



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Microextracción In-Vial asistida por membrana. Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino

Maria Florencia Listorti

Grau de Química

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: X5888615V

Treball tutelat per Dr. Juan Gabriel March Isern
Departament de Química Analítica



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Ftalato de dibutilo, vino, microextracción líquido-líquido asistida por membrana, cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Índice

Resumen	5
1. Introducción	6
1.1 Extracción líquido-líquido: principios básicos.....	7
1.2 Técnicas de microextracción.....	9
1.2.1 La microextracción en gota (<i>single-drop microextraction, SDME</i>)	9
1.2.2 La microextracción líquido-líquido dispersiva (<i>dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME</i>).....	10
1.2.3 La microextracción asistida por membrana	12
1.3 Ftalatos: presencia en alimentos y efectos sobre la salud	14
1.3.1 Características físicas y químicas	14
1.3.2 Usos y producción	14
1.3.3 Toxicología	15
2. Parte Experimental.....	16
Reactivos	16
El dispositivo de extracción	16
Procedimiento de extracción líquido-líquido asistida por membrana	17
3. Resultados	19
Estudio cualitativo.....	19
Estudio cuantitativo	23
4. Discusión	25
5. Conclusión	28
6. Bibliografía	29

Resumen

En el presente trabajo de fin de grado (TFG) se ha llevado a cabo una determinación analítica basada en un proceso de **microextracción líquido-líquido asistida por membrana** y el posterior análisis de la fase orgánica por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La **microextracción líquido-líquido asistida por membrana** consiste en dos fases, una aceptora y otra dadora, donde se transfiere el analito a analizar desde la fase dadora (en este caso acuosa) a la fase aceptora (fase orgánica) a través de una membrana polimérica. La configuración del sistema de extracción utilizado ha consistido en un microvial compatible con el autoinyector del cromatógrafo, en cuyo tapón, el septum ha sido sustituido por la membrana de extracción. El contacto entre las dos fases se consigue mediante la simple inmersión del microvial, conteniendo el disolvente orgánico y la membrana incorporada en el tapón, dentro de la propia muestra contenida en un tubo de mayores dimensiones. La evolución de esta nueva técnica lo que nos da a mejorar aparte de la preparación de la muestra y otras ventajas, es la mínima manipulación del microvolumen de disolvente orgánico que se requiere después de la extracción.

Se ha estudiado cualitativamente y cuantitativamente el contenido de ftalatos en una muestra de vino comercial. Para ello se han analizado muestras aditivadas y sin aditivar, y los espectros de masas se han adquirido en método SIM (Selected Ion Monitoring) y método SCAN. Los espectros obtenidos en SCAN se han utilizado para realizar los estudios cualitativos, mientras que la determinación cuantitativa se ha llevado a cabo a partir de las masas registradas en SIM, por presentar, los correspondientes cromatogramas un menor ruido de fondo, que permite mejorar el límite de detección.

Según la bibliografía, en los vinos se han detectado distintos ftalatos, siendo el **ftalato de dibutilo [DBP]** el más frecuente y el que, normalmente, se encuentra en mayor concentración. Posiblemente, esta presencia de ftalatos en vinos sea consecuencia de la transferencia desde materiales que, durante la etapa de producción, almacenamiento, transporte o comercialización, están en contacto con el vino, como por ejemplo, el policloruro de vinilo.

En la muestra estudiada en este TFG, se ha identificado, únicamente, DBP. Su concentración, determinada mediante el método de la adición de patrón, resultó ser de $34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con una desviación estándar de $12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estos datos son comparables con los de la bibliografía.

1. Introducción

En las determinaciones analíticas de analitos a niveles de concentración traza, tanto si se trata de una determinación cualitativa como cuantitativa, una de las etapas más importantes es la preparación de la muestra; ésta condiciona en gran medida la precisión y exactitud de los resultados. Además, es habitual que se trate de una etapa laboriosa, con un cierto riesgo de contaminación de la muestra y/o pérdidas del analito. De hecho según la bibliografía especializada, esta etapa es considerada como el talón de Aquiles del procedimiento analítico¹; en consecuencia el estudio y optimización de procesos y/o técnicas orientados a mejorar la preparación de la muestra es un tema de evidente interés.

La etapa de la preparación de la muestra², depende del estado físico de la muestra (puede ser sólida, líquida o gaseosa y, dentro de cada estado, la complejidad de la matriz puede ser muy distinta) y de la naturaleza de los analitos (básicamente, orgánicos o inorgánicos). Dentro de todas las posibles combinaciones, nos vamos a centrar en la determinación de trazas de analitos orgánicos relativamente poco polares contenidos en muestras acuosas que, entre otras alternativas, puede resolverse mediante una extracción líquido-líquido (más o menos selectiva) y la posterior separación de los analitos de otras especies coextraídas mediante una cromatografía.

La extracción líquido-líquido convencional, basada en el uso de embudos de decantación, presenta diversos inconvenientes y limitaciones³:

- Se necesita una gran cantidad de disolventes orgánicos. Suelen ser caros y con una alta toxicidad.
- Se pueden formar emulsiones que alargan el tiempo de separación de fases.
- Pueden producirse pérdidas de compuestos debido, entre otras causas, al proceso de evaporación.
- Se generan una gran cantidad de residuos nocivos, tanto para el ser humano, como el medio ambiente.

Para intentar solucionar (al menos en parte) estos inconvenientes, la extracción líquido-líquido convencional con finalidad analítica, ha evolucionado hasta otras variantes técnicas, que se caracterizan por la utilización de volúmenes de disolvente orgánico del orden de μL s. Entre ellas, por sus ventajas y calidad de las aplicaciones desarrolladas, destacan: La microextracción en una gota (*single-drop microextraction*, SDME), la microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) y las distintas modalidades microextracción asistida por membrana, una de las cuales ha sido utilizada para desarrollar la parte experimental de este TFG.

Por tanto, esta introducción continúa con tres apartados. En el primer apartado voy a resumir algunos de los principios básicos de la extracción líquido-líquido y a definir las relaciones más utilizadas en Química Analítica para cuantificar la extensión en que tienen lugar de los procesos de extracción, que son: la constante de distribución (o reparto) ($K_{org/ac}$), la eficiencia de la extracción (E) y el factor de enriquecimiento (FE). A continuación, voy a presentar las técnicas de microextracción comentadas en el apartado anterior. Y por último, dado que la aplicación analítica seleccionada para este TFG es la determinación de ftalatos en vino, se incluye un apartado adicional sobre estos analitos, su presencia en alimentos y sus efectos nocivos sobre la salud.

1.1 Extracción líquido-líquido: principios básicos

La extracción líquido-líquido es un proceso químico de separación que se fundamenta en la transferencia de los analitos entre dos líquidos inmiscibles (o fases), en función de su distinta solubilidad en ambas fases, hasta llegar a una situación de equilibrio químico. La transferencia de la materia requiere de una superficie de contacto directo entre las dos fases que se llama interfase.

