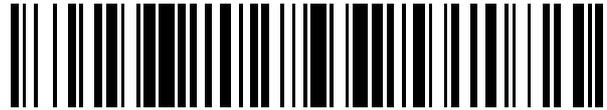


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 954**

21 Número de solicitud: 201730211

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/14 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

20.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.05.2017

Fecha de concesión:

02.10.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación. Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz (Badajoz) ES**

72 Inventor/es:

**MORA DIEZ, Nielene María;
ACEDO VALENZUELA, María Isabel;
RODRÍGUEZ CÁCERES, María Isabel y
PALOMINO VASCO, Mónica**

54 Título: **MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE GLIOXAL**

57 Resumen:

Método de determinación de glioxal.

La presente invención se refiere a un método de determinación de glioxal; la determinación se realiza mediante la derivatización y extracción simultánea del glioxal en una muestra acuosa; de manera preferente dicha determinación se realiza en bebidas alcohólicas.

ES 2 611 954 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE GLIOXAL

5 La presente invención se refiere a un método de determinación de glioxal. La determinación se realiza mediante la derivatización y extracción simultánea del glioxal de una muestra acuosa. De manera preferente dicha determinación se realiza en bebidas alcohólicas.

Antecedentes de la invención

10 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
15 cardiovasculares y enfermedades relacionadas con la edad.

El glioxal aparece en los alimentos fermentados como el vino y la cerveza debido a la actividad microbiana de *Saccharomyces cerevisiae* y *Leuconostoc oenos*. Los compuestos dicarbonílicos son importantes debido a su impacto sensorial, su reactividad y sus
20 potenciales efectos microbiológicos. La presencia de glioxal puede dar lugar a detrimentos en el sabor del vino y la cerveza, al reaccionar con aminoácidos que poseen azufre en su estructura, ya que se generan sustancias con olores desagradables. Por todas estas razones, es importante conocer y controlar la cantidad de glioxal presente en los alimentos.

25 Por ejemplo, en la solicitud de patente EP3030904 se describe un método de determinación de compuestos alfa dicarbonilos, específicamente el glioxal, mediante la derivatización de dicho compuesto y detección del producto derivatizado por fluorescencia. Dicho método es selectivo para glioxal.

30 Por ello es de gran interés poder desarrollar nuevos métodos de determinación de glioxal que sean precisos y selectivos para este compuesto.

Descripción de la invención

35 Debido a su estructura el glioxal no presenta ni absorbancia ni fluorescencia, por lo que es difícil de determinar y es necesario su derivatización.

En cuanto al estado de la técnica, en los métodos descritos para la derivatización del glioxal las reacciones requieren largos tiempos, de dos a tres horas y altas temperaturas de 60°C a
40 90°C. En el método de la invención se reduce el tiempo de reacción porque se produce de manera simultánea la derivatización del glioxal y su extracción. Por otro lado, esta tiene lugar a temperatura ambiente. El método de la presente invención consigue disminuir el tiempo y la temperatura respecto a los métodos ya conocidos.

45 En el método de la invención se emplean volúmenes de disolvente muy pequeños lo que es siempre favorable desde el punto de vista económico y medioambiental.

El método de la invención es selectivo para el glioxal ya que el resto de los compuestos α dicarbonílicos no reaccionan en las condiciones del método de la invención.

50 El método presenta una buena precisión.

El presente método derivatiza y extrae el glioxal mediante una micro-extracción líquido-líquido dispersiva.

Por lo tanto un aspecto de la invención se refiere a un método de determinación del glioxal caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) mezclar un disolvente extractante y un disolvente dispersante;
- b) adicionar 3,4 diaminopiridina a una muestra acuosa que contiene glioxal;
- 5 c) fijar el pH en un rango comprendido entre 10,5 y 12,5;
- d) introducir la mezcla de la etapa a) en la muestra acuosa que presenta glioxal y 3,4 diaminopiridina;
- e) homogeneizar la mezcla de la etapa d);
- f) centrifugar y
- 10 g) recoger la fase donde se encuentra el glioxal y eluirlo en un sistema cromatográfico, donde las etapas a) y b) pueden realizarse en cualquier orden.

Descripción de una realización preferida

- 15 Como se ha referenciado anteriormente la presente invención se refiere a un método de determinación del glioxal.

El disolvente extractante debe ser insoluble en agua, tener una alta capacidad de extracción para el analito diana, tener un buen comportamiento en cromatografía y dispersarse fácilmente en fase acuosa.

Por ello el disolvente extractante se selecciona entre haluros de alquilo alifático de 1 a 6 átomos de carbono; de manera preferente se selecciona entre: diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono o mezclas de ellos. De manera particular el disolvente extractante es diclorometano.

