

Fortificación,
biodisponibilidad
y especiación
del selenio en
leche de vaca

ÓSCAR MUÑIZ NAVEIRO
abril 2005

USC

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Química

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología
Avenida das ciencias s/n
15782 Santiago de Compostela
España

DRA. DNA. PILAR BERMEJO BARRERA, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA

Que la presente memoria, titulada “**Fortificación, biodisponibilidad y especiación del selenio en leche de vaca**”, que para optar al Grado de Doctor en Química presenta D. Oscar Muñiz Naveiro, fue realizada bajo su dirección, la de **Dra. Dña. Adela Bermejo Barrera y Dra. Dña. Raquel Domínguez González** en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y, para que así conste, firma el presente informe en Santiago de Compostela, a 17 de Enero de 2005.

Dra. Dña. Pilar Bermejo Barrera



Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología
Avenida das ciencias s/n
15782 Santiago de Compostela
España

DRA. DNA. PILAR BERMEJO BARRERA, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, ADELA BERMEJO BARRERA, Profesora titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela y RAQUEL DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, Profesora ayudante del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

AUTORIZAN:

Al graduado D. Oscar Muñiz Naveiro a la presentación ante la Comisión del Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela, y para optar al Grado de Doctor en Química, de la presente memoria titulada “**Fortificación, biodisponibilidad y especiación del selenio en leche de vaca**”, realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firma la presente autorización en Santiago de Compostela, a 17 de enero de 2005.

Dra. Dña. Pilar Bermejo Barrera

Dra. Dña. Adela Bermejo Barrera

Raquel Domínguez González

Agradecimientos

Este estudio tiene sus orígenes en un proyecto firmado entre Feiraco y la Universidad de Santiago de Compostela mediante el grupo GETEE. Entre ese inicio y la conclusión, muchas personas contribuyeron y por ello merecen mi gratitud. Para ellos escribo estas palabras aunque seguro que en ellas no voy a saber expresar toda la gratitud que me gustaría transmitir.

Al **Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología** de la Universidad de Santiago de Compostela por permitirme formar parte de él y llevar a cabo este estudio y otros realizados durante mis seis años de estancia aquí.

A **Feiraco** por permitirme participar en este proyecto y disponer de sus instalaciones para poder llevar a cabo este estudio.

A **Pila** por acogerme en su grupo, por darme la posibilidad de hacer este trabajo, tratarme con cariño y ayudarme en los buenos y los malos momentos, por su confianza, su paciencia y aprecio, muchas gracias.

A **Adela** por su apoyo, su sinceridad y por su amistad. La verdad que no encuentro palabras que puedan decirte lo mucho que me ayudaste y lo importante que has sido en este trabajo.

A **Raquel** por su fe en mí, su amistad y por su paciencia como lectora y consejera durante todo este trabajo.

A **Lusi**, esta tesis non sería a mesma sen non te coñecera. O certo é que o mellor non se daría acabado sen a túa axuda.

A **Rosa**, a miña primeira compañeira de mesa no laboratorio e a miña fiel escudeira de viños para olvidar as penas do laboratorio, ¡que tempos aqueles!, a verdade é que se botan de menos.

A **Eva**, el último apoyo importante en el laboratorio, la verdad que fue un placer conocerte y poder charlar contigo durante esos pequeños ratos.

A **Guchis** por nuestras risas. Con él empecé mi estancia en el departamento tras solicitar juntos la tesina a pesar de nuestras dudas.

A todos los demás compañeros que forman parte del **grupo GETEE** o que durante este trabajo formaron parte de él ya que todos en muchos momentos me han aguantado y durante las míticas reuniones de los viernes me sugirieron nuevas ideas y consejos.

A la **Delegación de Árbitros de Fútbol de Santiago de Compostela** y los diferentes equipos que me permitieron subsistir durante la realización de esta tesis. A Iván por darme la chapa en los entrenamientos.

A **Marcos y Sonia, Fernando, Belén y Pol, a Dora y a Eva**, mis amigos que no tienen nada que ver con la química pero que son importantes en mi vida, gracias por vuestro afecto.

A **mis padres** a los que le debo todo lo que soy. Gracias por apoyarme y por haberme dado la posibilidad de llegar hasta aquí. A **mi hermano y mi abuela** que aunque ya no esté sé que se sentiría orgullosa de mí.

Por último a **Merche** porque eres muy importante en mi vida, por acompañarme en el camino, por apoyar mis decisiones aunque no estuvieras de acuerdo y por tantas cosas.....

En resumen gracias a todos los que se subieron a este barco durante el largo tránsito que ha supuesto realizar este trabajo.

En este estudio se ha llevado a cabo la determinación de la concentración de selenio en leche de vaca mediante generación de hidruros espectrometría de absorción atómica y generación de hidruros espectrometría fluorescencia atómica. Para ello se ha optimizado la preparación de la muestra que nos permita generar el hidruro de selenio y cuantificarlo posteriormente.

Una vez desarrollada la metodología necesaria para llevar a cabo la determinación del selenio en leche de vaca se han cuantificado los niveles de selenio en leches comerciales que se pueden encontrar en cualquier supermercado gallego y en leche de granja sin tratar para conocer en que niveles se encuentra.

Posteriormente se llevó a cabo un estudio, en el cual se buscó si existía una relación de la fortificación de la alimentación de las vacas con dos formas distintas de selenio, selenio orgánico y selenio inorgánico, con el contenido de selenio en la leche. Se vio que si la alimentación de las vacas era fortificada con levaduras ricas en selenio orgánico el contenido de selenio en la leche producida por las mismas era mayor. En la siguiente etapa de este estudio se evaluó la influencia del nivel de fortificación de los forrajes en el contenido de selenio en la leche. Este estudio nos reveló que un aumento de la concentración de selenio orgánico en los forrajes producía un aumento proporcional en la concentración de selenio en la leche.

En otra etapa de este trabajo se estudió la biodisponibilidad del selenio presente en la leche de vaca mediante un método de digestión “in vitro” con diálisis, siendo la dializabilidad el parámetro escogido para estudiar la diferente biodisponibilidad del selenio presente en la leche de vaca. En esta parte estudio se evaluó la influencia de la sustancia empleada en la fortificación, así como el nivel de fortificación de los forrajes empleado en la biodisponibilidad del selenio en la leche. Este estudio nos indicó que a niveles de fortificación de 0,4 y 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ presentan un mayor porcentaje de dializabilidad con respecto a niveles de 0,2 y 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Igualmente, se estudió mediante HPLC-UV-HG-AFS qué especies de selenio estaban presentes en la leche de vaca y si estas se veían alteradas con las diferentes

alimentaciones proporcionadas al ganado. En esta parte del trabajo se comprobó que una alimentación suplementada con selenio orgánico se correspondía con la presencia de selenocistina, selenio (IV) y selenometionina, mientras que las restantes muestras de leche sólo ocurrían la selenocistina y el selenio (IV).

Por último se intentó ver si existía una relación entre el contenido de selenio en la leche y un antioxidante muy vinculado a este nutriente como es la vitamina E. En estudios médicos anteriores, se demostró que un déficit de esta vitamina se veía contrarrestado por la presencia de selenio. Para ello se desarrolló una metodología que nos permitiera la determinación de la vitamina E en la leche utilizando la cromatografía líquida como método de separación y como detector la reacción quimioluminescente del luminol con el peróxido de hidrógeno. Se llevó a cabo una extracción líquido-líquido y se cuantificó la vitamina E en la leche. Con los datos obtenidos en este estudio no se pudo establecer ninguna correlación entre la concentración de la vitamina E y la concentración de selenio en las diferentes leches.

PRÓLOGO		1
CAPÍTULO	EL SELENIO: INTERÉS DE SU ESTUDIO	5
1.		
1.1	Introducción	7
1.2	Fuentes y distribución	8
1.2.1	Fuentes naturales de selenio	8
1.2.2	Fuentes antropogénicas de selenio	11
1.3	Importancia bioquímica del selenio	13
1.4	El selenio en los alimentos	18
1.5	Toxicidad del selenio	26
1.6	Bibliografía	28
CAPÍTULO	DETERMINACIÓN DE SELENIO EN LECHE DE VACA	33
2.		
2.1	Introducción	35
2.2	Objetivos	37
2.3	Determinación de selenio en leche mediante generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica (HGAAS)	38
2.3.1	Métodos de preparación de la muestra para el análisis de elementos traza en medios biológicos	38
2.3.2	Métodos para determinar selenio total en muestras biológicas	40
2.3.3	Pretratamiento de las muestras de leche	45
2.3.3.1	Optimización del pretratamiento de la muestra para la determinación de selenio en leche de vaca con un horno de microondas de uso doméstico	48
2.3.3.2	Optimización del pretratamiento de la muestra para la determinación de selenio en leche de vaca con un horno de microondas Ethos Plus	58
2.3.4	Optimización de la determinación de selenio por generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica	67
2.3.5.	Definición: Características analíticas del método	78
2.3.6	Comparación de los resultados obtenidos con los dos hornos de microondas empleados en el pretratamiento de la muestra para la determinación de selenio en leche de vaca	79
2.3.7	Determinación de selenio en leches comerciales	85
2.3.8	Distribución de selenio en suero, nata y caseínas de leche comerciales	91
2.3.8.1	Características analíticas	92
2.3.8.2	Determinación de selenio en los distintos componentes de la leche	98
2.4	Conclusiones	101
2.5	Bibliografía	102
CAPÍTULO	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE SELENIO EN LECHE EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA QUÍMICA DEL	107

3.	SUPLEMENTO UTILIZADO EN LA ALIMENTACIÓN DEL GANADO	
3.1	Introducción	109
3.2	Objetivo	116
3.3	Parte experimental	117
3.3.1	Estudio 1. Niveles de selenio en leche en función de la naturaleza química del suplemento de selenio utilizado en la alimentación del ganado	117
3.3.1.1	Determinación de selenio en los forrajes utilizados para la alimentación del ganado.	119
3.3.1.1.1	Optimización de la digestión ácida para forrajes	119
3.3.1.1.2	Determinación de selenio en forrajes por generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica	125
3.3.1.2	Determinación de selenio en la leche obtenida después de la suplementación de los forrajes con diferentes formas de selenio	126
3.3.1.3	Estudio de la distribución del selenio en los diferentes componentes de la leche obtenida tras la suplementación de los forrajes	130
3.3.2	Estudio 2. Fortificación de forrajes con selenio orgánico a diferentes niveles de concentración	140
3.3.2.1	Determinación de selenio en leche de vaca después de la suplementación de los forrajes con selenio orgánico a diferentes niveles	141
3.4	Conclusiones	146
3.5	Bibliografía	148
4.	BIODISPONIBILIDAD DEL SELENIO EN LECHE DE VACA	151
4.1	Introducción	153
4.1.1	Estudios de la biodisponibilidad de elementos traza basados en la determinación de los componentes solubles, bajo condiciones fisiológicas simuladas	158
4.1.2	Estudios de la biodisponibilidad de elementos traza basados en la determinación de los mismos en los dializados, bajo condiciones fisiológicas simuladas	160
4.2	Objetivo	165
4.3	Parte experimental	166
4.3.1	Procedimiento digestión “in vitro”	166
4.3.2	Determinación de selenio en los dializados y digeridos gastrointestinales	168
4.3.2.1	Optimización de métodos para la determinación de selenio en muestras de leche, dializados y digeridos gastrointestinales	169
4.3.2.2	Características analítica del método	182
4.3.3	Estudio de la dializabilidad del selenio en leche de vaca	187
4.4	Conclusiones	195

4.5	Bibliografía	196
CAPÍTULO 5.	ESPECIACIÓN DE SELENIO MEDIANTE HPLC-UV-HG-AFS	199
5.1	Introducción	201
5.1.1	Métodos utilizados en la especiación de selenio	201
5.1.1.1	Extracción de las diferentes especie de selenio	202
5.1.1.2	Separación de las diferentes especies de selenio	205
5.1.1.3	Detección de los compuestos de selenio	209
5.2	Objetivo	212
5.3	Parte experimental	213
5.3.1	Procedimiento experimental	213
5.3.1.1	Optimización de los parámetros experimentales	215
5.3.1.1.1	Optimización de la etapa de reducción	216
5.3.1.1.2	Optimización de la separación cromatográfica de los compuestos de selenio mediante cromatografía líquida de alta resolución	233
5.3.1.1.3	Comparación de los resultados obtenidos con los dos tipos de cromatografía empleados en la separación de los diferentes compuestos selenio en leche de vaca	246
5.3.1.1.4	Generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica	250
5.3.1.2	Pretratamiento de la muestra para la especiación de selenio en leche	251
5.3.1.3	Características analíticas del método propuesto	253
5.3.2	Determinación de las especies de selenio en muestras de leche de vaca	258
5.4	Conclusiones	261
5.5	Bibliografía	262
CAPÍTULO 6.	VITAMINA E EN LECHE DE VACA	267
6.1	Introducción	269
6.1.1	Métodos de determinación de la vitamina E	272
6.2	Objetivo	276
6.3	Parte experimental	277
6.3.1	Optimización de la reacción quimioluminescente del luminol-peróxido de hidrógeno	277
6.3.2	Pretratamiento de las muestras de leche para el análisis de vitamina E por quimioluminescencia	288

6.3.3	Características analíticas del método	289
6.3.4	Determinación de los niveles de vitamina E en leches de vaca	292
6.4	Conclusiones	294
6.5	Bibliografía	295
CONCLUSIONES GENERALES		299
ANEXO 1		307
	Aparatos	309
	material	310
ANEXO 2		312
	Reactivos	315

El selenio es un elemento traza esencial que desempeña un importante papel nutricional y clínico. El control analítico del selenio ha adquirido una gran importancia dentro de los laboratorios especializados en elementos traza por la necesidad de evaluar su ingesta y sus niveles en los medios biológicos en situaciones clínicas de muy diversa naturaleza.

El hecho de que sean grupos de riesgo para presentar déficits de selenio, tanto los que reciben una ingesta inadecuada, como los que presentan una demanda anabólica aumentada, amplía enormemente el campo de estudio de este elemento traza. Además este elemento se vincula con la aparición de enfermedades crónicas y de gran importancia en la sociedad actual como el cáncer, alzheimer, sida, etc. El organismo no es capaz de sintetizarlo y todo el selenio procede de la dieta. Por todo esto la leche juega un importante papel, puesto que es elemento de consumo diario que nos puede ayudar a evitar un posible déficit de este elemento.

Dentro de los datos que se disponen se concluye en España se dan déficits de este elemento, y una de las zonas en las que existe déficit es Galicia. Esto aconseja llevar a cabo estudios de mayor amplitud y ello ha motivado la realización de esta tesis doctoral denominada “Fortificación, biodisponibilidad y especiación del selenio en leche de vaca” y que se estructuró en seis capítulos.

Los objetivos que nos hemos marcado en este estudio fueron:

El primer objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método analítico para la determinación de selenio total en distintas muestras de leche. Dicho estudio se llevará a cabo utilizando la generación de hidruros acoplado a la espectrometría de absorción atómica y espectrometría de fluorescencia atómica. Igualmente para llevar a cabo este propósito, en primer lugar, se optimizará una preparación de la muestra que nos permitan extraer todo el selenio de una forma rápida y sencilla.

Posteriormente se estudiará la influencia de la suplementación del selenio en los forrajes, que se utilizan en la alimentación de las vacas, en el contenido de selenio en la leche con el fin de poder aumentar la concentración de este elemento en la leche de forma natural y con ello poder aumentar la ingesta en la dieta del ser humano. Para ello se llevará a cabo un estudio tanto en función del tipo de suplementación

(selenito sódico o levaduras selenizadas) como en función de los niveles utilizados en la suplementación de los forrajes con que se alimentan las vacas.

Una vez se halla establecidos los contenidos de selenio total en las distintas muestras de leche se intentará estimar qué porcentaje de este selenio presente en las leches es biodisponible para el ser humano mediante un estudio de digestión “in vitro”.

En este estudio, también, nos proponemos establecer las diferentes especies de selenio presentes en la leche debido a que el aporte de este elemento depende de la forma química en que se halle en el alimento. Para ello se desarrollará un método analítico que nos permita la separación de las diferentes especies y su posterior cuantificación. Utilizaremos una separación mediante cromatografía líquida de alta resolución y posterior cuantificación mediante generación de hidruros acoplado a espectrometría de fluorescencia atómica.

Por último se estudiará si existe una relación con otro antioxidante presente en la leche como es la vitamina E. El concepto de que los antioxidantes “hablan entre ellos” y se cubren sus efectos protectores hace necesario ver si un aumento de selenio provoca una variación del contenido de esta vitamina en la leche.

En la presente monografía se recoge los estudios llevados a cabo y las conclusiones que de éstos se han podido extraer.

1.1 INTRODUCCIÓN

El selenio fue descubierto en 1817 por Jöns Jacobs Berzelius cuando encontró un residuo rojo en el material de desecho que se forma durante la producción del ácido sulfúrico en una mina de sulfuro de cobre de Falun (Suecia). Debido a que sus propiedades químicas eran similares al telurio se describió como tal, hasta que poco después llegó a la conclusión de que se trataba de un nuevo elemento con propiedades únicas.

El selenio pertenece al grupo VIA del Sistema Periódico junto con el oxígeno, azufre, telurio y polonio. Su situación en el centro de dicho grupo le confiere un carácter que no es ni puramente metálico ni no metálico. Es precisamente esta peculiaridad la responsable de su especial comportamiento biológico. El selenio es similar en muchas de sus propiedades químicas y sus formas biológicamente importantes (orgánicas e inorgánicas) son, en general, análogas a las del azufre. Al igual que el azufre, el selenio presenta una gran variedad de estados de valencia (-2, 0, +2, +4, +6) y los dos elementos presentan un radio covalente y una electronegatividad muy similares. Los análogos del selenio de los ácidos sulfuroso y sulfúrico son los ácidos selenioso (H_2SeO_3) y selénico (H_2SeO_4), respectivamente. Los selenatos poseen un mayor poder oxidante que los sulfatos. Esto es debido a la mayor diferencia de la energía libre estándar entre el selenito y el selenato, frente a la existente entre el sulfato y el sulfito. La estructura cristalina de las sales de sulfato y selenato es tetraédrica, los átomos de azufre y selenio ocupan el centro del tetraedro que está rodeado de cuatro átomos de oxígeno. La solubilidad en agua de los selenatos es en general mayor que la de los sulfatos.

El selenio, cuyo peso atómico es de 78,96, presenta seis isótopos naturales, ^{74}Se (0,89%), ^{76}Se (9,36%), ^{77}Se (7,63%), ^{78}Se (23,78%), ^{80}Se (49,61%), ^{82}Se (8,73%) y varios isótopos radioactivos ^{75}Se , ^{77a}Se y ^{81}Se (8,73%), siendo el ^{75}Se el más importante (radiación gamma, $t_{1/2}$ 120 días). Éste es utilizado para llevar a cabo diagnósticos radiológicos¹.

En la naturaleza el selenio se presenta en dos estados alotrópicos: selenio gris, modificación metálica de tipo hexagonal cuya temperatura de fusión es 217 °C a 760 mm Hg y densidad 4,79 g cm⁻³, y el selenio rojo, modificación monoclinica cuyo punto de fusión varía desde 70 a 180 °C y su densidad es de 4,46 g cm⁻³. A temperatura ambiente la forma gris es la más estable.

El selenio se obtiene generalmente como subproducto del refinado electrolítico del cobre, concretamente de los barros anódicos depositados durante este proceso².

En disoluciones acuosas está presente generalmente como selenito (SeO₃⁻²), el cual puede ser reducido de sus compuestos para dar selenio rojo metal.

1.2 FUENTES Y DISTRIBUCIÓN

1.2.1 FUENTES NATURALES DE SELENIO

El selenio se encuentra presente en casi todos los materiales de la corteza terrestre, principalmente en rocas magmáticas y sedimentarias, asociado con arcilla, apareciendo tanto en forma elemental como en seleniuros, selenitos y selenatos. En suelos arcillosos y en suelos con alto contenido en materia orgánica el selenio se encuentra preferentemente como seleniuro y sulfuro de selenio. En suelos neutros bien drenados está presente fundamentalmente como selenito, y en suelos alcalinos y oxidativos se encuentra como selenato³. En la naturaleza las distintas formas de selenio se van transformando mediante reacciones de oxidación, metilación y reducción. El selenio inorgánico es incluido en la cadena trófica a través de reacciones de biometilación llevadas a cabo por acción de las plantas, animales marinos y algunos organismos unicelulares que transforman las especies inorgánicas en orgánicas como dimetilselenio, trimetilselenio o aminoácidos⁴. La existencia del selenio en distintas formas químicas dentro de la naturaleza viene dado por factores como la temperatura, la concentración de oxígeno, la luz solar, pH, salinidad y

potencial redox⁵. El contenido de este elemento en los suelos es muy variable. En regiones selenodeficientes (Finlandia, Nueva Zelanda, China) encontramos concentraciones inferiores a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$, y en regiones con un mayor contenido en selenio los valores se encuentran entre $2-100 \mu\text{g g}^{-1}$ (EEUU, Canadá y Venezuela)⁶.

La reactividad química del selenio en el suelo influye fuertemente en su solubilidad y por tanto en la disponibilidad del mismo. En suelos oxidantes y a pH alto, el selenio elemental y los seleniuros son oxidados a selenatos, los cuales son difícilmente asimilados por las plantas. A pH muy bajos la forma selenito está favorecida y es fuertemente fijada por el suelo coprecipitado con el hierro. Algunas bacterias reducen los compuestos orgánicos y minerales a un hidruro de selenio (H_2Se) volátil mientras que otras oxidan el selenio a selenato o a un óxido de selenio (SeO_3).

El clima, el tipo de suelo, el contenido en coloides y la concentración de materia orgánica tienen influencia variable en la disponibilidad real de selenio en el suelo. La concentración en las plantas depende de estos parámetros y de su contenido en proteínas, observándose niveles entre $0,01-1000 \mu\text{g g}^{-1}$. Las plantas con un contenido en selenio de más de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ se llaman acumuladores primarios de selenio, mientras que las que contienen entre $50-500 \mu\text{g g}^{-1}$ son acumuladores secundarios. Existen ciertas plantas que con contenidos en selenio de $30 \mu\text{g g}^{-1}$ son acumuladores secundarios. La mayoría de las plantas (forrajes, cereales y legumbres) contienen concentraciones menores a $30 \mu\text{g g}^{-1}$, generalmente entre $0,1-0,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

En el agua, el selenio aparece debido a la meteorización de las rocas y la lixiviación de los suelos, procesos que están controlados por factores biológicos y microbiológicos, encontrándose principalmente como selenato aunque el selenito y las formas organometálicas también están presentes. El contenido de selenio en aguas subterráneas y superficiales es variable pudiendo ir de $0,1$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, lo cual depende de factores físico-químicos. En las aguas potables la cantidad es más variable siendo normalmente menor o igual a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Los límites legales de

potabilidad se sitúan entre 8 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ dependiendo de las normativas de cada país² y raramente son superados.

La atmósfera juega un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del selenio⁷. Los aportes de selenio de forma natural a la atmósfera son debidos fundamentalmente a las reacciones de metilación de éste en aguas, suelos y sedimentos por acción de hongos y bacterias que dan lugar a especies volátiles como el dimetilseleniuro, además de emanaciones volcánicas, etc. La deposición atmosférica de dicho elemento contribuye a la contaminación de los demás componentes de la biosfera (agua, suelo, plantas)⁸. En el aire los niveles de selenio son generalmente bajos, entre 0,1 – 10 ng m^{-3} , aunque estos valores pueden aumentar debido a procesos de origen antropogénico (actividades industriales). El valor límite tolerable para diversos compuestos de selenio es de 0,2 ng m^{-3} en aire.

1.2.2 FUENTES ANTROPOGÉNICAS DE SELENIO

El selenio es utilizado en la fabricación de materiales semiconductores, células fotoeléctricas, máquinas fotocopadoras, vidrio, pigmentos, cerámica, plásticos, lubricantes, productos farmacéuticos, metalurgia y en la combustión de carbones y fuel-oil^{5,9,10}. La concentración media de selenio en la corteza terrestre es inferior a la del azufre, situándose en torno a 0,09 $\mu\text{g g}^{-1}$, pero en carbones y fuel-oils el intervalo varía de 0,47-8 $\mu\text{g g}^{-1}$, y de 2,4-7,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, dependiendo del tipo y origen de los mismos. Estas diferentes aplicaciones se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Usos industriales del selenio

Compuesto	Uso industrial
Selenio elemental	Rectificadores, células fotoeléctricas, Acero inoxidable, etc
Selenito	Insecticida, manufactura de vidrio, medicina veterinaria, etc
Selenato	Abonos, manufactura de vidrio, medicina veterinaria, etc
Selenodietilditiocarbamato	Fungicida
SeS ₂	Champúes, semiconductor, medicina veterinaria, etc
SeO ₂	Catalizador redox
SeF ₆	Aislante eléctrico
SeOCl ₂	Disolvente
CuSeO ₄	Aleaciones de cobre, colorante de cobre
WSe ₂	Lubricantes
Al ₂ Se ₃ , Bi ₂ Se ₃ , CuSe, InSe	Semiconductores
(NH ₄)SeO ₃ , As ₂ Se	Manufactura de vidrio rojo
CdSe	Fotoconductores, baterías solares, etc.
Selenometionina	Alimentación

El aporte antropogénico juega un importante papel en el ámbito atmosférico. Dicho aporte es producido en forma de vapor o partículas, especialmente de procesos en minas seleníferas, combustión de carbón en centrales térmicas y otras fuentes identificadas como responsables de la emisión de trazas de metales, incluyendo el selenio. De acuerdo a las condiciones meteorológicas, puede ser transportado a diversos lugares, contaminando los ecosistemas terrestres y acuáticos.

1.3 IMPORTANCIA BIOQUÍMICA DEL SELENIO

Desde que fue descubierto, el selenio fue considerado como un elemento carente de propiedades biológicas hasta que a finales de la década de los cincuenta Schwarz y Foltz observaron que pequeños aportes de selenio mejoraban la necrosis hepática y el sangrado capilar en animales con déficit de vitamina E, lo que sugería que este elemento reducía la demanda de esta vitamina¹¹. Este hecho fue motivo de gran controversia, pues resultaba difícil de comprender que un elemento que se encontraba “in vivo” en forma reducida (acción prooxidante) pudiera asumir la función antioxidante de la vitamina E. Rotruck y col.¹² en 1973 resolvieron esta paradoja al descubrir que la función antioxidante del selenio estriba en que forma parte del centro activo de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), enzima necesaria para el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares y que cataliza la reducción de una amplia variedad de peróxidos orgánicos (lipídicos) y el peróxido de hidrógeno. Estos radicales pueden formarse como consecuencia del metabolismo de sustancias tóxicas, etanol, derivados clorados y medicamentos (antibióticos) y en la sociedad actual se asocian al estrés que sufren los individuos. A partir de esto, se han descrito varios mecanismos bioquímicos que implican selenoproteínas, sobre todo la glutatión peroxidasa, formando parte de mecanismos de defensa antioxidantes^{13,14}

Existen amplias evidencias de que muchas de las enfermedades y problemas asociados a la deficiencia de selenio están causadas por la disminución de los niveles de esta enzima. Es evidente que la glutatión peroxidasa, la vitamina E y otras enzimas, como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión transferasa,

constituyen la parte esencial del mecanismo de defensa celular frente al peróxido de hidrógeno y los radicales libres, como alcoxi, peroxi e hidroxilos¹⁵. Esta protección es particularmente importante en la conservación de las membranas celulares, cuya integridad y correcto funcionamiento es fundamental para mantener en orden los sistemas y procesos biológicos en organismos superiores. Parece que, tanto el envejecimiento de los organismos, como la aparición de tumores cancerosos^{16,17}, podrían estar relacionados con los efectos degenerativos causados por los radicales libres.