Un sistema químico constituido por dos fases: una acuosa y otra orgánica (que en el contexto de este TFG también se denominan fase dadora y fase aceptora, respectivamente) y un soluto orgánico (o analito, A), evoluciona hasta una situación de equilibrio químico (1) ⁴



cuya constante, $K_{org/ac}$, se define como:

$$K_{org/ac} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,ac}} \quad (2)$$

donde $C_{eq,org}$ es la concentración de equilibrio de A en la fase aceptora y $C_{eq,ac}$ es la concentración de equilibrio de A en la fase dadora, que normalmente contiene la muestra objeto de análisis.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

No obstante, hay que indicar que en los procedimientos de preparación de la muestra, en muchas ocasiones, no se llega a la situación de equilibrio. Por ello, en Química Analítica, la extensión de los procesos de extracción se suele cuantificar mediante la **eficiencia de la extracción (E)**⁵, definida como el tanto por uno de A extraído en la fase orgánica:

$$E = \frac{n_{org}}{n_{total}} \quad (3)$$

donde n_{org} y n_{total} son el número extraído y el total de moles de A, respectivamente.

Directamente relacionado con este concepto, otra ratio de interés utilizada en Química Analítica es el **factor de enriquecimiento (EF)**⁶ definido como la relación entre la concentración en la fase orgánica después de la extracción y la concentración inicial de analito en la fase acuosa (antes de la extracción).

$$EF = \frac{C_{org}}{C_{inicial}} \quad (4)$$

La relación entre ambas ratios es:

$$EF = E \cdot \frac{V_{ac}}{V_{org}} \quad (5)$$

donde v_{ac} es el volumen de la fase acuosa, y v_{org} es el volumen de la fase orgánica.

1.2 Técnicas de microextracción

Como ya se comentó anteriormente, se van a explicar dos de las técnicas con más ventajas y aplicaciones que hay hoy en día. Y también, se va a explicar con más detalle la que se utiliza en este trabajo. En general, todas las microextracciones líquido-líquido utilizan un volumen de disolvente orgánico en el intervalo de microlitros.

La eficiencia de estas técnicas está influenciada por varios factores (por ejemplo, los volúmenes de extracción y los diferentes disolventes, el tiempo de extracción, la cantidad de muestra, pH, y la adición de sal).

1.2.1 La microextracción en gota (single-drop microextraction, SDME)

Esta técnica consiste en poner en contacto una gota (volumen de 1 a 3 μL) de un disolvente orgánico relativamente viscoso (que actuará como fase aceptora) suspendida en el extremo de una aguja de una microjeringa cromatográfica sobre la fase dadora que contiene los analitos a determinar, bien mediante inmersión directa o bien por simple exposición en el espacio de cabeza, donde se han concentrado los analitos más volátiles. De esta forma, los analitos que presentan afinidad por la fase aceptora, en una determinada extensión, se concentran en la gota. Después de esta extracción, durante un tiempo predeterminado, la gota es retraída hacia el interior de la jeringa e inyectada (con la misma jeringa) en el cromatógrafo. En figura 1 se puede observar el mecanismo.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

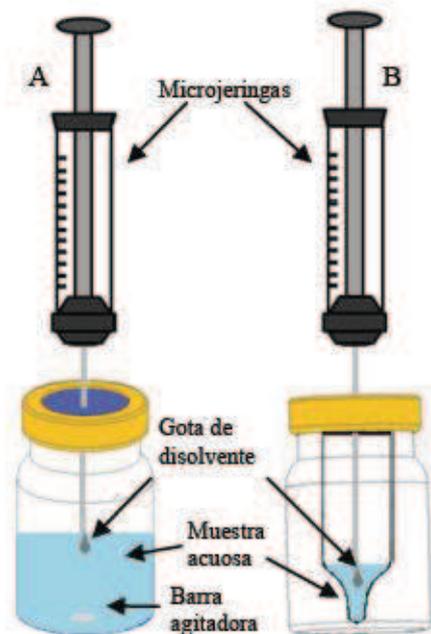


Figura 1. Microextracción en gota.³

Entre las ventajas de esta técnica, además del mínimo volumen de disolvente orgánico que se utiliza, cabe destacar el que no sea necesario disponer de equipamientos sofisticados.

Por el contrario, al ser la interfase de contacto entre la fase dadora y la aceptora muy pequeña, la cinética de la extracción es muy lenta; en consecuencia, los tiempos de extracción son relativamente prolongados. No obstante, al ser el volumen de la fase aceptora muy pequeño, aun con pobres eficiencias de extracción, se obtienen factores de enriquecimiento satisfactorios, lo que posibilita la aplicación de la técnica al análisis de trazas. Otro inconveniente hace referencia a la inestabilidad de la gota suspendida en el extremo de la aguja de la jeringa.

1.2.2 La microextracción líquido-líquido dispersiva (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

La microextracción líquido-líquido dispersiva⁷ se basa en el uso de dos disolventes orgánicos: uno, la fase aceptora propiamente dicho, y el otro, denominado disolvente dispersante, debe cumplir la condición de ser miscible con la fase acuosa y también con el disolvente orgánico que actúa como fase aceptora.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

Así, por simple inyección, mediante una jeringa o una pipeta automática, de una mezcla de los dos disolventes orgánicos (por ejemplo 8 μL de tetracloroetileno más 1 mL de acetona) se forma una dispersión (turbia) de finísimas gotas del disolvente orgánico aceptor en el seno de la fase acuosa, con lo que el área de la superficie de contacto entre ambas fases se hace muy grande, lo que permite que casi instantáneamente se alcance el equilibrio (sin necesidad de agitación adicional).

La dispersión formada se rompe por centrifugación, lo que permite la nítida separación de las dos fases. Finalmente, con una microjeringa, se aspiran los μL s de disolvente orgánico necesarios para el correspondiente análisis cromatográfico. En la figura 2 se observan esos paso a seguir.

En cuanto a las ventajas⁸, además de las propias de las técnicas de microextracción, cabe resaltar la rapidez con que se llega al equilibrio; y entre los inconvenientes, señalar la necesidad de centrifugar la dispersión.

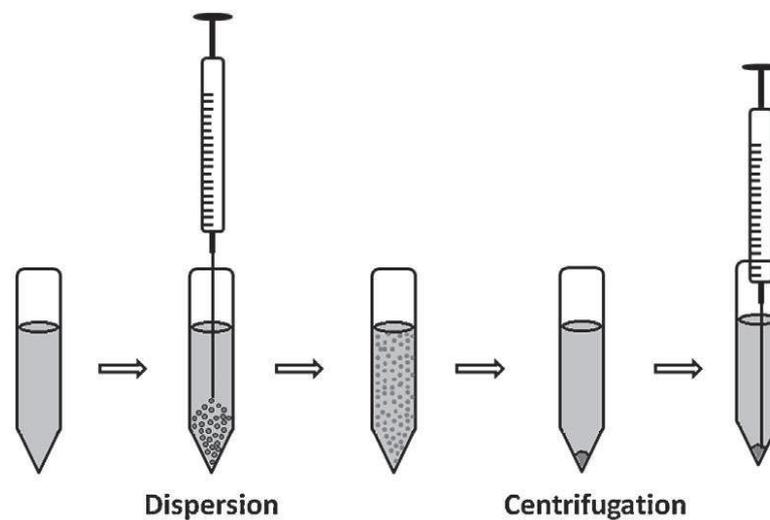


Figura 2. Pasos involucrados en una microextracción líquido-líquido dispersiva.⁹

1.2.3 La microextracción asistida por membrana

En esta modalidad de microextracción las dos fases están en sendos compartimentos separadas mediante una membrana polimérica hidrofóbica porosa, normalmente de Politetrafluoroetileno (PTFE) o polietileno.

