos fuma diariamente? \_\_\_\_\_
- ¿A qué edad comenzó a fumar? \_\_\_\_\_
- Si es exfumador, ¿Cuántos años lleva? \_\_\_\_\_
- ¿Bebe cerveza?  SI  NO
- En caso afirmativo, ¿cuántas cerveza bebe la semana \_\_\_\_\_
- ¿Bebe vino?  SI  NO
- En caso afirmativo, ¿cuántas copas de vino bebe la semana \_\_\_\_\_

14. ¿Toma alguna medicación? SI NO

15. En caso afirmativo, tipo de medicación y periodicidad \_\_\_\_\_

- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_

16. ¿Padece algún tipo de enfermedad crónica? SI NO

17. En caso afirmativo, ¿qué tipo? Renal Años  
Diabetes Años  
Hepática Años  
Hipertensión Años  
Otras Años

18. Hobbies/actividades lúdicas \_\_\_\_\_

- Agrícolas
- Manejo de disolventes
- Deportes
- Otros

Taula 7.- Informació sobre la dieta. El qüestionari es va completar durant 15 dies.

DIA 1
ESMORZAR
DINAR
SOPAR
ALTRES MENJADES FORA DE L'HABITUAL

A partir d'aquestes dades els participants van ser classificats segons tres grups: no fumadors, fumadors i antics fumadors. Als fumadors se'ls preguntava el tipus de tabac (cigarret, puro o pipa), la quantitat diària, i el temps que portaven fumant. Als que ho havien deixat se'ls preguntava el temps que havia passat des que abandonaren el tabac.

La informació general dels 28 treballadors escollits obtinguda a partir dels paràmetres anteriorment descrits i la enquesta de la Taula 6 es mostra pels anys 1999, 2000 i 20001 en les taules (8-10).

Seguidament, als treballadors escollits se'ls va fer una enquesta que contenia informació sobre la dieta dels últims quinze dies (Taula 7). A partir d'aquesta, es va determinar el contingut de dioxines, furans i metalls pesants a què estaven exposats a través de la dieta (Taula 11 i 12).

Taula 8.- Sexe, edat, i hàbits de fumar dels participants l'any 1999.

	Lloc de Treball		
	Planta	Laboratori	Administració
Número de persones	21	4	3
Dona/home	1/20	4/0	1/2
Edat (anys); mitjana $\pm$ DE	28.2 $\pm$ 7.5	28.5 $\pm$ 4.7	27.3 $\pm$ 2.5
Fumadors/no fumadors	13/8	1/3	1/2

Taula 9.- Sexe, edat, i hàbits de fumar dels participants l'any 2000.

	Lloc de Treball		
	Planta	Laboratori	Administració
Número de persones	19	3	1
Dona/home	1/18	3/0	1/0
Edat (anys); mitjana $\pm$ DE	27.3 $\pm$ 3.2	31 $\pm$ 4.4	26
Fumadors/no fumadors	13/6	1/2	0/1

Taula 10.- Sexe, edat, i hàbits de fumar dels participants l'any 2001.

	Lloc de Treball		
	Planta	Laboratori	Administració
Número de persones	22	3	3
Dona/home	1/21	3/0	3/0
Edat (anys); mitjana $\pm$ DE	28.5 $\pm$ 3	32 $\pm$ 4	26.7 $\pm$ 2
Fumadors/no fumadors	12/10	1/2	1/2

Taula 11.- Exemple de la ingesta diària de PCDD/Fs, per un treballador de la planta incineradora de residus especials, obtinguda a partir de les dades de l'enquesta.

ALIMENTS	Ingesta diària d'aliment del treballador (g/dia)	*PCDD/Fs en l'aliment (ng/kg pes humit)	PCDD/Fs ingerit pel treballador (I-TEQ ng/día)
Vegetals	194	0,14	2,72E-02
Llegums	14	0,19	2,71E-03
Cereals	170	0,25	4,26E-02
Fruites	182	0,09	1,64E-02
Peix blanc	61	0,27	1,64E-02
Peix blau	7	0,76	5,43E-03
Marisc	28	0,42	1,19E-02
Peix llauna	0	0,24	0
Porc	47	0,11	5,15E-03
Pollastre	14	0,11	1,57E-03
Vedella	33	0,13	4,32E-03
Corder	0	0,13	0
Ous	41	0,12	4,93E-03
Derivats lactis	20	0,04	8,00E-04
Llet sencera	226	0,18	4,08E-02
Llet semidesnatada	0	0,06	0
Oli	45	0,64	2,88E-02
Margarina	0	0,49	0
<b>**DDDI (pg I-TEQ/kg/dia)</b>			<b>2,99</b>

\* Valors obtinguts de l'estudi realitzat per Domingo i cols. l'any 1999.

\*\* DDDI= ingesta diària en la dieta de dioxines. El rang acceptable per l'OMS és d'1-4 pg I-TEQ/kg/dia (OMS, 1998).

Aquest valor obtingut com exemple, ens informa de que els nivells de dioxines (PCDD/Fs) dels treballadors aportada per la dieta està dintre dels valors permesos per la OMS.

Taula 12.- Exemple de la ingesta diària d'arsènic per un treballador de la planta incineradora de residus especials, obtinguda segons dades de l'enquesta.