El disolvente dispersante debe de tener una buena solubilidad tanto en fase acuosa como en fase orgánica. Por ello el disolvente dispersante de manera preferente se selecciona entre: metanol, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, y alcoholes alifáticos de 1 a 6 átomos de carbono o mezclas de ellos. De manera particular el disolvente dispersante es metanol, 1-propanol, butan-1-ol y pentan-2-ol o mezclas de ellos.

De manera particular la combinación de disolventes es diclorometano/butan-1-ol. De manera particular el volumen utilizado es 0.75 mL de disolvente dispersante y 150 µL de disolvente extractante.

De manera preferente el pH en la etapa c) se ajusta entre 10.5 y 12.5. De manera particular el pH es 11.6. De manera particular en la etapa c) la relación es 1:12 (en ppm) entre el glioxal: 3, 4 diaminopiridina.

De manera preferente la etapa e) de homogeneización se realiza durante un tiempo comprendido entre 0,5 min y 5 min. De manera particular es 1 min. De manera particular la homogeneización se realiza mediante agitación. De manera particular la etapa f) de centrifugación se realiza a 3000rpm y durante 5 min.

De manera preferente la etapa g) es monitorizado fluorimetricamente. De manera particular se realiza la determinación en un HPLC con un detector de fluorescencia.

De manera preferente en la etapa g) tras recoger la fase donde se encuentra el glioxal se añade metanol hasta obtener una solución homogénea que evita la evaporación de disolvente, se ajusta el pH a 2 con objeto de maximizar la señal fluorescente.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 5 Sobre una solución acuosa de glioxal (vino o cerveza): 3,4 diaminopiridina en una relación 1:12 con un volumen final de 1,5 mL y un pH de 11,5 a 12 se añadió de manera rápida una mezcla formada por 750 μ L de 1-butanol y 150 μ L de CH₂Cl₂, se homogenizó el conjunto en vortex durante 1 minuto, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se esperó 10 minutos, se añadió 0,5 mL de tampón ácido cloroacético/cloroacetato de sodio (ClCH₂COOH/ClCH₂COONa) (0,3M, pH 2,0) y 1,5 mL de metanol y se enrasó con H₂O.
- 10 Se introdujo la muestra en el equipo de HPLC y se determinó el glioxal.

Ejemplo 2

- 15 El método de la invención se aplicó a varios vinos monovarietales pertenecientes a la D.O. "Ribera del Guadiana" y a varias marcas de cervezas españolas. 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

- 20 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.
- 25 Con el ánimo de evaluar la precisión se analizó una muestra de vino tinto durante cinco días consecutivos. La desviación estándar relativa calculada fue de 4,1% para 7,4 mg/L de glioxal.

REIVINDICACIONES

1. Método de determinación del glicoxal caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 5 a) mezclar un disolvente extractante y un disolvente dispersante;
b) adicionar 3,4 diaminopiridina a una muestra acuosa que contiene glicoxal;
c) fijar el pH en un rango comprendido entre 10,5 y 12,5;
d) introducir la mezcla de la etapa a) en la muestra acuosa que presenta glicoxal y 3,4
10 diaminopiridina;
e) homogeneizar la mezcla de la etapa d);
f) centrifugar y
g) recoger la fase donde se encuentra el glicoxal y eluirla en un sistema cromatográfico,
donde las etapas a) y b) pueden realizarse en cualquier orden.
- 15 2. Método de determinación del glicoxal según la reivindicación 1 caracterizado porque el disolvente extractante se selecciona entre haluros de alquilo alifático de 1 a 6 átomos de carbono.
- 20 3. Método de determinación de glicoxal según la reivindicación 2 caracterizado porque el disolvente extractante selecciona entre: diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono o mezclas de ellos.
- 25 4. Método de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizado porque el disolvente dispersante se selecciona entre: alcoholes alifáticos de 1 a 6 átomos de carbono, metanol, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, o mezclas de ellos.
- 30 5. Método de determinación según la reivindicación 4 caracterizado porque el disolvente dispersante se selecciona entre: metanol, 1-propanol, butan-1-ol y pentan-2-ol o mezclas de ellos.
- 35 6. Método de determinación del glicoxal según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 caracterizado porque el pH en la etapa b) se encuentra entre 10.5 y 12.5.
7. Método de determinación del glicoxal según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el eluido de la etapa g) es monitorizado fluorimetricamente.