El disolvente orgánico accede fácilmente al interior de los poros, donde permanece relativamente retenido por fuerzas capilares, impregnando completamente la membrana. Y así, el disolvente orgánico contacta con la fase acuosa que ocupa el otro compartimento, a través de dicha interfase tiene lugar la extracción de analitos según su correspondiente constante de distribución.

Inicialmente, la extracción tiene lugar en la boca de un poro en contacto con la fase acuosa, y a continuación, por difusión pasiva, los analitos extraídos tenderán a migrar hacia la otra cara de la membrana, desde donde acceden al compartimento que contiene el disolvente orgánico.

La cinética de la extracción se ve favorecida por una mayor superficie de la membrana, por aumentar la interfase, y la agitación de las fases, por disminuir el espesor de la capa de difusión. Por el contrario, la extracción es más lenta al aumentar el grosor de la membrana, por aumentar la distancia que deben recorrer los analitos para pasar de una cara de la membrana a la otra.

La realización de la extracción a través de la membrana, cuenta con algunas ventajas adicionales como son: se evita la formación de emulsiones y se pueden extraer disoluciones con sólidos en suspensión y/o macromoléculas que no pueden acceder a los poros.

Se han propuesto varias configuraciones que permiten llevar a cabo la extracción asistida por membrana de forma eficiente. Entre ellas cabe citar la microextracción en fibra hueca (*hollow fiber liquid-phase microextraction*, HF-LPME) y la microextracción in-vial.

La microextracción en fibra hueca (figura 3) utilizan membranas tubulares (denominadas fibras huecas), de varios cms de longitud y diámetros del orden de decimas de mm. Mediante una microjeringa se introduce dentro de la fibra hueca el disolvente orgánico (del orden de 20 – 50 μL), y se sumerge dentro de la muestra acuosa, que normalmente se mantiene en agitación, para facilitar la cinética de la extracción. Transcurrido el tiempo de extracción predeterminado (del orden de varias horas), con la misma microjeringa se recupera la fase orgánica y se analiza, normalmente por cromatografía.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

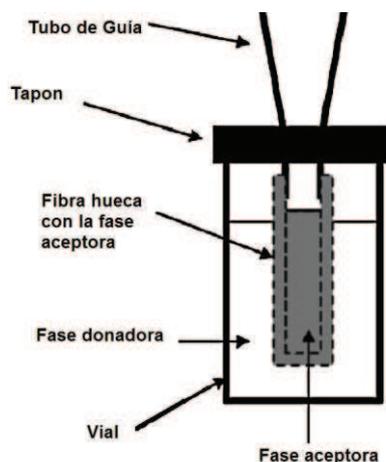


Figura 3. Microextracción en fibra hueca, HF-LPME. ¹⁰

La microextracción in-vial utiliza membranas planas, y el compartimento que contiene el disolvente orgánico (de 100 a 180 μL) es un microvial de cromatografía compatible (a ser posible) con el inyector automático del cromatógrafo a utilizar. La membrana se coloca en el propio tapón del vial substituyendo al septum comercial. El contacto entre las dos fases se consigue mediante la simple inmersión del microvial, conteniendo el disolvente orgánico y la membrana incorporada en el tapón, dentro de la propia muestra contenida, por ejemplo, en un tubo de mayores dimensiones. La agitación de, en este caso, las dos fases se consigue por rotación basculante de todo el dispositivo. Finalizada la extracción, se recupera el microvial, y tras un simple secado con papel absorbente, puede analizarse mediante el inyector automático. Así, desde el punto de vista de procedimiento, esta configuración nos permite evitar la manipulación de microvolúmenes de disolvente orgánico. A cambio, el tiempo de extracción suele ser más largo, debido a las reducidas dimensiones de la membrana, y el volumen de disolvente orgánico es mayor debido a que, si se utiliza un autoinyector, debemos asegurar el volumen mínimo de disolvente dentro del vial.

En este trabajo se presenta una determinación analítica, basada en una extracción in-vial desarrollada en los laboratorios del área de Química Analítica de la UIB ¹¹. Concretamente, se ha analizado el contenido de ftalato de dibutilo en una muestra de vino comercial.

1.3 Ftalatos: presencia en alimentos y efectos sobre la salud

1.3.1 Características físicas y químicas

Se denominan ftalatos a los diésteres aromáticos derivados del ácido orto-ftálico. Presentan dos cadenas laterales, generalmente alifáticas lineales; o también pueden presentar grupos alifáticos ramificados, cicloalifáticos o aromáticos. En la figura 4, se muestra la estructura química del ácido ftálico, así como la estructura del ftalato que se analizó en este trabajo; se trata del **ftalato de dibutilo**.

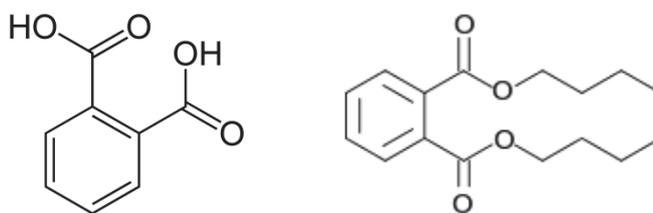


Figura 4. Estructuras químicas de los ftalatos.

Los ftalatos son líquidos claros a temperatura ambiente, de aspecto aceitoso, poco solubles en agua y con una volatilidad baja. También, presentan estabilidad y un ligero aroma. Pero las propiedades físico-químicas, pueden variar según su peso molecular.

1.3.2 Usos y producción

Los ftalatos son compuestos sintéticos con diversos usos industriales, donde su producción es a gran escala. Dentro de la gran variedad, destacan los de alto peso molecular, por ejemplo, ftalato de di (2-etilhexil) [DEHP], gracias a sus propiedades (alta solubilidad en materiales poliméricos, estabilidad, fluidez y baja volatilidad), se emplean como plastificantes no reactivos en la fabricación de distintos materiales, aportando mayor flexibilidad y maleabilidad.

Por otro lado los de bajo peso molecular, como por ejemplo, ftalato de dietilo [DEP] y ftalato de dibutilo [DBP]; donde el [DEP] es un líquido incoloro que presenta un sabor amargo. Éste compuesto sintético es usado comúnmente para dar flexibilidad a los plásticos. Se puede encontrar en cepillos de dientes, partes de automóviles, juguetes y empaquetamiento de alimentos. Puede ser liberado con relativa facilidad de estos productos, ya que no forma parte de la cadena de productos químicos que forma el plástico (polímeros).