Debido a ello, la mayoría de los estudios recientes intentan ver como afecta este elemento en la prevención del cáncer y los efectos que provoca^{18,19,20,21}. Estos estudios llegan a la conclusión de que existe una relación inversa entre la ingesta de selenio en la dieta y la mortalidad producida por el cáncer. Otros autores²² han propuesto la manipulación dietética como estrategia de tratamiento para la prevención del cáncer.

Igualmente, el selenio se relaciona con otro tipo de enfermedades que implican el deterioro de los tejidos, como puede ser el cardiovascular, en zonas extremadamente pobres en este metal y donde se encontraron con enfermedades endémicas asociadas a la deficiencia de selenio²³. Las enfermedades que tradicionalmente se atribuyen a esta deficiencia son:

- La enfermedad de Keshan (enfermedad cardiaca)
- La enfermedad de Kaschin (enfermedad de los huesos)
- Cretinismo endémico mixedematoso

Actualmente los estudios médicos van encaminados, además de estudiar la relación del selenio con el cáncer, a relacionar el contenido de este elemento con enfermedades que tienen gran importancia en la sociedad actual como el sida, alzheimer, diabetes, etc.

En 1994 C. Sappey y col^{24,25} encuentran que pacientes de SIDA padecen una deficiencia de selenio en el plasma, además de apreciar una disminución ostensible

en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Finalmente, en 1998²⁶ se encontró que existe una relación entre el estrés oxidativo y el estado de selenio con el desarrollo de la neuropatía diabética.

Selenoproteínas

El selenio realiza todas sus funciones biológicas mediante su incorporación a diversos sistemas enzimáticos^{27,28}. Las auténticas selenoproteínas son aquellas que contienen específicamente en su centro activo la selenocisteína y cuya actividad enzimática depende de la presencia del mismo²⁹. Las selenoproteínas identificadas en humanos incluyen:

La glutatión peroxidasa, la selenoproteína P, la iodotironina deiodinasa de tipo I, la selenofosfatasa, selenoproteína W, la selenoproteína mitocondrial, la selenoproteína prostática y la selenoproteína testicular

De todas ellas la que confiere una mayor importancia al selenio como elemento esencial, es la glutatión peroxidasa. La glutatión peroxidasa es una enzima selenio dependiente muy específica para el glutatión pero sin embargo, poco específica para los hidroperóxidos. Esto, junto al hecho de que la glutatión peroxidasa se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria como en la membrana celular, la hace ser un mecanismo de protección celular importante contra el daño oxidativo producido a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos. Su concentración varía según los tejidos. En el músculo esquelético, por ejemplo, el 45 % de su actividad es citosólica y el 55 % es mitocondrial, y además, en las fibras lentas presentan una mayor actividad la glutatión peroxidasa que en las rápidas³⁰.

Mientras la vitamina E actúa a nivel de la membrana celular impidiendo la formación de los hidroperóxidos, la glutatión peroxidasa lo hace a nivel del citosol³¹ catalizando la rápida oxidación de glutatión reducido (G-SH) a glutatión oxidado (G-S-S-G).

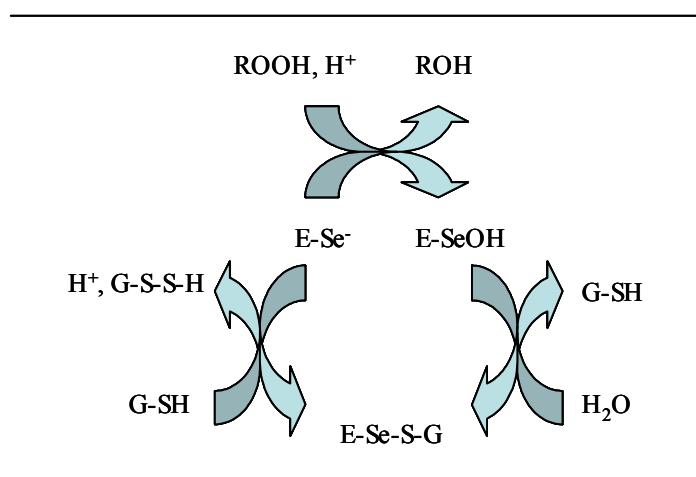
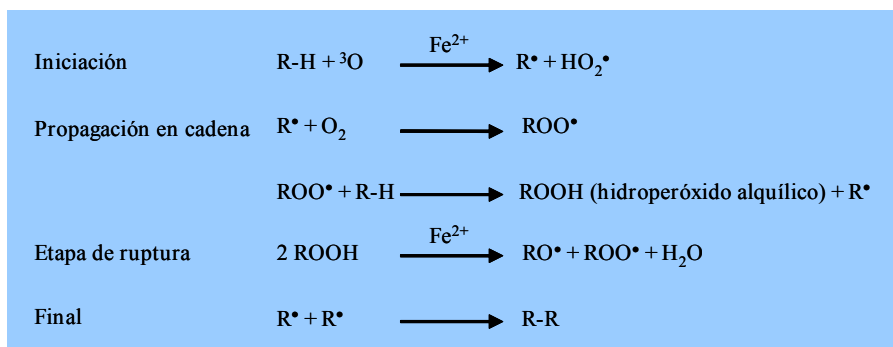


Figura 1. Reacción de la glutatión peroxidasa en la eliminación de radicales libres

A pesar de la existencia de varios mecanismos que impiden la formación de los peróxidos de hidrógeno de los ácidos grasos, existen una serie de procesos de carácter incontrolado que los favorecen, por ejemplo la presencia de metales de transición como el Fe (II), que aumentan el riesgo debido a que por cambio de sus valencias pueden seguir provocando aparición de nuevos radicales libres³². De acuerdo con el esquema que se indica a continuación, una autoxidación particularmente efectiva de las moléculas lipídicas puede ocurrir a través de una reacción de cadenas de radicales con derivaciones hechas a través de peróxidos y metales de transición, que hacen que la estabilidad y la función de la membrana se debiliten.



Debido a que el correcto funcionamiento de las membranas celulares es absolutamente esencial para todos los organismos, sus correspondientes desórdenes tienen consecuencias muy graves en la salud del individuo. La inhibición de las reacciones en cadenas autoxidativas deber ser importante para la existencia de organismo, particularmente en una atmósfera con alto contenido en oxidantes (Figura 1). Además respecto al sistema inmune la glutatión peroxidasa también parece tener un papel importante en la regulación de la cantidad de peróxido de hidrógeno³¹. Éste en pequeñas cantidades en el mismo ambiente celular parece estimular la reactividad de los linfocitos y contribuye al poder bactericida de los fagocitos; pero grandes concentraciones, presenta un efecto inhibitor, disminuyendo la capacidad inmunológica del organismo.

A la hora de que el organismo sintetice las selenoproteínas, éste tiene unas preferencias, siendo la glutatión peroxidasa una de las que ostenta una menor prioridad, por lo que es una de las primeras en disminuir y nos puede servir como indicador de un consumo insuficiente de selenio. Así durante las etapas de un consumo bajo en selenio, los órganos del cerebro, glándulas endocrinas y los órganos reproductores tienen preferencia sobre los tejidos del hígado, corazón, esqueleto, etc. Es decir tejidos donde está presente la glutatión peroxidasa, de ahí que las principales enfermedades por el déficit de selenio estén vinculadas a esta enzima.

1.4 EL SELENIO EN LOS ALIMENTOS

Como se acaba de indicar el selenio juega un importante papel en la función biológica y por ello se ha incluido en alimentos como requerimiento dietético.

El selenio se presenta principalmente en los alimentos en forma orgánica, y de modo especial como aminoácidos de selenometionina y selenocistina. La selenometionina es la forma principal y es absorbida y almacenada en el cuerpo humano. La ingesta de selenio como seleniometionina libre o levadura selenizada ha demostrado ser más biodisponible que como selenito o selenato. El selenio inorgánico es excretado, generalmente, más rápidamente y es más tóxico que la selenometionina.

Exceptuando algunas circunstancias particulares (exposición industrial, consumo accidental de reactivos que contienen selenio), la mayor parte del selenio corporal proviene de la dieta³³.

Al hablar del selenio en el medio ambiente, existen regiones que denominamos selenodeficientes, en las que la concentración de selenio biodisponible es insuficiente y los aportes de las dietas son bajos para poder satisfacer las necesidades humanas. A diferencia de éstas, existen otras regiones en las que las necesidades mínimas están suplidas debido a que la concentración biodisponible del elemento en la dieta es muy elevada.

Este contenido en los alimentos es función de la biodisponibilidad del selenio en los suelos y aguas. Además de la concentración del selenio en los suelos de la región, la concentración de éste en los alimentos depende de otros factores como el pH, la salinidad, el contenido en carbonatos, etc., que tenga dicho suelo y que afectan el paso del selenio a las plantas que lo introducen en la cadena trófica.

En un suelo ácido, la biodisponibilidad del elemento es menor, pues las especies de selenio más abundantes en este medio son poco solubles, desarrollándose en estos

terrenos plantas con bajos contenidos en selenio. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, en zonas industriales. Por el contrario, en suelos en los que predominan los selenatos, suelos alcalinos, oxidados, ocurre todo lo contrario, debido a que estas especies altamente movibles son más biodisponibles para las plantas. Las plantas absorben el selenio inorgánico y usan este selenio inorgánico para sintetizar selenoaminoácidos, selenometionina, selenocisteína, selenocistina y selenometilselenocisteína. Esta transformación se puede observar en la Figura 2.

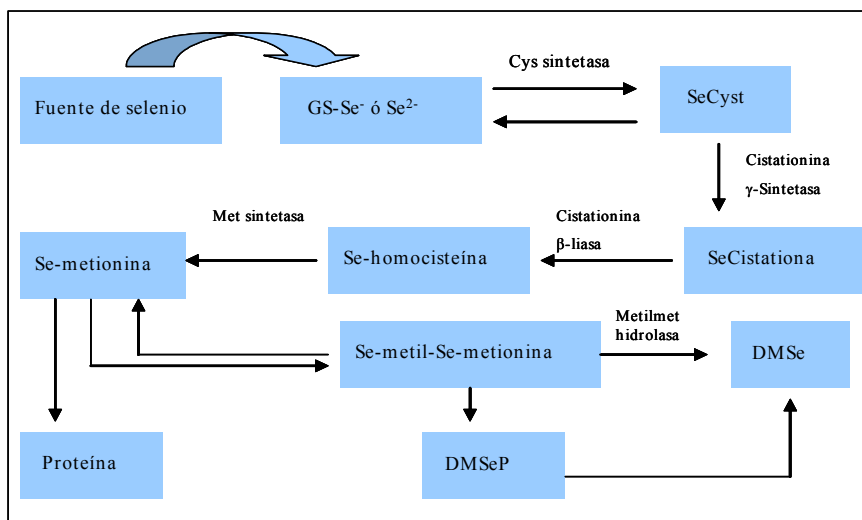


Figura 2. Transformación biogénicas del selenio en las plantas

La biodisponibilidad del elemento para los vegetales de la zona determinará el contenido del metal en los demás eslabones de la cadena trófica.

Dentro de los alimentos que componen de modo general nuestra dieta, cabe destacar como fuente de selenio los pescados y mariscos, las carnes y en menor medida los cereales, frutos secos, huevos, etc. Sin embargo, las frutas, legumbres, leche y derivados lácteos (a excepción de determinados tipos de quesos), las materias grasas y las bebidas son fuentes pobres en selenio^{34,35,36}. Debido a la poca aportación de selenio por parte de estos alimentos, se destacará la leche y el pan,

alimentos de gran consumo en la sociedad, sea cual sea la cultura y las costumbres alimenticias.

En general, los organismos marinos poseen mayores concentraciones de selenio que los animales terrestres. El ciclo biogeoquímico del selenio en el medioambiente marino transforma las formas inorgánicas de este elemento a compuestos organometálicos como dimetilseleniuro³⁷ y selenoaminoácidos³⁸. Una vez los organismos marinos, pescados y mariscos, son consumidos por los seres humanos en su dieta, la biodisponibilidad del selenio (20-50%) presente en estos alimentos varía en función de la unión del selenio al mercurio y otros metales pesados.

Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la necesidad fisiológica del selenio en los seres humanos y fijan los valores de la ingesta de selenio por día. En 1980 la Academia Americana de las Ciencias, estimó que la cantidad inofensiva y adecuada de selenio era de 50-200 μg de selenio por día para un adulto. En posteriores estudios³⁹, nos indican una ingesta adecuada de selenio en función del individuo tal y como se muestra en la Tabla 2, aumentando el intervalo adecuado entre los valores de 50-400 μg . La cantidad mínima necesaria de selenio es diferente en regiones del mundo con déficit de selenio como Nueva Zelanda que consume de 28 a 32 μg de selenio por día y no presenta signos clínicos de deficiencia, o en China, donde la enfermedad de Keshan no aparece si el aporte alimentario medio es superior a los 30 μg por día. En los países europeos se estima que una ingesta de 55 a 70 μg por día es adecuada.

Tabla 2. Valores recomendados por National Research Council de consumo de selenio por individuo

Ingesta dietética recomendada			
Grupo personas	Ingesta recomendada	Ingesta recomendada	
	$\mu\text{g}\text{d}\text{i}\text{a}^{-1}$ / (Año 1989)	Las ingesta	Nivel máximo
		recomendadas	tolerable
Niños			
0-6 meses	10	-	45
6-12 meses	15	-	60
1-3 años	20	20	90
4- 8 años	20	30	150
Chicos			
9-13	40	40	280
14-18	50	55	400
Chicas			
9-13	45	40	280
14-18	50	55	400
Hombres			
19-30	70	55	400
31-50	70	55	400
51-70	70	55	400
>70	-	55	400
Mujeres			
19-30	55	55	400
31-50	55	55	400
51-70	55	55	400
>70	-	55	400
Embarazadas			
14-50	65	60	400
Periodo lactancia			
24-50	75	70	400

Existen estudios realizados en Galicia (región considerada probablemente como selenodeficiente debido al marcado carácter ácido de sus suelos) donde se trata de

establecer si la ingestión de selenio por persona y día^{40,41}, en función de los contenidos del elemento en los alimentos de la dieta (Tabla 3), se encuentra comprendida en el intervalo recomendado por la Comisión de Alimentos y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias de Washington en 1980. En el trabajo llevado a cabo por M. C. Mejuto Martí⁴⁰ y col. se emplean seis dietas teóricas basadas en el modelo de Randoín y col⁴². En ambos trabajos se llega a valores de ingesta de selenio muy similares e igualmente resaltan que no existen grandes diferencias entre las dietas rurales y urbanas. Ambos estudios dan como valor medio ingerido en la dieta de la población gallega entorno a los 98 μg Se por persona y día utilizando el método Randoín y col, y un valor de 92 μg Se por persona y día en el estudio de OERGA. Ambos valores están comprendidos dentro del intervalo de ingestión diario estimado como seguro y adecuado por la Comisión de Alimentos y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias de Washington³⁹ (50-400 μg Se por persona al día).

Tabla 3. Contenido de selenio en los alimentos y aporte a la dieta de la población gallega

Producto	Estudio Radoín		OERGA
	[Se] $\mu\text{g g}^{-1}$	μg Se por persona y día	μg Se por persona y día
Leche	0,01	2,8	3,29
Pescado	0,84	21	52,42

Carne	0,09	91	90,64
Embutidos	0,26	6,5	3,54
Huevos	0,70	14	25,90
Legumbres frescas	0,05	15,3	8,15
Legumbres secas	0,02	0,38	0,24
Frutas	0,03	4,34	3,98
Setas	0,69	6,9	6,90
Pan	0,03	11,2	8,37
Harinas y derivados	0,03	1,19	1,77
Queso	0,09	3,64	1,00
Yogur	0,10	4,75	0,45
Cacao	0,03	0,29	0,19
Patatas	0,02	4,5	9,03
Total ($\mu\text{g Se día}^{-1}$)		188	216
Kcal dieta		2436	2328
$\mu\text{g Se 1000 Kcal dieta}^{-1}$		77	93

En la tabla anterior se puede observar lo indicado anteriormente, las carnes, pescados y setas son los alimentos de mayor contenido en selenio consumidos por la población gallega.

Aunque el estudio llevado a cabo M. C. Mejuto Martí y col.⁴⁰ indica que el nivel de selenio en la dieta de los gallegos está dentro del intervalo recomendado, esto es realizado de forma teórica. En este mismo sentido y para establecer el consumo de selenio en los recién nacidos, se llevó a cabo una tesis doctoral⁴³ donde se intentó establecer los contenidos de selenio en la leche materna y fórmulas infantiles que se encuentran en el mercado. Esto se llevó a cabo debido que en esta etapa de la vida el selenio tiene una gran importancia para el niño y en anteriores estudios con neonatos gallegos se apreció que existían bajos niveles séricos de selenio⁴⁴.

En estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación por M. J. Lorenzo Alonso⁴⁵, en los que se ha evaluado un grupo de mujeres y sus hijos determinando el contenido de selenio en la sangre de las madres y de los niños, en la placenta, en el cordón umbilical, en el pelo y las uñas se ha puesto de manifiesto que los niveles de selenio en los citados medios biológicos son bajos.

En este mismo estudio, igualmente se afirma que los niveles de selenio dependen de la situación geográfica. Así, las zonas costeras presentan un nivel superior de selenio en los distintos medios biológicos estudiados que los de la zona interior de Galicia, lo cual puede ser debido a un mayor consumo de productos del mar. Igualmente estudios realizados por Fraga y col.⁴⁶ determinan el selenio en medios biológicos de las madres y sus hijos encontrando que los valores de selenio en los distintos medios biológicos estudiados corresponden a zonas selenodeficientes.

1.5 TOXICIDAD DEL SELENIO

En general, el selenio es considerado un elemento esencial. Sin embargo este elemento puede producir efectos tóxicos cuando se produce una exposición a concentraciones superiores a 400 µg por día³⁹ aunque no está claro este límite y otros organismos de control fijan otras cantidades superiores. Además, el valor de toxicidad a la exposición está también condicionado por diferentes factores entre los que destacamos:

- a) La especie química; son más tóxicas las formas inorgánicas que las orgánicas y más el selenio (IV) que el selenio (VI).
- b) El pH; a pH neutro se favorece la complejación del elemento, disminuyendo su toxicidad.
- c) El mecanismo de transporte, la especies organometálicas se difunden rápidamente a través de las membranas y eso aumenta la toxicidad.

- d) La interacción con otros metales (plata, arsénico, cobre) que pueden alterar la toxicidad debido a la formación de complejos.
- e) La naturaleza de la matriz del alimento ingerido, si es de naturaleza proteica, un carbohidrato, etc.
- f) De la especie animal afectada, edad, sexo, etc.

La toxicidad de selenio a elevadas concentraciones se debe a su intervención en procesos metabólicos que incluyen grupos $-SH$. Salvando su acción tóxica irritante o cáustica, desde el punto de vista general, el selenio actúa sustituyendo al azufre en diversas biomoléculas. La actividad de la cisteína y la metionina, debido a la formación de puentes disulfuro y a los grupos tioles, se ve afectada cuando el selenio (en niveles muy superiores a los normales) sustituye al azufre. Las nuevas proteínas resultan menos estables debido a la mayor reactividad del selenio, y cambian tanto estructural como funcionalmente. Estos cambios se producen con mayor facilidad cuanto más soluble y por tanto, absorbible es el compuesto responsable².

La alta toxicidad de los compuestos de selenio se conoce desde 1934 cuando se relacionó la enfermedad de “mal alcalino” en el ganado doméstico con altas concentraciones de selenio en el forraje, observándose una sintomatología clínica caracterizada por la debilidad e inflamación de las pezuñas, pérdida de visión, cuernos y pelos hasta provocar la muerte por fallo respiratorio.

Las primeras evidencias de esta enfermedad en humanos se manifestaron en la década de los sesenta en China, causada por la ingestión de maíz con alta concentración de selenio y que se manifestó con la caída de uñas y pelo, irritación de la piel y ojos y caries².

El envenenamiento con selenio por ingestión produce vómitos, diarrea, dolor abdominal, alteraciones de la conciencia, coma, espasmos musculares, llegando incluso a la muerte. Esto se ha demostrado para las especies inorgánicas de selenio, produciéndose mortalidad de animales cuando la concentración tanto de selenitos

como de selenatos en aguas potables sobrepasa los 6-9 $\mu\text{g L}^{-1}$. En humanos, la LD_{50} es de 0,5-1,0 g de selenio en ambas especies.

Cuando el selenio elemental se absorbe oralmente no se ha apreciado toxicidad, pero cuando el selenio está en forma de vapor o polvo fino en suspensión causa irritación en el tracto respiratorio. Así mismo se puede producir irritación en la piel y en los ojos por contacto con el SeO_2 .

Entre las especies de selenio más probables de producir este tipo de desórdenes clínicos se encuentran: SeO_2 , SeOCl_2 , H_2Se , y SeF_6 , todas ellas volátiles y producidas industrialmente.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

-
1. J. D. Odom. *Selenium Biochemistry Chemical and Physical Studies*, 1983, Springer-Verlang Berlin Heidelberg, pag. 1-26.
 2. S. E. Raptis, G. Kaiser, G. Tölg. *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 1984, **17**, 113-170.
 3. V. Kos, M. Verber, V. Hudnik, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1998, **360** (2), 225-229.
 4. P. B. Moser-Veillon, A.R. Mangels, K. Y. Patterwon, C. Veillon, *Analyst*, 1992, **117** (3), 559-562.
 5. R. Muños Olivas, O.F. X. Donard, C. Cámara, P. Quevauviller, *Analytica Chimica Acta*, 1994, **286**, 357-370.
 6. Y. Cai, M. Cabanas, J. L. Fernández-Turiel, M. Abalos, J. M. Bayona, *Analytica Chimica Acta*, 1995, **314** (3), 183-192.
 7. I. de Gregori, M. G. Lobos, H. Pinochet, *Water Research*, 2002, **36**, 115-122.
 8. A. D'Ulivo, *Analyst*, 1997, **122** (12), 117R-144R.
 9. L. Fishbein, *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 1984, **17**, 113-170.

-
10. G. N. Schrauzer, *Journal of Nutrition*, 2000, **130**, 1653-1656.
 11. K. Schwarz, C. M. Foltz, *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79**, 3292-3293.
 12. J. T. Rotruck A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D.G. Hafeman, W. G. Hoekstra, *Science*, 1973, **179** (73), 588-590.
 13. A. Muller, E. Cadenas, P. Graf, H. Sies, *Biochemical Pharmacology*, 1984, **33** (20), 3235-3239.
 14. R. Pérez-Campo, M. López-Torres, C. Rojas, S. Cadenas, G. Barja, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 1993, **105B** (3-4), 749-55.
 15. J. J. Wen, G. Vyatkina, N. Garg, *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, **37** (11), 1821-1833.
 16. B. Sancak, A. Unal, S. Candan, U. Coskun, N. Gunel, *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 2003, **16** (2/3), 87-94.
 17. F. F. Chu, R. S. Esworthy, J. H. Doroshov, *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, **36** (12), 1481-1495.
 18. L. C. Clark, G. F. Combs, B. W. Turnbull, E. H. Slate, D. K. Chalker, J. Chow, L. S. Davis, R. A. Glover, G. F. Graham, E. G. Gross, A. Krongrad, J. L. Lesher, H. K. Park, B. B. Sanders, C. L. Smith, J. R. Taylor, *Journal of the American Medical Association*, 1996, **276**, 1957-1963.
 19. J. E. Spallholz, V. P. Palace, T. W. Reid, *Biochemical Pharmacology*, 2004, **67** (3), 547-554.
 20. N. M. Corcoran, M. Najdovska, A. J. Costello, *Journal of Urology*, 2004, **171** (2), 907-910.
 21. P. D. Whanger, *British Journal of Nutrition*, 2004, **91** (1), 11-28.
 22. C. T. Lee, W. R. Fair, *Seminars in Urologic Oncology*, 1999, **17** (3) 154-163.
 23. F. Y. Yang, Z. H. Lin, S. G. Li, B. Q. Guo, Y. S. Yin, *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 1988, **2** (3), 157-163.
 24. C. Sappey, S. Legrand-POels, M. Best-Belpomme, a. Favier, B. Rentier, J. Piette, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1994, **10** (11), 1451-1461.

-
25. R. Kupka, G. I. Msamanga, D. Spiegelman, S. Morris, F. Mugusi, D. J. Hunter, W. W. Fawzi, *Journal of Nutrition*, 2004, **134** (10), 2556-2560.
 26. A. Martínez-Blasco, F. Bosch-Morell, C. Trenor, F. J. Romero, *Biofactors*, 1998, **8** (1-2), 41-43.
 27. S. G. Patching, P. H. E. Gardiner, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 1999, **13**, 193-214.
 28. D. H. Holben, A. M. Smith, *Journal of the American Dietetic Association*, 1999, **99** (7), 836-843.
 29. C. Sturchlerpierrat, P. Carbon, A. Krol, *Medicine Sciences*, 1995, **11**, 1081-1088.
 30. L. L. Ji, C. Leeuwenburgh, S. Leichtweis, M. Gore, R. Fiebig, J. Hollander, J. Bejma, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, **854** (Towards Prolongation of the Health Life Span), 102-117.
 31. H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, **57** (3-4), 134-144.
 32. T. P. Whitehead, G. H. G. Thorpe, S. R. J. Maxwell, *Analytica Chimica Acta*, 1992, **266** (2), 265-277.
 33. D. G. Barceloux, *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*, 1999, **37** (2), 145-172.
 34. O. Oster, W. Prellwitz, *Biological Trace Element Research*, 1989, **20** (1-2), 1-14.
 35. M. Matek, M. Blanus, J. Grgic, *European Food Research and Technology*, 2000, **210** (3), 155-160.

 36. V.A. Maihara, I.B. Gonzaga, V. L. Silva, D. I. T. Favaro, M. B. A. Vasconcellos, S. M. F. Cozzolino, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2004, **259** (3), 465-468.
 37. T. D. Cooke, K. W. Bruland, *Environmental Science and Technology*, 1987, **21** (12), 1205-1210.
 38. W. Maher, S. Baldwin, M. Deaker, M. Irving, *Applied Organometallic Chemistry*, 1992, **6** (2), 103-112.

-
39. E. R. Monsen, *Journal of the American Dietetic Association*, 2000, **100** (6), 637-640.
 40. M. C. Mejuto Martí, M. H. Bollain Rodríguez, F. Bermejo Martínez, *Boletín Academia Galega de Ciencias*, 1986, **V**, 41-48.
 41. Observatorio Estadístico Regional de Galicia (OERGA). La alimentación en Galicia. Instituto Nacional de Estadística, 1980.
 42. Randoín Le Galli, Guserey y Duchene, *Rations Equilibrees*, 1969, Ed Foucher, 8ª Edition, Hygyene, Tomo I, París, pag. 35.
 43. J. Barciela García, *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España, 1999.
 44. J. R. Cervilla, *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España, 1988.
 45. M.J. Lorenzo Alonso, *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España, 2001.
 46. J. M. Fraga, J. A. Cocho de Juan, M. L. Couce Pico, J. R. Cervilla, *Proceedings of the International Symposium on the Uses of Selenium and Tellurium*, 1994, **8-10**, 157-158.

2.1 INTRODUCCIÓN

El creciente interés en la determinación de elementos traza en alimentos y en la identificación de su función en los procesos bioquímicos hace necesario desarrollar nuevos estudios para conocer los niveles de estos elementos en los alimentos. Aunque los estudios más recientes se fijan como objetivo la identificación de las diferentes formas, de acuerdo con su toxicidad y biodisponibilidad, nadie discute el interés de determinar la concentración total del elemento traza en los alimentos. En este estudio se determinará el contenido de selenio en leche, alimento ampliamente consumido por la población, no sólo como leche sino también sus derivados, yogures, queso, etc.