ALIMENTS	Ingesta diària d'aliment del treballador (g/dia)	As en l'aliment ( $\mu\text{g/g}$ )	As ingerit pel treballador ( $\mu\text{g/dia}$ )
Vegetals	194	3,51	680,64
Llegums	14	17,36	248,02
Cereals	170	5,67	965,13
Fruites	182	0,40	72,74
Peix blanc	61	0,58	35,10
Peix blau	7	0,68	4,88
Marisc	28	1,03	29,18
Peix llauna	0	0,12	0
Porc	47	0,05	2,15
Pollastre	14	0,10	1,40
Vedella	33	0,11	3,49
Corder	0	0,23	0
Ous	41	1,25	51,35
Derivats lactis	20	0,25	5,08
Llet sencera	226	0,21	48,32
Llet semidesnatada	0	0,22	0
Oli	45	0	0
Margarina	0	0	0
<b>Ingesta Total Arsènic <math>\mu\text{g/kg/dia}</math></b>			<b>30,68</b>

### 4.3.- Determinacions analítiques

Els anàlisis dels compostos orgànics en sangs i orines han estat fets al Departament of Analytical Laboratory del MPU de Berlin (Dr. L. Müller i Prof. Dr. J. Jager). La digestió àcida de les mostres per a la determinació dels metalls pesants en sangs i orines es va fer al Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental de la URV i, la determinació analítica de les mostres en la Unitat d'Espectroscòpia dels Serveis Científic–Tècnics de la Universitat de Barcelona.

A l'any 1999 (estudi blanc), es van analitzar els següents compostos orgànics: BTEX, dibenzodioxines policlorades (PCDD), dibenzofurans policlorats (PCDF), hexaclororbenzè (HCB), bifenils policlorats (PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153, PCB-180), i 2,4-clorfenol, 2,5-clorfenol, 2,4,6-triclorfenol, 2,4,5-triclorfenol, pentaclorfenol, i 1-hidroxipirè. Les anàlisis es van fer individualment per determinar els nivells de referència. Tenint en compte els resultats obtinguts en aquest estudi, es va considerar fer uns canvis pels dos anys següents: eliminar el grup de compostos orgànics format pel BTEX, degut a la seva imprecisió i dificultat de controlar els paràmetres analítics, i preparar “pools” de les mostres; ja que per la seva complexitat, suposaven uns costos molt elevats, especialment els de les dioxines i furans. Tanmateix, si en qualsevol moment es pogués sospitar d'exposició a aquests compostos en els següents estudis es tornarien a analitzar de forma individual.

Per tant, es van fer 6 mostres “composites” per determinar els compostos orgànics en sang i 6 mostres “composites” més per l'orina. Els subgrups es van agrupar d'acord amb les concentracions obtingudes a l'estudi blanc o de referència de l'any 1999.

Els “composites” van estar constituïts per “pools” formats de la següent manera: 1 mostra del personal d'administració, 1 mostra del personal del laboratori, i 4 mostres del personal de planta (formades cadascuna de 4-6 persones).



### **4.3.1.- Determinacions analítiques en sang**

Les mostres de sang van ser extretes als treballadors per personal sanitari especialitzat, a l'hospital de Sant Joan de Reus o a la Mútua d'Accidents de Treball de Tarragona (MATT).

Les mostres van ser dipositades en contenidors estèrils amb anticoagulants per a la seva posterior centrifugació (3000 rpm durant 10 minuts). Es va separar el plasma que va ser objecte d'anàlisis dels productes orgànics citats anteriorment. Altrament, en sang sencera es van determinar els nivells de benzè, toluè, etilbenzè i m-xilè (BTEX).

Es va reservar una petita quantitat de sang sencera per analitzar el contingut dels següents metalls: beril·li (Be), manganès (Mn), mercuri (Hg) i plom (Pb).

#### **4.3.1.1.- Determinació analítica de PCDD/PCDFs, PCBs i HCB en plasma.**

La determinació es va portar a terme d'acord amb els mètodes alemanys VDI 3499 (1993) i dels procediments descrits per la "Environmental Protection Agency" (EPA USA Method 1625).

Totes les concentracions han estat transformades en base al pes lipídic ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ja que els compostos orgànics són substàncies lipofíliques que es distribueixen en els lípids del cos.

Abans de l'extracció, les mostres van ser homogeneïtzades. Les etapes fonamentals que caracteritzen aquesta metodologia són:

1.- Extracció, segons les característiques particulars de cada mostra, amb addició simultània dels 17 isòmers 2,3,7,8 substituïts, marcats amb  $^{13}\text{C}$ , i un conjunt de  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs i  $^{13}\text{C}_6$ -hexaclorbenzè com a patró de quantificació, utilitzant el mètode de dilució isotòpica.

2.- Purificació o "clean-up" de l'extracte mitjançant cromatografia d'adsorció sòlid-líquid en columnes obertes, eluïdes per gravetat. A continuació, es fa una reducció de la

fracció que conté les PCDD/Fs i la fracció que conté els PCBs, fins arribar al volum necessari.

3.- Anàlisi de l'extracte purificat per cromatografia de gasos d'alta resolució (HRGC) acoblat a espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS).

4.- Quantificació pel mètode de dilució isotòpica d'estàndards interns.

