

# CAPÍTULO 49

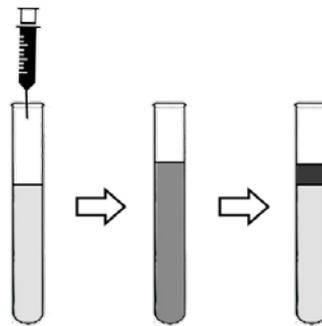
DLLME: Una técnica sostenible  
para ahorrar tiempo y dinero.

MÓNICA PALOMINO VASCO

La microextracción líquido-líquido dispersiva, o DLLME por sus siglas en inglés (*Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*), consiste en una versión miniaturizada de la extracción líquido-líquido, desarrollada por el grupo de investigación liderado por Rezaee (Rezaee, Assadi, Milani Hosseini, Aghaee, Ahmadi y Berijani, 2006). En la misma se emplea un sistema ternario de disolventes:

1. Muestra acuosa en la que se encuentra el analito de interés.
2. Extractante: disolvente orgánico inmiscible con la muestra y en la que el analito es más soluble que en fase acuosa.
3. Dispersante: disolvente orgánico miscible tanto con la muestra acuosa como con el extractante y que actúa como puente entre ambos.

El procedimiento para realizar la microextracción es muy sencillo y consta de los siguientes pasos: mezcla de los disolventes extractante y dispersante; inyección rápida mediante una jeringa de la mezcla extractante en el seno de la muestra acuosa; homogeneización de la mezcla y formación de emulsión; y centrifugación para la separación de las fases. En la Figura 1 se muestra un esquema de este procedimiento. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran la rapidez, sencillez y el uso de volúmenes mínimos de disolventes.



**Figura 1.** Esquema del procedimiento de la DLLME: inyección rápida de la mezcla de disolventes en el seno de la muestra; homogeneización y formación de la emulsión; y separación de las fases tras la centrifugación.

En el presente trabajo se empleó la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva para la derivatización y extracción simultáneas de glioxal en bebidas fermentadas.

El glioxal es el representante más pequeño de la familia de los compuestos dicarbonílicos, cuya importancia radica en su alta reactividad para generar especies carbonílicas y de oxígeno, que pueden producir efectos toxicológicos en el cuerpo humano y que se relacionan con la

diabetes, problemas cardiovasculares y enfermedades relacionadas con la edad (Maruf, Lip, Wong y O'Brien, 2015). Aunque estos compuestos aparecen de forma normal en el metabolismo, y el cuerpo humano posee mecanismos para controlarlos (Daglia, Amoroso, Rossi, Mascherpa y Maga, 2013), cuando alcanzan altos niveles en sangre pueden llegar a ser patogénicos (Uribarri, Woodruff, Goodman, Cai, Chen, Pyzik, Yong, Striker y Vlassara, 2010).

El glioxal aparece también en el cuerpo debido a rutas exógenas como la comida. En particular, el glioxal aparece en los alimentos fermentados como el vino y la cerveza debido a la actividad microbiana de *Saccharomyces cerevisiae* y *Leuconostoc oenos* (De Revel, Pripis-Nicolau, Barbe y Bertrand, 2000).

Además de su elevada reactividad, los compuestos dicarbonílicos son importantes ya que pueden afectar al impacto sensorial y poseer potenciales efectos microbiológicos. La presencia de glioxal puede dar lugar a detrimentos en el flavor del vino y la cerveza, al reaccionar con aminoácidos que posean azufre en su estructura y generando sustancias con olores desagradables (Pripis-Nicolau, De Revel, Bertrand y Maujean, 2000). Por todas estas razones, es importante conocer y controlar la cantidad de glioxal presente en los alimentos.

Con vistas a obtener la máxima eficiencia de extracción del glioxal de las muestras (vino y cerveza, es decir, de base acuosa), en la presente investigación se estudiaron diferentes parámetros que afectan a la DLLME, como el tipo y volumen de disolvente extractante y dispersante, el pH de la extracción, los tiempos de homogenización y centrifugación y la cantidad de agente derivatizante.

La selección de los disolventes adecuados es primordial en la eficiencia de la DLLME. En este sentido, el disolvente extractante debe ser insoluble en agua, tener una alta afinidad por los analitos, un buen comportamiento cromatográfico y ser fácilmente dispersado en la fase acuosa. Normalmente se emplean para ello disolventes clorados (diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono), así como otros disolventes, tipo isohexano o isobutanol.

Por otra parte, la principal característica que debe poseer un buen dispersante es que sea soluble tanto en fase acuosa como en el extractante. Los dispersantes más empleados en la bibliografía son metanol, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo y algunos alcoholes de cadena media (propanol o butanol).

Se realizó un exhaustivo estudio con todas las mezclas posibles de extractante-dispersante. Se comprobó que el extractante tenía que ser clorado para que se separasen las fases y que los dispersantes que generaban mejores resultados eran los alcoholes de cadena de longitud media. Asimismo, se realizaron pruebas para optimizar los volúmenes necesarios. Finalmente, se seleccionó una mezcla de 750  $\mu\text{L}$  de 1-butanol y 150  $\mu\text{L}$  de diclorometano, como disolventes dispersante y extractante, respectivamente.

El pH de la disolución es fundamental ya que el derivado debe estar en forma neutra para que pueda ser extraído en la fase orgánica. Se llevó a cabo un estudio de la influencia del pH

y se comprobó que la reacción era altamente dependiente del mismo, siendo 11,6 el pH que generaba una mayor extracción del analito.