Dentro de todas las posibilidades, su principal aplicación es en la industria de plásticos, se adiciona a diferentes polímeros y uno de ellos es, el policloruro de vinilo [PVC]. De esta forma existen numerosos productos que contienen ftalatos como: papel tapiz, alfombras, pinturas, aislantes de cables, juguetes, calzados, empaques para alimentos y medicamentos, etc. Asimismo, los ftalatos se añaden como aditivos y lubricantes, a la producción de cosméticos, esmaltes de uñas, perfumes, jabones, medicamentos, plaguicidas, aceite para bombas de vacío y fluidos dieléctricos.

1.3.3 Toxicología

La exposición de los humanos a los ftalatos puede ocurrir a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados (por ejemplo, bebidas alcohólicas o alimentos procesados), por la inhalación de aire contaminado o por el contacto dérmico con productos de plástico que los contengan.

La información acerca de la toxicidad de los ftalatos en el humano es muy reciente y escasa; incluso para algunos de los compuestos las investigaciones son nulas. Se conocen ciertos efectos tóxicos sistémicos, reproductivos y durante el desarrollo fetal, que han sido documentados.

Los primeros estudios sobre los efectos carcinogénicos de los ftalatos con animales de laboratorio, pusieron de manifiesto que dosis elevadas provocaban la aparición de tumores en el hígado. No obstante, es arriesgado extrapolar los resultados de la experimentación animal a la especie humana.

2. Parte Experimental

Reactivos

Los reactivos que se utilizaron fueron ftalato de dibutilo 99,0% [DBP], benzoato de bencilo (estándar interno, IS) y tolueno 99,9 % que se adquirieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Etanol al 99,9% (grado de cromatografía líquida) se compró en Scharlau Chemie (Barcelona, España).

El dispositivo de extracción

El dispositivo de extracción consistió en un microvial de vidrio de cromatografía de 200 μ L (comprado en Teknokroma, Barcelona, España) compatible con inyectores automáticos convencionales. El septum del tapón de rosca del microvial fue sustituido por un disco de membrana (del cual la superficie disponible para la extracción era de 0,79 cm^2) del mismo tamaño obtenido a partir de un disco de membrana de mayores dimensiones mediante un troquel (150 μm de espesor, un 85% de porosidad y 0,45 μm del tamaño del poro), comprado en Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos. En la figura 5 se puede observar cómo está constituido ¹¹.

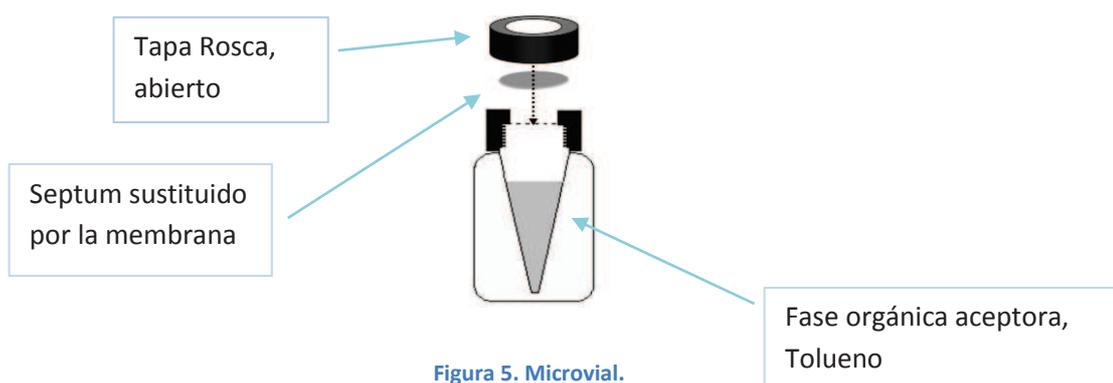


Figura 5. Microvial.

El microvial, que contiene la fase orgánica aceptora, se introdujo en el tubo de vidrio de 50 mL (con tapón de rosca) que contiene la fase donante (en nuestro caso la muestra de vino). El conjunto se mantuvo en un movimiento rotatorio usando un agitador de rodillos con forma de barra, que contenía 7 rodillos de 24 cm de largo. La velocidad de rotación fue 45 rpm. En la figura 6 se puede ver un dibujo esquemático.

Microextracción In-Vial asistida por membrana. Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino

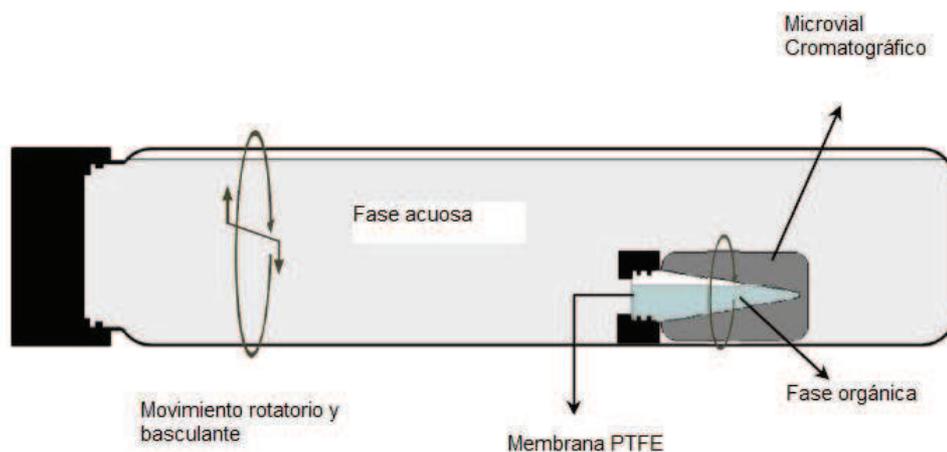


Figura 6. Tubo de vidrio con el microvial.

Como se puede ver, tanto la fase acuosa como la orgánica se agitaron al mismo tiempo estando en contacto con la membrana de extracción, lo que constituye una ventaja con respecto a otros dispositivos de microextracción.

Procedimiento de extracción líquido-líquido asistida por membrana

En un tubo de vidrio con tapón de rosca de 50 mL se introdujeron: 40.0 mL de la muestra (medidos por pesada), de 0 a 130 μL de disolución patrón de DBP en etanol de concentración 1000 mg L^{-1} . Además, 20 μL de disolución de IS en etanol de concentración 1000 mg L^{-1} y el volumen de etanol necesario para llegar a un volumen añadido de 200 μL . De esta manera resultan varias disoluciones que contienen exactamente la misma matriz y cantidades crecientes de patrón añadido, adecuadas para determinar la concentración de DBP en la muestra de vino mediante el método de la adición de patrón.