### **1.- Extracció**

L'objectiu d'aquesta fase va consistir en recuperar de forma quantitativa les dioxines i furans, PCBs i HCB continguts en les mostres. Es van prendre 25 g de mostra seca i s'addicionà una quantitat coneguda dels 15 isòmers tòxics durant 2 h. A continuació, s'extragué en un soxhlet durant 48 h amb toluè (qualitat per anàlisi de residus). Finalment, l'extracte es va concentrar en rotavapor fins arribar a uns 2-3 mL abans de començar la fase de purificació.

### **2.- Purificació o “Clean-up”**

En aquesta etapa, l'objectiu va ser l'eliminació dels diferents compostos interferents que es van extreure conjuntament amb les dioxines i furans. Aquest procés de purificació es realitzà mitjançant cromatografia d'adsorció sòlid-líquid en columnes obertes eluïdes per gravetat. L'extracte obtingut es va sotmetre a l'acció de tres tipus de columnes:

- \* Columna de sílica modificada amb  $H_2SO_4$  i NaOH
- \* Columna de florisil
- \* Columna d'alúmina bàsica

Com a eluents, s'utilitzen dissolvents de diferent polaritat com hexà, diclorometà, toluè i èter. En aquesta etapa es van separar els PCDD/Fs dels PCBs i de l'HCB. El procés de “clean-up” es va controlar en cada pas mitjançant HRGC amb detector de captura electrònica (ECD). Si després de les tres columnes anteriors, el cromatograma ECD encara presentava interferències, l'extracte es purificava finalment

amb una columna de carbó (Carbopack 80/100). Al final de l'etapa de purificació, l'extracte es va concentrar en primer lloc amb rotavapor, i després amb corrent de nitrogen, fins a un volum final de 10 mL.

### **3.- Anàlisi i quantificació per HRGC-HRMS**

La determinació final es va realitzar mitjançant cromatografia de gasos d'alta resolució (Carlo Erba 8000). Es va utilitzar una columna cromatogràfica apolar J&WDB-5 acoblada a un cromatògraf de masses d'alta resolució (Fisons CE 8000 acoblat a un sistema VG Autospec Ultima). L'ús de la cromatografia de gasos d'alta resolució és necessari per a la separació de les diferents famílies de congèneres, així com per a obtenir una bona separació entre isòmers dintre de cada grup de congèneres. La detecció es va efectuar per espectrometria de masses d'impacte electrònic a una resolució mínima de 10.000, treballant amb modalitat S.I.R. (Selected Ion Recording), obtenint així una alta sensibilitat i selectivitat. Els compostos van ser identificats especialment pel senyal dels dos ions moleculars  $M^+$  i  $M^{+2}$  ó  $M^{+4}$  de l'isòmer natiu i del corresponent marcat amb  $^{13}C$ , per la relació isotòpica correcta i pels temps de retenció cromatogràfics.

Prèviament a l'anàlisi de la mostra per HRGC/HRMS, es va procedir a la calibració de l'espectròmetre a una resolució de 10.000, així com a la determinació de la linealitat i de les rectes de calibrat per a cadascun dels congèneres tòxics, a partir dels quals s'obtenen els factors de resposta relativa (RRFs). Per això, es van utilitzar solucions de calibrat subministrades per CHEMSYN Science Laboratorie (Lennexa, USA), les quals contenen cadascuna, concentracions exactament conegudes dels isòmers analitzats, així com els corresponents marcats amb  $^{13}C$  com s'especifica en el mètode 1613 de l'EPA.

Per a la quantificació, s'utilitzà el mètode de dilució isotòpica, el qual té en compte la relació entre la suma de les àrees dels ions  $M^+$  i  $M^{+2}$  ó  $M^{+4}$  de l'isòmer natiu i el corresponent marcat, així com els RRFs determinats prèviament en les rectes de calibració. Amb aquest mètode, els resultats són automàticament corregits per a les pèrdues inevitables produïdes durant els processos d'extracció i purificació.

Les concentracions de dioxines i furans es van donar en equivalents tòxics (I-TEQ). Pels càlculs d'aquests equivalents tòxics, s'han utilitzat els factors tòxics internacionals (I-TEF) que juntament amb els de l'OMS són els més generalment acceptats. Es deriven d'un estudi fet per l'OTAN al 1988, i són molt utilitzats en la regulació legal alemanya. Aquests factors es mostren a la Taula 13.

Taula 13.- Factors Tòxics Internacionals (I-TEF) dels 17 congèneres de dioxines i furans de major toxicitat

FURANS		DIOXINES	
2,3,7,8-TCDF	0.1	2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	1,2,3,7,8-PeCDD	0.5
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5		
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01
1,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01		
OCDF	0.001	OCDD	0.001

Pels càlculs dels I-TEQ, vam utilitzar la següent fórmula:

$$I-TEQ = \sum (TEF * \text{concentració})$$

Els congèneres que no figuren a la Taula 13 tenen assignat un I-TEF = 0.

#### **4.3.1.2.- Determinació analítica de BTEX (benzè, toluè, etilbenzè, xilè) en sang**

La determinació es va portar a terme d'acord amb el procediment NIOSH (National Institute of Occupational and Safety Health) núm. 8002, punt 2. L'anàlisi es va realitzar directament mitjançant el mètode head-GC/MS (cromatògraf de gasos/espectrofotòmetre de masses) en les mostres de sang originals.