La determinación de selenio ha recibido una especial atención en los últimos años ya que su determinación constituye un problema analítico complejo. Este problema se acrecienta en la leche ya que el selenio se encuentra en concentraciones muy bajas y la leche es una matriz complicada. En este sentido, se buscan técnicas analíticas que posean unas determinadas características: elevada sensibilidad, una preparación de la muestra sencilla con una utilización mínima de reactivos, mínimo coste, poca manipulación y por último, eliminación de interferencias en la medida.

La determinación del contenido total de metales traza en muestras biológicas se lleva a cabo siguiendo distintas metodologías, pero todas ellas siguen una estrategia común, la de incluir una serie de etapas como el pretratamiento de la muestra, detección y cuantificación. Dependiendo de la muestra, puede ser necesaria la introducción de un mayor número de etapas en el proceso de pretratamiento de la misma, como puede ser una limpieza previa, derivatización, preconcentración, etc. Un esquema general para la determinación del contenido total de metales traza se observa en la Figura 1.

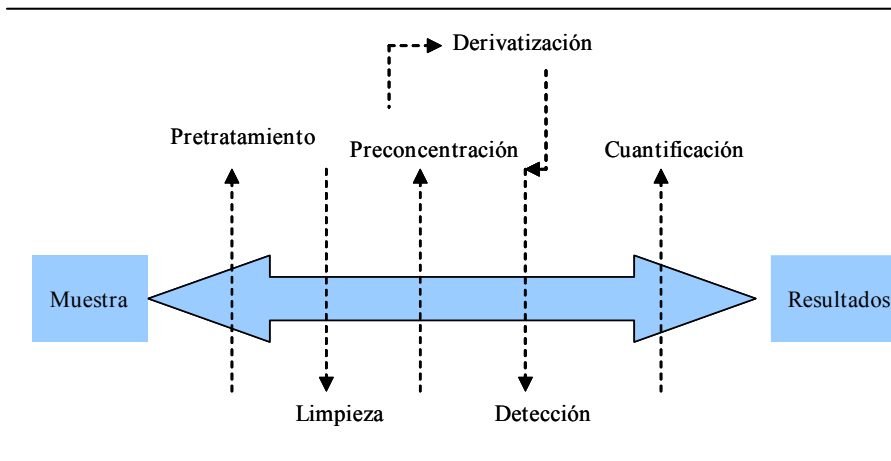


Figura 1. Estrategia secuencial para la determinación del contenido total de metales traza en muestras biológicas

2.2 OBJETIVO

El primer objetivo del trabajo planteado en este capítulo es desarrollar y optimizar un método analítico que nos permita la determinación del contenido de selenio en muestras de leche de vaca. Una vez optimizado este método se aplicará a muestras comerciales de leches enteras y desnatadas con el objeto de comparar si el

tratamiento al que se somete la leche para eliminar la grasa influye en el contenido de este nutriente en las mismas.

El segundo objetivo planteado para este capítulo será el estudio de la distribución de selenio en los distintos componentes de la leche de vaca (suero lácteo, micelas de caseína y nata) y tratará de establecer una relación, si existe, que relacione el contenido de selenio en la leche y en sus componentes.

2.3 DETERMINACIÓN DE SELENIO EN LECHE MEDIANTE GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (HGAAS)

2.3.1 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA EN MEDIOS BIOLÓGICOS

Un adecuado pretratamiento de la muestra es imprescindible como paso previo a la posterior determinación analítica. Dicho pretratamiento de la muestra debe de ser sencillo y rápido para que el método no se haga tedioso. En este sentido, la mínima

manipulación de la muestra sería la deseable, lo que evitaría el riesgo de contaminación y pérdidas del analito. Pero esto no siempre es posible, sobre todo en muestras que presenten una matriz compleja. Igualmente, se busca una mínima utilización de reactivos, ahorro económico y menor riesgo medioambiental.

Al medir el selenio en muestras biológicas como la leche es necesario llevar a cabo un pretratamiento de la muestra. Esta fase de pretratamiento de muestra consiste normalmente en una destrucción la materia orgánica para liberar el ión metálico y posteriormente realizar su determinación mediante alguna técnica analítica. Las digestiones húmedas de la muestra con ácidos concentrados¹, como el ácido nítrico, ácido perclórico, o con álcalis como hidróxido de tetrametilamónio², son los procedimientos más utilizados en el tratamiento de la muestra para determinar metales en medios biológicos por las diferentes técnicas de espectroscopía atómica. En los métodos clásicos^{3,4} de digestión, se suministra calor por conducción y se necesita un tiempo mínimo para obtener la digestión completa, de una a dos horas y, en muchos casos, este tiempo puede ser aún mayor. Sin embargo este tiempo exigido para llevar a cabo la destrucción total de la muestra se reduce cuando se utiliza la energía de microondas para acelerar el proceso de digestión. Por consiguiente, muchas aplicaciones de digestiones ácidas asistidas por energía de microondas pueden encontrarse en la bibliografía reciente para la determinación de selenio en leche^{5,6,7,8,9}. Este tipo de procedimientos destruye la matriz de la leche completamente en pocos minutos usando ácidos concentrados. Las mayores diferencias existentes para los distintos tratamientos desarrollados con la energía de microondas y otras fuentes de energía, radican principalmente en los agentes oxidantes y en los intervalos de tiempo utilizados.

Alrededor de la década de los ochenta, se desarrollaron procedimientos basados en el análisis de muestras sólidas, particularmente para espectroscopía absorción atómica con llama y espectroscopía absorción atómica con atomización electrotérmica haciendo uso de suspensiones. Las suspensiones consisten en la dispersión de un sólido en una fase líquida y tienen la característica de que pueden transportarse como las disoluciones.

Esta metodología alternativa evita la digestión de la muestra completa y el empleo de ácidos concentrados y los riesgos que conlleva su uso. La técnica de las suspensiones para determinar metales traza en leche, la cual ya es una disolución líquida, no está tan extendida como las digestiones ácidas asistidas por microondas pero se pueden encontrar varios trabajos en la bibliografía que se decantan por la misma^{10,11}.

Por último, también se pueden encontrar trabajos donde la muestra de leche se introduce directamente, evitando así riesgos de contaminación y pérdida del analito¹². Esta forma de trabajar se puede llevar a cabo usando una técnica analítica que permite la introducción de la muestra de forma directa, como es la espectroscopía absorción atómica con atomización electrotérmica, donde la muestra se introduce directamente y la matriz se destruye en el tubo de grafito liberando así el analito. Aunque este método presenta estas ventajas no es muy utilizado debido a que está limitado a pocas técnicas analíticas y éstas no presentan una sensibilidad suficiente para determinar el selenio en las muestras de leche.

2.3.2 MÉTODOS PARA DETERMINAR SELENIO TOTAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Una vez ha sido destruida la materia orgánica y los metales se encuentran en la disolución resultante, es necesario llevar a cabo la detección mediante técnicas analíticas que nos permitan tanto identificar la especie como llevar a cabo su cuantificación. En el caso de la determinación de selenio total en muestras biológicas las técnicas analíticas más empleadas son:

- Espectrometría de fluorescencia molecular

La espectrometría de fluorescencia molecular^{13,14} se encuentra entre los métodos de cuantificación más antiguos en la determinación de selenio. Esta técnica se basa en las propiedades fluorescentes de los selenoselenoles, los cuales se forman tras la

reacción del selenio (IV) con diaminas aromáticas, generalmente diaminonaftaleno. Es una técnica muy sensible pero su principal inconveniente es que es un método muy laborioso y puede provocar pérdidas de analito o contaminación.

- Fluorescencia de Rayos X

Hasta la década de los noventa, la fluorescencia de rayos X no alcanzó los límites de detección adecuados para la determinación de selenio en muestras biológicas. El método consiste fundamentalmente en irradiar la muestra con un haz de rayos X procedente de una fuente radioactiva o de tubo de rayos X de alta potencia, el cual sin saturar el detector de rayos X produce una excitación del selenio por absorción del haz primario y produce la emisión de rayos X fluorescentes que son recogidos y cuantificados. La fluorescencia de rayos X fue utilizada en la determinación de selenio en diferentes muestras de origen biológico¹⁵ y también en leche¹⁶, muestra objeto de nuestro estudio.

Los instrumentos modernos de fluorescencia de rayos X son capaces de proporcionar análisis cuantitativos de materiales complejos con una precisión que iguala o supera a las técnicas utilizadas usualmente para el análisis de selenio, como el análisis por espectrometría de absorción atómica. Para que esta precisión se alcance se ha de disponer de estándares de calibrado que se aproximen lo más posible a la muestra tanto en composición física como química.

- Análisis de activación neutrónica

El estudio de radioisótopos de selenio en leche^{17,18,19} y en sistemas biológicos²⁰ se ha utilizado considerablemente. Los métodos de activación de neutrones se basan en la medida de la radioactividad que ha sido inducida en la muestras por irradiación con neutrones o partículas cargadas, tales como los iones hidrógeno, deuterio o helio. La mayor parte de los métodos de activación se basan en utilizar neutrones térmicos producidos en los reactores nucleares. Es una de las técnicas que mejores resultados

proporciona y se considera una técnica de referencia para la determinación de selenio.

- Espectrometría de absorción atómica

La espectrometría de absorción atómica es comúnmente utilizada para la determinación de elementos traza debido a su alta sensibilidad. Dentro de las técnicas espectrometría de absorción atómica las más utilizadas en la determinación del selenio son la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica y la espectrometría de absorción atómica acoplada a la generación de hidruros.

La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica es una técnica rápida, emplea pequeñas cantidades de muestra, no precisa pasos previos de pretratamiento de la muestra en algunos casos¹² y consigue buena sensibilidad cuando se superan las interferencias espectrales. El problema que nos presenta esta técnica son el gran número de interferencias en la determinación de selenio y los límites de detección y cuantificación relativamente altos, las cuales hacen que el análisis sea muy laborioso y no válido para todas las matrices, entre ellas la leche. Aún teniendo en cuenta estos inconvenientes se pueden encontrar en bibliografía autores que utilizan esta técnica para la determinación de selenio en muestras de leche^{21,22,23}.

La obtención del hidruro que se acopla posteriormente a la espectrometría de absorción atómica consigue eliminar gran número de estas interferencias, debido a la separación del analito de la matriz por volatilización en forma de hidruro gaseoso. La técnica está libre de interferencias espectrales causadas por la absorción de fondo y debido a que pocos elementos dan lugar a especies volátiles, las interferencias en fase vapor son mínimas. Esta técnica presenta como principal inconveniente la necesidad de un pretratamiento de la muestra que consiga que todo el selenio presente en la muestra se encuentre como selenio (IV), única especie que genera el hidruro.

La determinación de selenio por espectrometría de absorción atómica acoplada a la generación de hidruros ha sido estudiada por numerosos autores y aplicada al análisis de muestras de muy distinto origen, incluido la leche^{5,8,24,25,26}.

- Generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica

Hoy día, la espectrometría de fluorescencia atómica es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de metales capaces de formar hidruros volátiles. Ello es debido a que es una alternativa relativamente económica respecto a técnicas como la espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción y muy sensible para la determinación de selenio en muestras biológicas. Los límites de detección se encuentran del orden de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$. En un repaso de la bibliografía se encuentra una serie de trabajos que aplican esta técnica para determinar el contenido total de selenio en diferentes muestras de leche^{1,7,11}.

- Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción

La espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción se utiliza generalmente en el análisis de elementos traza por ser una técnica muy sensible y por su capacidad multielemental, aunque presenta un gran número de interferencias. En el caso concreto del selenio, presenta límites de detección no muy bajos y un gran número de interferencias, si comparamos esta técnica tomando como referencia otras técnicas empleadas en la determinación de selenio como espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción o la generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica. Aún así, esta técnica ha sido utilizada con éxito en muestras de leche^{27,28,29}.

- Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción

Probablemente sea la técnica más usada en la determinación de selenio actualmente. Con esta técnica se consiguen límites de detección muy buenos y

necesitan un mínimo pretratamiento de la muestra. El analito es atomizado e ionizado dando lugar a iones cargados que son directamente introducidos en el interior del espectrómetro de masas. Debido al elevado grado de ionización de los metales en el plasma y a las pocas interferencias obtenidas los límites de detección con esta técnica son excelentes. Si hacemos un recorrido a través de la bibliografía que utiliza esta técnica como detector de selenio en muestras de leche nos encontramos con numerosos trabajos^{9,30,31,32,33,34}.

- Espectrometría de masas con dilución isotópica

Dentro de las técnicas que utilizan la espectrometría de masas como detector es necesario mencionar la dilución isotópica, la cual sólo se puede usar para elementos que presenten más de un isótopo. La dilución isotópica con espectrometría de masas es una técnica rápida, precisa, independientemente de la matriz y exacta, lo que la convierte en una de las técnicas con más futuro y de gran importancia para el análisis de elementos traza. Esta técnica se ha aplicado al análisis de selenio en muestras de leche^{35,36,37} aunque en esta matriz no es ampliamente utilizada.

Dentro de esta técnica se han desarrollado algunas variantes:

- Dilución isotópica con espectrometría de masas con ionización térmica negativa (NTI-IDMS), fue empleada en leches por K. G. Heumann³⁸ y colaboradores. El principal inconveniente es la preparación de la muestra que es muy laboriosa y necesita una instrumentación muy específica.
- Espectrometría de masas con ionización secundaria (SIMS).
- Acelerador de espectrometría de masas (AMS)

Aunque estas dos técnicas no se han aplicado al análisis de selenio en leche por el momento.

En este capítulo vamos a desarrollar la cuantificación del selenio total en muestras de leche. Para lograrlo es indispensable la puesta a punto de un pretratamiento de la muestra que nos permita extraer el selenio completamente de la matriz. Esta preparación de la muestra estará condicionada por el detector a emplear.

Para la realización de este trabajo, de todos los métodos comentados anteriormente, se ha seleccionado la generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica ya que es una técnica, rápida, simple, barata y que ofrece la suficiente sensibilidad para determinar selenio en muestras de leche.

2.3.3 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LECHE

Las dos técnicas más empleadas en el pretratamiento de muestras, para su posterior análisis por técnicas de espectroscopía de absorción atómica o de fluorescencia atómica, son las digestiones ácidas o las suspensiones debido a las ventajas que presentan ambas frente al resto de procedimientos utilizados. Aunque en los últimos años se buscan alternativas a estas técnicas de trabajo, estos dos procedimientos siguen teniendo una gran vigencia. La digestión enzimática o extracciones ácidas se presentan como las alternativas a estos procedimientos. Estas dos técnicas han sufrido un gran desarrollo y utilización en análisis de elementos traza en los últimos años. La extracción enzimática se usa en la mayoría de los casos para llevar a cabo trabajos de especiación ya que es un método menos agresivo que las digestiones o extracciones ácidas.

En esta parte del trabajo nos hemos decantado por una digestión ácida asistida por energía de microondas frente otros posibles tratamientos. Esta elección fue tomada debido a que facilitaba la posterior medida del analito por la técnica que se ha elegido para llevar a cabo la cuantificación del mismo.

Las razones que nos han llevado a tomar esa decisión fueron:

- La generación del hidruro de selenio sólo se produce con selenio (IV). Por ello es necesario llevar a cabo una preparación de la muestra que extraiga todo el selenio y posteriormente lo transforme en selenio (IV) para poder llevar a cabo la medida por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica.
- La generación del hidruro es necesario llevarla a cabo en un medio ácido.

- El uso de enzimas hace que el coste de la técnica a emplear aumente considerablemente debido al coste de estos reactivos.
- En este estudio la introducción de la muestra en el sistema de generación de hidruros lo vamos a llevar a cabo con un sistema de inyección en flujo lo que complica mucho el uso de suspensiones que pueden atascar los conductos y válvulas del sistema.

En este estudio se optimizarán dos procedimientos, uno desarrollado para un horno de microondas doméstico (Taurus, potencia máxima 800W) y otro para un microondas de laboratorio ETHOS PLUS. Una vez optimizados los dos métodos se llevará a cabo una comparación de los resultados obtenidos con cada uno de los hornos microondas empleados.

El pretratamiento de la muestra que nos planteamos desarrollar en este estudio consiste en tres etapas:

- Una primera etapa donde se llevará a cabo la destrucción de la matriz para liberar el analito, lo que consideramos la digestión ácida de la muestra.
- Una segunda etapa, en la cual se realizara una reducción del selenio desde la forma selenio (VI) a la forma selenio (IV), debido a que esta última es la forma que da lugar al hidruro.
- Finalmente, se incluirá una última etapa donde se eliminarán los vapores nitrosos formados y que interfieren en la generación del hidruro de selenio.

Cada una de estas etapas del procedimiento de pretratamiento de la muestra empleado en este estudio ha sido optimizada de forma independiente, tomando como punto de partida un método para análisis de selenio en muestras biológicas desarrollado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo³⁹.

2.3.3.1 Optimización del pretratamiento de la muestra para la determinación de selenio en leche de vaca con un horno de microondas de uso doméstico

Se han optimizado las variables que están involucradas en una digestión ácida de las muestras de leche para la posterior determinación de selenio por espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros. Como se ha comentado, se tomará como punto de partida un método de digestión ácida asistida por radiación de microondas desarrollado en un microondas de uso doméstico. El esquema de este procedimiento se muestra en la Figura 2.

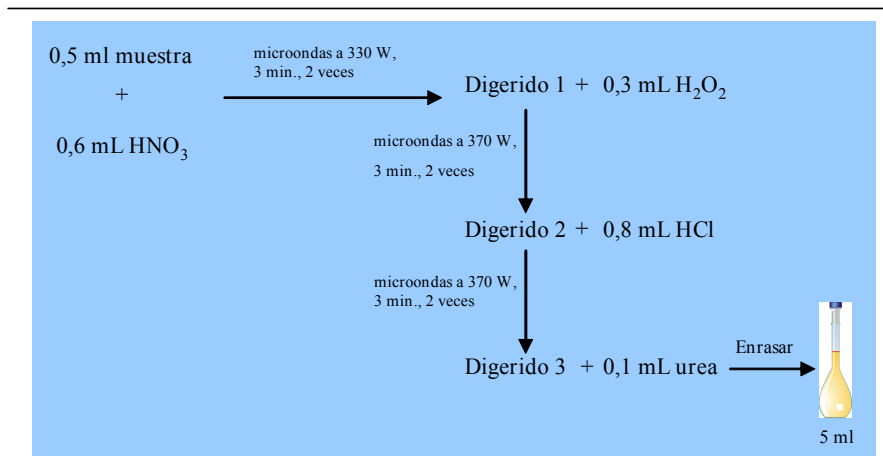


Figura 2. Método tomado de partida para realizar la digestión ácida de muestras de leche

Aunque parece lógico suponer que si esta digestión era óptima para la determinación de selenio en otras muestras biológicas también sería válida para la determinación de selenio en muestras de leche de vaca, tras llevar a cabo una serie de digestiones con estas condiciones, se puede ver que esta suposición de partida no es correcta.

Por lo tanto, se llevará a cabo una optimización de este método para la leche de vaca, en el cual se van estudiar los siguientes parámetros:

- Tiempo de permanencia de las muestras en el microondas
- Cantidad de ácido nítrico
- Cantidad de peróxido de hidrógeno

La optimización de los volúmenes de ácido y peróxido de hidrógeno empleados y del tiempo de permanencia de las muestras en el horno de microondas se ha realizado mediante un método de prueba-error. Esta técnica consiste en fijar todas las variables objeto de estudio, excepto una. Estos valores pueden ser escogidos al azar o ser fijados por conocimientos adquiridos con anterioridad. En nuestro caso los fijaremos con ayuda de los valores obtenidos en la digestión ácida que tomamos como referencia para este estudio. Una vez establecidos los valores de partida, se han realizado una serie de experimentos variando el valor de la variable que queremos estudiar hasta encontrar el valor que nos produzca un mejor resultado. A continuación se realiza lo mismo con cada una de las variables, de una en una, hasta conseguir un resultado para nuestro sistema que no sea mejorable. Se ha descartado el uso de un diseño de experimentos debido a la imposibilidad de obtener una variable independiente, que sea cuantificable numéricamente, que nos pueda indicar la mejoría de nuestra digestión ácida.

- Tiempo de exposición a la energía de microondas

Se preparó una serie de seis bombas de teflón de baja presión conteniendo cada una 0,5 mL de leche de vaca y 2 mL de ácido nítrico y se sometió durante dos etapas de tres minutos a la radiación de microondas con una potencia de 330 W, dejando enfriar dos minutos entre una etapa y otra. Posteriormente se añadió 1 mL de peróxido de hidrógeno y se volvió a someter a radiación de microondas con una

potencia de 370 W durante dos etapas de tres minutos y con un tiempo de enfriamiento entre las etapas. De igual modo se prepararon otras tres series exponiéndolas a tres, cuatro y cinco etapas de radiación de microondas respectivamente con una potencia de 330 W antes de añadir el peróxido de hidrógeno. Una vez llevados a cabo estos experimentos, las series realizadas con dos y tres etapas de exposición a la energía de microondas, se descartan debido a que el digerido presenta una cierta turbidez y tras dejar reposar éste, aparece un ligero precipitado porque no se ha logrado una destrucción total de la matriz de la leche. Las digestiones realizadas con cuatro y cinco etapas presentan una destrucción óptima de la matriz. A partir de este resultado tomamos como tiempo óptimo de exposición a las radiaciones de microondas el programa compuesto por cuatro etapas de tres minutos a la radiación de microondas con una potencia de 330 W, dejando enfriar dos minutos entre una etapa y otra y tras añadir el peróxido de hidrógeno, sometiendo las bombas a otras dos etapas de tres minutos con una potencia de la radiación de microondas de 370 W

- Estudio del volumen de ácido nítrico

Se prepararon igualmente otras cuatro series de seis bombas conteniendo cada una, 0,5 mL de leche de vaca, y diferentes volúmenes, 1, 2, 3 y 4 mL, de ácido nítrico concentrado. Las cuatro series fueron sometidas a las diferentes etapas de exposición a energía de microondas optimizadas, se dejan enfriar y se añade 0,3 mL de peróxido de hidrógeno en todos los casos. En este punto, añadimos 0,8 mL de ácido clorhídrico y sometemos la disolución obtenida a la radiación de microondas durante dos etapas de tres minutos con un intervalo de dos minutos entre ambas, a una potencia de 370 W. Tras este paso se le añade 0,1 mL de urea y la disolución final ha sido llevada a un volumen final de 5 mL para su posterior análisis por generación de hidruros acoplada a espectrometría de absorción atómica. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 1 y en la Figura 3 donde observamos los perfiles de absorbancia obtenidos.

Tabla 1. Evaluación del efecto del volumen de ácido nítrico en la digestión de muestras de leche para la determinación de selenio total por HG-AAS

Volumen HNO ₃	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
Absorbancia	0,036	0,025	0,012	0,002

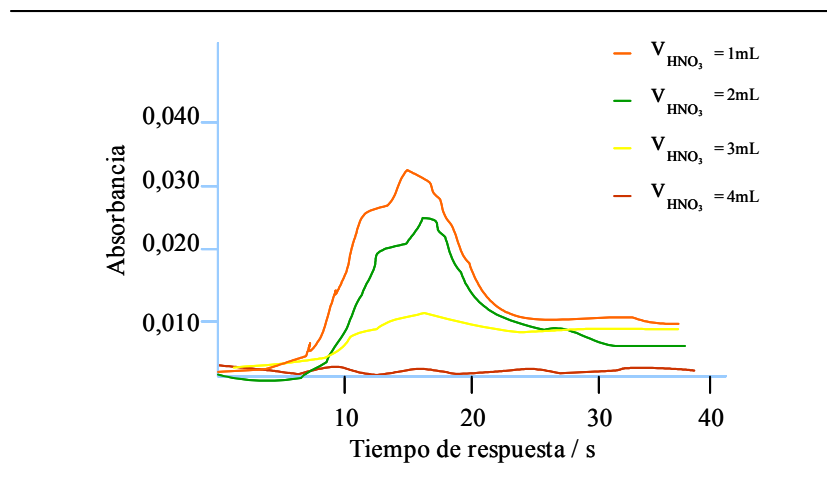


Figura 3. Perfiles de absorbancia obtenidos en la determinación de selenio por HG-AAS en función del volumen de ácido nítrico

A la vista de los resultados obtenidos se puede apreciar que un aumento del volumen de ácido nítrico produce una depresión de la señal analítica, por lo cual nos hemos decantado por coger el volumen de 1 mL como el volumen óptimo. No hemos utilizado volúmenes menores, ya que esta reducción provocaba que la muestra no quedara bien destruida, lo cual ya fue comprobado usando el método de partida.

- Estudio del volumen de peróxido de hidrógeno

Una vez optimizada la primera parte de la digestión ácida se vuelven a preparar cuatro series de seis bombas conteniendo cada una 0,5 mL de leche de vaca, y 1 mL de ácido nítrico, se someten durante cuatro etapas de tres minutos a la radiación de microondas con una potencia de 330 W, dejando enfriar dos minutos entre una etapa

y otra. En este momento se añaden volúmenes diferentes de peróxido de hidrógeno; 0,0, 0,5, 1,0 y 1,5 mL, y se someten a dos etapas de tres minutos a la radiación de microondas a una potencia 370 W con un intervalo de 2 minutos entre ambas etapas. A continuación se añaden 0,8 mL de ácido clorhídrico y sometemos la disolución obtenida a la radiación de microondas de igual forma que en el apartado anterior y enrasamos a 5 mL tras añadir 0,1 mL de urea. Una vez realizada la preparación de la muestra se realizan las medidas de las disoluciones resultantes mediante generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2 y en la Figura 4 (perfiles de absorbancia).

Tabla 2. Evaluación del efecto del volumen de peróxido de hidrógeno en la digestión de muestras de leche para la determinación de selenio total

VOLUMEN H ₂ O ₂	0,0 ML	0,5 ML	1,0 ML	1,5 ML
Absorbancia	0,033	0,041	0,035	0,032

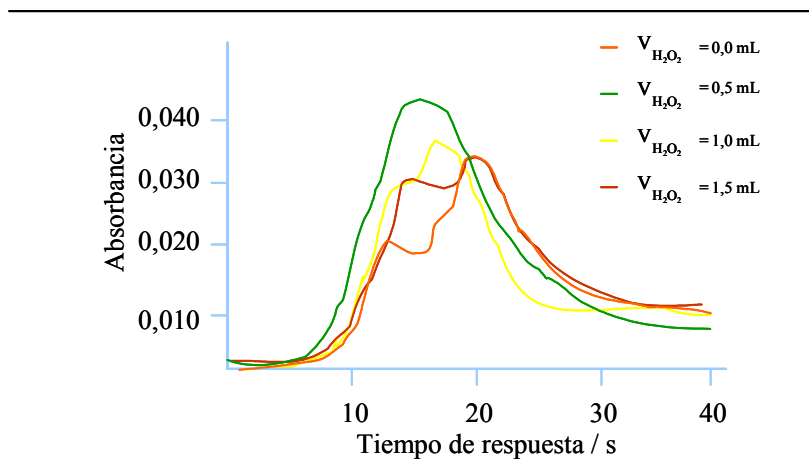


Figura 4. Perfiles de absorbancia obtenidos en la determinación de selenio por HG-AAS en función del volumen de peróxido de hidrógeno

Tras obtener estos resultados se toma como valor óptimo para el volumen de peróxido de hidrógeno 0,5 mL ya que se obtiene un mejor perfil de absorbancia. También se puede comprobar si vemos la Figura 3 que el volumen de 0,3 mL de peróxido de hidrógeno que usamos en la optimización del volumen de ácido nítrico aunque da un resultado bueno, la forma del perfil de absorbancia no es tan buena como la obtenida para el volumen de 0,5 mL.

