

DISEÑO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO Y MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE, PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS EN MATRICES COMPLEJAS

Ramirez, Daniela^a; Locatelli, Daniela^b; Torres-Palazzollo, Carolina^b; Camargo, Alejandra^{b,c}; Fusari, Cecilia^a; Altamirano, Jorgelina^{a,c}

^a *Laboratorio de Química Ambiental (IANIGLA-CONICET), Av. Ruiz Leal s/n, CP 5500, Parque Gral. San Martín, Mendoza, Argentina*

^b *Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos (IBAM – CONICET), Alte. Brown 500, CP 5505, Chacras de Coria, Mendoza, Argentina. (acamargo@fca.uncu.edu.ar) y Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, Mendoza, Argentina.*

^c *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCuyo, Mendoza, Argentina.*

Sección: Ciencia y Tecnología de los alimentos

Introducción:

El ajo (*Allium sativum* L.) es considerado un alimento funcional debido a que es responsable de diversos efectos biológicos como, anticancerígeno, antitrombótico, antioxidante, entre otros [1]. Estas propiedades son atribuidas a compuestos presentes en dicho vegetal, denominados fitoquímicos, mayormente organoazufrados (OSCs), en adición a fructosanos, flavonoides y minerales (Se, Ge, etc.) [2].

Dentro de los organoazufrados podemos mencionar a la alicina, el principal tiosulfonato presente en ajo crudo; y sus productos de transformación ajoenos, vinilditiinas y polisulfuros. Cada uno de ellos evidencia propiedades biológicas que le son características [3]. Por otro lado, es necesario evaluar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los mismos luego de su consumo, para determinar si los efectos biológicos estudiados podrían verificarse. Por esta razón, para realizar este tipo de estudios es necesario además, contar con herramientas analíticas que permitan identificar y cuantificar los compuestos bioactivos de interés en matrices complejas como alimentos sometidos a cocción y fluidos biológicos (fluidos digestivos, sangre y plasma). Dichos análisis permitirían responder interrogantes relacionados a la liberación de los OSCs de la matriz del alimento y su posterior disponibilidad en el organismo para ejercer su efecto benéfico.

Es importante considerar que los analitos de interés tienen la característica de ser volátiles y lábiles [4] y a su vez se hallan en matrices complejas. Tanto la matriz vegetal, como los fluidos biológicos presentan diferentes sales, células y enzimas, que complejizan su determinación. En los últimos años, los reportes de metodologías para la determinación de estos analitos no evidencian una modernización sobre todo en la etapa de preparación de muestras, además son muy escasos los antecedentes que refieren el estudio de estos analitos en las matrices de interés en el presente trabajo [5,6].

Recientemente Rezaee y col. [7] reportaron una Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) como una técnica de extracción que utiliza microlitros (μL) de un solvente orgánico como extractante, junto con mililitros de un solvente dispersante, para la extracción y concentración de solutos hidrofóbicos presentes en solución acuosa.

Considerando lo expuesto anteriormente es que se propuso desarrollar una nueva metodología analítica basada en DLLME para la extracción de alicina, ajoeno, 2-vinilditiina, dialil sulfuro y dialil disulfuro, presentes en muestras de ajo cocidas y fluidos biológicos (fluidos digestivos sintéticos, sangre y plasma de ratas), previo a su determinación por Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a detector Ultravioleta (HPLC-UV).

Resultados y Conclusiones

En primer lugar se realizó un Diseño Experimental analizando la superficie de respuesta de tres factores (solvente de extracción, solvente dispersante y volumen de solvente de extracción). Los resultados indicaron que la función deseabilidad óptima se logró usando $600\mu\text{L}$ de cloroformo, utilizando acetonitrilo como dispersante. Posteriormente se analizaron las figuras de mérito linealidad (estimador $r > 0,99$), los valores de RSD fueron $\leq 3,9$ y se obtuvieron recuperaciones mayores a 80%.

La aplicación del presente método analítico mostró ser confiable sobre distintos tipos de muestras. En primer lugar los análisis de muestras vegetales, mostraron resultados satisfactorios. Las recuperaciones relativas variaron entre 107-116% para ajo feteado frito y 99-120% para ajo feteado hervido.

Los resultados del análisis de sangre y plasma, mostraron una baja recuperación. En el caso de los OSCs añadidos directamente a sangre, las recuperaciones fueron las más bajas (4-8%). Esto podría deberse a la rápida reacción de los OSCs con eritrocitos y proteínas plasmáticas. Las recuperaciones en plasma fueron mayores que las anteriores (13-20%), esto refuerza la teoría de que los analitos reaccionan con los eritrocitos. Por último se adicionó OSCs a plasma desproteinizado, obteniéndose altas recuperaciones (87-98%). En este caso, la reacción entre analitos y $-\text{SH}$ presentes en las proteínas, no se produce, y los OSCs permanecen intactos para ser extraídos. Por otro lado, los resultados del análisis de muestras de fluido gástrico mostraron recuperaciones entre 28-87%; el valor más alto correspondiente a alicina, en acuerdo con investigaciones previas que indican que este compuesto es más estable a pH bajo [8,9]. Las cantidades encontradas de DAS y DADS aumentaron en fluido intestinal, indicando una mayor estabilidad a mayor pH mientras que las recuperaciones de ajoenos y 2-VD, fueron las más altas en ambos fluidos.

En conclusión, la metodología desarrollada ofrece una buena linealidad, precisión y recuperaciones cuantitativas aceptables. Además, nuestra metodología evita transformaciones de los compuestos durante el procedimiento analítico, por lo tanto, se convierte en una alternativa útil y práctica para la determinación de OSC. Por otro lado, se observó que la extracción y determinación de OSCs es posible aún incluso en la presencia de matrices complejas como la que constituyen los fluidos biológicos, y el método propuesto basado en DLLME resultó ser una herramienta analítica eficaz para complementar estudios sobre bioaccesibilidad y biodisponibilidad de organoazufrados.

Bibliografía

XXXI Congreso Argentino de Química

25 al 28 de Octubre de 2016 Asociación Química Argentina

Sánchez de Bustamante 1749 – Ciudad de Buenos Aires – Argentina

The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January – December 2016 ISSN: 1852 -1207

Anales de la Asociación Química Argentina AAQAE 095 - 196

- [1] A. Alvidrez, B. Gonzalez, *Salud Pública Y Nutr.* 3 (2002).
- [2] N. Benkeblia, V. Lanzotti, *Glob. Sci. Books* 2 (2007) 193.
- [3] L.J. Gómez, F.J. Sánchez-Muniz, *ALAN Online* 50 (2000).
- [4] P.O. Box, T.H. Yu, C.M. Wu, Y.C. Liou, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 725.
- [5] L.D. Lawson, C. Gardner, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6254.
- [6] R.T. Rosen, R.D. Hiserodt, E.K. Fukuda, R.J. Ruiz, Z. Zhou, J. Lech, S.L. Rosen, T.G. Hartman, *BioFactors* 13 (2000) 241.
- [7] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [8] F. Freeman, Y. Kodera, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2332.
- [9] T.H. Yu, C.M. Wu, S.Y. Chen, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 730.