#### **4.3.1.3.- Determinació analítica dels metalls beril·li (Be), manganès (Mn), mercuri (Hg) i plom (Pb) en sang**

Les etapes fonamentals que caracteritzen la metodologia són:

- 1.- Digestió àcida de la mostra
- 2.- Anàlisi del digerit

##### ***Digestió de les mostres de sang***

Previ a l'anàlisi, les mostres van ser digerides en vasos de tefló tancats per a l'extracció dels metalls. A 3 g de mostra s'addicionaven 4 mL d'àcid nítric 65% (p.a, pro analysis) i 1 mL de peròxid d'hidrogen. Es va realitzar una predigestió a temperatura ambient durant 8 h, i seguidament una digestió a 80 °C durant 8 h més en una estufa. Un cop digerides les mostres, es van filtrar els digerits amb paper de filtre Watman 40 i es van diluir fins a 25 mL amb aigua desmineralitzada (Mili Q) (Llobet i cols. 1998). Les mostres van ser congelades en tubs de vidre (-20°C) fins la seva anàlisi.

##### ***Anàlisi de les mostres***

L'anàlisi de les mostres una vegada digerides es va dur a terme mitjançant el mètode d'inducció de plasma acoblat amb detector de masses (ICP-MS, Perkin Elmer Elan 6000). La tècnica d'espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament (ICP-MS) s'aplica a l'anàlisi elemental a nivell de traces i ultratraces. Es poden determinar molts elements de la taula periòdica amb límits de detecció que van des dels ng/L fins als mg/L, depenent de l'element i de la matriu de la mostra. Emprant el sistema d'introducció de mostra per nebulització, aquesta ha d'estar en solució aquosa i

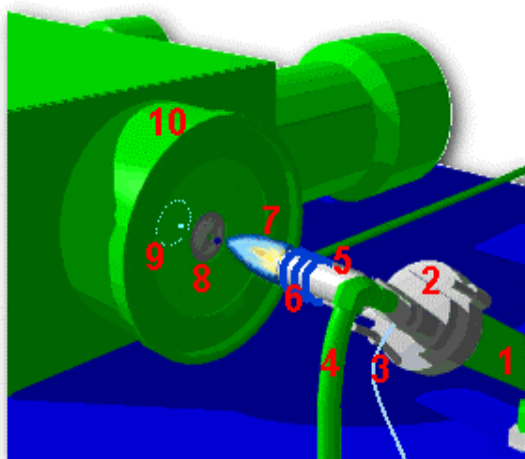
no contenir quantitats altes de sòlids dissolts. Això implica un tractament àcid de les mostres sòlides i la seva posterior dilució, si fos necessari. En el cas de les mostres líquides, el seu tractament dependrà de la naturalesa de la mostra (contingut de matèria orgànica, oxidants, pH) i del contingut total en sòlids en solució. En el cas de fluids amb baixa mineralització, la mostra només requereix un filtrat.

La tècnica permet també la realització de mesures semiquantitatives, donant informació sobre l'ordre de concentració de molts elements amb una mesura relativament senzilla. En alguns casos es poden emprar tècniques de microinjecció per treballar amb mostres amb alt contingut de sòlids en solució.

### ***Característiques de l'anàlisi per ICP-MS***

L'espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament (ICP-MS) es basa en la vaporització, dissociació i ionització dels diferents elements químics d'una mostra en l'interior d'un plasma. Els ions positius generats en aquest procés són separats en funció de la seva relació massa/càrrega, i finalment detectats amb un sistema multiplicador de ions.

Seguidament, es descriuen les diferents etapes de que consta la tècnica amb les seves possibles variants:



- 1.** Cambra de nebulització.
- 2.** Nebulitzador de flux creuat.
- 3.** Entrada de mostra.
- 4.** Entrada d'argó de nebulització.
- 5.** Torxa de quars.
- 6.** Bobina d'inducció de RF.
- 7.** Plasma.
- 8.** Primer con de l'interfície. 'Sampler'.
- 9.** Segon con de l'interfície. 'Skimmer'.
- 10.** Bloc de l'interfície.

### Introducció de mostra

Primerament, cal introduir la mostra a l'interior del plasma. El mètode més emprat es el de nebulització, on una part de la mostra líquida és transformada en un aerosol i conduïda a l'interior del plasma per un flux de gas. En aquest cas, totes les mostres a mesurar han d'estar generalment en solució aquosa, implicant un procés de digestió previ de les mostres sòlides. Aquest procés de nebulització pot portar-se a terme després de etapes de separació (HPLC, CZE) o de pretractament de les mostres (FIA).

Un altre sistema d'introducció de mostra que s'està emprant en ICP, és el de vaporització electrotèrmica. En aquest cas, un petit volum de mostra es introduït en un tub de grafit, i vaporitzat per escalfament electrotèrmic. Els vapors produïts es porten al plasma emprant un flux de gas. El tipus de forns utilitzats en aquest sistema són molt similars als emprats en absorció atòmica amb forn de grafit (GFAAS).

Una altra tècnica molt interessant es la de generació d'hidrurs. Aquesta es pot emprar per a la determinació d'alguns elements químics que presenten la propietat de generar espècies volàtils per reducció, com es el cas de l'As, Sb, Se, Ge, Bi i Hg. Aquest sistema d'introducció de mostra és molt més eficient que el de nebulització i permet la separació de l'analit de la matriu de la mostra. Com inconvenient, cal dir que es produeix una important pèrdua de capacitat multielemental de l'ICP-MS.