Etapa 2. Fase de reducción

- Estudio del volumen de ácido clorhídrico

Una vez llevada a cabo la optimización de la digestión ácida de la muestra vamos a estudiar la cantidad necesaria de ácido clorhídrico para reducir el selenio (VI) a selenio (IV). Para llevar a cabo este estudio hemos realizado ocho digestiones de una muestra a las cuales añadimos diferentes volúmenes de ácido clorhídrico y estudiamos como evoluciona la absorbancia y el perfil de absorbancia.

Los volúmenes de ácido clorhídrico añadidos han sido 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,90, 1,0, 1,25 y 1,50 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación del volumen de ácido clorhídrico necesario para reducir el selenio (VI) a selenio (IV) para la determinación de selenio por HG-AAS

Volumen HCl /mL	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00	1,25	1,50
Absorbancia	0,033	0,037	0,042	0,043	0,041	0,042	0,039	0,043

Con los resultados obtenidos en este estudio se eligió el volumen 0,7 mL de ácido clorhídrico concentrado como el volumen óptimo de reductor. El resultado obtenido es similar al de partida ya que tanto 0,7 y 0,8 mL dan resultados que se pueden considerar iguales. En el perfil de los picos de absorbancia (Figura 5) se puede observar que a volúmenes superiores la línea de base es muy alta llegando incluso a distorsionar el pico totalmente, por lo que fueron descartados. En volúmenes inferiores aunque el perfil es bueno, la señal analítica es inferior, lo cual se puede deber a que no reducimos todo el selenio (VI) a selenio (IV), por lo que también se descartan.

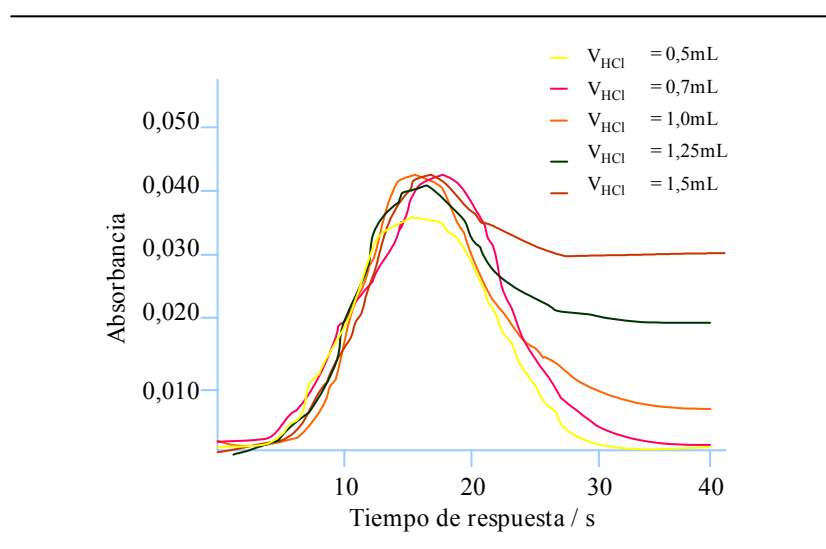


Figura 5. Perfiles de absorbancia obtenidos en la determinación de selenio por HG-AAS en función del volumen de ácido clorhídrico utilizado

Etapa 3. Eliminación de interferencias presentes en la disolución producidas por el tratamiento de la muestra

Los vapores nitrosos que se forman durante las digestiones de las muestras son una importante fuente de interferencias para la generación del hidruro de selenio.

Esto es debido a su alto potencial de oxidación, lo que provoca que el selenio no se encuentre como selenio (IV) en disolución, objetivo desarrollado en la etapa 2, lo cual impide una buena generación del hidruro de selenio y un descenso en la señal analítica. Para evitar este problema, se ha introducido una tercera etapa, en la cual se va intentar eliminar los vapores nitrosos añadiendo urea a la disolución resultante de las dos etapas anteriores.

- Estudio del volumen de urea

Una vez desarrollado la etapa de reducción, nos encontramos que algunas digestiones al añadir el ácido clorhídrico se ponen de un color amarillo intenso, otras con una ligera tonalidad amarilla y otras totalmente incoloras. Esto se debe a la presencia de vapores nitrosos, producto de la descomposición del ácido nítrico durante la digestión de las muestras. Tras dejar enfriar las muestras a la temperatura ambiente se prepara una serie de 4 bombas a las que se le añade un volumen de 0,05, 0,1, 0,2 y 0,3 mL de urea al 50%. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 6 podemos observar los perfiles de absorbancia obtenidos.

Tabla 4. Evaluación del efecto de la adición de urea en la determinación de selenio por HG-AAS

Volumen de urea (50% m/v)	0,05 mL	0,1 mL	0,2 mL	0,3 mL
Absorbancia	0,028	0,033	0,046	0,043

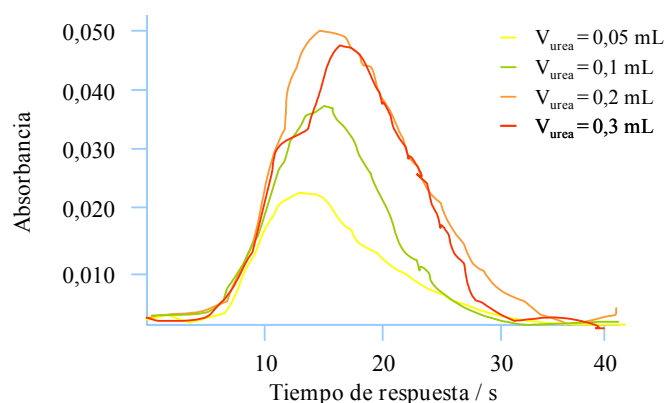


Figura 6. Perfiles de absorbancia obtenidos en la determinación de selenio por HG-AAS en función del volumen de urea empleado

Con los resultados obtenidos se puede apreciar que un aumento del volumen de urea produce una mejora en la absorbancia apreciable. Aunque a cantidades elevadas de urea se produce una distorsión en el perfil de absorbancia (Figura 6), apareciendo un pequeño hombro. Por todo esto se ha adoptado añadir 0,2 mL de urea (50%) como el valor óptimo.

Condiciones óptimas para el pretratamiento con un microondas de uso doméstico

En la siguiente figura (Figura 7) se recogen los valores óptimos para cada variable del pretratamiento de la muestra de leche para la medida de selenio total por espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros.

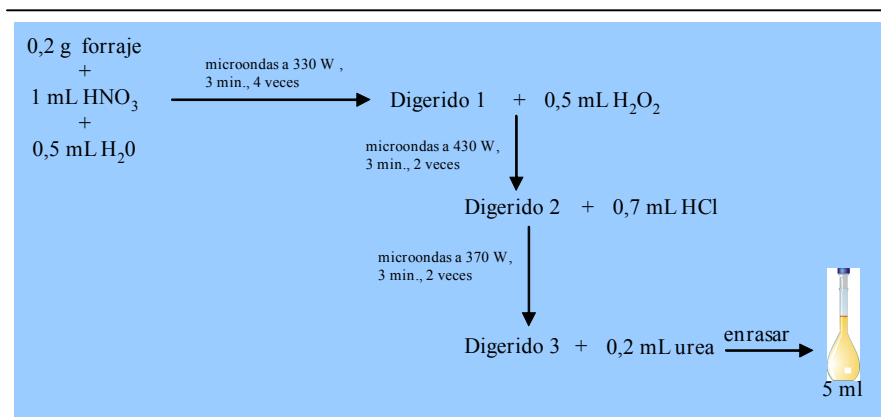


Figura 7. Procedimiento de pretratamiento de la muestra propuesto para la determinación de selenio total en muestras de leche con un microondas de uso doméstico

2.3.3.2 Optimización del pretratamiento de la muestra para la determinación de selenio en leche de vaca con un horno de microondas Ethos Plus

En este estudio el pretratamiento de la muestra se ha realizado en bombas de teflón cuya capacidad es de 100 mL en un microondas Ethos Plus (potencia máxima 1000 W, temperatura máxima 300°C) con control de temperatura interno (Milestone, Sorisole, Italia). Debido al sistema de control de temperatura existente en este equipo vamos a usar la temperatura como variable a optimizar en la preparación de la muestra en lugar de la potencia.

Partiremos de los valores de los reactivos empleados en el pretratamiento de la muestra optimizados previamente para el microondas doméstico, teniendo en cuenta que ahora utilizaremos un volumen de muestra de 2,5 mL.

Se ha descartado el uso de un diseño de experimentos debido a la imposibilidad de obtener una variable independiente, que sea cuantificable numéricamente, que nos pueda indicar la mejoría de nuestra digestión ácida.

Etapa 1. Digestión de la muestra

- Estudio de la temperatura máxima aplicada

La primera variable estudiada ha sido la temperatura ya que ésta no se puede asignar un valor conocido pues, en la digestión ácida de partida la variable objeto de estudio es la potencia. Se parte de un programa de temperaturas base, facilitado en la base de datos del software de horno de microondas, para una digestión ácida de muestras biológicas. En la Tabla 5 se muestra dicho programa.

Tabla 5. Programa de temperaturas base utilizado para la digestión ácida de partida.

	Temperatura inicial / °C	Temperatura final / °C	Duración / min
Etapa 1	20	90	2,5
Etapa 2	90	140	6
Etapa 3	140	160	5
Etapa 4	160	160	10

Las tres primeras etapas del programa de temperaturas se han mantenido igual que en el programa de partida y se ha variado la temperatura máxima en un rango de 160-200°C. Se han llevado a cabo digestiones de 2,5 mL de leche con 5mL de ácido nítrico y 2,5 mL de peróxido de hidrogeno. Las pruebas realizadas con temperaturas de 160, 170 y 180 °C se descartan debido a que las disoluciones obtenidas presentaban una cierta turbidez y tras dejarlas reposar aparece un ligero precipitado, el cual se debe a que no se ha logrado una destrucción total de la matriz de la leche. La prueba llevada a cabo a 190°C presenta resultados óptimos para muestras con

bajos contenidos de nata pero aparece una pequeña capa de grasa por encima del digerido en algunas muestras. Esto se soluciona si se aumenta la duración de la etapa en cinco minutos o si se aumenta a 200°C la temperatura máxima del proceso de digestión ácida. En este caso nos hemos decantado por aumentar la temperatura 10°C en vez de aumentar la duración de la etapa para no alargar en demasía el proceso de tratamiento de la muestra.

Tras realizar este estudio el programa de temperaturas de la digestión ácida seleccionado es el mostrado en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de temperaturas utilizado en la digestión ácida de muestras de leche con el horno de microondas Ethos Plus

	Temperatura inicial / °C	Temperatura final/ °C	Duración/ min
Etapa 1	20	90	2,5
Etapa 2	90	140	6
Etapa 3	140	200	5
Etapa 4	200	200	10

- Estudio del volumen de ácido nítrico

Se preparan diez bombas con 2,5 mL de leche a los que se le añaden diferentes cantidades de ácido nítrico, 1, 2, 3, 4 y 5 mL por duplicado. Se adoptó llevar a cabo el estudio de todos los volúmenes de ácido nítrico en una misma tanda ya que en este tipo de horno microondas no afecta el número de bombas como puede ocurrir en un microondas doméstico donde siempre colocamos seis bombas y así reducimos tiempo de trabajo. En cada una de las bombas se añade 2,5 mL de peróxido de hidrógeno y se llevan con agua a un mismo volumen, en este caso a 10 mL. Es necesario tener un volumen mínimo de 8 mL para que la sonda de temperatura funcione correctamente. Además, es necesario tener el mismo volumen en cada

bomba para tener las mismas condiciones de trabajo y que la temperatura sea la misma en la bomba que contiene la sonda de temperatura y las restantes bombas. Una vez preparadas las bombas las introducimos en el carrusel del horno microondas y las sometemos al programa de temperaturas optimizado (ver Tabla 6). Tras llevar a cabo la digestión ácida se procede a la fase de reducción añadiendo 3,5 mL de ácido clorhídrico y se somete al programa de temperatura mostrado en la Tabla 7. Este programa se adopta de una aplicación que trae el horno de microondas en su software y no se optimiza ya que consideramos que las temperaturas recogidas en este programa nos proporcionan un buen resultado para la reducción de selenio (VI) a selenio (IV) cuando se usa el ácido clorhídrico como reductor. Para finalizar el pretratamiento de la muestra se añade 1 mL de urea y se enrasa la disolución a 25 mL.

Tabla 7. Programa de temperaturas utilizado en la fase de reducción.

	Temperatura inicial / °C	Temperatura final / °C	Duración / min
Etapa 1	20	90	3
Etapa 2	90	130	3
Etapa 3	130	130	6

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8 y en la Figura 8 podemos observar los perfiles de absorbancia obtenidos en función del volumen de ácido nítrico utilizado.

Tabla 8. Evaluación del efecto del volumen de ácido nítrico empleado en la digestión de muestras de leche para la determinación de selenio por HG-AAS

Volumen HNO ₃	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Absorbancia	0,028	0,035	0,017	0,015	0,016

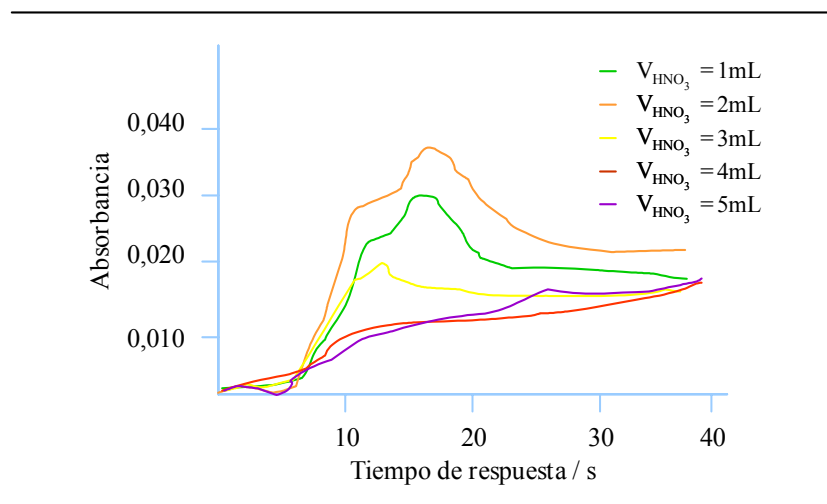


Figura 8. Perfiles de absorbancia obtenidos en la determinación de selenio por HG-AAS en función del volumen de ácido nítrico empleado

A la vista de los resultados obtenidos se vuelve apreciar que un aumento del volumen de ácido nítrico produce una depresión de la señal analítica, aunque es necesario llegar a un volumen de 2 mL para poder obtener una buena destrucción de la matriz de la muestra. También se observa que los perfiles de absorbancia obtenidos no son buenos, eso es debido a que los volúmenes de peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico y urea no son los óptimos. Adoptamos 2 mL de ácido nítrico como el valor más adecuado.

- Estudio del volumen de peróxido de hidrógeno

Se preparan diez bombas con 2,5 mL de leche a los que se le añaden 2 mL de ácido nítrico y diferentes volúmenes de peróxido de hidrógeno, 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 mL por duplicado. Se llevan a un mismo volumen con agua, en este caso a 8 mL. Una vez preparadas las bombas se lleva a cabo la etapa de digestión ácida (Tabla 6), la etapa de reducción (Tabla 7) y la etapa de eliminación de interferencias del mismo

modo que se ha descrito anteriormente. Se lleva a cabo el análisis por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica en las disoluciones resultantes y se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla 9. En la Figura 9 se puede ver gráficamente la influencia del volumen de peróxido de hidrógeno empleado sobre la señal de selenio.

Tabla 9. Evaluación del efecto del volumen de peróxido de hidrógeno empleado en la digestión de muestras de leche sobre la señal de selenio obtenida por HG-AAS

Volumen de H ₂ O ₂	0,5 mL	1,0 mL	1,5 mL	2,0 mL	2,5 mL
Absorbancia	0,037	0,036	0,037	0,035	0,034

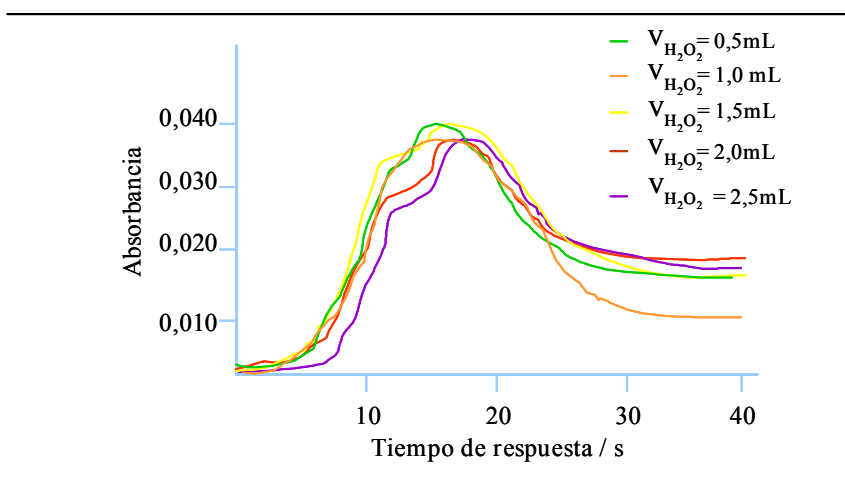


Figura 9. Influencia del volumen de peróxido de hidrógeno empleado en la digestión de una muestra de leche sobre la señal de selenio obtenida por HG-AAS

Tras estudiar los resultados obtenidos se puede observar que los valores de absorbancia son prácticamente idénticos, pero el aumento de volumen de peróxido de hidrógeno, a partir de 1 mL, provoca una distorsión de la señal que también se

aprecia ligeramente cuando se añade 0,5 mL. Por todo ello se tomó como valor óptimo para el volumen de peróxido de hidrogeno 1 mL.

Etapa 2. Fase de reducción

- Estudio del volumen de ácido clorhídrico

En esta etapa del pretratamiento de la muestra sólo vamos estudiar el volumen de ácido clorhídrico empleado, descartando revisar el programa de temperaturas empleado, ya que esta etapa no es un parámetro crítico y se adopta como válido el usado con anterioridad.

La optimización del volumen de ácido clorhídrico se lleva a cabo tras realizar la digestión de las muestra con los valores óptimos de ácido nítrico, peróxido de hidrógeno y el programa de temperaturas desarrollado. A las disoluciones resultantes se le añaden diferentes volúmenes de ácido clorhídrico, 0,7, 1,4, 2,1, 2,8 y 3,5 mL. Se añade 1 mL de urea (50%) para eliminar el exceso de óxidos de nitrógeno. Los resultados obtenidos tras la medida de la absorbancia son los mostrados en la Tabla 10 y Figura 10.

Tabla 10. Evaluación del volumen de ácido clorhídrico necesario para reducir el selenio (VI) a selenio (IV) para su determinación por HG-AAS

Volumen HCl	0,7 mL	1,4 mL	2,1 mL	2,8 mL	3,5 mL
Absorbancia	0,037	0,043	0,044	0,046	0,045

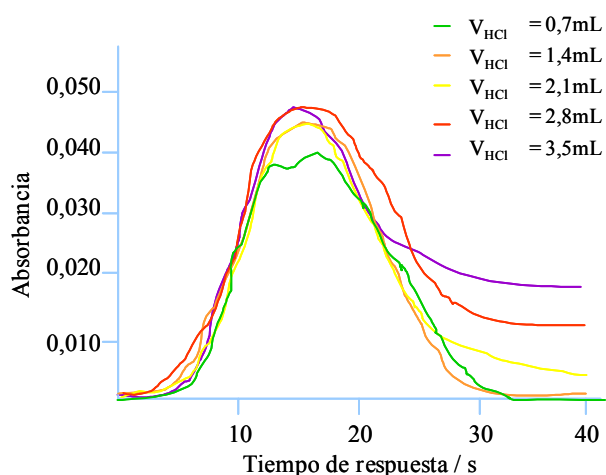


Figura 10. Perfil de los picos de absorbancia obtenidos para la determinación de selenio por HG-AAS en función del volumen de ácido clorhídrico empleado

Tras los resultados obtenidos se puede concluir que el volumen óptimo de ácido clorhídrico es 1,4 mL. Cantidades superiores producen una distorsión del perfil del pico de absorbancia y un aumento de la señal en el blanco producido por un aumento de la línea base que nos lleva a grandes errores. Un volumen de 0,7 mL no es suficiente para llevar a cabo la transformación de todo el selenio (VI) a selenio (IV).

Etapa 3. Eliminación de las interferencias

-Volumen de urea

Esta etapa, como hemos comentado en la optimización del pretratamiento para un horno microondas doméstico, se introduce para eliminar los vapores nitrosos que tienen como origen el ácido nítrico presente en la digestión ácida. En esta etapa no se ha utilizado un método de prueba error para optimizar la cantidad de urea (50% m/v) que se debe añadir a la disolución resultante de las dos etapas anteriores, sino que se adoptó un valor de compromiso tras estudiar lo que ocurrió con las otras variables objeto a estudio. Si observamos los valores óptimos para las variables

volumen de ácido nítrico, volumen de peróxido de hidrógeno y volumen de ácido clorhídrico en el pretratamiento de la muestra llevado a cabo con el horno de microondas doméstico y el horno de microondas Ethos Plus comprobamos que los volúmenes usados para el horno de microondas Ethos Plus son el doble de los usados para el horno de microondas doméstico. A la vista de esto adoptamos que el volumen que usaremos de urea (50% m/v) para llevar a cabo el pretratamiento de las leches para la determinación de selenio total será de 0,4 mL.

Condiciones óptimas para el pretratamiento de muestras de leche con un microondas ETHOS-PLUS

En la siguiente figura (Figura 11) se recogen los valores óptimos para cada variable del pretratamiento de la muestra de leche para la medida de selenio total por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

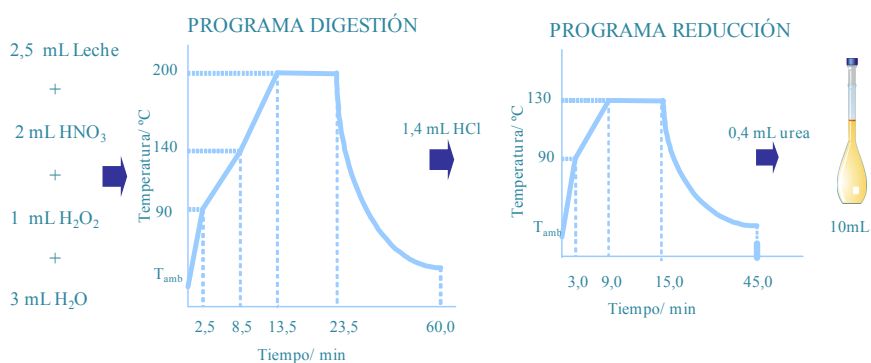


Figura 11. Procedimiento de pretratamiento de la muestra propuesto para la determinación de selenio total en muestras de leche con un microondas ETHOS-PLUS

2.3.4 OPTIMIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE SELENIO POR GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROMETRÍA DE

ABSORCIÓN ATÓMICA

Una vez optimizado la preparación de la muestra vamos a llevar a cabo la optimización de las condiciones de trabajo de la técnica instrumental utilizada para la cuantificación del selenio en muestras de leche de vaca. En esta optimización se utiliza un diseño de experimentos. En un primer paso se llevará a cabo una identificación de las variables críticas en la generación del hidruro y su posterior cuantificación y una vez identificadas se procederá a la búsqueda de su valor óptimo.

- Identificación de las variables que afectan de forma significativa al sistema

La identificación de las variables que afectan de forma significativa al la generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica se realiza mediante un diseño de screening. Estos diseños se utilizan cuando un sistema es poco conocido y resulta muy difícil decidir que variables debemos de considerar a la hora de optimizarlo. La solución de partida es tomarlas todas pero esto hace inviable la utilización de estas técnicas quimiométricas como herramienta de optimización, el diseño de experiencias tendría una matriz de experimentos enorme. Con el fin de reducir el trabajo y el costo de esta labor en este estudio se ha optado por un diseño Plackett-Burman de ocho variables con tres grados de libertad, con lo que al ser a dos niveles resulta una matriz de doce experimentos. A la hora de plantear el diseño de experiencias es necesario elegir las variables a estudiar teniendo en cuenta su posible influencia sobre el resultado final del análisis.

Las variables consideradas a la hora de realizar el estudio de la generación del hidruro y la determinación de selenio total han sido las concentraciones de ácido clorhídrico y borohidruro sódico, el volumen de muestra inyectada, la temperatura de atomización, el caudal del gas portador, el tiempo de reacción y la velocidad de las bombas.

La Tabla 11 recoge las variables que se han considerado en el estudio, así como los dos niveles elegidos, seleccionados a partir de posibles limitaciones instrumentales y datos bibliográficos consultados. Las limitaciones instrumentales encontradas son debidas, por un lado a que nuestro sistema de inyección en flujo no permite ni una velocidad de las bombas, menor de 80 rpm ni superior a 120 rpm, y la celda de cuarzo tiene como temperatura máxima de calentamiento 1000 °C. Por otro lado necesitamos un tiempo de reacción mínimo para que llegue el hidruro hasta la celda de cuarzo para su medición. Teniendo en cuenta estas limitaciones, los valores para las variables seleccionadas (nivel inferior y nivel superior) son los recogidos en la Tabla 11.

La matriz resultante de los diseños de experiencias planteados, correspondiente a un diseño Plackett-Burman 2⁸*3/64 implicando doce experiencias y con tres grados de libertad se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11. Variables seleccionadas para el diseño de experiencias Plackett-Burman para la determinación de selenio por HGAAS

Código	Variable	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	[NaHB ₄] / % p/v	0,05	0,3
B	[HCl] / M	1,0	5,0
C	Velocidad bomba 1 /rpm	80	120
D	Velocidad bomba 2 /rpm	80	120
E	Volumen de muestra/ mL	0,5	2
F	T ^a atomización / °C	700	1000
G	Caudal Argón / mL min ⁻¹	50	100
H	Tiempo de reacción /s	20	30

Tabla 12. Matriz del diseño Plackett-Burman empleado para la optimización de la determinación de selenio por HGAAS

VARIABLES

Experiencia	A	B	C	D	E	F	G	H
1	+	-	+	-	-	-	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	+	-	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-	-
5	+	+	-	+	+	-	+	-
6	+	+	+	-	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	+	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+
9	-	-	-	+	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-

A continuación se llevan a cabo todas las experiencias del diseño de experimentos de acuerdo a la matriz correspondiente midiendo un patrón de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ y se obtienen los resultados que se recogen en la Tabla 13. Una vez obtenida la respuesta para cada uno de los experimentos (absorbancia), se aplica el diseño Plackett Burman elegido con el paquete estadístico, Statgraphics plus version 5,0, y se obtiene la información necesaria para evaluar la importancia de cada una de las variables en la determinación de selenio por espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros.

Tabla 13 Resultado de los experimentos programados en nuestra matriz Plackett-Burman

Experiencia	Absorbancia
1	0,022
2	0,022
3	0,012
4	0,028
5	0,027

6	0,060
7	0,039
8	0,002
9	0,012
10	0,028
11	0,036
12	0,003

El análisis de la importancia de cada una de las variables se llevó a cabo con ayuda de la carta Pareto estandarizada para un nivel de confianza de un 95%. Dichas carta Pareto se muestran a continuación en la Figura 12.