21 N.º solicitud: 201730211

22 Fecha de presentación de la solicitud: 20.02.2017

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G01N33/52** (2006.01)
G01N33/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RODRÍGUEZ-CÁCERES, M.I. et al., 'Novel HPLC--Fluorescence methodology for the determination of methylglyoxal and glyoxal. Application to the analysis of monovarietal wines "Ribera del Guadiana"', FOOD CHEMISTRY, 2015 Nov, Vol. 187, Págs 159-165, ISSN: 0308-8146(print), ISSN: 1873-7072(electronic), doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.103. Todo el documento.	1-7
A	CAMPILLO, N. et al., 'Glyoxal and methylglyoxal determination in urine by surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and LC', BIOANALYSIS, 2017 Feb, Vol. 9, No. 4, Págs. 369-379, ISSN: 1757-6180(print), ISSN: 1757-6199(electronic), doi: 10.4155/bio-2016-0217, Epub: 19/01/2017, todo el documento.	1-7
A	SAISON, D. et al., 'Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry', JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2009, Vol. 1216, No. 26, Págs. 5061-5068, ISSN: 0021-9673 (print), doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.077, todo el documento.	1-7
A	WU, M.Y. et al., 'A novel derivatization approach for simultaneous determination of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone in plasma by gas chromatography-mass spectrometry', JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2008, Vol. 1204, No. 1, Págs. 81-86, ISSN: 0021-9673 (print), doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.040 todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.04.2017

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201730211

22 Fecha de presentación de la solicitud: 20.02.2017

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G01N33/52** (2006.01)
G01N33/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NENG, N.R. et al., 'Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization', JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2007, Vol. 1169, Nos. 1-2, Págs. 47-52, ISSN: 0021-9673 (print), todo el documento.	1-7
A	SARAJI, M. et al., 'Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction', ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2014 Mar; Vol. 406, No. 8, Págs. 2027-2066, ISSN: 1618-2642(print), ISSN: 1618-2650(electronic), doi: 10.1007/s00216-013-7467-z Todo el documento.	1-7
A	ASENSIO-RAMOS, M. et al. 'Liquid phase microextraction applications in food analysis', JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2011, Vol. 1218, No 42, Págs. 7415-7437, ISSN: 0021-9673 (print), ISSN: 1873-3778 (electronic), doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.096, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.04.2017

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.04.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Rodríguez-Cáceres, M.I. et al., <i>Food Chem.</i> , (2015 Nov), 187: 159-65.	2015
D02	Campillo, N. et al., <i>Bioanalysis</i> , (2017 Feb), 9(4): 369-79.	19/01/2017
D03	Saison, D. et al. <i>J. Chromatogr. A</i> , (2009), 1216(26): 5061-8.	2009
D04	Wu, M.Y. et al. <i>J. Chromatogr. A</i> , (2008), 1204(1): 81-6.	2008
D05	Neng, N.R. et al. <i>J. Chromatogr. A</i> , (2007), 1169(1-2): 47-52.	2007
D06	Saraji, M. et al. <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> , (2014 Mar), 406(8): 2027-66.	2014
D07	Asensio-Ramos, M. et al., <i>J. Chromatogr. A</i> , (2011), 1218(42): 7415-37.	2011

En D01- D05 se describen métodos para determinar el glioxal en muestras de diferentes orígenes.

En D06 y D07 se describe la aplicación de la microextracción en fase líquida en el análisis de alimentos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración.

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de la reivindicación 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-7 comprende características técnicas que cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva con respecto al estado de la técnica anterior, representado por los documentos D01-D05.

1.2. En D01-D05 se han divulgado métodos para determinar el glioxal en diferentes tipos de muestras. En particular, se ha descrito un método de determinación y cuantificación de compuestos α -dicarbonílicos (glioxal y metilglioxal) en muestras de vinos monovarietales de la 'Ribera del Guadiana' que comprende una etapa de derivatización del compuesto α -dicarbonílico con el reactivo 2,3-diaminopiridina (2,3-DAP) a pH 2 durante 120 min a 90°C. Tras dicha etapa de derivatización, la muestra es analizada directamente mediante HPLC con detección espectrofluorimétrica (HPLC-FD), sin ningún tratamiento previo de limpieza o extracción ('clean-up') de dicha muestra (D01: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión). En D02 se describe un método de determinación de glioxal y metilglioxal en muestras de orina que comprende una etapa de derivatización con el reactivo 2,3-diaminonaftaleno (2,3-DAN), seguida de microextracción en fase líquida del analito (DLLME: 'Dispersive Liquid-Liquid Microextraction') y detección mediante HPLC-FD (D02: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión).

Por consiguiente, en el estado de la técnica no se ha divulgado ningún método para determinar el glioxal que comparta las características técnicas del reivindicado en la solicitud. Además, la diferencia técnica entre el método reivindicado y los descritos en D01-D05 radica en que el primero comprende una etapa de derivatización del analito con el reactivo 2,3-DAP a temperatura ambiente y una etapa de microextracción líquido-líquido (DLLME) que se llevan a cabo de manera simultánea. El efecto técnico derivado de la simultaneidad de las etapas de derivatización y de microextracción es la reducción del tiempo y de la temperatura de reacción con respecto a los métodos divulgados en el estado de la técnica.

Por todo ello, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-7 es nuevo e inventivo (Art. 4.1., Art. 6.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).