Una de les tècniques d'introducció de mostra més utilitzades en ICP-MS per l'anàlisi de mostres sòlides és la d'ablació per làser (LA). En aquest cas, una petita quantitat de mostra sòlida és vaporitzada emprant un làser i conduïda fins el plasma. Aquest sistema permet l'anàlisi directe de mostres sòlides, però presenta alguns problemes en el procés de calibració de l'equip, ja que s'ha de disposar de patrons sòlids semblants a les mostres a analitzar.

### Plasma acoblat inductivament (ICP)

Podríem definir el plasma com un gas neutre, parcialment ionitzat. En el cas del plasma acoblat inductivament, el gas emprat és l'argó a pressió atmosfèrica, i l'energia que el manté en funcionament és transferida inductivament mitjançant una bobina per on circula radiofreqüència. L'argó és conduït mitjançant una torxa de quars.

Normalment es treballa amb radiofreqüències de 27 ó 40 MHz i amb unes potències entre 1 i 2 kW. Les temperatures que s'aconsegueixen a l'interior del plasma en aquestes condicions, són de l'ordre dels 8000 °K, i depenen de la zona.

L'aerosol de mostra és introduït per la part central del plasma mitjançant un injector. Degut a les altes temperatures del plasma, la mostra es vaporitza i ionitza parcialment, generant part d'ions positius de la majoria del elements presents a la mostra.

### Interfície

És un dels punts més crítics de l'equip ja que ha de permetre passar part dels ions positius obtinguts a la zona del plasma fins l'analitzador de masses. Això implica un pas de pressió atmosfèrica (760 torr) i 8000 °K fins a 10<sup>-5</sup> torr i temperatura ambient. Aquest pas es fa en dues etapes. En la primera, un con metàl·lic (normalment de Ni, Pt ó Cu) amb un petit orifici central, mostreja la part central del plasma. Aquest con s'anomena "sampler" i dona pas a una zona intermèdia amb una pressió de l'ordre d'1 torr. Posteriorment, un segon con anomenat "skimer", torna a mostrejar la part central del "jet" d'expansió dels gasos que han passat pel sampler, donant pas a la zona d'alt buit amb una pressió de l'ordre de 10<sup>-5</sup> torr.

### Òptica iònica i discriminador de masses

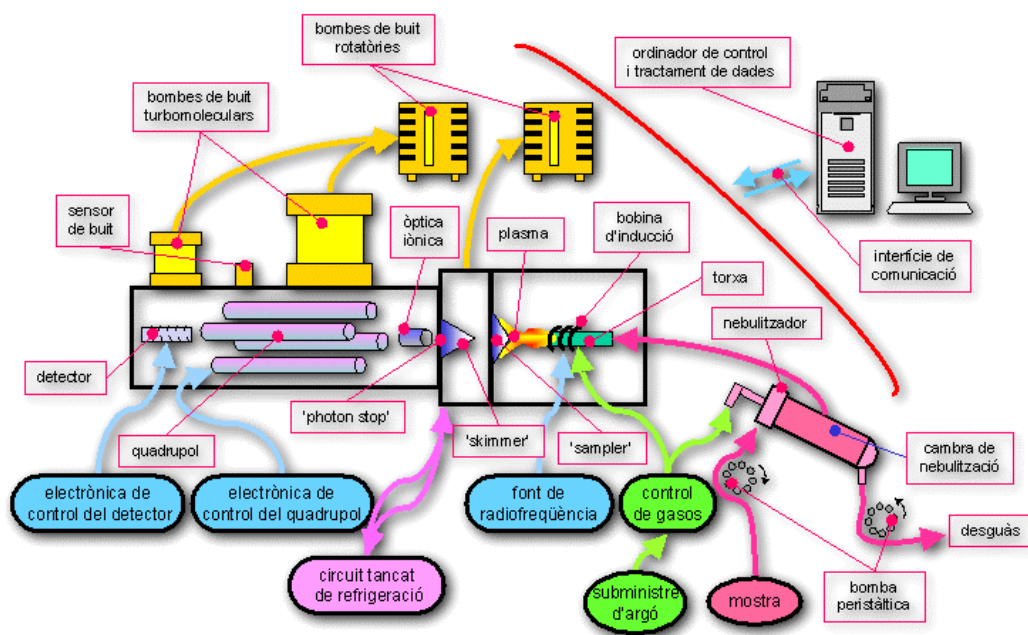
Un cop els ions han entrat a la zona d'alt buit, aquests són focalitzats emprant una sèrie de lents iòniques que poden ser més o menys complexes. En aquesta zona de l'instrument hi ha també algun sistema per aturar els fotons, degut a que el detector que



emprarem finalment per detectar els ions, també és sensible als fotons. Normalment és un petit disc metàl·lic posat en el centre de la trajectòria dels fotons. Els ions són desviats per l'òptica iònica, mentre que els fotons impacten contra el disc.

El feix d'ions passa finalment a l'analitzador de masses. En aquesta zona els ions són separats en funció de la seva relació massa/càrrega. Aquesta separació es pot portar a terme mitjançant un filtre de quadrupol, amb tècniques de temps de vol (TOF-ICP-MS), o amb una gran resolució, mitjançant sectors magnètics (HR ICP-MS).

Els aparells d'ICP-MS més estesos empenen el sistema de quadrupol. Aquest sistema proporciona una resolució propera a 1 amu en tot el rang de masses. Aquesta resolució no és suficient per distingir isòtops amb masses molt similars, donant lloc a possibles interferències isobàriques i altres degudes a combinacions poliatòmiques.