A continuación, se colocó dentro del tubo de 50 mL un microvial de cromatografía que contenía 200 μL de tolueno (fase orgánica) con la membrana de extracción incorporada en su tapón, sustituyendo al septum. El conjunto se colocó en el mezclador de rodillos durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas de agitación, se recuperó el microvial, el cual se secó por el simple contacto con el papel absorbente, la membrana se cambió por un septum convencional (para evitar las pérdidas de disolvente por evaporación) y el vial se guardó a 4 $^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de su análisis cromatográfico. En los casos que el análisis cromatográfico se realizó inmediatamente después de la extracción, no fue necesario sustituir la membrana por

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

un septum, ya que para intervalos cortos de tiempo la cantidad de disolvente que se evapora a través de la membrana puede considerarse despreciable, y además el patrón interno nos permite corregir las eventuales disminuciones de volumen.

Todo el material de vidrio, antes de ser utilizado se limpió con acetona y se mantuvo durante un mínimo de 2 horas a 380 °C.

Equipamiento y condiciones para cromatografía gases - espectro de masas

Se efectuó el análisis cromatográfico de la fase orgánica utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2010 equipado con un detector selectivo de masas Shimadzu GCMS-QP20105, un auto-muestreador Shimadzu AOC-20i y una columna capilar TRB-645 de sílice (30 m, 0,25 mm de diámetro, 1,40 mm de espesor de película) comprada en Teknokroma.

El gas portador utilizado fue helio, que se suministró por Carbueros Metálicos (Barcelona, España), con un caudal de 1 mL/min. Se inyectó 1 µL en la entrada del divisor que está a 200 °C, usando el auto-muestreador Shimadzu AOC-20i para su introducción. La temperatura del horno se inicia a 40 °C durante 2 min, que se aumenta a 30 °C por min hasta 230°C, donde se mantiene a esa temperatura durante 40 min.

3. Resultados

En este TFG se ha analizado el contenido de DBP en una muestra de vino comercial. Para ello, primeramente se investigó la presencia del analito en la muestra, y posteriormente se cuantificó su contenido.

Estudio cualitativo

El estudio se ha basado en la comparación de los tiempos de retención (t_R) obtenidos a partir de un patrón de DBP en etanol y a partir del extracto de una alícuota de la muestra sin aditivar (ni patrón, ni patrón interno), y el posterior análisis del espectro de masas promedio del pico del cromatograma de la muestra, que por su t_R podría tratarse de DBP, al que se sustrae el espectro promedio del ruido de fondo registrado justo antes de empezar el pico (o justo al terminar).

En la figura 7 y 8 se muestran los cromatogramas correspondiente al extracto de la alícuota de la muestra sin aditivar y aditivada. Se indica con una flecha el pico que, por tiempo de retención, puede ser debido a la presencia de DBP. Pero, para el cromatograma hicimos el estudio con dos métodos, método SIM (Selected Ion Monitoring) y método SCAN. Este estudio cualitativo se tiene que hacer en el modo SCAN, porque se necesita el espectro completo. Pero para la determinación cuantitativa es mejor el método SIM, ya que el ruido de fondo es menor y el área del pico cromatográfico es mayor.

Se muestran los dos cromatogramas para poder comprobar que el pico de DBP del sin aditivar es correspondiente con el aditivado y así, poder comparar y asegurarnos el tiempo de retención para el DBP. Para registrar estos cromatogramas se seleccionó el pico con $m/z = 149$. Además, se observa claramente que el aditivado presenta mayor pico, ya que al introducir la muestra le añadimos DBP, por tanto, es lógico que tenga mayor pico que el cromatograma sin aditivar.

Microextracción In-Vial asistida por membrana.
 Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino

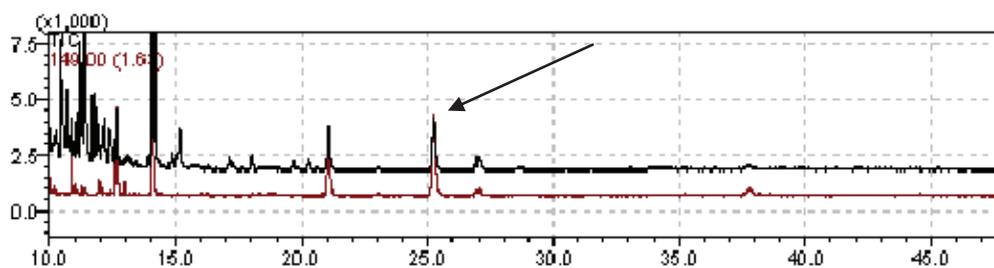
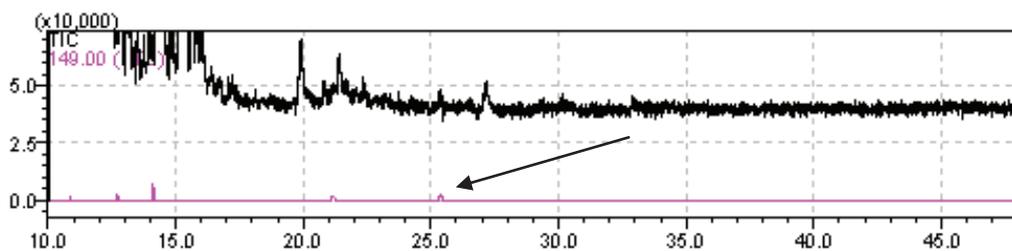


Figura 7. Modo SIM y SCAN, sin aditivar.

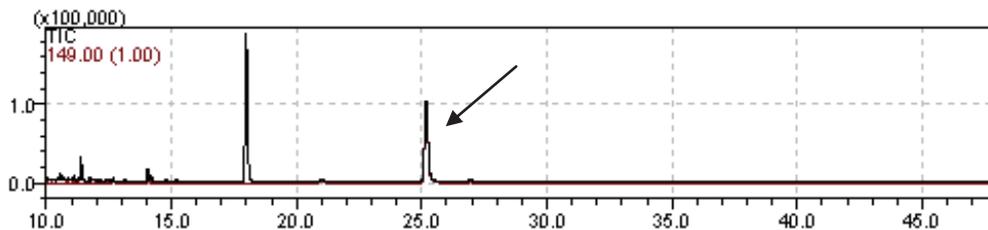
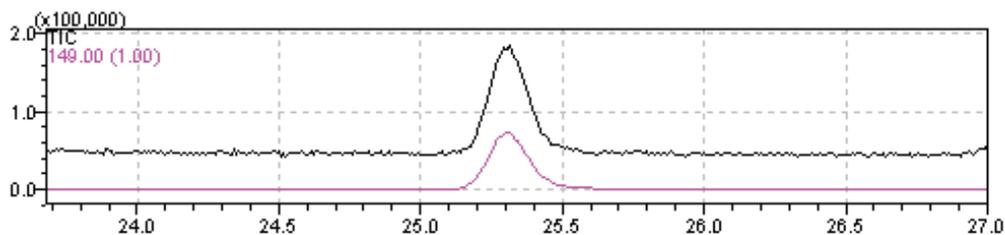
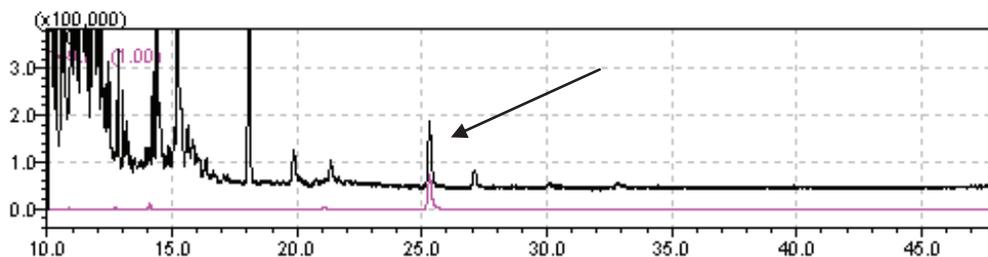