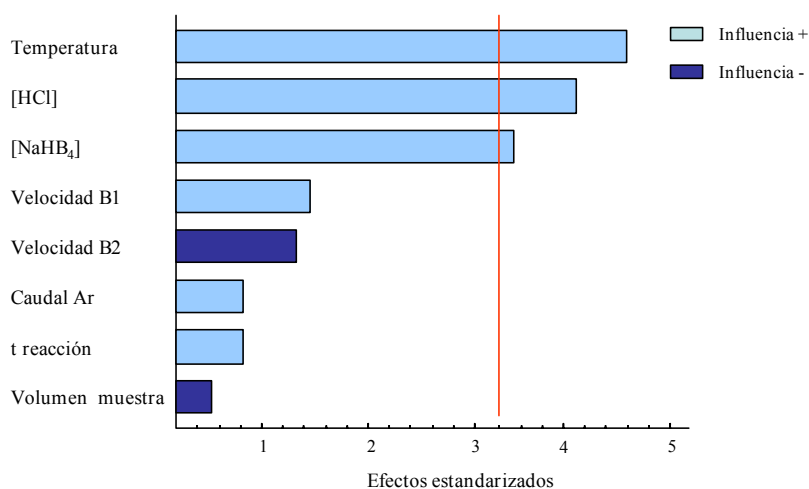


Figura 12. Carta Pareto de primer orden para la determinación de selenio por HGAAS

A la vista de los resultados obtenidos se concluye que las tres variables que presentan una influencia significativa sobre nuestro sistema son: la temperatura de la celda de cuarzo, la concentración del ácido clorhídrico y el borohidruro. Las restantes variables aunque afectan al sistema su importancia es menor por lo que

podemos fijar sus valores, dentro del rango que hemos estudiado que mejor nos convenga. Para las tres variables que nos resultan significativas se llevará a cabo la búsqueda de su valor óptimo mediante un diseño composicional.

- Optimización de las variables significativas

Para llevar a cabo la optimización de las variables que han resultado significativas para la determinación de selenio generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica se aplicara un diseño composicional $2^3 +$ estrella.

Se establecen los intervalos objeto de estudio para cada una de las tres variables significativas de la misma forma que se hizo a la hora de fijar los distintos valores a cada variable en los diseños Plackett-Burman. Las restantes variables se fijaron en los valores que más nos convinieron en cada caso. Los valores de las variables se muestran en la Tabla 14 y los intervalos de trabajo de cada una de las variables significativas se muestran en la Tabla 15. Estos intervalos de trabajo se han cambiado respecto a los usados en el Plackett-Burman debido a las limitaciones instrumentales, ya que si colocamos los 1000°C como límite superior de la temperatura de atomización sería imposible realizar el valor axial superior ya que superaría la capacidad máxima de calentar nuestra celda de cuarzo. De igual forma sucede con el límite inferior del borohidruro ya que sabemos que si mantenemos el límite inferior de 0,05 % (m/v) el valor axial inferior sería próximo a cero y sabemos ya que no es posible generar el hidruro sin su presencia.

Tabla 14. Valores adjudicados a las variables que no resultaron significativas

Variable	Valor adjudicado
Velocidad bomba 1 /rpm	80
Velocidad bomba 2 /rpm	120
Volumen de muestra/ mL	0,5
Caudal de Argón / mL min ⁻¹	50

Tiempo de reacción / s	20
------------------------	----

Tabla 15. Intervalo de estudio en el diseño compositivo para la determinación de selenio por HGAAS

Código	Variable	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	[NaHB ₄]/ % p/v	0,1	0,3
B	[HCl]/ M	1,0	5,0
C	T ^a atomización / °C	700	900

Una vez fijados los valores superiores e inferiores para el intervalo a estudiar en cada uno de los sistemas se crea la matriz del diseño compositivo con ayuda del paquete estadístico empleado anteriormente, Statgraphics plus versión 5,0. En este caso las variables no sólo tomarán los valores superior e inferior adjudicados por nosotros, sino que tomarán un valor central en el intervalo de cada variable y valores alrededor de los valores superior e inferior.

La matriz resultante de los diseños de experiencias planteados (Tabla 16), consta de 16 experiencias, que son distintas combinaciones entre los valores que adoptan las variables para tratar de establecer la superficie de respuesta de nuestro sistema. En la Tabla 17 se muestran los valores superior (+) e inferior (-) así como los valores intermedios (K₀) y superior axial (+ α) e inferior axial (- α) alrededor de los valores límites del intervalo de cada una de las variables fijados por nosotros.

Tabla 16. Matriz del diseño composicional llevado a cabo para la optimización de la determinación de selenio por HGAAS

Experiencia	[NaBH ₄]/ % (m/v)	[HCl]/M	Temperatura/ °C
1	Ko	Ko	Ko
2	-	-	-
3	+	-	-
4	-	+	-
5	+	+	-
6	-	-	+
7	+	-	+
8	-	+	+
9	+	+	+
10	-α	Ko	Ko
11	+α	Ko	Ko
12	Ko	-α	Ko
13	Ko	+α	Ko
14	Ko	Ko	-α
15	Ko	Ko	-α
16	Ko	Ko	Ko

Tabla 17. Valores que adoptan las variables en el diseño composicional 2³ + estrella para la optimización de la determinación de selenio por HGAAS

Valores	Variables		
	[NaBH ₄]/ %	[HCl]/ M	Temperatura atomización / °C
+	0,3	5,0	900
-	0,1	1,0	700
Ko	0,2	3,0	800
+α	0,368	5,68	968
-α	0,032	0,31	631

Ko es el valor medio de la variable; ± α es el valor estrella para cada variable

Las experiencias fijadas por la matriz del diseño composicional se realizan con disolución patrón de selenio concentración 5 µg L⁻¹. Una vez realizados los

experimentos de acuerdo con la matriz de nuestro diseño composicional se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 18.

Una vez obtenidos estos resultados se introducen en el diseño composicional para obtener la información necesaria para obtener los valores óptimos de cada variable. Esta búsqueda se llevará a cabo con ayuda de las superficies de respuesta estimadas para el conjunto de dos variables que se pueden ver en la Figura 13.

Tabla 18. Resultados obtenidos para el diseño composicional para la determinación de selenio por HG-AAS

Experiencia	Absorbancia
1	0,108
2	0,081
3	0,051
4	0,035
5	0,052
6	0,036
7	0,104
8	0,092
9	0,087
10	0,085
11	0,092
12	0,047
13	0,058
14	0,089
15	0,079
16	0,110

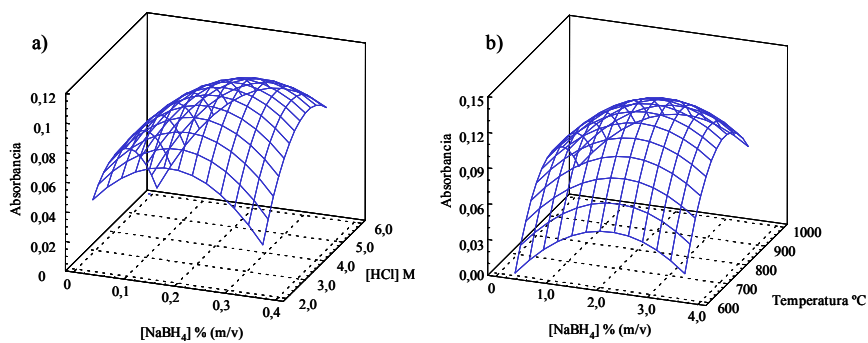


Figura 13. Superficies de respuestas obtenidas para la determinación de selenio por HG-AAS

Como era de esperar y a la vista de las superficies de respuesta obtenidas encontramos los valores óptimos de nuestras variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente hemos fijado. Así que podemos fijar los valores óptimos de nuestras variables para llevar a cabo una buena generación del hidruro de selenio. Estos valores óptimos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Valores óptimos para las variables significativas en la generación del hidruro de selenio

Código	Variable	Valor óptimo
A	[NaBH ₄]/ %	0,2
B	[HCl]/ M	4,0
C	Temperatura atomización / °C	850

2.3.5 DEFINICIÓN: CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Sensibilidad y precisión del método

Una vez desarrollado el método se van determinar la sensibilidad y precisión del mismo. La sensibilidad del método desarrollado se estudió a partir de dos parámetros: límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). El límite de detección se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada y diferenciada del blanco con un determinado nivel de probabilidad. Para un nivel de confianza del 99,7 %, el límite de detección se obtiene de la siguiente expresión:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{Sd}}{\text{pte}}$$

Donde Sd es la desviación estándar de las medidas del blanco y pte es la pendiente de la recta del calibrado.

El límite de cuantificación se define como la concentración mínima de analito que puede ser determinada cuantitativamente con un determinado nivel de probabilidad. Para un nivel de confianza del 99,7 %, el límite de detección se obtiene de la siguiente expresión:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{Sd}}{\text{pte}}$$

Tras aplicar las ecuaciones los valores encontrados para el límite de detección y límite de cuantificación de $0,176 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0,587 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

Para estudiar la precisión del método, se prepararon tres disoluciones patrón de 1, 2 y $3 \mu\text{g L}^{-1}$ y se midieron once veces cada una. Se calcula la media (μ) de las absorbancias así como la desviación estándar (Sd) y con estos datos se calcula el coeficiente de variación (%CV) siguiendo la siguiente expresión:

$$\% CV = \frac{Sd}{\mu} \times 100$$

Los valores obtenidos fueron 3,2, 2,8 y 3,5 % para los tres niveles estudiados respectivamente.

2.3.6 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS DOS HORNOS DE MICROONDAS EMPLEADOS EN EL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO EN LECHE DE VACA

Una vez desarrollados los métodos de pretratamiento de la muestra para los dos hornos microondas hemos realizado un estudio comparativo para determinar si con ambos métodos se obtienen resultados estadísticamente iguales. Al mismo tiempo se llevará a cabo un estudio de las características analíticas de los dos métodos para determinación de selenio en muestras de leche.

Rectas de calibrado y adición

Las rectas de calibrado y adición se han obtenido para concentraciones comprendidas entre 0 y 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se realizó una adición para el digerido obtenido con el microondas doméstico y otra adición para el digerido del microondas Ethos plus. Las rectas de calibrado y adición se muestran en la Tabla 20 y en la Figura 14.

Tabla 20. Pendientes de las rectas de calibrado y adición para la determinación de selenio en leche por HG-AAS

Curva	Pendiente
Calibrado	0,021

Adición leche digerido microondas Ethos Plus	0,0143
Adición leche digerido microondas doméstico	0,0138

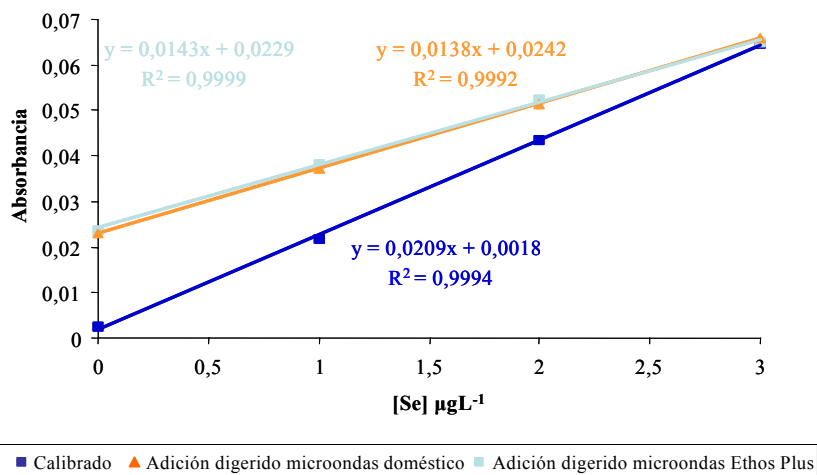


Figura 14. Rectas de calibrado y adición para la determinación de selenio en leche por HG-AAS

Las pendientes de las rectas de calibrado y adición de los digeridos obtenidos con los dos microondas, difieren significativamente (test t, nivel de confianza 99.5%) por lo que hay que utilizar para cada una de las medidas de selenio en leche las rectas de adición. Mientras que las rectas de adición de ambos digeridos no difieren significativamente entre ellas (test t, nivel de confianza 99.5%) por lo que se puede deducir que se obtienen resultados similares con los dos hornos microondas.

Exactitud

Para validar el pretratamiento de la muestra y su posterior análisis por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica se va aplicar ambos

métodos a un material de referencia de leche con el valor de selenio certificado (NIST 8435, leche entera en polvo, $[Se]_{\text{certificada}} = 131 \pm 14 \mu\text{g L}^{-1}$).

El material de referencia se preparó como si se tratara de una leche en polvo comercial. Se pesaron quince gramos del material de referencia, se diluyeron en agua y se enrasaron a 100 mL. Esta disolución es la que vamos emplear para llevar a cabo el pretratamiento de la muestra en ambos hornos de microondas.

Se preparó una serie de diez bombas de baja presión con 0,5 mL del material de referencia, del mismo modo se tomaron diez bombas del microondas industrial y se le añadieron 2,5 mL del mismo material. Se sometió cada serie al método optimizado para cada horno de microondas y en las disoluciones obtenidas se determinó la concentración de selenio por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Los resultados obtenidos para cada disolución se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Comparación de concentración de selenio en el material de referencia de leche entera (NIST 8435) obtenida tras el pretratamiento con dos hornos microondas

Bomba	[Se] $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Método 1	Método 2
1	127,8	127,2
2	124,4	130,0
3	133,9	122,7
4	141,2	131,7
5	123,4	134,4
6	131,7	127,2
7	136,2	128,9
8	124,4	134,4
9	128,9	126,6
10	143,3	137,8
Método 1 → utilizando el horno de microondas doméstico		
Método 2 → utilizando el horno de microondas Ethos Plus		

Con estos datos se ha realizado un test t, con un nivel de confianza del 95% de dos colas para grupo de datos con varianzas iguales, para determinar si los valores obtenidos son estadísticamente iguales. Se usa un test t para grupo de datos con varianzas iguales ya que tras realizar un test F para los dos grupos de datos se obtiene un F con un valor de 2,43, el cual es un valor menor al F crítico que es 3,18, así que la hipótesis de que las varianzas son iguales es correcta. Tras la realización del test t (95 % nivel de confianza) se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales con un nivel de confianza del 95%

	Microondas doméstico	Microondas Ethos Plus
Media	131,52	130,09
Varianza	49,79	20,46
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	35,12	
Diferencia hipotética medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0,54	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10	

Tras el análisis de estos valores podemos concluir que el pretratamiento de la muestra con los dos hornos microondas da origen a resultados estadísticamente iguales.

Igualmente se realizó un test t de dos colas (95 % nivel de confianza) para comparar los valores encontrados con el valor de selenio certificado por el material de referencia de leche NIST-8435 ($131 \pm 14 \mu\text{g L}^{-1}$). Tras la comparación de los valores medios (Tabla 22) obtenidos para cada método mediante los dos procedimientos de preparación de la muestra y posterior medida por generación de

hidruros-espectrometría de absorción atómica podemos decir que ambos procedimientos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre el valor de la concentración de selenio determinado y el valor de selenio certificado.

Precisión

La precisión de las medidas (n=11), expresada como el coeficiente de variación (%CV), fue estudiada para el procedimiento completo, desde la digestión ácida con ambos hornos microondas, y su posterior medida por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Para este estudio se prepararon tres series para cada uno de los hornos microondas, donde a cada una de las series se le añadía 1, 2 y 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selenio. Se someten al proceso de digestión ácida inducida por los dos hornos microondas y se miden por el método de generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica optimizado en el apartado 2.3.4. Los valores obtenidos fueron 5,2, 4,8 y 6,2 % para los tres niveles estudiados respectivamente en leche digerida en el microondas doméstico. En los tres niveles estudiados para la leche digerida en el microondas Ethos Plus los valores del coeficiente de variación fueron de 6,9, 5,5 y 4,8 % respectivamente. Tras este estudio puede decirse que los valores de precisión, para los métodos, son buenos en ambos casos.

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad de los métodos desarrollados, se estudió a partir de dos parámetros: límites de detección y cuantificación definidos en el apartado 2.3.5. Los resultados obtenidos para cada uno de los microondas utilizados en muestras de leche se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para determinación de selenio en leche por HG-AAS

	LOD	LOQ
Microondas doméstico	1,78 $\mu\text{g L}^{-1}$	5,94 $\mu\text{g L}^{-1}$

Microondas Ethos Plus	0,715 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,40 $\mu\text{g L}^{-1}$
-----------------------	----------------------------	---------------------------

Tras estudiar las características analíticas de ambos métodos vamos a decantarnos por utilizar en estudios posteriores la digestión ácida llevada a cabo en el microondas Ethos Plus (Figura 11) dado que tiene un límite de detección y cuantificación más bajos, debido que nos permite realizar un pretratamiento de la muestra con una menor dilución que el microondas casero. Además el Ethos Plus es un equipo más robusto y seguro.

2.3.7 DETERMINACIÓN DE SELENIO EN LECHE COMERCIALES

Niveles de selenio en leches comerciales

Una vez que se ha desarrollado la metodología necesaria para el análisis, ésta se aplicó a distintas muestras de leche. Se estudió el contenido de selenio en leches comerciales que se pueden comprar en cualquier supermercado gallego y en dos muestras de leche cruda. Esta leche cruda fue recogida en días diferentes, directamente de la cuba de recolección de Feiraco S. L., tras un día de almacenamiento de leche procedente de las granjas que venden la leche a esta empresa.

El estudio del contenido de selenio en estas muestras se realizó con el objetivo de establecer los niveles medios de selenio en las leches que en este momento están en el mercado y que llegan a la mayoría de los consumidores. Para ello, se ha determinado la concentración de selenio en treinta y seis muestras de leche de vaca, en sus formas entera y desnatada, excepto para el caso de la muestra de leche Puleva Omega 3 que no posee leche de tipo desnatada. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, empleando el método de adición, ya que vimos en el apartado 2.3.6 que existe efecto matriz. Los resultados obtenidos expresados como valor medio \pm desviación estándar se muestran en la Tabla 24.

Para el caso de las leches enteras, los niveles de selenio se encuentran entre 13.7-21.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ con un valor medio de 16.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para las leches de tipo desnatadas el rango de concentración determinado en las muestras se encuentra entre 8.5-17.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ con un valor medio de 13.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. A la vista de estos resultados (Tabla 24) se puede apreciar que los niveles de selenio son menores en el caso de las leches de tipo desnatadas que las leches enteras de la misma marca comercial. Esto también se aprecia en la representación recogida en la Figura 15.

Para confirmar si las concentraciones de selenio en las leches enteras y leches desnatadas de una misma marca presentan concentraciones estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% se lleva a cabo un análisis ANOVA de una vía (Tabla 25). Este análisis estadístico nos confirmó la primera impresión de que en todos los casos la concentración de selenio en la leche entera de una misma marca es mayor que las de su leche desnatada. Esto se vuelve a confirmar tras aplicar un Test de Rango Múltiple que nos vuelve a poner de relevancia las diferencias entre las concentraciones de selenio en las leches entera y desnatada de la misma marca.

Tabla 24. Concentraciones de selenio encontradas en diferentes leches comerciales. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=12)

Marca Comerciales	[Se] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Leche entera	Leche desnatada

Feiraco	16,2 ± 0,67	14,4 ± 0,66
RAM	18,4 ± 0,80	15,0 ± 0,73
CLAS	17,3 ± 0,58	16,2 ± 0,67
Larsa	17,2 ± 0,73	16,0 ± 0,54
Pascual	20,1 ± 0,77	16,6 ± 0,92
Lauki	18,2 ± 0,88	15,1 ± 0,70
Rio	16,5 ± 0,55	14,7 ± 0,54
Oro del Valle	16,2 ± 0,45	11,6 ± 0,40
Campobueno	16,9 ± 0,53	12,5 ± 0,93
Solan	17,5 ± 0,40	15,7 ± 0,61
President	12,2 ± 0,40	10,8 ± 0,64
Celta	15,6 ± 0,56	11,2 ± 0,80
Clesa	14,0 ± 0,57	12,6 ± 0,65
Champion	21,0 ± 1,20	17,2 ± 0,56
Puleva Omega 3	17,2 ± 0,59	---
RAM Calcio	16,8 ± 0,93	12,2 ± 0,91
CLAS Calcio	13,7 ± 0,68	8,5 ± 0,50
Pascual Calcio	17,7 ± 0,64	13,8 ± 0,78
Lauki Calcio	15,5 ± 0,41	12,7 ± 0,57

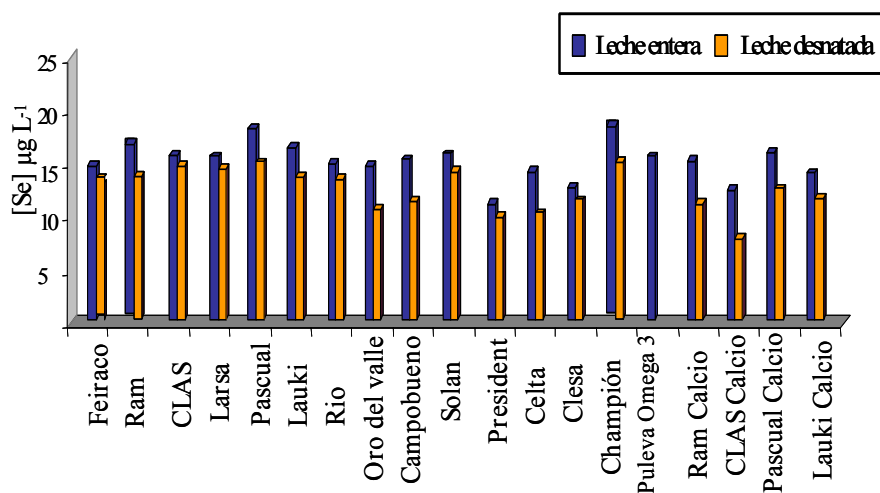


Figura 15. Comparación de los niveles de selenio en leches enteras y leches desnatadas de la misma marca comercial

Tabla 25. Resultados del Test de rango múltiple usando el método de Fisher (95% nivel de confianza) para comparar los niveles de selenio en leche comerciales de la misma marca, desnatadas y enteras

Marca comercial	Media $\mu\text{g L}^{-1}$		Límites (\pm)	Diferencia
	Desnatada	Entera		
Feiraco	13,4	16,2	0,67	- 2,77*
RAM	15,0	18,4	0,77	- 3,37*
CLAS	16,2	17,3	0,63	- 1,10*
Larsa	16,0	17,2	0,64	- 1,21*
Pascual	16,6	20,1	0,85	- 3,50*
Lauki	15,1	18,2	0,82	- 3,04*
Rio	14,7	16,5	0,55	- 1,81*
Oro del Valle	11,6	16,2	0,42	- 4,57*
Campobueno	12,5	16,8	0,74	- 4,37*
Solan	15,7	17,5	0,53	- 1,89*
President	10,8	12,2	0,53	- 1,46*
Celta	11,2	15,6	0,69	- 4,40*
Clesa	12,6	14,0	0,61	- 1,39*
Champion	17,2	21,0	0,94	- 3,90*
RAM Calcio	10,8	12,2	0,92	- 4,56*
CLAS Calcio	8,5	13,7	0,84	- 5,11*
Pascual Calcio	13,8	17,7	0,72	- 3,86*
Lauki Calcio	12,7	15,5	0,74	- 2,82*

* Existen diferencias significativas entre los niveles comparados

En el caso de la leche sin tratar recogida de la cuba de Feiraco, los niveles de selenio que se encontraron fueron de $17,7 \pm 0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ el primer día de recogida y $18,1 \pm 0,80 \mu\text{g L}^{-1}$ el segundo día. El cual nos da un valor medio de los dos días de $17,9 \pm 0,58 \mu\text{g L}^{-1}$.

Con este valor medio encontrado para los dos días de recogida se llevo a cabo un test t para comparar el valor de la leche cruda procedente de los tanques de Feiraco y el valor encontrado en el tetrabrik comercial de leche Feiraco que salió al mercado esa misma semana. Tras este análisis se ve que el valor obtenido para la leche cruda no es comparable que el de tetrabrik de Feiraco que se puede comprar en un supermercado (Tabla 26). Esto puede deberse a que en el proceso de tratamiento de la leche para su posterior comercialización se pierde selenio.

Tabla 26. Resultados de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales con un nivel de confianza del 95%

	Leche comercial FEIRACO	Leche cruda FEIRACO
Media	16,2	17,9
Varianza	0,45	0,34
Observaciones	9	18
Varianza agrupada	0,38	
Diferencia hipotética medias	0	
Grados de libertad	25	
Estadístico t	-6,77	
Valor crítico de t (dos colas)	2,06	

2.3.8 DISTRIBUCIÓN DE SELENIO EN SUERO, NATA Y CASEÍNAS DE LECHE COMERCIALES

Una vez determinado el contenido de selenio en las distintas muestras de leche vamos a estudiar el contenido de selenio en los diferentes componentes de la leche, suero lácteo, micelas de caseína y nata. Para ello vamos a llevar a cabo la separación de cada uno de los componentes de la leche y su posterior preparación de la muestra utilizando la digestión ácida inducida por energía de microondas utilizada para la

leche en este estudio. El estudio se realizó con 14 muestras de leche entera comerciales.

Separación de los distintos componentes de la leche de vaca

Para realizar este estudio necesitamos separar los diferentes componentes de la leche para determinar a continuación el contenido de selenio en cada uno de ellos.

En bibliografía se recogen diferentes métodos para la obtención de los diferentes componentes de la leche:

- Precipitación isoeléctrica a pH 4,6^{40,41}
- Precipitación química^{42,43}
- Precipitación física^{44,45}

El primer método es inespecífico y además no es posible separar la nata. La precipitación química presenta el problema que puede introducir impurezas en la muestra y diluir aún más los componentes, e igual que el método precipitación isoeléctrica no se separa la nata. Por ello se optó por llevar a cabo la separación de los distintos componentes mediante precipitación física usando las condiciones propuestas por P. Bermejo y col⁴⁵. Tras llevar a cabo la ultracentrifugación se obtuvieron tres fases: un precipitado que contiene las micelas de caseína y las proteínas de alto peso molecular, una fase líquida, situada en el medio que es el suero y una capa sólida superior que es la grasa o nata (Figura 16).

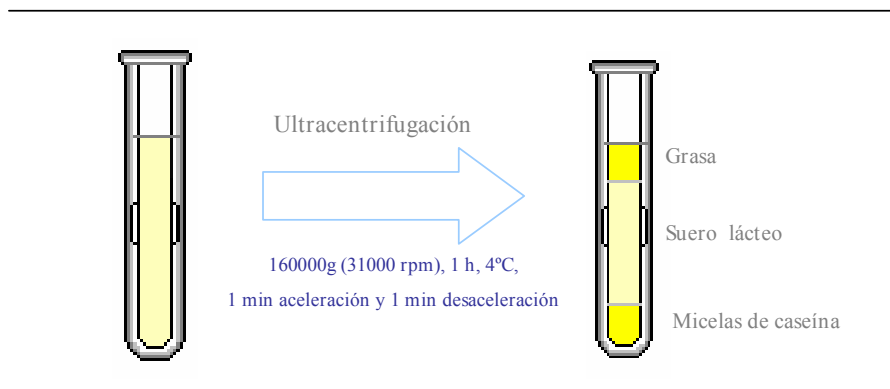


Figura 16. Obtención de los tres componentes de la leche mediante ultracentrifugación

2.3.8.1 Características analíticas

Rectas de calibrado y adición para la determinación de selenio en los diferentes componentes de la leche

Las rectas de calibrado y adición se han obtenido para concentraciones comprendidas entre 0 y 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. La adición se ha realizado añadiendo el patrón de selenio a las muestras digeridas directamente. Las pendientes de las rectas de calibrado y adición de cada uno de los componentes difieren significativamente (test t, nivel de confianza 99,5%) por lo que hay que utilizar las rectas de adición en el análisis de selenio total en los diferentes componentes de la leche de vaca. Mientras que las rectas de adición de cada uno de los componentes no difieren significativamente (test t, nivel de confianza 99,5%), por lo que es indistinta la utilización de cualquiera de las tres rectas de adición. Las ecuaciones de las rectas de calibrado y adición de cada uno de los componente se muestran en la Tabla 27 y pueden verse gráficamente en la Figura 17.