Esquema general d'un instrument d'ICP-MS amb discriminador de masses de quadrupol

### Detector

La detecció es porta a terme normalment emprant un multiplicador d'electrons. Aquest tipus de detector proporciona una gran sensibilitat, ja que permet detectar els ions individualment quan treballa en mode de compte de polsos, mentre que pot arribar a mesurar intensitats molt altes en el mode analògic, proporcionant un rang dinàmic de més de 5 ordres de magnitud.

La tècnica proporciona uns límits de detecció molt baixos per a molts elements de la taula periòdica, sobretot pels metalls pesants i terres rares.

Una desavantatge inherent a la tècnica és la formació d'espècies poliatòmiques i de ions amb doble càrrega. Els isòtops d'argó, oxigen, nitrogen i hidrogen es poden combinar amb ells mateixos o bé amb altres elements presents a les mostres, produint interferències poliatòmiques. En el cas dels ions amb doble càrrega, part de l'analit es perd en forma de iò amb doble càrrega i interfereix a masses inferiors. Aquest tipus d'interferències són molt depenents de la matriu de la mostra, per la qual cosa la seva correcció és complicada (Serveis Científic-Tècnics UB).

### 4.3.2 Determinacions analítiques en orina

Les mostres d'orines van ser recollides en contenidors estèrils al mateix centre sanitari.

Es van determinar els següents productes orgànics: 2,4-clorfenol, 2,5-clorfenol, 2,4,6- triclorfenol, 2,4,5-triclorfenol, pentaclorfenol i 1-hidroxiipirè.

Es va reservar una petita quantitat d'orina per a determinar el contingut dels següents metalls: arsènic (As), cadmi (Cd), crom (Cr), níquel (Ni) i vanadi (V).

Els resultats dels diferents contaminants mesurats es van normalitzar mitjançant la concentració de creatinina en orina, per eliminar possibles influències dels nivells de creatinina en la substància a analitzar (Alfvén i cols. 2000; Hoffman i cols. 2000; Jarüp i cols 2000). Aquesta es va determinar pel mètode de Jaffé utilitzant un autoanalitzador Cobas (Alimonti i cols. 2000).

#### 4.3.2.1.-Determinació analítica de clorfenols (CLP) en orina

L'anàlisi de CLP en orina es va realitzar pel mètode NIOSH (National Institute of Occupational and Safety Health) núm. 8001. El pentaclorfenol en orina es va determinar mitjançant el mètode Henschler (determinació de PCP en orina o sèrum després de l'acetilació: Henschler, Analytische Methoden, Analysen in biologischem Material, 5. Lieferung, 1981).

L'extracció dels CLP es va realitzar mitjançant un procés d'hidròlisi obtenint-se els diferents derivats. Aquests van ser analitzats per HRGC/HRMS (cromatografia de gasos/espectrofotometria de masses d'alta resolució), fent servir un Fisons CE 8000 GC acoblat a un sistemaVG Autosepc Ultima. La detecció s'efectuà per espectrometria de masses d'impacte electrònic a una resolució mínima de 10.000. L'anàlisi es va realitzar en un medi polar amb una columna DB-XLB. La quantificació es va portar a terme utilitzant estàndards interns de CLP, marcats amb  $^{13}\text{C}$ .

#### **4.3.2.2.-Determinació analítica d'1-hidroxi pirè**

La determinació d'1-hidroxi pirè es va realitzar utilitzant el mètode DFG, Anàlisi de Substàncies Pelilloses en Matrius Biològiques (Analyses of Hazardous Substances in Biological Matrices, Vol.3, S.151, 1990). Aquest mètode s'utilitza per la determinació d'1-hidroxi pirè lliure o conjugat. Després d'una hidròlisi enzimàtica s'allibera part del conjugat d'1-hidroxi pirè, que és separat de la matriu i purificat per una extracció líquid/sòlid en una columna de fase reversa. Els components de l'eluït van ser separats per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) i l'1-hidroxi pirè es va determinar amb detector de fluorescència.

#### **4.3.2.3.-Determinació analítica dels metalls arsènic (As), cadmi (Cd), crom (Cr), níquel (Ni) i vanadi (V) en mostres d'orina.**

##### ***Digestió de les mostres de orina***

Previ a l'anàlisi, totes les mostres van ser centrifugades a 3000 rpm durant 10 minuts. Per l'arsènic i el vanadi, van ser digerides en vasos de tefló tancat per a l'extracció dels metalls. A 3 mL de mostra s'addicionaven 2 mL d'àcid nítric del 65% (p.a, pro analysis). Es va realitzar una predigestió a temperatura ambient durant 8 h, i seguidament una digestió a 80 °C durant 8 h més en una estufa. Un cop digerides, es van filtrar els digerits amb paper de filtre Watman 40, i es van diluir a 10 mL amb aigua desmineralitzada (Mili Q). Per l'anàlisi de cadmi, crom i níquel les mostres, es van analitzar sense digerir. Es van utilitzar 4 mL de mostra acidificada amb àcid nítric a l'1% (Järup i cols. 2000).