Figura 8. Modo SIM y SCAN, aditivado.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

El espectro de masas del pico cromatográfico que corresponde al DBP obtenido a partir de la muestra sin aditivar, se representa en la figura 9, donde podemos observar que el pico (o línea) correspondiente a $m/z = 149$ claramente es el más intenso y, en consecuencia, el que ha sido utilizado para la determinación cuantitativa en método SIM.

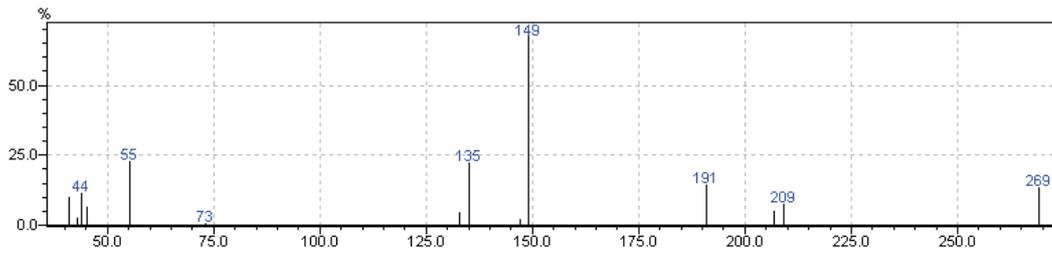


Figura 9. Espectro de masas sin aditivar, correspondiente al pico base con un tiempo de retención de 25,4 min.

La línea de $m/z = 149$ se explica por la rotura que se puede observar en la figura 10.

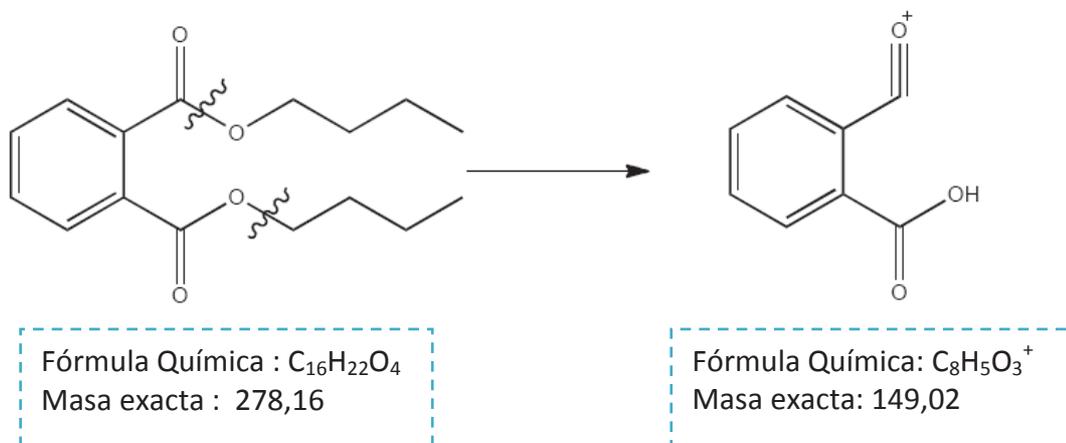


Figura 10. Rotura que explica el pico base.

El mecanismo para que se de esa rotura es el siguiente (figura11):

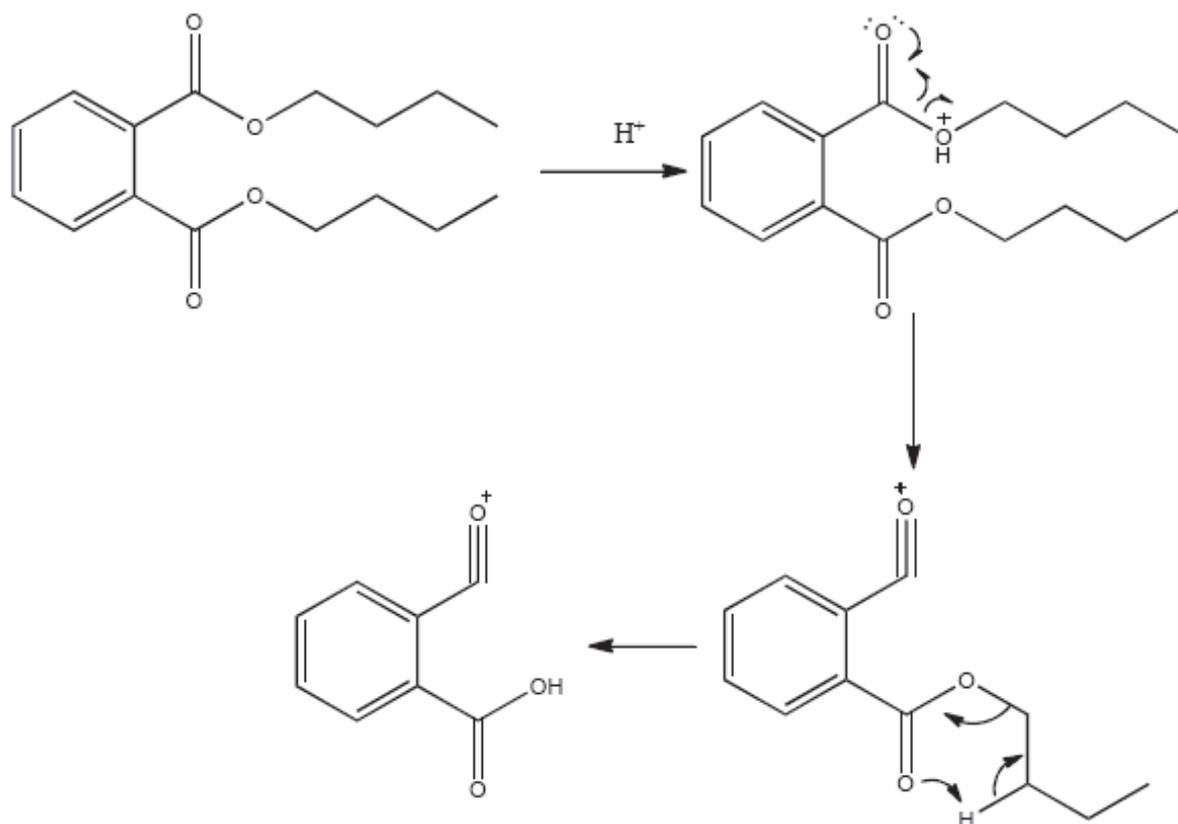


Figura 11. Mecanismo de la rotura del pico base.