Tabla 27. Pendientes de las rectas de calibrado y adición, t experimental (texperimental) y crítica (tcritica) después de realizar un test t (nivel de confianza 99,5%)

Curva	Adición suero	Adición caseínas	Adición nata
-------	---------------	------------------	--------------

	Pendiente	t _{exp}	t _{teórico}	t _{exp}	t _{teórico}	t _{exp}	t _{teórico}
Calibrado	0,0202	40,54	2,09	40,02	2,09	43,02	2,09
Adición suero	0,0143	-----	-----	1,92	2,09	0,87	4,30
Adición caseínas	0,0139	1,92	2,09	-----	-----	1,975	2,09
Adición nata	0,0134	0,87	4,30	1,975	2,09	-----	-----

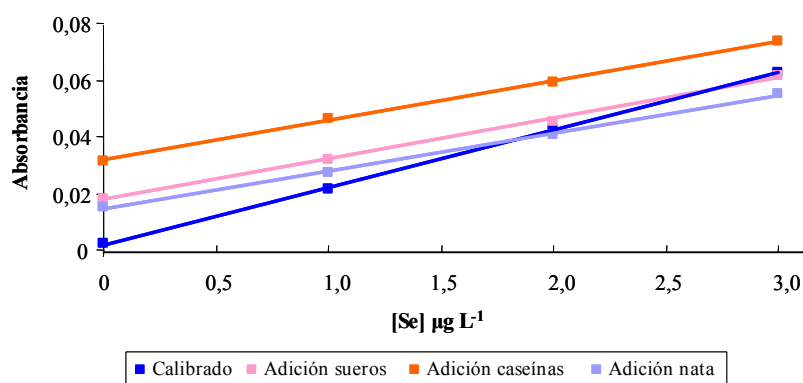


Figura 17. Rectas de calibrado y adición para la determinación de selenio en los diferentes componentes del a leche de vaca

Precisión

La precisión de las medidas, expresada como la desviación estándar relativa (%CV), fue estudiada para cada uno de los componentes de la leche. Para ello se tomaron un suero, una nata y una micelas de caseínas de una leche y se fortificaron con 10, 20 y 30 μg L⁻¹ una vez depositadas las muestras en la bomba de teflón. Se llevo a cabo la digestión ácida de las muestras y la medición por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Se realizaron cuatro réplicas de cada una de las muestras y nivel y se midió cada una de ellas tres veces por lo que disponemos de doce medidas para calcular el %CV de cada uno de los niveles de

concentración en los tres componentes de la leche. Los valores obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 28.

Tabla 28. Precisión del método para los diferentes componentes de la leche

[Se] $\mu\text{g L}^{-1}$	Componente de la leche								
	Suero			Micelas caseína			Nata		
	Medi a $\mu\text{g L}^{-1}$	Sd	%C V	Medi a $\mu\text{g L}^{-1}$	Sd	%C V	Medi a $\mu\text{g L}^{-1}$	Sd	%C V
Muestra +1	22,2	0,70	3,15	17,5	0,90	5,14	12,1	0,82	6,77
Muestra +2	32,4	0,65	2,01	27,2	1,04	3,82	21,9	0,89	4,06
Muestra +3	42,6	0,87	2,04	37,4	1,12	3,00	31,8	1,05	3,30

Los valores medios del coeficiente de variación obtenidos para cada uno de los componentes de la leche fueron de 2,4, 4,0 y 4,0 para el suero lácteo, micelas de caseína y nata respectivamente.

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad del método para cada uno de los componentes de la leche se estudió mediante el límite de detección y cuantificación definidos en el apartado 2.3.5. Los resultados obtenidos para cada una de las matrices se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para determinación de selenio suero lácteo, micelas de caseína y por HG-AAS

Muestra	LOD	LOQ
Suero lácteo	0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,40 $\mu\text{g L}^{-1}$
Micelas de caseína	2,14 ngg^{-1}	7,13 ngg^{-1}

Nata	2,25 ngg ⁻¹	7,50 ngg ⁻¹
------	------------------------	------------------------

Exactitud

Uno de los principales problemas a la hora de realizar estudios en los diferentes componentes de la leche es la inexistencia de materiales de referencia que nos garanticen que nuestro análisis es exacto. Con el objeto de comprobar la exactitud del análisis de selenio en los diferentes componentes se ha realizado un estudio de la recuperación analítica. Para ello se tomo una mezcla de muestras de suero lácteo y se dividió en cinco alícuotas de 10 mL. A estas alícuotas se le añadió diferentes cantidades de selenio, una primera alícuota no se fortificó con patrón y las otras se fortificaron con patrón para tener una concentración de éste al final de 5, 10, 20 y 30 µg L⁻¹. Igualmente se realizó con las micelas de caseína y natas. Una vez fortificadas las muestras se prepararon tres réplicas de cada nivel y de cada una de las matrices, se sometieron al proceso de digestión ácida y se llevo a cabo la medida por generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica.

Una vez obtenidos los valores de concentración para cada una de los niveles y distintas muestras se calculará la recuperación analítica usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{[\text{Se}]_{\text{medida}}}{[\text{Se}]_{\text{añadida}}} \times 100$$

Los resultados obtenidos para cada una de los componentes de la leche se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Recuperaciones analíticas encontradas para los diferentes componentes de la leche

Componente de la leche						
	Suero		Micelas caseína		Nata	
[Se] _{añadid} a μg L ⁻¹	[Se] _{detec} μg L ⁻¹	Recuperación Analítica %	[Se] _{detec} μg L ⁻¹	Recuperación Analítica %	[Se] _{detec} μg L ⁻¹	Recuperación n Analítica %
10	9,92	99,20	9,91	99,10	9,87	98,70
20	19,9	99,40	20,3	101,1	20,2	101,0
30	30,2	100,8	29,7	99,10	30,4	101,1
40	40,1	100,3	39,7	99,20	39,5	98,60

[Se]_{detectada} = [Se]_{nivel dopado} - [Se]_{nivel sin dopar}; [Se]_{detec} = [Se]_{detectada}

En la Tabla 30 se puede observar las recuperaciones analíticas encontradas para el suero de la leche que están entre 99,2-100,8%, con un valor medio de 99,9 % para los cuatro niveles de concentración. En el caso de las micelas de caseínas el rango es de 99,1-101,1%, con un valor medio de 99,6% mientras que para la nata el rango de valores se encuentra entre 98,6-101,1 %, con un valor medio de 99,9%. Con estos datos podemos decir que el procedimiento utilizado para medir el selenio en los diferentes componentes de la leche por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica es exacto.

Balance de masas

Debido a la necesidad de llevar a cabo un control de calidad en el análisis se vio la posibilidad de realizar un balance de masas para comprobar si la cantidad de selenio en los tres componentes es igual a la cantidad de selenio en la leche total. Esto también nos confirma que la medida de la concentraciones de selenio en los diferentes componentes de la leche.

Para evaluar la separación de la leche en sus diferentes componentes y la determinación de selenio en los mismos se ha realizado un balance de masas para tres de las muestras estudiadas, tanto enteras como desnatadas. Para ello se tomaron los valores de las leches totales obtenidos en el apartado 2.3.7 como el 100% del contenido de selenio en la muestra de leche. Tras determinar los contenidos de

selenio en cada uno de los componentes de la leche se observa que el sumatorio de la masa de selenio presente en los tres componentes entre un 95% a 101% de la masa de selenio encontrada en la leche (Tabla 31).

Tabla 31. Balance de masas para la determinación de selenio en los componentes de la leche

	[Se]total ng	[Se]suero ng	[Se]caseína ng	[Se]nata ng	% masa
Leche 1	253,9 ± 6,5	133,4 ± 4,4	98,20 ± 4,9	19,70 ± 2,3	99,03 ± 2,0
Leche 2	220,8 ± 8,3	111,5 ± 3,5	82,90 ± 6,2	16,03 ± 2,5	95,32 ± 1,9
Leche 3	241,2 ± 9,2	126,8 ± 5,4	93,50 ± 6,5	19,10 ± 1,4	99,32 ± 1,7
Leche 4	194,4 ± 9,0	103,8 ± 6,2	76,30 ± 5,2	16,21 ± 2,0	101,0 ± 2,2
Leche 5	207,6 ± 7,0	108,24 ± 4,1	80,40 ± 3,8	15,62 ± 2,8	98,43 ± 1,3
Leche 6	218,4 ± 10,6	114,0 ± 3,8	85,20 ± 3,8	16,84 ± 2,8	98,91 ± 0,9

Con estos resultados puede concluirse que en próximos estudios no será necesario medir el contenido de selenio en todos los componentes. Por ello en la determinación del contenido de selenio en los componentes de las restantes muestras de leche no se determinará el contenido de selenio en la nata y estos se obtendrán por diferencia de los contenidos de selenio en la leche total y los contenidos de selenio en sueros y micelas de caseínas. Esta decisión se tomó debido a que el pretratamiento que es necesario realizar a las natas antes de analizarlas es más dificultoso que el que hay que emplear para los otros componentes estudiados.

2.3.8.2 Determinación de selenio en los distintos componentes de la leche

Una vez separados los distintos componentes de la leche se llevó a cabo el análisis de selenio mediante generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Para ello se empleó el tratamiento de las muestras desarrollado para las leches totales. En el caso del suero se tomaron 2,5 mL igual que en el caso de la leche, mientras que para las micelas de caseína y nata se tomaban pesos entorno a

0,5 g. Las muestras fueron analizadas por triplicado empleando un método de adición estándar. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 32. Como se puede observar en la Tabla 32 los niveles de selenio encontrados en el suero de la leche están entre 7,1-14,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, con un valor medio de 9,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, en las micelas de caseínas el rango es de 3,3-7,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ con un valor medio de 5,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, finalmente el rango de valores en la fase grasa se encuentra entre 1,2-3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 32. Concentración de Selenio en leche entera y sus diferentes componentes (suero, micelas de caseína y fase grasa). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=12)

Marca Comercial	[Se] ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)			
	Leche entera	Suero lácteo	Micelas Caseína	Grasa *
Feiraco	16,2 \pm 0,67	8,52 \pm 0,42	6,01 \pm 0,12	1,67
RAM	18,4 \pm 0,80	11,0 \pm 0,47	4,71 \pm 0,14	2,69
CLAS	17,3 \pm 0,58	8,11 \pm 0,08	7,82 \pm 0,16	1,37
Larsa	17,2 \pm 0,73	9,42 \pm 0,18	7,01 \pm 0,25	0,78
Pascual	20,1 \pm 0,77	14,8 \pm 0,61	4,34 \pm 0,14	0,96
Lauki	18,2 \pm 0,88	10,8 \pm 0,30	4,39 \pm 0,12	3,01
Rio	16,5 \pm 0,55	8,32 \pm 0,33	6,08 \pm 0,60	2,10
Oro del Valle	16,2 \pm 0,45	7,62 \pm 0,48	7,24 \pm 0,24	1,34
Campobueno	16,9 \pm 0,53	8,43 \pm 0,45	7,29 \pm 0,20	1,18
Solan	17,5 \pm 0,40	9,73 \pm 0,91	5,89 \pm 0,33	1,88
President	12,2 \pm 0,40	7,11 \pm 0,29	3,32 \pm 0,15	1,77
Celta	15,6 \pm 0,56	9,00 \pm 0,77	5,11 \pm 0,44	1,49
Clesa	14,0 \pm 0,57	8,13 \pm 0,51	4,33 \pm 0,25	1,54
Champion	21,0 \pm 1,20	12,9 \pm 0,47	6,53 \pm 0,14	1,57

*El contenido de selenio en muestras de grasa fueron calculadas como:
 $[\text{Se}]_{\text{grasa}} = [\text{Se}]_{\text{leche entera}} - [\text{Se}]_{\text{suero lácteo}} - [\text{Se}]_{\text{micelas de caseína}}$

La distribución porcentual de selenio en los diferentes componentes de la leche se muestra en la Figura 18. Los mayores porcentajes de selenio se encontraron en el suero de la leche con valores entre 47,2-73,6 % y los porcentajes mínimos entre 4,8-16,2% corresponden a la fase grasa.

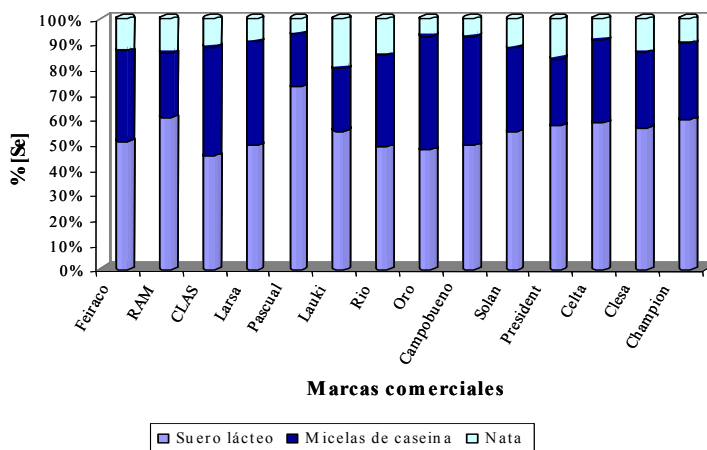


Figura 18. Distribución porcentual de selenio en los diferentes componentes de la leche de vaca

Se estableció la existencia de una correlación estricta entre los niveles de selenio en leche entera (LE), suero de la leche (SL) y las micelas de caseína (MC) aplicando una regresión lineal $Z = a + bX + cY$, donde Z es el contenido de selenio en LE, X es el contenido de selenio en SL e Y es el contenido en MC y a, b, c son constantes. Los valores de a, b y c así como el valor del coeficiente de correlación r se calcularon empleando el programa estadístico Statgraphics plus versión 5,0. Los resultados muestran un valor de coeficiente de correlación de 0,942 (LE, SL y MC). Por otro lado, la correlación entre los diferentes niveles de selenio en los componentes de la leche y el suero de la leche se describen mediante la ecuación:

$$LE = 1,35 + 0,97SL + 1,07 MC$$

$$R^2 = 0,945$$

2.4 CONCLUSIONES

- Se han optimizado dos métodos para el pretratamiento de muestras de leche que permiten la determinación de selenio mediante generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. El método de digestión ácida llevado a cabo en el horno de microondas Ethos Plus presenta pequeñas ventajas respecto a la digestión ácida realizada en un horno microondas doméstico, por lo que nos decantamos por usar ese método. Igualmente se ha optimizado el procedimiento de medida obteniéndose una buena precisión, exactitud y límites de detección ($0,715 \mu\text{g L}^{-1}$) y cuantificación ($2,40 \mu\text{g L}^{-1}$). El método desarrollado ha sido aplicado a 39 muestras de leche comerciales y dos muestras de leche de vaca sin tratar, recogidas en granjas que suministran la alimentación tradicional a las vacas.

- Se ha aplicado un método de separación de los distintos componentes de la leche y se ha determinado el contenido de selenio mediante el método optimizado, en cada uno de ellos, obteniéndose una buena precisión en los resultados, y un balance de masas con rendimiento superior al 95%.

- Se ha determinado la distribución del selenio en las leches comerciales, encontrándose los mayores porcentajes de selenio en el suero lácteo, con valores entre 47,2-73,6 % y los porcentajes mínimos entre 4,8-16,2% corresponden a la fase grasa.

- Por último se estableció una relación mediante una ecuación matemática entre el contenido de selenio en la leche y el contenido de selenio en el suero y las micelas de caseína.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

1. D. Mazej, M. Horvat, F. Barbone, V. Stibilj, *Microchimica Acta*, 2004, **147** (1-2), 73-79.
2. A. S. Ribeiro, A. L. Moretto, M. A. Z. Arruda, S. Cadore, *Mikrochimica Acta*, 2003, **141** (3-4), 149-155.
3. R. Inam, G. Somer, *Food Chemistry*, 2000, **69** (3), 345-350.
4. J. Murphy, K. D. Cashman, *Food Chemistry*, 2001, **74** (4), 493-498.

-
5. P. Bermejo, J. Barciela, E. M. Peña, A. Bermejo, J. M. Fraga, J. A. Cocho, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, **16** (2), 188-193.
 6. S. P. Dolan, S. G. Capar, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2002, **15** (5), 593-615.
 7. P. Cava-Montesinos, M. L. Cervera, A. Pastor, M. de la Guardia, *Analytica Chimica Acta*, 2003, **481** (2), 291-300.
 8. T. Klapac, M.L. Mandic, J. Grgic, L. Primorac, A. Perl, V. Krstanovic, *Food Chemistry*, 2004, **85** (3), 445-452.
 9. R. R. de la Flor St. Remy, M. L. Fernandez Sanchez, J. B. Lopez Sastre, A. Sanz-Medel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, **9** (5), 616-622.
 10. E.M. Garcia, M.L. Lorenzo, C. Cabrera, M.C. López and J. Sánchez. *Journal of Dairy Research*, 1999, **66**, 569-578.
 11. P. Cava-Montesinos, M.L. Cervera, A. Pastor, M. de la Guardia, *Talanta*, 2004, **62** (1), 175-184.
 12. P. C. Aleixo, J. A. Nobrega, *Food Chemistry*, 2003, **83** (3), 457-462.
 13. J. Pettersson, L. Hansson, U. Oernemark, A. Olin, *Clinical Chemistry*, 1988, **34** (9), 1908-1910.
 14. I. Harrison, D. Littlejohn, G.S. Fell, *Analyst*, 1996, **121** (11), 1641-1646.
 15. A. C. F. Gomes, A. A. Menegario, D. C. Pellegrinotti, M. F. Gine, V. F. Nascimento Filho, *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004, **59** (9), 1481-1484.
 16. R. G. Flocchini, M. C. Lagunas-Solar, B. P. Perley, *International Journal of PIXE*, 1996, **6** (1-2), 375-394.
 17. Y. Shi, E. E. Sullivan, J. Holzbecher, A. Chatt, *Biological Trace Element Research*, 1999, **71-72**, 377-386.
 18. S. Waheed, J. H.Zaidi, S. Ahmad, M. Saleem, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2002, **254** (3), 597-605.
 19. K. P. Gill, J. H.Zaidi, S. Ahmad, *Radiochimica Acta*, (2003), **91** (9), 547-551.

-
20. M. B. A. Vasconcellos, M. G. M. Catharino, G. Paletti, M. Saiki, P. Bode, D. I. T. Favaro, R. Baruzzi, D. A. Rodrigues, *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 2002, **20** (4), 527-538.
 21. K.K. Cook, *Journal of AOAC International*, 1996, **79** (5), 1162-1166.
 22. M. Kantola, E. Mand, A. Viitak, J. Juravskaja, R. Purkunen, T. Vartiainen, S. Saarikoski, M. Pasanen, *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 1997, **10** (4), 225-232.
 23. E. M. García, M. L. Lorenzo. C. Cabrera, M. C. López, J. Sánchez, *Journal of Dairy Research*, 1999, **66** (4), 569-578.
 24. M. Korenovska, *Chemical Papers*, 2003, **57** (3), 155-157.
 25. L. Schloske, H. Waldner, F. Marx, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, **372** (5-6), 700-704.
 26. Y. Tamari, *Biomedical Research on Trace Elements*, 1999, **10** (2), 125-133.
 27. P. Braetter, V. E. Negretti de Braetter, S. Recknagel, R. Brunetto, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 1997, **11** (4), 203-209.
 28. P. Braetter, V. E. Negretti de Braetter, A. Raab, I. Navarro-Blasco, *Analyst*, 1998, **123** (5), 821-826.
 29. I. Navarro-Blasco, J. I. Álvarez-Galindo, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2004, **17** (4), 277-289.
 30. M. Krachler, F. S. Li, E. Rossipal, K. J. Irgolic, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, (1998), **12** (3), 159-176.
 31. F. A. Rivero-Martino, M. L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, **15** (2), 163-168.
 32. M. Krachler, T. Prohaska, G. Koellensperger, E. Rossipal, G. Stingeder, *Biological Trace Element Research*, 2000, **76** (2), 97-112.
 33. F. A. Rivero-Martino, M. L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **442** (2), 191-200.
 34. L. Yang, M. Zhang, S. Lin, D. Chen, M. Zheng, *Microchimica Acta*, 2003, **142** (1-2), 85-88.

-
35. W. R. Wolf, J. M. Holden, A. Schubert, D. G. Lurie, J. Woolson-Doherty, *Journal of Food Composition and Analysis*, 1992, **5** (1), 2-9.
36. W. T. Buckley, M. Ihnat, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1993, **345** (2-4), 217-220.
37. C. Veillon, K.Y. Patterson, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1995, **352** (1-2), 77-79.
38. K. G. Heumann, N. Raedlein, *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, 1989, **335** (7), 751-754.
39. J. Barciela García, *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España, 1999.
40. J. Mikkelsen, P. Hoejrup, J. Knudsen, *Journal of Dairy Research*, 1987, **54** (3), 361-367.
41. E. D. Strange, D. Van Hekken, M. P. Thompson, *Journal of Food Science*, 1991, **56** (5), 1415-1420.
42. B. Lönnerdal, B. Hoffman, L. S. Hurley, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1982, **36** (6), 1170-1176.
43. P. Blakeborough, D. N. Salter, M. I. Gurr, *Biochemical Journal*, 1983, **209** (2), 505-512.
44. M. T. Martin, F. A. Jacobs, J. G. Brushmiller, *Journal of Nutrition*, 1984, **114** (5), 869-79.
45. P. Bermejo, R. Domínguez, A. Bermejo, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **357**, 457-461.

3.1 INTRODUCCIÓN

La creciente incorporación de alimentos ricos en grasas o en azúcar en la dieta habitual hace que se cubran las necesidades de energía y de proteínas para el individuo, pero no así las de vitaminas y minerales. Ciertos hábitos de alimentación determinan un mayor riesgo en la aparición de carencias específicas de vitaminas y minerales. Llama la atención un problema nutricional que es más frecuente en comunidades de mayor nivel socioeconómico: la tendencia de la gente joven hacia la comida “basura” sumada a la dieta habitual aumentan el riesgo de obesidad y si reemplazan a los alimentos pueden provocar o agravar la deficiencia de micronutrientes. El consumo de bebidas carbonatadas muy ricas en azúcar, zumos artificiales, golosinas, snacks, las comidas rápidas ricas en grasa en su elaboración o en su cocción, como las hamburguesas, conforman parte de la dieta habitual de los niños a edades cada vez más tempranas. Este cambio en el estilo de vida y hábitos dietéticos de las sociedades occidentales, han favorecido el desarrollo en el ser humano de enfermedades crónicas y degenerativas que constituyen, hoy en día, el principal problema de salud de estas colectividades. No es de extrañar por tanto, que una de las mayores preocupaciones de las autoridades sanitarias y de la propia población sea la promoción de modificaciones dietéticas desde edades tempranas de la vida, como medio de prevención y control, a corto y a largo plazo, de estas afecciones.

Ha sido claramente demostrado que amplios sectores de población, incluso en países desarrollados, reciben una alimentación con niveles deficientes de minerales¹. Por ello, la suplementación de las dietas con minerales y elementos traza es ya una práctica corriente en muchos países, especialmente en hierro y calcio, al ser los elementos que plantean problemas más comunes y mejor definidos en este momento. Un aumento del conocimiento de la relación existente entre el contenido mineral de la dieta y la presencia de enfermedades crónicas, tales como hipertensión, osteoporosis o enfermedades cardiovasculares ha contribuido a generar un mayor interés por el estudio del contenido de estos nutrientes minerales en los alimentos. En esta línea, el rol del selenio en la prevención del cáncer ha recibido una particular

atención en estos últimos años. La relación entre los niveles de selenio y las enfermedades de tipo cancerígeno se apoya en numerosos estudios epidemiológicos llevados a cabo en los últimos años. Estos estudios realizados en diferentes regiones del mundo, China, Rusia, etc., casi de manera unánime demuestran que bajos consumos en selenio llevan asociado un alto nivel de aparición de enfermedades como cáncer, problemas de próstata y tiroides, etc.^{2,3,4,5}. A pesar de estar demostrado el importante papel del selenio en la obtención de un nivel óptimo en la salud humana, no se le reconoce la importancia debida a este elemento en los hábitos de alimentación de la mayor parte de la población mundial. La deficiencia de este elemento se puede presentar por un déficit de selenio mediante la ingesta de éste a través de la dieta o en los individuos que presentan una demanda anabólica aumentada. Un aumento de esta demanda puede deberse al estrés oxidativo al que se encuentran sometidos ciertas personas durante períodos prolongados, y casos de déficit, de forma general, en los desnutridos, en los que padecen enfermedades gastroenterológicas crónicas, en los sujetos de edad avanzada y en los pacientes con nutrición parenteral total.

En el capítulo 1 se han comentado las fuentes del selenio y se ha dicho que éste se encontraba en los suelos y era absorbido por las plantas que lo introducían en la cadena trófica. Por ello, zonas de especial vigilancia, por la posibilidad de que se produzcan situaciones de déficit por bajos consumos en la dieta, son aquellas que poseen suelos ácidos o bien calcáreos con regadío intenso. En España, Galicia estaría entre los primeros y Aragón entre los segundos. Como solución para paliar las deficiencias derivadas de la naturaleza de los suelos de estas regiones, se busca llevar a cabo una suplementación de selenio en alimentos de uso diario para aumentar así la ingesta diaria de dicho elemento en la dieta.

Para ello se han realizado estudios donde se suplementa los suelos⁶ y la alimentación de los animales⁷ con distintas formas de selenio para evitar esta deficiencia. Pero esta forma de suplementar con nutrientes esenciales y vitaminas en la alimentación animal están totalmente desfasados para los actuales sistemas de producción láctea en Europa expresados por el último National Research Council

(NRC-96⁸). La razón es que se basan en estudios hechos hace 20 años y desde entonces la situación productiva en las granjas ha cambiado drásticamente en aspectos tales como:

- Genética
- Nivel de alimentación
- Condiciones de explotación (reducción de la situación de pastoreo)

Las próximas recomendaciones del NRC deberán recoger datos sobre aspectos como:

- Efecto de los elementos traza y vitaminas sobre el sistema inmunitario y la prevención de enfermedades en los animales, como la mastitis, caso en el que se usa el selenio para su prevención, y la entrada de estos en la cadena trófica.
- Concentración de los elementos traza de los alimentos empleados actualmente en la nutrición animal.
- Métodos de control en granja de dichos alimentos.
- Suplementación con elementos traza como el selenio, definición de situaciones en que deben usarse.
- Minimizar el aporte de los nutrientes como el fósforo para evitar la polución y con ello el riesgo medioambiental.
- Efecto de la grasa sobre la absorción de ciertos minerales como calcio y selenio.

La moderna agricultura industrial usa nuevos productos para conseguir una mejora en el rendimiento de sus explotaciones, tanto para aumentar la producción como para disminuir gastos. Por ello es necesario estudios sobre la influencia en la alimentación del ganado el uso de estos nuevos suplementos como las levaduras selenizadas, vitaminas, etc., utilizados actualmente en la industria ganadera. Estos

trabajos deben centrarse en estudiar los efectos que éstos producen en la vida de los animales y la introducción de estas sustancias en la cadena trófica. Además se deberían realizar experiencias que reflejarán que influencia tienen estos nuevos productos en la salud humana, para comprobar que son beneficiosos y dar tranquilidad a los consumidores que son reacios a estos nuevos productos.

Métodos desarrollados para la suplementación de selenio en alimentos

La suplementación de alimentos es un reto para las industrias alimentarias, ya que los consumidores se muestran en gran número reticentes al uso de las cosas nuevas o desconocidas para ellos. Además de que estos productos conseguidos deben cumplir la legislación vigente en los países donde se quiera introducir este producto.

En los últimos años se desarrollaron numerosos trabajos de investigación con objeto de estudiar la fortificación de alimentos con diferentes micronutrientes necesarios para organismo humano^{9,10,11,12}.