##### ***Anàlisi de les mostres d'orina***

L'anàlisi de les mostres una vegada digerides, es va portar a terme mitjançant el mètode d'inducció de plasma acoblat amb detector de masses (ICP-MS, Perkin Elmer Elan 6000) ja explicat anteriorment a l'apartat d'anàlisi de metalls en sang. L'arsènic, donat la seva volatilitat, va ser determinat mitjançant generació d'hidrurs (Cornelis i cols. 1996; Llobet i cols. 1998; Cano-Pavon i cols. 1999). Es pot emprar la generació d'hidrurs com a sistema d'introducció de mostra per a la determinació dels elements

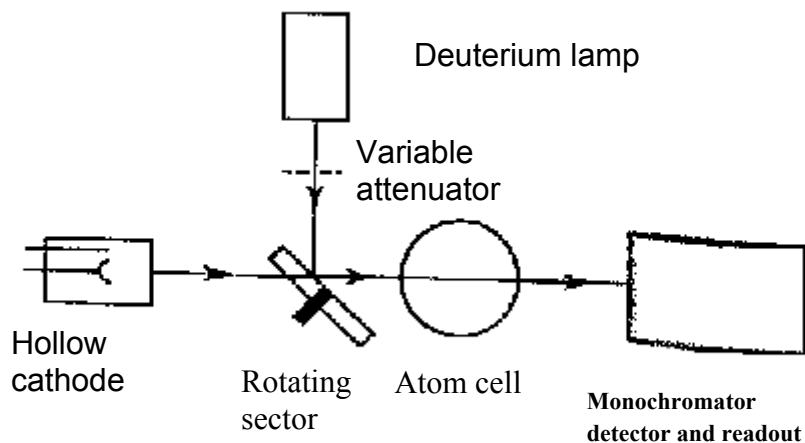
formadors d'espècies volàtils (As, Se, Sb, ...), quan la seva determinació normal no sigui possible per problemes d'interferències. El cadmi, crom i níquel, per evitar possibles interferències degut a les sals procedents de l'orina (ions de sodi i de potassi), es va determinar per espectrofotometria d'absorció atòmica amb forn de grafit (Blanusa, 1996; Cornelis i cols. 1996; Lin i Huang, 2001). Es va utilitzar un corrector de deuteri pel Ni (UNICAM 939/959) i de Zeeman pel Cr i Cd (Varian Spectrophotometer, Spectra A-30).

### Característiques del forn de grafit

Encara que el mètode d'atomització més utilitzat per la seva economia i facilitat d'ús continua sent la flama, l'atomització electro tèrmica està àmpliament introduïda, evitant els inconvenients del sistema nebulitzador-cremador, i arribant a millors sensibilitats. Aquest consta de dos tipus de correctors:

#### *a) Corrector de fons de deuteri*

L'aparell utilitza dos llums, una de càtode buit que emet línies estretes i un llum de deuteri que emet una banda ampla entre 200 i 350 nm. Els dos llums han d'estar alineats amb el fotomultiplicador i tenir anàloga intensitat. L'esquema d'un aparell amb corrector de fons seria el representat a continuació:



És molt important per a una bona correcció (especialment en forn on les senyals són molt ràpides), que el gir del separador de raigs de llum (“beamsplitter”, “rotating sector”) sigui molt ràpid; és a dir, que la velocitat de la lectura de fons sigui molt petita (inferior a 1ms).

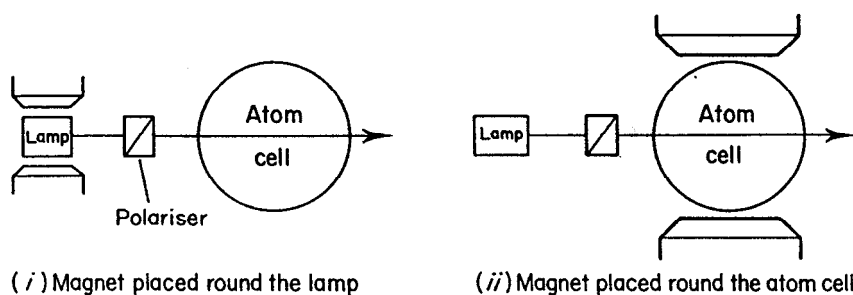
A l'utilitzar una llum de font continua, l'absorció atòmica que es mesura és quasi nul·la, mentre que l'absorció no específica és anàloga a la que s'ha mesurat amb el llum de càtode buit (llegim el fondo). Restant els dos valors, obtenim la senyal atòmica neta. És el mètode més utilitzat per la seva economia, solucionant el 95% dels anàlisis.

Els seus principals inconvenients són:

- només treballa en l'UV, en la zona de 200-350 nm, encara que és la zona on es troben els fons més importants.
- No compensa bé les senyals estructurades.
- Les intensitat dels dos llums són a vegades difícils de compensar.

### b) Efecte Zeeman

El corrector Zeeman utilitza un camp magnètic que divideix la línia espectral en tres components de longitud d'ona ( $\lambda$ ) lleugerament diferent. El camp magnètic es pot aplicar a la font de radiació o a l'atomitzador, sent els aparells més utilitzats els que utilitzen aquesta última orientació (és més econòmic).



Les ventatges del mètode són:

- a) només és un llum, amb el qual no hi ha problemes de compensació.
- b) El fons es mesura a una  $\lambda$  molt pròxima a l'absorció amb la qual cosa es corregeixen fons estructurats.
- c) És aplicable a tot el rang de  $\lambda$ .