Estos espectros han sido comparados con los espectros de la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST) obtenidos en las mismas condiciones de ionización, mediante la aplicación GCMS solution Software for GCMS-QP2010. Los espectros experimentales del extracto de la muestra sin aditivar se asociaron con el de DBP de la base de datos con un nivel de similitud de 85, lo que, se supone, confirma la presencia de DBP en la muestra analizada.

Estudio cuantitativo

La validación del procedimiento de extracción utilizado en este TFG, evidenció que la muestra de vino (y otras bebidas alcohólicas) presenta un efecto matriz significativo ¹¹. Este inconveniente se resolvió mediante la aplicación del método de la adición de patrón ¹².

Los resultados obtenidos, siguiendo el procedimiento de extracción indicado, y registrando los cromatogramas en modo SIM a m/z=149 y 105 (pico base del espectro de masas del DBP y del patrón interno, respectivamente), se resume en la tabla número 1.

Tabla1. Resultados correspondientes a la aplicación del método de la adición de patrón

Volumen de DBP añadido (µL)	Concentración de DBP añadida (mg /L)	Área del pico de DBP (t _R = 25,4 min; m/z=149)	Área del pico de patrón interno (t _R =18,1 min; m/z=105)	Relación de áreas (y) Area _{DBP} /Area _{IS}
0,000	0,000	15469	358541	0,043
0,010	0,249	89985	342078	0,263
0,020	0,498	175900	371991	0,473
0,040	0,995	359897	398523	0,903
0,060	1,493	525000	386540	1,358
0,090	2,239	709085	351991	2,014
0,130	3,234	1150925	391001	2,944

Volumen de muestra = 40 mL, concentración del patrón de DBP en etanol= 1000 ppm, Volumen final de la fase dadora= 40,2 mL. En estas condiciones, la E de la extracción es del orden de 0.1, y el EF del orden de 20¹¹.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

Tomando como señal analítica (y) la relación: área del pico correspondiente al DBP / área del pico correspondiente al patrón interno, la ecuación de la recta de regresión de y frente a la concentración de DBP añadida, obtenida por aplicación del método de los mínimos cuadrados, resultó ser:

$$y = 0,8946 x + 0,0299$$

Según el método de la adición de patrón, la extrapolación de esta recta hasta $y=0$ nos da la concentración de la disolución no aditivada; a partir de este valor, considerando la dilución efectuada de 40 mL a 40,2 mL (que permite la adición de patrón), se calculó la concentración de la muestra de vino comercial, aplicando la ecuación (6). La desviación estándar de esta concentración, de acuerdo con las recomendaciones de la estadística para Química Analítica¹², se calculó por aplicación de la ecuación (7).

$$x_E = \frac{a}{b} \quad (6)$$

$$s_{x_E} = \frac{s_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{y^2}{b^2 \cdot \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7)$$

Donde:

n : es el número de puntos incluyendo la muestra no aditivada

$s_{y/x}$: error típico en Excel

b : es la pendiente

a : es la ordenada en el origen

\bar{y} : es la media de la relación $\text{Área}_{\text{DBP}}/\text{Área}_{\text{IS}}$

$\sum (x_i - \bar{x})$: es el sumatorio de la concentración de cada valor de patrón añadido menos la media de esa concentración

En base a estos cálculos, se concluye que la muestra analizada tiene un contenido en DBP de $34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con una desviación estándar de $12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo cual implica una desviación estándar relativa del 35 %.

4. Discusión

La discusión se divide en dos partes. Primero se centrará en la técnica de extracción utilizada, y a continuación se pasará a comentar la muestra analizada y su contenido en DBP.

Discusión sobre las técnicas de extracción

Podemos encontrar notables diferencias entre los dispositivos ya conocidos y la configuración de extracción líquido-líquido asistida por membrana utilizada en este TFG. Esas diferencias se pueden ver en las condiciones de agitación, la manipulación de la muestra y el área de la membrana de extracción. Por ejemplo, para la manipulación de la muestra, se puede efectuar la cromatografía directamente en el microvial que se utilizó para hacer la extracción, lo que evita la manipulación de microvolúmenes del disolvente orgánico, así como la pérdida de muestra.

La configuración del dispositivo de microextracción utilizado en este trabajo, constituye uno de los pocos ejemplos donde se agitan simultáneamente las dos fases (dadora y aceptora), a diferencia de la mayoría de las configuraciones (comentadas en la introducción y otras no mencionadas¹³, donde se agita solamente la fase dadora. Al agitar las dos fases, se favorece la cinética de la extracción, y en consecuencia se mejoran las características de la determinación analítica. Como inconveniente, hay que mencionar que la reducida área de la membrana de extracción tiene un efecto negativo sobre la cinética, lo que implica la necesidad de tiempos prolongados de extracción para llegar al equilibrio. Como resultado de la conjugación de estas dos influencias, se ha propuesto (como se indica en el procedimiento) un tiempo de extracción de 24 horas, que en principio, resta interés práctico al método. No obstante, considerando que, fácilmente, y sin necesidades adicionales, se pueden preparar varias muestras en paralelo (simultáneamente), resulta un tiempo de análisis por muestra comparable a otros procedimientos. Y así, como es habitual en análisis cromatográfico, el factor que más condiciona el tiempo de análisis ha sido la duración del cromatograma. Cabe señalar que el agitador de rodillos permite agitar simultáneamente varias muestras, dependiendo del tamaño de los tubos y del número y longitud de los rodillos. El agitador utilizado en este trabajo permite agitar simultáneamente 12 tubos.

Pero, además de las ventajas e inconvenientes comentados (modo de la agitación, superficie de la membrana y la manipulación del disolvente orgánico después de la extracción), el prolongado tiempo de extracción impone ciertos requisitos a los disolventes orgánicos a utilizar. Así, se ha observado que dos características claves para obtener buenos resultados son la polaridad y la volatilidad.

**Microextracción In-Vial asistida por membrana.
Aplicación a la determinación de ftalato de dibutilo en Vino**

Al utilizar disolventes relativamente polares (por ejemplo acetato de etilo o n-octanol) como consecuencia de la interacción entre los disolventes y el agua de la fase dadora, el prolongado tiempo de extracción permite que tenga lugar la transferencia de agua hacia el interior del vial en cantidad de suficiente formar 2 fases. Esta observación se ilustra mediante la fotografía de la figura 12, correspondiente al vial después de la extracción de una muestra de vino con acetato de etilo.



Figura 12. Imagen de dos fases dentro del vial.