Estos estudios se llevan a cabo en la producción agrícola con el fin de obtener productos ricos en nutrientes y que mejoren la vida de los animales. Dentro de los estudios de fortificación de alimentos el selenio tiene un papel destacado debido a las propiedades sanitarias adjudicadas en los últimos años y expuestas en el capítulo 1.

En el año 2003 Schloske y col.⁶ llevan a cabo estudios para mejorar la salud y la fertilidad de las vacas mediante suplementación de los pastos con selenato sódico en una región en la cual sus suelos eran selenodeficientes. También comprobaron que esta suplementación provocaba un aumento de selenio en la leche producida por las vacas que comían dichos forrajes. Por consiguiente, ese procedimiento podría ayudar a mejorar el consumo de selenio en las zonas de Europa deficitarias en selenio en su dieta.

A. Diowksz y col.¹³. (2003), presentan los datos de su trabajo investigación que indica la posibilidad de llevar a cabo un enriquecimiento de comida animal con selenio orgánico, la forma en que se encuentra en las plantas, y en levaduras, y el uso potencial en la producción de alimentos utilizados regularmente en la dieta humana, sugiriendo como ejemplo la suplementación del pan fermentado.

Givens y col.⁷. (2004), estudian la suplementación de la alimentación de las vacas con tres sustancias diferentes, selenito sódico, un quelato de selenio y levaduras selenizadas. Los autores señalan que el selenio aportado como levaduras selenizadas en la alimentación produce un mayor aumento del nivel de selenio en la leche. El estudio se realiza en granjas de Inglaterra con el objetivo de conseguir una leche que aporte mayor cantidad de selenio a la dieta.

A. C. Pappas y col.¹⁴. (2004), estudian la suplementación selenio en la alimentación de aves de corral, lo cual produce un aumento de la concentración de este nutriente en los huevos y en los tejidos de los pollos. Los autores señalan que no existen diferencias significativas en la concentración de selenio en los huevos en función de la alimentación que les proporcionan a los animales. En cambio si existen diferencias en el contenido de selenio encontrado en los tejidos de las crías.

Liu y col.¹⁵. (2004), estudian las interacciones entre selenio y fósforo, y sus efectos en el crecimiento y acumulación del selenio en el arroz. Los resultados revelaron que un suministro conveniente de selenio puede promover el crecimiento de arroz y el selenio excesivo podría dañar la planta. El suministro de selenito sódico podría reforzar los niveles de selenio en el arroz e introducirlo en la dieta china donde son deficientes de este nutriente esencial.

Además de estos estudios de investigación también se han desarrollado patentes de cómo llevar a cabo la fortificación de productos de la dieta de animales con distintas especies de selenio en estos años^{16,17,18,19}.

Las proteínas de la leche, caseínas y proteínas del suero, son fuentes importantes de aminoácidos azufrados, siendo las caseínas particularmente ricas en metionina mientras que las proteínas del suero lo son ricas en cisteína. Por consiguiente, estas pueden constituir un importante vehículo para el enriquecimiento del selenio dietético, porque la selenometionina es incorporada inespecíficamente en la proteína en el lugar de la metionina. La selenometionina parecería una forma óptima de suplementación de selenio para animales y humanos, debido que es la forma en la cual el selenio es presentado comúnmente en los alimentos, y es almacenado eficientemente en las proteínas corporales. Con esta suplementación existe la posibilidad de mejorar el estatus del selenio en humanos por medio de los alimentos lácteos, si puede establecerse que ese procedimiento beneficia a los animales y finalmente a la salud humana.

Además, la leche es un alimento que el ser humano consume habitualmente durante toda su vida, desde su infancia hasta la vejez y que podría suponer un aumento del aporte de selenio para el individuo sin variar sustancialmente sus hábitos alimenticios y también, se ha de tener en cuenta que se ha demostrado que es un eficiente vehículo de fortificación de vitaminas, calcio, cinc, hierro, etc.

3.2 OBJETIVO

El objetivo principal de esta parte del trabajo es estudiar la influencia de la suplementación del selenio en los forrajes, que se utilizan en la alimentación de las vacas, en el contenido de selenio en la leche. Esta influencia se estudiará tanto en función del tipo de suplementación (selenito sódico o levaduras selenizadas) como en función de los niveles utilizados en la suplementación.

También se estudiará la evolución temporal de la concentración de selenio en la leche producida por las vacas durante un periodo de tiempo donde se lleva a cabo la alimentación de las vacas con diferentes formas de selenio.

Por último se buscará definir un perfil de distribución del selenio en los diferentes componentes de la leche (suero lácteo, micelas de caseína y nata) para cada uno de los tipos de suplementación y se verá si cambia o no dicho perfil.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 ESTUDIO 1. NIVELES DE SELENIO EN LECHE EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA QUÍMICA DEL SUPLEMENTO DE SELENIO UTILIZADO EN LA ALIMENTACIÓN DEL GANADO

Con el objeto de estudiar si las distintas formas de selenio, selenito sódico y levaduras ricas en selenometionina, aportadas como suplemento a la alimentación del ganado pasan a la leche en diferente medida y con ello a la cadena trófica, se procederá a alimentar las vacas durante un mes con forrajes fortificados con estas dos especies. Se recogerán muestras durante un periodo de cuarenta días y se determinará el contenido de selenio en las muestras de leche obtenidas durante este periodo. Finalmente, se tratará de buscar una relación entre el aporte de selenio y la cantidad de éste en la leche.

Planificación de la suplementación de selenio en cada una de las granjas y toma de muestra.

El estudio 1 se llevará a cabo en tres granjas de ganado vacuno asociadas a la empresa láctea que nos proporciona las instalaciones y las muestras. Estas tres granjas se seleccionaron en base las características más homogéneas posibles (lugar, tamaño de la granja, modo de funcionamiento, equipos utilizados, etc.). Las características de las granjas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las granjas que participan en el estudio de suplementación con distintas formas químicas de selenio

Características	Granja A	Granja B	Granja C
Nº de vacas	60	40	40
Producción de leche / L	1700	1160	1200
Raza de las vacas	Holstein Friesian	Holstein Friesian	Holstein Friesian

Alimentación ganado	Forrajes	Forrajes + Se ₂ O ₃	Forrajes + SeMet
---------------------	----------	---	------------------

La granja donde el ganado vacuno sólo ingirió los piensos que conforman los forrajes (silo de hierba, maíz y alfalfa) se considera la granja con nivel cero de suplementación. Se eligió esta granja como blanco del estudio debido a que es de las tres granjas la que tiene unas características menos homogéneas. Este valor será utilizado como blanco con el fin de conocer el aporte natural de selenio mediante los silos que se usan generalmente para la fabricación de piensos para ganado vacuno. En el caso de las otras dos granjas disponemos del mismo número de vacas y una producción láctea muy similar. Las especies seleccionadas para la suplementación no han sido seleccionadas aleatoriamente. Para la suplementación con selenio inorgánico fue empleado el selenito sódico debido a que esta especie es la que se utiliza normalmente como complemento alimenticio en las granjas de vacas con el fin de evitar enfermedades como la mastitis. Mientras, para la suplementación con selenio orgánico, se empleó la selenometionina procedente de levaduras. Se ha decidido utilizar estas levaduras ricas en selenometionina debido a que esta especie es la forma más común en los vegetales que toman los rumiantes.

En las distintas granjas se recogen muestras de leche en distintos periodos de tiempo, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 días tras llevar a cabo el cambio de alimentación elegida en cada caso. Este diseño de muestreo se realizó con el fin de estudiar cuanto tiempo es necesario para que el selenio aportado en la alimentación pase a la leche y si el nivel de selenio en la leche permanece constante con el tiempo. Las muestras se recogen del tanque lácteo de cada granja, donde se mezcla la leche de todas las vacas pertenecientes a dicha granja que fue recogida durante dos ordeños (matinal y nocturno), llevados a cabo mediante un ordeñado automatizado. Las muestras se recogen por duplicado en botellas de vidrio de 500 mL, lavadas anteriormente en el laboratorio con ácido nítrico al 10% y agua ultrapura. Una vez en el laboratorio las muestras se dividen en distintos viales de polietileno y se congelan a -20°C hasta su análisis.

3.3.1.1 Determinación de selenio en los forrajes utilizados para la alimentación del ganado

Para llevar a cabo el estudio del aporte de selenio a la leche en función de la especie de selenio que utilizemos en la fortificación de los forrajes usados en la alimentación de las vacas es necesario conocer la cantidad de selenio que ingieren las vacas a partir de los forrajes. En este apartado vamos a determinar el contenido de selenio en los forrajes que se van a consumir en las tres granjas durante el tiempo que van durar los dos estudios que vamos a realizar.

3.3.1.1.1 Optimización de la digestión ácida para forrajes

Para poder analizar el contenido de selenio en los diferentes forrajes que componen el pienso, hierba, maíz y alfalfa, vamos a optimizar un método de digestión ácida asistida por energía de microondas capaz de destruir la matriz de los distintos forrajes tomando como base el método de digestión ácida optimizado anteriormente para las leches de vaca (capítulo 2).

Para ello, se prepararon una serie de seis bombas conteniendo cada una 0,2 gramos de un material de referencia de hierba de centeno (BCR-281), 1 mL de ácido nítrico y 0.5 mL de agua. Y se sometió al programa de temperaturas y potencias desarrollado para el microondas de uso doméstico. Posteriormente se añadieron 0,5 mL de peróxido de hidrógeno y se volvió a someter a las distintas etapas obtenidas para la leche tras la optimización (ver apartado 2.3.3).

Una vez desarrollado este proceso se comprobó que la digestión de los forrajes no era completa quedando restos del vegetal y sílice. Por este motivo se decidió estudiar los distintos parámetros que afectan significativamente al proceso de digestión. Descartamos estudiar la cantidad de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno empleada debido a que en el estudio de optimización de la digestión ácida de la leche comprobamos que el aumento de estas variables provocaba una depresión en

la señal analítica del selenio. Los parámetros estudiados fueron el tiempo de exposición y la potencia de microondas.

Tiempo de exposición

Para llevar a cabo este estudio se prepararon tres series de seis bombas que fueron expuestas a cuatro, cinco y seis etapas de radiación de microondas respectivamente con una potencia de 330 W antes de añadir el peróxido de hidrógeno. A continuación se le añadieron 0,5 mL de peróxido de hidrógeno y se sometieron a radiación de microondas con una potencia de 370 W durante dos etapas de tres minutos y dejando enfriar entre las etapas. Las disoluciones resultantes presentan una mala digestión de la hierba y no difieren sustancialmente entre ellas de modo significativo. Todas las disoluciones presentan un precipitado y están turbias aunque la exposición a la radiación microondas haya sido superior, por lo que se ha decidido mantener los periodos de tiempo optimizados para la digestión de las leches.

De igual modo, se tomaron tres series y se estudió el tiempo de exposición a energía de microondas tras añadir el peróxido de hidrógeno. En el primer paso de la digestión se tomaron 0,2 gramos de material de referencia de alfalfa, se le añadieron 0,5 mL de agua, 1 mL de ácido nítrico y se sometieron a cuatro etapas de radiación de microondas con una potencia de 330 W. En este instante, se añade el peróxido de hidrógeno y se someten a diferentes tiempos de exposición, conformados por dos, tres y cuatro etapas de tres minutos con periodos de enfriamiento de dos minutos en cada etapa con una potencia de 370 W.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el aumento del tiempo de exposición a la radiación de microondas, tras añadir el peróxido de hidrógeno, mejora la destrucción de los forrajes aunque la destrucción no llega a ser total presentando todavía restos vegetales además de la sílice. Debido a que el aumentar el tiempo de exposición a la radiación de energía microondas, es decir introducir un mayor número de etapas, nos llevaría a la obtención de un proceso tedioso y con

riesgos de pérdidas del analito, se procede a estudiar el efecto del aumento de la potencias después de adición del peróxido de hidrógeno.

Potencia de la energía de microondas

De igual modo que se indica en el apartado anterior se tomaron tres series de seis bombas conteniendo 0,2 gramos de material de referencia de alfalfa al que se adicionaron 0,5 mL de agua, 1 mL de ácido nítrico y se sometieron a cuatro etapas de radiación de microondas con una potencia de 330 W. En esta etapa no se ha variado la potencia debido a que un aumento en el tiempo de exposición en la misma no producía mejora sustancial en la destrucción de los forrajes. Además de un impedimento técnico, un aumento de la potencia en esta etapa puede generar una situación de sobrepresión en las bombas empleadas, altamente peligrosa.

Después de llevar a cabo esta etapa, se añadieron 0,5 mL de peróxido de hidrógeno y se sometieron a tres etapas de tres minutos con potencias de 300, 370, 400 y 430 W, dejando enfriar las bombas entre cada una de las etapas.

Una vez realizados estos ensayos, se observa una destrucción completa de la matriz en la serie digerida empleando 430 W aunque permanece un residuo de sílice. El digerido es sometido a centrifugación, eliminándolo. Una vez que se obtiene una disolución transparente y sin ningún residuo, se le añade 0,7 mL ácido clorhídrico y se introduce en el microondas a 370 W durante 2 etapas de 3 minutos para llevar a cabo la reducción de las especies de selenio a selenio (IV). A continuación, se añade la urea para eliminar el exceso de vapores nitrosos generados durante nuestro proceso de digestión. Finalmente, se llevó a cabo la determinación de selenio mediante generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (optimizado capítulo 2). El resultado obtenido tras medir las seis disoluciones resultantes por triplicado fue de $26,3 \pm 2,2 \text{ ng g}^{-1}$. Este resultado nos confirma que nuestro método es válido debido que el resultado encontrado está dentro del intervalo certificado en el material de referencia, cuyo valor para el contenido de selenio es de $28 \pm 4 \text{ ng g}^{-1}$.

Tras comprobar que los resultados obtenidos son satisfactorios se adopta como método de pretratamiento para los forrajes empleados para la alimentación de las vacas en las tres granjas el indicado en la Figura 1.

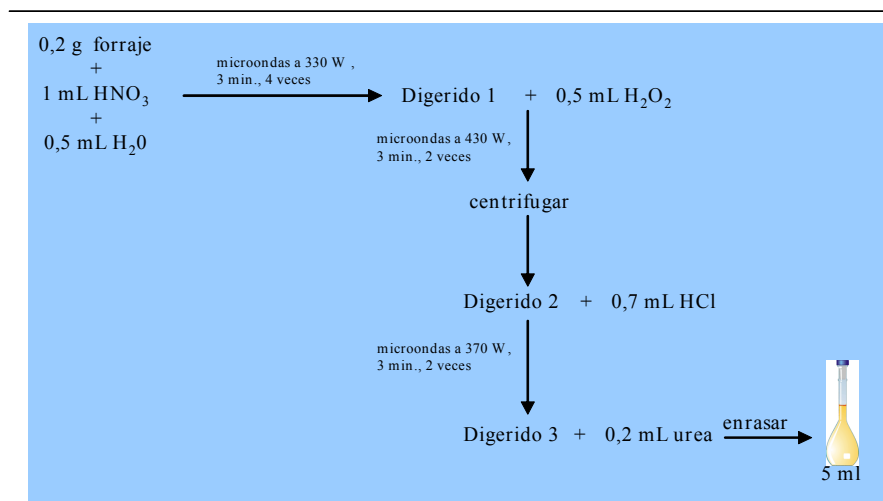


Figura 1. Método de pretratamiento de la muestra propuesto para la determinación de selenio total en forrajes

Características analíticas del método de análisis de selenio en forrajes

Rectas de calibrado y adición

Las rectas de calibrado y adición se han llevado a cabo en el rango de 0 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Tras la aplicación de un test t con nivel de confianza 99.5% se obtiene que las rectas de calibrado y adición difieren significativamente ($t_{\text{experimental}} = 44,40$, $t_{\text{teórico}} = 2,09$). Por ello, las determinaciones de selenio en los forrajes fueron realizadas por el procedimiento de adiciones. Las ecuaciones de las rectas de calibrado y adición de cada uno de los componente se muestran en la Tabla 2

Tabla 2. Rectas de calibrado y adición para la determinación de selenio en forrajes

Recta de calibrado	$A = 0,021[\text{Se}] + 0,002$
Recta de adición	$A = 0,013[\text{Se}] + 0,021$

Precisión

La precisión del método, expresada como el coeficiente de variación (%CV), fue estudiado para el procedimiento completo, la digestión ácida asistida por energía de microondas, y la medida por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Para este estudio se prepararon tres series de seis bombas, donde se colocaban 0,5 g de forraje, y a cada una de las series se le añadía de 1, 2 y 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selenio respectivamente. Se someten al proceso de digestión ácida inducida por energía microondas y se miden por el método de generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Los valores del coeficiente de variación obtenidos fueron 6,3, 4,2 y 3,8 % para los tres niveles de concentración estudiados, por lo que podemos decir que el método empleado en la determinación de selenio en los forrajes es preciso a los niveles estudiados.

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad de los métodos desarrollados se estudió a partir de dos parámetros: límites de detección y cuantificación definidos previamente (apartado 2.3.5). El límite de detección para la medida de selenio en forrajes fue de 2,23 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ y el límite de cuantificación 7,43 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Exactitud

La exactitud se estudió aplicando el método propuesto al material de referencia BCR-281 (hierba de centeno), el cual presenta el valor de selenio certificado (28 ± 4 ng g^{-1}). La digestión del material de referencia se llevo a cabo por triplicado y cada una de las digestiones se midió tres veces obteniéndose un valor de $26 \pm 2,2$ ng g^{-1} . Tras la realización de un test t de dos colas para un nivel de confianza del 95% podemos afirmar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el

valor encontrado y el valor certificado. Por ello, se puede decir que la digestión ácida de los forrajes y la posterior medida del selenio por generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica es un procedimiento exacto para determinar este elemento en forrajes.

3.3.1.1.2 Determinación de selenio en forrajes por generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica

Una vez desarrollado el método de preparación de la muestra para los distintos forrajes proporcionados como alimentación a las vacas de las tres granjas objeto de estudio se llevo a cabo la determinación de selenio mediante la generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica. Estos forrajes que vamos a analizar se van a utilizar en la preparación de la ración de alimento que se añadirá a las vacas durante todo el estudio. El porcentaje de cada uno de los silos en la mezcla total es calculado con el fin de obtener una dieta con el mismo valor nutricional para las vacas (17 % proteína bruta en peso seco, 22-25 % almidón en peso seco, 1.7 Energía neta Mcal Kg⁻¹) en cada una de las tres granjas. Tras prepararse el forraje (la mezcla de maíz, hierba y alfalfa) se le añade una mezcla concentrada compuesta por cereales, soja, y el complemento de selenio que se vaya a utilizar en esa granja en particular, que es facilitada por la compañía láctea y se introduce en el carro mezclador el cual deposita el alimento en el pesebre.

Tras realizar los análisis de cada uno de los silos los valores de selenio que han sido encontrados son los que se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Contenido de selenio en los forrajes usados en las diferentes granjas incluidas en el estudio

[Se] µg de selenio por kg forraje			
	Maíz	Hierba	Alfalfa
Granja A	20.1 ± 3.84	65.0 ± 6.92	*

Granja B	23.5 ± 2.51	49.8 ± 6.54	58.8 ± 4.70
Granja C	30.5 ± 7.33	53.6 ± 3.94	32.3 ± 5.43
Resultados expresados como la media ± la desviación estándar (n=8)			
*La granja A no usa la alfalfa para configurar el forraje			

3.3.1.2 Determinación de selenio en la leche obtenida después de la suplementación de los forrajes con diferentes formas de selenio

La determinación del selenio total en las muestras de leche se ha llevado a cabo mediante generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica después de una digestión ácida de la misma. La optimización del método de determinación así como las condiciones finales utilizadas se encuentran detalladas en el capítulo 2. Los valores de selenio total encontrados en cada una de las muestras de leche procedentes de las tres granjas estudiadas se pueden ver en la Tabla 4. Estas muestras han sido recogidas en nueve días diferentes de un período de cuarenta días, período durante el cual la alimentación es perfectamente homogénea.

Tabla 4. Niveles de selenio encontrados en las leches analizadas durante el estudio de suplementación de forrajes con distintas formas de selenio. Los resultados están expresados como media ± desviación estándar (n= 12)

Días de fortificación	[Se] / $\mu\text{g L}^{-1}$		
	Granja A	Granja B	Granja C
1	22,9 ± 0,3	23,3 ± 0,3	28,7 ± 0,2
5	22,4 ± 0,3	23,5 ± 0,3	31,8 ± 0,2
10	22,6 ± 0,4	23,2 ± 0,2	32,2 ± 0,2
15	23,0 ± 0,3	23,1 ± 0,2	32,8 ± 0,2
20	22,4 ± 0,3	23,5 ± 0,2	31,7 ± 0,3
25	22,5 ± 0,3	22,4 ± 0,3	31,9 ± 0,3

30	22,4 ± 0,3	23,1 ± 0,3	30,9 ± 0,1
35	22,6 ± 0,2	22,6 ± 0,3	31,3 ± 0,2
40	23,6 ± 0,3	23,1 ± 0,3	31,5 ± 0,3
Granja A → Suplementación cero (blanco) Granja B → Suplementación 0,3 µg g ⁻¹ con selenito sódico Granja C → Suplementación con 0,3 µg g ⁻¹ selenio orgánico (levaduras selenizadas)			

Evolución temporal de la concentración de selenio en la leche tras la fortificación de los forrajes con diferentes especies de selenio.

Con estos valores de concentración de selenio en la leche hemos construido unas cartas de control, con objeto de identificar la presencia de causas, ajenas a nuestro estudio, que puedan producir un cambio en la medida que provoque una excesiva variabilidad. Se fijan una serie de límites frontera que nos permitirán conocer si la variabilidad de las concentraciones obtenidas fue provocada por el azar o poseen causas asignables. A la vista de las cartas de control de rangos realizadas para cada una de las granjas (Figura 2) se observa que el proceso se encuentra en estado estacionario, siendo las variaciones presentes a lo largo del tiempo, debida a factores aleatorios. Las cartas de medias (Figura 3) nos indican que el proceso se encuentra bajo control estadístico, esto es, el modelo de variabilidad del proceso no cambia con el tiempo y el proceso es capaz de cumplir las especificaciones fijadas por nosotros.

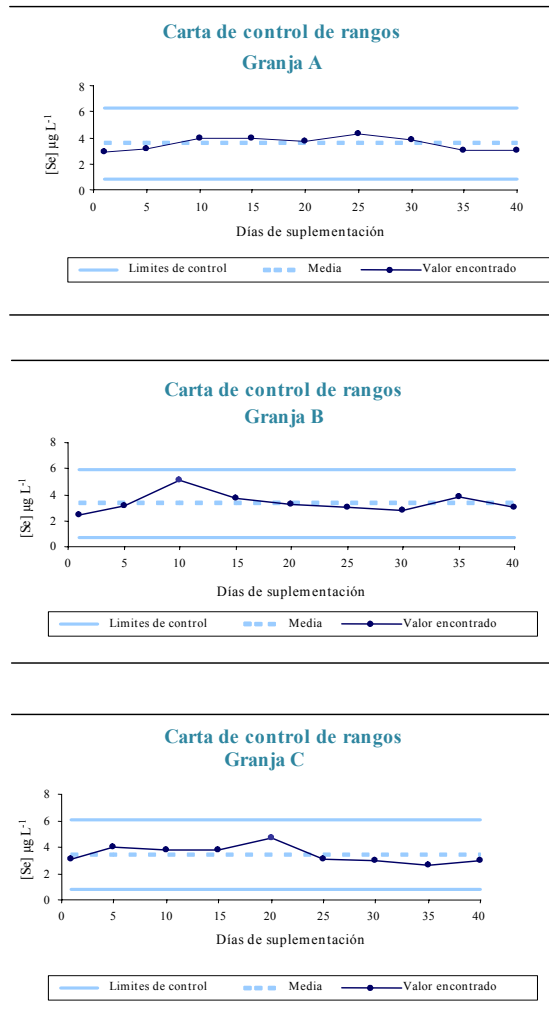


Figura 2. Cartas de control de rangos obtenidas en el estudio de fortificación de los forrajes para el contenido de selenio en las leches procedentes de las tres granjas estudiadas durante un período de 40 días. Granja A: sin fortificación, Granja B: fortificación con Se inorgánico, Granja C: fortificación con Se orgánico

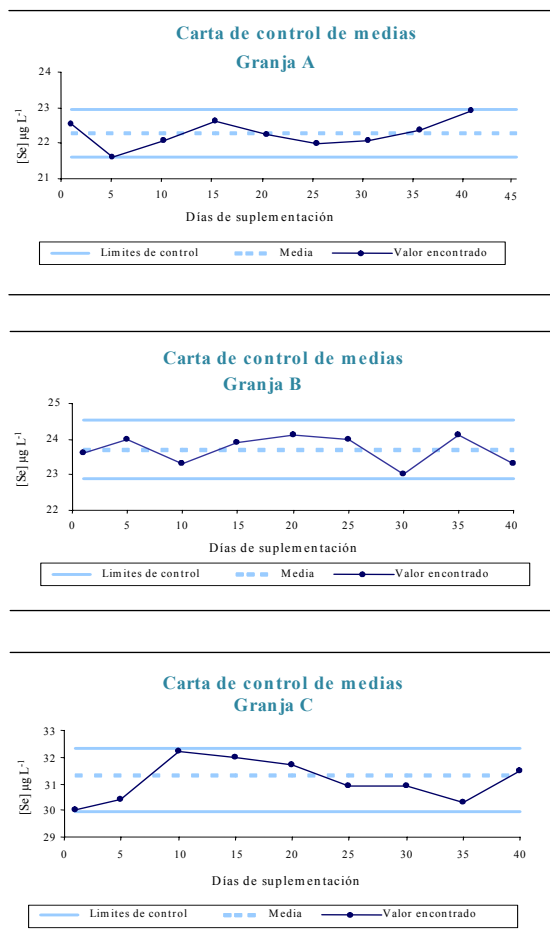


Figura 3. Cartas de control de medias obtenidas en el estudio de fortificación de los forrajes para el contenido de selenio en las leches procedentes de las tres granjas estudiadas durante un período de 40 días. Granja A: sin fortificación, Granja B: fortificación con Se inorgánico, Granja C: fortificación con Se orgánico

Con los resultados obtenidos (Tabla 5), y la aplicación de un test t de dos colas a un nivel de confianza de 99.5% se puede concluir que la suplementación con selenio en forma de levaduras ricas en selenometionina produce un aumento significativo en el nivel de selenio en leche ya que presenta un $t_{\text{estadístico}}$ de 21,40 siendo el $t_{\text{teórico}}$ de 2,12. Mientras que si la fortificación de los forrajes se lleva a cabo con selenito

sódico no existe una diferencia significativa en la concentración de selenio encontrada en la leche producida por las vacas que han sido alimentadas solamente con forrajes, ya que presenta un $t_{\text{estadístico}}$ de 2,09 siendo el $t_{\text{teórico}}$ de 2,12. Según estos resultados, el selenio inorgánico utilizado normalmente en las granjas gallegas como suplemento de forrajes para minimizar ciertas enfermedades en el ganado, no produce un aumento significativo en la concentración de selenio en la leche.

Tabla 5. Concentraciones medias de selenio en las leches obtenidas de las tres granjas estudiadas. Granja A: sin fortificación, Granja B: fortificación con Se inorgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Granja C: fortificación con Se orgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$)

	[Se] media / $\mu\text{g L}^{-1}$	σ / $\mu\text{g L}^{-1}$	CV / %
Granja A	22,7	0,40	1,6
Granja B	23,1	0,37	1,7
Granja C	31,4	1,15	3,67
σ - desviación estándar (n= 16) CV – coeficiente de variación			

3.3.1.3 Estudio de la distribución del selenio en los diferentes componentes de la leche obtenida tras la suplementación de los forrajes

Tras los análisis de selenio en las muestras de leche de vaca obtenidas en el desarrollo del Estudio 1, se observa que el contenido de selenio en leche se mantiene estable en función del tiempo, independientemente del tipo de alimentación empleada. Por ello, se ha decidido estudiar el contenido de selenio en los distintos componentes de la leche a través de dos muestras de cada granja. Para este análisis se seleccionaron las muestras de leche recogidas de cada granja, una a los cinco y la otra a los treinta días después de comenzar a alimentar las vacas con los forrajes a estudio.

