

Derivatización y extracción simultánea de glioxal en bebidas alcohólicas mediante microextracción líquido-líquido dispersiva

M. Palomino-Vasco, M.I. Rodríguez-Cáceres, N. Mora Díez, M.I. Acedo Valenzuela

Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Av. De Elvas, S/N, 06006 Badajoz (España). monicapalominovasco@gmail.com

El glioxal pertenece a la familia de los compuestos dicarbonílicos de bajo peso molecular. Estos compuestos son importantes ya que pueden producir efectos toxicológicos en el cuerpo humano, debido a que reaccionan rápidamente para formar especies reactivas carbonílicas y de oxígeno, que están relacionadas con la diabetes, problemas cardiovasculares y enfermedades relacionadas con la edad [1]. Aunque estos compuestos aparecen de forma normal en el metabolismo, y el cuerpo humano posee mecanismos para lidiar con ellos [2], cuando alcanzan altos niveles en sangre pueden llegar a ser patogénicos [3].

Además de las vías endógenas, el glioxal puede llegar al cuerpo humano a través de 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* [4]. Los compuestos dicarbonílicos son importantes debido a su impacto sensorial, su reactividad y sus 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 poseen azufre en su estructura, ya que se generan sustancias con olores desagradables [5]. Por todas estas razones, es importante conocer y controlar la cantidad de glioxal presente en los alimentos.

En esta investigación se ha empleado la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME por sus siglas en inglés) para la derivatización y extracción simultánea de glioxal en bebidas fermentadas. DLLME consiste en una versión miniaturizada de la extracción líquido-líquido, en la que se emplea un sistema ternario de disolventes: 1) muestra acuosa en la que se encuentra el analito de interés; 2) disolvente extractante inmiscible con la muestra y en la que el analito es más soluble que en la muestra; y 3) disolvente dispersante, que se trata de un disolvente orgánico miscible tanto con la muestra acuosa como con el extractante y que hace las veces de puente entre ambos.

El procedimiento para realizar la microextracción es muy sencillo y se divide en 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; homogenización de la mezcla; y centrifugación para la separación de las fases. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran su rapidez, sencillez y el uso de volúmenes de disolventes del orden de los μL [6].

Con vistas a obtener la máxima eficiencia de extracción, se estudiaron diferentes parámetros, 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 juega un papel fundamental 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 como diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono, así como otros disolventes como 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 extractante-dispersante posibles. Se comprobó que el extractante tenía que ser clorado para que existiera separación de fases y que los dispersantes que generaban mejores resultados eran los alcoholes de cadena media. Asimismo, se realizaron pruebas para optimizar los volúmenes necesarios. Finalmente, se seleccionó una mezcla de 750 μL de 1-butanol y 150 μL de diclorometano, como disolventes dispersante y extractante, respectivamente.

El pH de la disolución es importante durante la extracción 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 el pH de 11.6 el que generaba una mayor extracción del analito.

La influencia del tiempo de homogenización también fue estudiada, y se seleccionó 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.

La cantidad de agente derivatizante empleado fue igualmente estudiada, comparando los resultados obtenidos al aumentar la cantidad del mismo. Los resultados 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 [7]) 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 de derivatización, que de forma tradicional empleando temperatura y tiempo servía para glioxal y metilglioxal, en estas nuevas condiciones es específica para glioxal, debido a que los aldehídos se adicionan nucleofílicamente más fácilmente 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 [8].

Este método se ha combinado con un método cromatográfico con detección fluorescente (modificado del anteriormente publicado [7] para incluir un paso de limpieza de la columna entre muestra y muestra) para la determinación de glioxal en bebidas alcohólicas. El tiempo total de tratamiento de la muestra es aproximadamente 15 minutos, y la señal cromatográfica correspondiente al glioxal aparece a 2,6 minutos.

La validación del método fue realizada y se obtuvo 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, la estabilidad del derivado fue estudiada 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 varios vinos monovarietales pertenecientes a la D.O. "Ribera del Guadiana" y a varias marcas de cervezas españolas y los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de glioxal (expresadas en mg/L) encontradas en las diferentes muestras analizadas, junto con su desviación estándar.

Bebida	Tipo	Concentración (mg/L)
Vino	Vino tinto 1	7,8 \pm 0,4
	Vino tinto 2	7,4 \pm 0,3
	Vino blanco	9,5 \pm 0,5
	Vino rosado	5,8 \pm 0,9
Cerveza	Cerveza 1	6,5 \pm 0,8
	Cerveza 2	2,8 \pm 0,5
	Cerveza 3	3,4 \pm 0,6
	Cerveza negra	5,57 \pm 0,08
	Cerveza sin alcohol	6,5 \pm 0,9

Los niveles de glioxal oscilan entre 5,8 y 9,5 mg/L en vinos y entre 2,8 y 6,5 mg/L en cervezas. 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.

Agradecimientos

La financiación ha sido recibida del Ministerio de Economía y Competitividad de España (Proyecto CTQ 2014-52309-P) y la Junta de Extremadura (GR15090 – Grupo de Investigación FQM003), ambos cofinanciados por los fondos europeos FEDER.

Referencias

- [1] A.A. Maruf, H. Lip, H. Wong y P.J. O'Brien (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. doi:10.1016/j.cbi.2014.11.007
- [2] M. Daglia, A. Amoroso, D. Rossi, D. Mascherpa y G. Maga (2013). Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 67–74. doi:10.1016/j.jfca.2013.05.002
- [3] J. Uribarri, S. Woodruff, S. Goodman, W. Cai, X. Chen, R. Pyzik, A. Yong, G.E. Striker y H. Vlassara (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *American Dietetic Association*, 110, 911-916. doi:10.1016/j.jada.2010.03.018
- [4] G. de Revel, L. Pripis-Nicolau, J.C. Barbe y A. Bertrand (2000). The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 102-108. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1<102::AID-JSFA493>3.0.CO;2-Y.
- [5] L. Pripis-Nicolau, G. de Revel, A. Bertrand y A. Maujean (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. doi: 10.1021/jf991024w.
- [6] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi y S. Berijani (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9. doi: 10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- [7] M.I. Rodríguez-Cáceres, M. Palomino-Vasco, N. Mora-Diez y M.I. Acedo-Valenzuela (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. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.103.
- [8] R.T. Morrison y R.N. Boyd (1992). Aldehydes and Ketones (Nucleophilic Addition). En: *Organic Chemistry*, 6th ed. Prentice-Hall International, New Jersey (US), pp 617-657.