Els seus inconvenients són:

- a) pèrdua de sensibilitat depenent de l'element, degut a que el component  $\lambda$  és parcialment absorbit per la mostra.
- b) a altes concentracions la corba gira cap l'eix de concentracions, sent l'efecte conegut com "rollover". Per tant, per a una absorvència donada podem tenir dos concentracions diferents. Per evitar el problema, degut a l'eixamplament de les components  $\pi$ , el rang de treball es limita a absorvències inferiors a 0.6.
- c) No es pot utilitzar amb flama (excepte en aparells que apliquin el camp magnètic a la font de radiació).

#### 4.4.- Control de qualitat

Per assolir una fiabilitat adient dels resultats, cal dur a terme un bon control de qualitat intern. Aquest proporciona una seguretat al llarg del temps d'absència d'errors apreciables en les dades analítiques.

##### a) *Compostos orgànics*

Es va fer al propi MPU.

##### b) *Metalls*

Per assegurar la veracitat dels nostres resultats vam utilitzar estàndards interns, així com un material de referència: TORT-2 (Lobster Hepatopáncreas), el qual s'utilitza per la determinació de metalls traça en materials biològics. La majoria del treball analític i de certificació va tenir lloc en l'Institut per a Mesures Estàndards Nacionals de Canadà. Altres laboratoris experts van cooperar en la certificació.

Tant els estàndards interns com el material de referència es va passar cada 10 mostres per comprovar la precisió del mètode emprat. Es va digerir i tractar a les mateixes condicions com la resta de mostres, obtenint una recuperació d'entre el 86% i el 98%.

També es van utilitzar mostres blanes intercalades per evitar possibles interferències en els resultats (Ex: contaminació).

Una calibració periòdica dels aparells i instruments de mesura utilitzats en l'anàlisi (ex: balança, estufa, pipetes..), proporciona una correcció de les mesures, i per tant, una correcta utilització d'aquests instruments en cada moment, el qual assegura una bona traçabilitat de les mesures.

S'ha utilitzat en tot moment els procediments específics i PNT's que reflexen els detalls concrets de la metodologia analítica, i que assegurin que el mètode aplicat sempre és el mateix i fet de la mateixa manera.

Per altra banda, un cop portades les mostres als Serveis Científico-Tècnics de la UB, els tècnics procedeixen al calibrat de l'aparell. Per calcular la incertesa de l'aparell es fa un triplicat d'atac amb 3 lectures, obtenint una mitjana i una desviació estàndard amb un error d'un 1%, error que és corregit a l'aparell, aconseguint un únic valor totalment fiable.

#### **4.5.- Anàlisi estadístic dels resultats**

Per comprovar la normalitat de les variables es va aplicar el test de Shapiro-Wilks i per l'homogeneïtat de les variàncies el test de Levene.

Degut a que les nostres dades no seguien una distribució normal (Gaussiana), es van utilitzar tests estadístics no paramètrics, els quals no suposen una forma específica de la distribució de les dades, i que engloben totes aquelles proves que les seves hipòtesis es formulen independentment de les distribucions de probabilitat que segueixen les variables. Els tests estadístics utilitzats van ser els de Kruskal-Wallis i el de la U de Mann-Whitney,



a fi d'avaluar la significació de les diferències. Es va considerar com significativa una probabilitat de 0.05 o menor ( $p \leq 0.05$ ).

El test de Kruskal-Wallis és l'equivalent no paramètric de l'ANOVA, i per tant, s'utilitza per a comparar K grups independents. Assigna un número d'ordre (un rang) a cada valor, considerant les mostres conjuntament. Quan hi ha dos o més puntuacions iguals, a cadascuna d'elles se li atribueix la mitjana dels rangs que han de repartir-se. Els números d'ordre de cada mostra es sumen per separat ( $R_i$ ) i es calcula l'índex H.

$$H = \frac{12}{N^2 + N} \left( \sum \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(N + 1)$$

on:

N: és el número total d'observacions

$n_i$ : és el número total d'observacions en el grup i

Si totes les mostres procedeixen de la mateixa població, l'índex H segueix la llei de Chi quadrat amb k-1 graus de llibertat (una distribució de Chi quadrat és una distribució continua, asimètrica que quan augmenten els graus de llibertat, convergeix cap una distribució normal com la distribució de Student, però més lentament). Si hi ha diferència entre els grups, es realitzen comparacions duals, amb el test de la U de Mann-Whitney.

El test de la U de Mann-Whitney és una altra prova de distribució lliure, equivalent no paramètric del test de la t amb dades independents. Assigna un número d'ordre a cada valor, considerant les dues mostres conjuntament. Es sumen per separat els rangs de cada mostra i es calculen els índexs U.

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

on:

n1: número d'elements del grup 1

n2: número d'elements del grup 2

R1: suma de rangs en el grup 1

R2: suma de rangs en el grup 2

La significació estadística es comprova amb l'índex U menor. Perqué existeixi una diferència significativa entre les dues distribucions, deu de ser més petit el valor de la U calculat que el corresponent valor tabulat.

Es va aplicar també la correlació entre variables mitjançant el test de Pearson i un anàlisi de regressió múltiple a fi d'avaluar quina de les variables indepenents podia explicar millor les variacions dels continguts dels diferents contaminants en sang i orina. Aquests estudis es van portar a terme mitjançant el paquet estadístic SPSS-X (10.0).