La influencia del tiempo de homogeneización también fue estudiada, seleccionándose 1 minuto como tiempo óptimo, ya que tiempos mayores no contribuían a una mayor extracción. De la misma forma, y teniendo en cuenta que las fases se separaban con bastante facilidad, la centrifugación se fijó en 5 minutos a 3000 rpm.

También se estudió la cantidad de agente derivatizante empleado, comparando los resultados obtenidos al aumentar la cantidad del mismo, los cuales mostraron que la extracción aumentaba al aumentar la concentración de 3,4-diaminopiridina hasta una relación glioxal: derivatizante de 1:12 (en unidades de mg/L).

En estas condiciones, la derivatización con el reactivo 3,4-diaminopiridina (cuya reactividad ya se estudió en un trabajo previo -Rodríguez-Cáceres, Palomino-Vasco, Mora-Diez y Acedo-Valenzuela, 2015) y la extracción del glioxal ocurren simultáneamente, disminuyendo así de forma drástica el tiempo de reacción con respecto a los métodos encontrados en la bibliografía, en los que para la derivatización del glioxal se emplean largos tiempos (60 – 120 minutos) y altas temperaturas (60 – 90°C).

Esta reacción simultánea de derivatización y extracción es específica para glioxal y no se produce con dicarbonilos de mayor tamaño. Esto se debe a que los aldehídos adicionan nucleófilos con mayor facilidad que las cetonas, debido a las diferencias de reactividad existentes en los diferentes estados de transición, y que tienen que ver con una combinación de factores electrónicos y estéricos (Morrison y Boyd, 1992).

Este método se combinó con un método cromatográfico con detección fluorescente, modificado del anteriormente publicado para incluir un paso de limpieza de la columna (Rodríguez-Cáceres, Palomino-Vasco, Mora-Diez y Acedo-Valenzuela, 2015) para la determinación de glioxal en bebidas alcohólicas. El tiempo total de tratamiento de la muestra es aproximadamente 20 minutos, y la señal cromatográfica correspondiente al glioxal aparece a 2,6 minutos.

Se llevó a cabo la validación del método obteniéndose una buena linealidad (97,6%), así como una  $R^2$  de 0,9906. La precisión (calculada como desviación estándar relativa) fue evaluada tanto *inter-day* (4,1%) como *intra-day* (4,5%), encontrándose ambos valores acordes a la bibliografía para esta técnica, y mejorando la precisión de algunos de los métodos descritos. Los límites de detección y cuantificación por la IUPAC fueron también calculados: 1,5 y 28,0  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

Finalmente, se estudió la estabilidad del derivado y se encontró que éste era estable durante tres horas a temperatura ambiente y sin estar protegido de la luz, lo cual posibilita el empleo de un muestreador automático en el equipo cromatográfico.

El método ha sido aplicado a vinos y cervezas españoles, encontrándose que el nivel de glioxal oscila entre 4,3 y 9,5 mg/L en vino, y es de 6,5 mg/L en las muestras de cerveza analizadas.

Estos resultados son acordes a la bibliografía, en la que se describen mayores concentraciones de glioxal en vino que en cerveza. Asimismo es importante destacar que dichas concentraciones son bajas y que no suponen riesgo alguno para la salud con un consumo responsable de estas bebidas.

## REFERENCIAS

- Daglia, M.; Amoroso, A.; Rossi, D.; Mascherpa, D. y Maga, G. (2013). Identification and quantification of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 67–74.
- De Revel, G.; Pripis-Nicolau, L.; Barbe, J. C. y Bertrand, A. (2000). The detection of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 102-108.
- Maruf, A.A.; Lip, H.; Wong, H. y O'Brien, P.J. (2015). Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Chemical and Biological Interactions*, 234, 96-104.
- Morrison, R.T. y Boyd, R.N. (1992). Aldehydes and Ketones (Nucleophilic Addition). En R.T. Morrison y R.N. Boyd (Eds.), *Organic Chemistry* (6ª ed., pp. 617-657). Nueva Jersey: Prentice-Hall International.
- Pripis-Nicolau, L.; De Revel, G.; Bertrand, A. y Maujean, A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766.
- Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M. R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F. y Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9.
- Rodríguez-Cáceres, M.I.; Palomino-Vasco, M.; Mora-Diez, N. y Acedo-Valenzuela, M.I. (2015). Novel HPLC – Fluorescence methodology for the determination of methylglyoxal and glyoxal. Application to the analysis of monovarietal wines “Ribera del Guadiana”. *Food Chemistry*, 187, 159-165.
- Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R.; Yong, A.; Striker, G.E. y Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *American Dietetic Association*, 110, 911-916.

## APUNTES BIOGRÁFICOS

**Mónica Palomino Vasco** (Mérida, 27 de marzo de 1991) es Graduada en Química por la Universidad de Extremadura, y posee el Máster en Gestión de la Calidad y Trazabilidad de Alimentos de Origen Vegetal por la misma Universidad. Reside desde 2009 en Badajoz, y actualmente compagina su contrato como tecnóloga en el Instituto Tecnológico y Agroalimentario de Extremadura (INTAEX-CICYTEX) con sus estudios de Doctorado.

Contacto: [monicapalominovasco@gmail.com](mailto:monicapalominovasco@gmail.com)