Por otra parte, al utilizar disolventes orgánicos muy volátiles, como por ejemplo el hexano (muy recomendados en cromatografía de gases) la cantidad que se pierde por evaporación durante las 24 horas de extracción reduce excesivamente la cantidad de disolvente orgánico que queda dentro del vial después de la extracción haciendo inviable la utilización del autoinyector. Con disolventes menos volátiles que el hexano, y menos polares que acetato de etilo o n-octanol, como es, por ejemplo el tolueno, se obtuvieron mejores resultados. Por dicha razón, en la determinación llevada a cabo en este TFG se utilizó tolueno como fase orgánica.

Contenido de DBP en la muestra

El contenido de DBP en la muestra de vino analizada resultó ser $34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (desviación estándar $12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Este resultado está en línea con los contenidos encontrados en otras muestras de vino analizadas mediante otras técnicas ¹⁴.

De este trabajo, y de otros estudios publicados, se concluye que el vino, en muchas ocasiones puede estar contaminado por ftalatos. Todos los materiales que entren en contacto con los alimentos deben tener la certificación de poder estar en contacto con dichos alimentos. Esas sustancias migradas de los materiales hacia los alimentos no deben afectar a la calidad organoléptica o la composición del producto alimenticio considerado. El producto debe ser capaz de demostrar el cumplimiento de la legislación y, por ejemplo, en el caso de un plástico específico, emitirá un documento de cumplimiento basado en las analíticas necesarias de trabajo, así como sus consideraciones. Si unas sustancias particulares en la composición del material representan un riesgo toxicológico, como es el caso de los ftalatos, también es necesario determinar si cumple desde el punto de vista legal con los límites de migración específica de la Unión Europea. De hecho, el contenido de ftalatos de un material no da ninguna indicación sobre el riesgo real de la migración en los vinos. El potencial de migración puede variar considerablemente.

Una de las causas de donde pueden migrar los ftalatos al vino es desde mangueras o bomba de almacenaje. Éstos pueden presentar una gran variedad de ftalatos, lo que en dicho trabajo se analiza la concentración de DBP, ya que varios estudios dieron abundante cantidades de este ftalato en muestras de vinos, aproximadamente un 11 % ¹⁵. Sin embargo, en vista de los parámetros de migración de ftalatos, es bastante preferible el uso de materiales que no contengan ningún tipo de ftalatos para poder evitar cualquier riesgo, o eliminar todos los materiales que contienen estos tipos de compuestos en las bodegas. También, el tiempo de exposición que tengan los vinos en el almacén, afectará mayor o menor contaminación.

En el caso del vino que este en contacto con el DBP, estará autorizado para estarlo, siempre y cuando la concentración no sea superior a los límites permitidos legalmente.

5. Conclusión

En el presente estudio se realizó una determinación analítica del contenido de DBP en un vino comercial, basada en una nueva técnica, denominada: microextracción in-vial asistida por membrana, puesta a punto en los laboratorios de Química Analítica de la Universitat de les Illes Balears.

En la muestra de vino analizada se detectó DBP en una concentración que es del mismo orden que las publicadas por diversos autores, utilizando otros métodos de análisis.

Estos valores de concentración, aun siendo bajos (del orden de $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), ponen de manifiesto que puede darse la transferencia de ftalatos desde los distintos materiales, que entren en contacto con el vino a lo largo de los procesos de producción, almacenamiento o comercialización.

La realización de este trabajo me dio a conocer la importancia de la investigación, como aplicarla, y los factores que ello conlleva. Se necesita mucho tiempo de investigación, de estudios y análisis, para poder obtener unos resultados satisfactorios. Pero en concreto, este trabajo me dio a entender que las técnicas de hoy en día avanzan cada vez más para mejorar nuestra calidad de vida, o de lo que nos rodea día a día. La técnica que se aplica en este trabajo es muy importante por las ventajas que presenta, ya que se pueden realizar estudios de cantidades mínimas, utilizando microvolúmenes, y favoreciendo la menor pérdida de muestra posible; generando mejores resultados.

6. Bibliografía

- ¹ E. Carasek; J. Merib; (2015) *“Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review”* en *Analytica Chimica Acta* 880, p. 8-25.
- ² A. Gallego Picó; R. M.^a Garcinuño Martínez; M.^a J. Morcillo Ortega; (2013) *“Experimentación en Química Analítica”*, ISBN electrónico 978-84 362-6530-9, p. 27.
- ³ F. Galán Cano; (2013) *“Innovaciones en técnicas de extracción miniaturizadas”*, Editorial Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, p. 28.
- ⁴ S. Mitra; (2003) *“Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry”*, Editorial Wiley-Interscience, p. 37 – 57.
- ⁵ M. Valcárcel Cases; A. Gómez Hens; (1988) *“Técnicas analíticas de separación”*, Editorial Reverté, S.A., ISBN 84-291-7984-4, p. 180.
- ⁶ P. Sanchez Batanero; A. Sanz Medel; (1985) *“Introducción a los métodos de separación”*, Editorial Simandas, S.A , p. 396.
- ⁷ A. V. Herrera Herrera; M. Asensio Ramos; J. Hernández-Borges; M. Á. Rodríguez-Delgado; (2010) *“Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes”* en *Trends in Analytical Chemistry* 29-7, p. 728-751.
- ⁸ A. Zgola Grzeskowiak; T. Grzeskowiak; (2011) *“Dispersive liquid-liquid microextraction”* en *Trends in Analytical Chemistry* 30 - 9, p. 1383.
- ⁹ Mei-I. Leong; Ming Ren Fuh; shang-Da Huang ; (2014) *“Beyond dispersive liquid-liquid microextraction”* en *Journal of Chromatography A* 1335 2-14, p. 4.
- ¹⁰ E. Carasek; J. Merib; (2015) *“Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review”* en *Analytica Chimica Acta*, 880, 8-25, p. 6.
- ¹¹ J.G. March; V. Cerdà; (2015) *“An innovative arrangement for in-vial membrane assisted liquidliquid microextraction. Application to the determination of esters of phthalic acid in alcoholic beverages by gas chromatography mass-spectrometry”* en *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:4213-4217.
- ¹² J. N. Miller; J. C. Miller; (2015) *“Estadística y quimiometría para química analítica”*, Editorial Pearson Educación, ISBN 8420535141.

¹³ C. Nerin; J. Salafranca; M. Aznar; R. Batlle; (2009) *“Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes”* en Analytical and Bioanalytical Chemistry 393, p. 809.

¹⁴ G. Cinelli; P. Avino; I. Notardonato; A. Centola; MV. Russo; (2013) *“Rapid analysis of six phthalate esters in wine by ultrasound-vortex-assited dispersive liquid-liquid micro-extraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector or gas chromatography-ion trap mass spectrometry”* en Analytica Chimica Acta 769:72-78.

¹⁵ P. Chatonnet; S. Boutou; A. Plana; (2014) *“Contamination of wines and spirits by phthalates: types of contaminants present, contamination sources and means of prevention”* en Food Additives & Contaminants: Part A 31- 9, p. 1605-1615.