De cada una de las muestras de leche a estudio, se ultracentrifugaron diez tubos de 15 mL, con lo que se obtuvieron diez muestras de suero de leche, diez muestras

de micelas de caseínas (y proteínas de elevado peso molecular) y diez muestras de nata para cada muestra de leche de partida. Los análisis se realizaron por triplicado a tres muestras de suero, tres muestras de micelas de caseínas y tres muestras de nata obtenidas de cada una de las leches seleccionadas. Los valores obtenidos para cada uno de los componentes estudiados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Niveles de selenio encontrados en los distintos componentes de la leche tras la suplementación de los forrajes con distintas formas de selenio. Granja A: sin fortificación, Granja B: fortificación con Se inorgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Granja C: fortificación con Se orgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$)

	Días suplementación	[Se] / $\mu\text{g L}^{-1}$		
		Suero	Caseínas	Nata
Granja A	5	$11,6 \pm 0,2$	$8,4 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$
	30	$11,8 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$
Granja B	5	$12,4 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$
	30	$12,3 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$
Granja C	5	$16,3 \pm 0,4$	$13,1 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$
	30	$16,3 \pm 0,2$	$13,2 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$

Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar (n= 12)

Como puede verse en la Figura 4, los niveles de concentración media de selenio en los diferentes componentes de la leche obtenidos tras el uso de la suplementación de selenio en su forma inorgánica es menor, que la obtenida para el mismo nivel de suplementación con selenio orgánico en suero lácteo, micelas de caseína y nata.

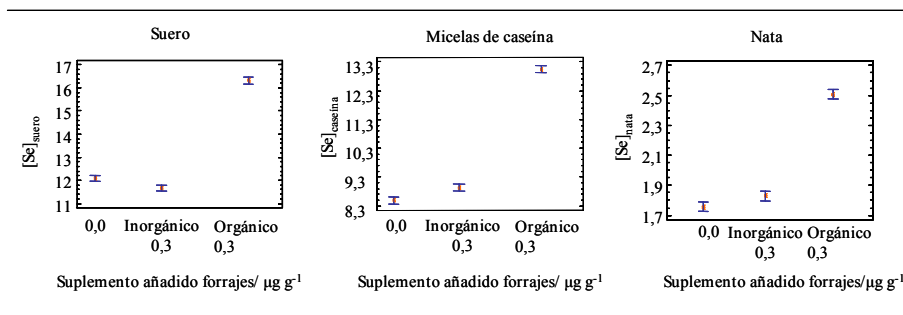


Figura 4. Concentración de selenio en los diferentes componentes de la leche de vaca obtenidos tras la fortificación de los forrajes con distintas especies de selenio

Antes de llevar a cabo el análisis un Test de Rango Múltiple para comparar los contenidos de selenio en cada uno de los componentes de la leche obtenidos a partir de leche de vaca resultantes de alimentar con diferentes suplementos de selenio, vamos a realizar un análisis de varianza con el Test de Cochran, para ver si existen diferencias significativas entre las varianzas de las concentraciones en los componentes de la leche obtenidos a partir de las leches obtenidas en cada una de las granjas con diferentes alimentaciones. Una vez realizado, podemos concluir que no hay diferencias significativas (95% nivel de confianza) entre las desviaciones estándar de la concentración de selenio en cada uno de los componentes de la leche.

Para conocer entre que componentes de la leche existen diferencias estadísticamente significativas (95% nivel de confianza) se llevo a cabo un Test de Rango Múltiple, el cual aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué grupo de datos son significativamente diferentes de los otros. El método establece que existen diferencias significativas entre los distintos grupos utilizando para la comparación el método de Fisher (95% nivel de confianza) entre las concentraciones medias de selenio encontradas en el suero, caseína o nata de las distintas leches obtenidas a diferentes alimentaciones (Tabla 7). El resultado de este análisis estadístico nos muestra que existen diferencias significativas entre los contenidos de selenio en las distintas muestras de leche estudiadas

Tabla 7. Resultados del Test de Rango Múltiple usando el método de Fisher (95% nivel de confianza) para la concentración de selenio en los diferentes componentes de la leche

Tipo de alimentación	Media / $\mu\text{g L}^{-1}$	Grupo homogéneo
SUERO LÁCTEO		
A	11,6	X
B	12,1	X
C	16,3	X
Limites (\pm)	Contraste	Diferencia
0,27	A-B	*-0,44
0,27	A-C	*4,67
0,27	B-C	*-4,22
MICELAS DE CASEÍNA		
A	8,4	X
B	9,0	X
C	13,1	X
Limites (\pm)	Contraste	Diferencia
0,26	A-B	*0,59

0,26	A-C	*-4,11
0,26	B-C	*4,70
NATA		
A	1,8	X
B	1,9	X
C	2,5	X
Limites (±)	Contraste	Diferencia
0,07	A-B	*0,09
0,07	A-C	*0,69
0,07	B-C	*-0,60
A=Forrajes, B=forrajes + Se_{Inorgánico} (0,3 µg g⁻¹), C=forrajes + Se_{Orgánico} (0,3 µg g⁻¹) * Existen diferencias significativas entre los niveles comparados		

Una vez comprobado que la concentración de selenio en los diferentes componentes de la leche, suero lácteo, micelas de caseína y nata, difieren en la concentración de selenio dependiendo de la alimentación aportada a las vacas en cada una de las granjas se va a proceder a estudiar si también hay variaciones significativas en la distribución porcentual de selenio en los diferentes componentes de la leche. Para ello se va a utilizar las mismas herramientas estadísticas empleadas en el estudio de comparación de la concentración de selenio en los diferentes componentes de la leche.

Con objeto de ver la distribución de selenio en los diferentes componentes de la leche se calcularon los porcentajes de selenio en cada uno de ellos (Figura 5).

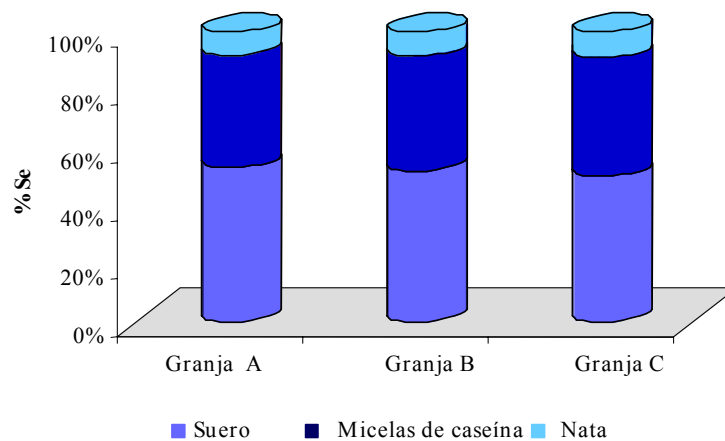


Figura 5. Distribución porcentual de selenio en los diferentes componentes de la leche de vaca. Granja A: sin fortificación, Granja B: fortificación con Se inorgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Granja C: fortificación con Se orgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$)

A la vista de esta figura parece que no existen diferencias en la distribución porcentual de selenio en los diferentes componentes de la leche. Pero esto no se puede afirmar si no se lleva a cabo un análisis estadístico.

Primeramente, representamos los valores medios de los porcentajes de selenio en cada uno de los componentes de la leche en función de la alimentación recibida por el ganado en las tres granjas (Figura 6). Tras observar la Figura 6 no parece existir una tendencia clara con la que podamos decir que existe una diferencia en el porcentaje de selenio en cada uno de los componentes lácteos en función de la alimentación empleada en cada una de las granjas.

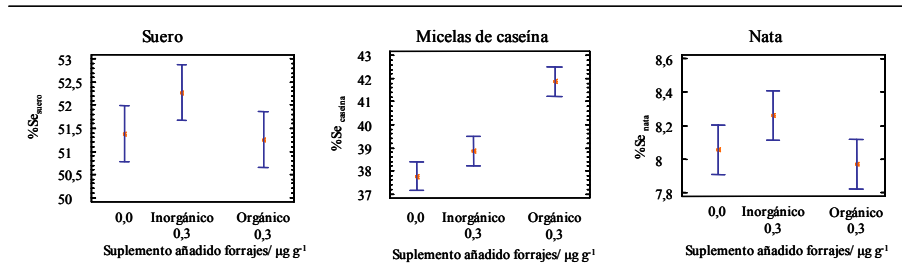


Figura 6. Porcentaje de selenio en los diferentes componentes de la leche de vaca obtenidos tras la fortificación de los forrajes con distintas especies de selenio

Por ello, se ha realizado un estudio estadístico utilizando el Test de Cochran, para comprobar que no existen diferencias significativas con un nivel de confianza del 95 % para la variabilidad de las medidas en los datos que comparamos.

Tras estos análisis se realizó un Test de Rango Múltiple para ver si influye la alimentación que se les había proporcionado a los animales en los porcentajes de selenio en cada uno de los componentes de la leche en las tres granjas. El Test de Rango Múltiple nos indicará si los porcentajes de selenio en cada uno de los componentes son estadísticamente iguales o se diferencian (nivel de confianza del 95 %) en función de la alimentación suministrada a las vacas.

Los resultados estadísticos del Test de Rango Múltiple pueden observarse en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del Test de rango múltiple usando el método de Fisher (95% nivel de confianza) para el porcentaje de selenio en los diferentes componentes de la leche

Tipo de alimentación	Media / %	Grupo homogéneo
SUERO LÁCTEO		
A	51,4	X
B	52,3	X
C	51,3	X
Limites (±)	Contraste	Diferencia
1,21	A-B	0,90
1,21	A-C	-0,13
1,21	B-C	1,02
MICELAS DE CASEÍNA		
A	37,8	X
B	38,9	X
C	41,9	X
Limites (±)	Contraste	Diferencia
1,25	A-B	1,08
1,25	A-C	*-3,02
1,25	B-C	*4,11
NATA		
A	8,1	X
B	8,3	X

C	8,0	X
Límites (±)	Contraste	Diferencia
0,29	A-B	0,20
0,29	A-C	-0,09
0,29	B-C	0,29

A=Forrajes, B=forrajes + Se_{Inorgánico} (0,3 µg g⁻¹), C=forrajes + Se_{Orgánico} (0,3 µg g⁻¹)
 * Existen diferencias significativas entre los niveles comparados

Tras este estudio hemos encontrado que existen diferencias significativas para el porcentaje de selenio en las micelas de caseína obtenidas de las leches de vaca que fueron alimentadas con forrajes suplementados con selenio orgánico respecto a las micelas de caseína de las leches de vaca procedentes de la granja A y granja B. En cambio no se encuentran diferencias entre los porcentajes de selenio en el suero lácteo y la nata de las leches procedentes de las tres granjas. Esta variación en el aumento en el porcentaje de selenio en las caseínas puede ser debido a que el selenio orgánico suministrado como suplemento es la selenometionina que es un aminoácido y que se puede incorporar más fácilmente a las proteínas.

Una vez desarrollado el estudio de fortificación se buscó si existía una correlación entre los niveles de selenio en leche entera (LE), suero de la leche (SL) y las micelas de caseína (MC) para cada una de las granjas. Para ello se aplicó una regresión lineal, $Z = a + bX + cY$, donde Z es el contenido de selenio en LE, X es el contenido de selenio en SL e Y es el contenido en MC y a, b, c son constantes. Los valores de a, b y c así como el valor del coeficiente de correlación r se calcularon empleando el programa estadístico Statgraphics plus versión 5.0. Dichas correlaciones existen y se pueden expresar en forma de las siguientes ecuaciones:

Granja A

$$LE = 1,83 + 0,96SL + 1,06 MC$$

$$R^2 = 0,971$$

Granja B

$$LE = 1,57 + 0,98 SL + 1,07 MC$$
$$R^2 = 0,913$$

Granja C

$$LE = 3,05 + 0,98 SL + 0,80 MC$$
$$R^2 = 0,973$$

3.3.2 ESTUDIO 2. FORTIFICACIÓN DE FORRAJES CON SELENIO ORGÁNICO A DIFERENTES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

Con objeto de estudiar la influencia del nivel de suplementación de los forrajes en el contenido de selenio en leche se ha procedido a diseñar un nuevo estudio de fortificación. Dicho estudio se realizó utilizando levaduras selenizadas ricas en selenio orgánico. Para ello se seleccionaron dos granjas, Granja 1 y Granja 2 que corresponden con la Granja A y Granja C del primer estudio. Se les cambió el nombre con el fin de facilitar la diferenciación de estudios y no llevar a error con descripciones utilizadas en el estudio anterior. El estudio se realizó de forma simultánea en el tiempo para evitar causas de error debidas a las diferencias entre granjas (tiempo atmosférico, estaciones del año, calidad de la vida de los animales, etc.). En dichas granjas, la alimentación se fue variando cada dos semanas en cuanto al nivel de fortificación en los forrajes suministrados a las vacas. Los niveles

estudiados en la fortificación fueron, 0 ó sin suplementar, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg de selenio por kg de forraje.

Las muestras fueron recogidas por duplicado siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio 1. La leche de las vacas se recoge tras una semana de alimentar las vacas con el nivel de suplementación elegido y al final de la segunda semana antes de cambiar al siguiente estado de fortificación. Esta elección es aleatoria, ya que como vimos en el estudio 1 la suplementación se encontraba en un estado estacionario prácticamente desde el primer día que las vacas son alimentadas con los piensos fortificados.

3.3.2.1 Determinación de selenio en leche de vaca después de la suplementación de los forrajes con selenio orgánico a diferentes niveles

Cada una de las muestras recogidas se ha analizado por triplicado siguiendo los mismos procedimientos de preparación de muestra y medida anteriormente descritos (apartado 2.3.3. y apartado 2.3.4, capítulo 2). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Niveles de selenio encontrados en las leches analizadas durante el estudio de suplementación con distintas cantidades de selenio orgánico en las granjas 1 y 2

Nivel de suplementación	Tiempo de suplementación	[Se] / $\mu\text{g L}^{-1}$	
		Granja 1	Granja 2

0,0 $\mu\text{g g}^{-1}$	1 semana	20,5 \pm 0,3	20,1 \pm 0,3
	2 semanas	20,9 \pm 0,3	20,2 \pm 0,4
0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$	1 semana	27,1 \pm 0,3	28,7 \pm 0,3
	2 semanas	26,7 \pm 0,4	28,3 \pm 0,4
0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$	1 semana	29,6 \pm 0,4	32,8 \pm 0,4
	2 semanas	30,0 \pm 0,5	32,5 \pm 0,4
0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$	1 semana	31,8 \pm 0,3	35,8 \pm 0,4
	2 semanas	32,2 \pm 0,3	36,1 \pm 0,4
0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$	1 semana	37,6 \pm 0,3	39,4 \pm 0,4
	2 semanas	37,5 \pm 0,4	38,9 \pm 0,4
Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar (n=12)			

De igual forma que en el estudio anterior, una vez que hemos obtenido los resultados de la concentración de selenio en las leches de vaca tras la suplementación de los forrajes con diferentes valores de concentración de selenio orgánico hemos llevado a cabo un Test de Rango Múltiple. Los resultados obtenidos (Tabla 10) muestran que existen diferencias significativas (95% nivel de confianza) entre los valores de selenio en la leche de vaca en función del nivel de suplementación empleado.

Tabla 10. Resultados del Test de rango múltiple usando el método de Fisher (95% nivel de confianza) para el porcentaje de selenio en leche de vaca en función del nivel de suplementación de selenio

Nivel de suplementación [Se] $\mu\text{g g}^{-1}$	Granja 1		Granja 2	
	Media $\mu\text{g L}^{-1}$	Grupo homogéneo	Media $\mu\text{g L}^{-1}$	Grupo homogéneo
0	20,5	X	20,2	X
0,2	27,2	X	28,7	X
0,3	29,6	X	33,1	X

0,4	32,2	X	35,8	X		
0,5	37,6	X	39,4	X		
Contraste	Limites (±)	Diferencia	Limites (±)	Diferencia		
0 – 0.2	0,3	*- 6,7	0,5	*- 8,5		
0 – 0.3		*-9,1		*-12,9		
0 – 0.4		*-11,6		*-15,6		
0 – 0.5		*- 17,1		*- 19,2		
0.2 – 0.3		*-2,4		*-4,7		
0.2 – 0.4		*- 5,0		*- 7,1		
0.2 – 0.5		*-10,4		*-10,7		
0.3 – 0.4		*-2,5		*-2,7		
0.3 – 0.5		*-8,0		*-6,3		
0.4 – 0.5		*-5,4		*-3,6		
* Existen diferencias significativas entre los niveles comparados						

En este estudio se encontró que el promedio de la concentración de selenio en la leche de vaca aumenta de forma significativa a medida que aumenta la concentración de selenio orgánico empleado en la alimentación de las vacas procedentes de cada una de las granjas.

Esto también se puede apreciar de forma clara en la Figura 7.

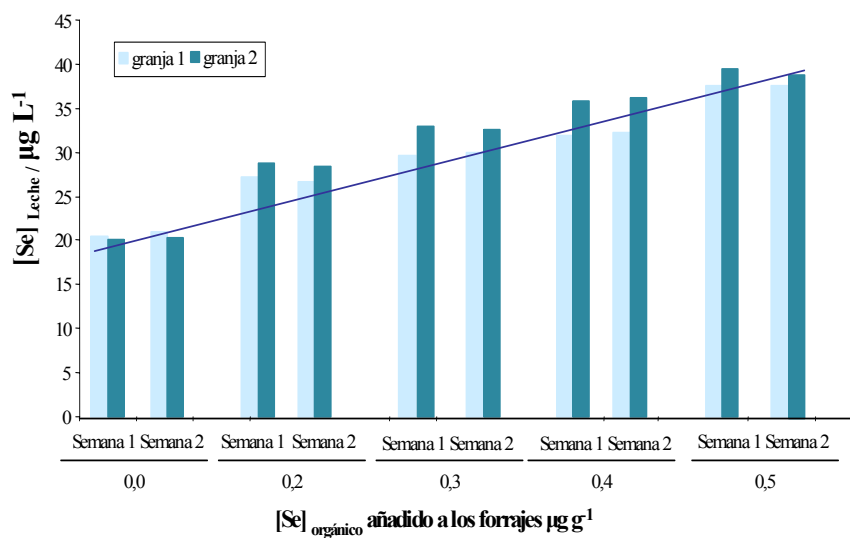


Figura 7. Niveles de selenio en leche procedentes de dos granjas diferentes en función de los niveles de suplementación de selenio (levaduras enriquecidas con selenometionina) en los forrajes

Igualmente se puede apreciar que este aumento de selenio en la leche es proporcional a la concentración de selenio aportado como suplemento a los forrajes, por lo que se va a intentar establecer unas ecuaciones matemáticas que nos indiquen que correlaciones existen.

Dichas correlaciones se encontraron y se pueden expresar en forma de las siguientes ecuaciones:

Granja 1

$$[\text{Se}] = 20,34 + 0,033[\text{Se}]_{\text{suplementado}}$$

$$R^2 = 0,982$$

Granja 2

$$[\text{Se}] = 20,48 + 0,038[\text{Se}]_{\text{suplementado}}$$
$$R^2 = 0,980$$

Donde $[\text{Se}]$ es la concentración de selenio encontrado en la leche y $[\text{Se}]_{\text{suplementado}}$ es la concentración de selenio añadida a los forrajes.

3.4 CONCLUSIONES

- Las vacas que consumen forrajes suplementados con selenio orgánico producen leche con mayor contenido en selenio que las alimentadas con selenio inorgánico.
- Tanto en el caso de suplementación de los forrajes con selenio orgánico como inorgánico el paso del selenio a la leche se produce desde el primer día en el que son alimentados con el forraje correspondiente y se mantiene hasta que se retira la suplementación de la alimentación.

- El contenido de selenio en los distintos componentes de la leche de vaca (suero lácteo, micelas de caseína y nata) varía en función del tipo de suplementación empleada en la alimentación del ganado. En todos los componentes el contenido de selenio es mayor cuando se utilizan levaduras selenizadas para la fortificación de los forrajes y el menor valor se obtiene cuando no se utiliza suplementación alguna.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución porcentual de selenio en el suero lácteo y nata en función del tipo de alimentación empleada. Sin embargo, si existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles porcentuales de selenio calculados para las micelas de caseína. La alimentación con levaduras ricas en selenometionina produce micelas de caseína con un porcentaje de selenio ligeramente superior que los calculados con las otras dos formas de alimentación.
- La suplementación con selenio procedente de levaduras enriquecidas en selenometionina de los forrajes dan lugar a un aumento proporcional de la concentración de selenio en la leche de las vacas que consumen dichos forrajes

Por último, también se podría concluir que es posible conseguir producir leche enriquecida en selenio de forma natural sin adulterar la composición original de la leche, como es habitual en la industria alimentaria donde se realiza la fortificación de diferentes elementos añadiendo estos al producto final en forma de sales inorgánicas. Según los resultados obtenidos en este estudio, la utilización de levaduras enriquecidas en selenometionina parecen ser las más adecuadas dado que, incluso a los mismos niveles de fortificación que el selenito sódico, dan lugar a la producción de leches con un mayor contenido en selenio; lo que demuestra su mayor biodisponibilidad para las vacas. Esto puede implicar que la salud de estos animales se vea mejorada y la producción láctea y rendimiento económico para el granjero sea mayor.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

-
1. J. Bello, *Alimentaria*, 1995, **267**, 49-58.
 2. R. Sinha, K. El-Bayoumy, *Current Cancer Drug Targets*, 2004, **4** (1), 13-28.
 3. A. S. Keck, J. W. Finley, *Integrative Cancer Therapies*, 2004, **3** (1), 5-12.
 4. P. D. Whanger, *British Journal of Nutrition*, 2004, **91** (1), 11-28.
 5. D. J. Waters, E. C. Chiang, D.M. Cooley, J. S. Morris, *Mutation Research*, 2004, **551** (1-2), 91-107.
 6. L. Schloske, H. Waldner, J. Lux, F. Marx, *Ernaehrung*, 2003, **27** (9), 357-364.
 7. D. I. Givens, R. Allison, Richard, B. Cottrill, J. S. Blake, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, **84** (8), 811-817.
 8. National Research Council, 1996, 7th ed. National Academy Press, Washington, D.C.
 9. P. Chaiwanon, P. Puwastien, A. Nitithamyong, P. P. Sirichakwal, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2000, **13** (4), 319-327.
 10. R. Krumbholz, M. Jochum, D. Burger, A. Pieper, H. Engelhardt, *Lebensmittelchemie*, 2002, **56**(6), 123-126.
 11. V. Tangpricha, P. Koutkia, S. M. Rieke, T. C. Chen, A. A. Perez, M. F., *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, **77** (6), 1478-1483.
 12. B. Koletzko, K. Pietrzik, *Ernaehrungs-Umschau*, 2004, **51** (8), 313-317.

-
13. A. Diowksz, W. Ambroziak, *Zeszyty Naukowe - Politechnika Lodzka, Chemia Spozywcza i Biotechnologia*, 2003, **67**, 5-15.
 14. A. C. Pappas, R. M. McDevitt, P. F. Surai, T. Acamovic, N. H. C. Sparks, *British Poultry Science*, 2004, **45** (Suppl. 1), S26-S27.
 15. Q. Liu, D. J. Wang, X. J. Jiang, Z. H. Cao, *Environmental Geochemistry and Health*, 2004, **26** (2), 325-330.
 16. Patente comercial: T. Shan, X. Wang, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 1999, 4 pp.
 17. Patente comercial: Z. Hou, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 1999, 4 pp.
 18. Patente comercial: R. Zhou, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2001, 4 pp.
 19. Patente comercial: D. Wu, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2002, 4 pp.

4.1 INTRODUCCIÓN

Aunque la determinación de selenio total en muestras de leche, ya sea leche comercial o leche procedente de vacas de diferentes granjas con una alimentación bien definida, tiene un gran interés, a la hora de determinar la eficacia del aporte de selenio en la dieta en el ser humano no basta con conocer su contenido total, sino que es necesario conocer el selenio biodisponible para el organismo. El concepto de biodisponibilidad se aplica a la proporción de nutrientes que es absorbida de la dieta y utilizada por el organismo o, dicho de otra manera, el porcentaje de nutrientes capaz de ser absorbido y disponible para ser utilizado por el organismo cuando éste lo necesite.

Digestión

La nutrición es una función vital en todos los organismos, animales o plantas. A diferencia de las plantas, el ser humano necesita sustancias sintetizadas que toma a partir de la alimentación para poder subsistir. Estas sustancias ingeridas son transformadas en nutrientes mediante el proceso de digestión. Los nutrientes pasan la barrera intestinal, siendo absorbidos por el organismo y haciéndose disponibles para los distintos órganos, en los que los nutrientes pueden ser almacenados, usándose en la renovación o síntesis de moléculas complejas necesarias para el mantenimiento de los equilibrios biológicos o transformándose en energía utilizable por las células y por tanto indispensables para la vida. En la digestión de los seres humanos se pueden diferenciar dos etapas. Una primera etapa que tiene lugar en el estómago, conocida como digestión gástrica, seguida de una segunda etapa llevada a cabo en el intestino delgado, llamada digestión intestinal.

Digestión gástrica

La digestión comienza una vez se introduce el alimento en la boca. En ese momento la amilasa salivar es segregada por las glándulas salivares, la cual se mezcla con el alimento y pasan al interior del estómago.

Una vez el alimento se encuentra en el estómago se mezcla con los fluidos gástricos; en ellos las dos enzimas digestivas de mayor relevancia son la pepsina y la lipasa gástrica, las cuales son segregadas por la mucosa gástrica. La pepsina se genera por activación de los pepsinógenos segregados por la mucosa gástrica. Estos pepsinógenos se transforman en pepsina en un ambiente ácido (pH menor de 4) y en el ser humano adulto este pH es 2. La digestión de las grasas comienza en el estómago, mediante la acción de la lipasa gástrica, liberando ácidos grasos libres y monosacáridos. Así, al contrario de lo que ocurre con las proteínas, el estómago es esencial en la digestión de las grasas, pues del 30 al 60% de la grasa de la leche es digerida, y su hidrólisis parcial en el estómago¹ es un requisito para la posterior digestión intestinal de la misma.

Digestión intestinal

Las enzimas pancreáticas son liberadas en el páncreas y se activan en el intestino (pH neutro), teniendo actividad tanto proteolítica como lipídica². Todas las proteasas pancreáticas se segregan como zimógenos inactivos, de modo que, por la acción de otro enzima segregado por la mucosa intestinal, se convierten en enzimas activas. Estas enzimas digieren las proteínas transformándolas en péptidos que, finalmente, son hidrolizados en las microvellosidades intestinales. Del mismo modo, las enzimas pancreáticas digieren la grasa proveniente del estómago en el intestino.

En cuanto a los hidratos de carbono su digestión es llevada a cabo por la amilasa pancreática que es capaz de segmentar el almidón existente en los alimentos.

Estudio de la biodisponibilidad de nutrientes en alimentos

A la hora de la valoración nutricional de un alimento no basta con determinar su contenido total en nutrientes sino que es preciso conocer qué cantidad de ellos se absorbe y es utilizada por el organismo. Los productos que se encuentran en el mercado cuentan con la información cuantitativa de los nutrientes adicionados pero carecen de la información sobre la biodisponibilidad de los mismos.

La biodisponibilidad de los minerales y elementos traza añadidos a un alimento, como aditivos nutritivos, depende de numerosos factores que afectan a la biodisponibilidad de los minerales y elementos traza, factores tanto fisiológicos del individuo (edad, sexo, estado fisiológico y nutricional, tiempo de tránsito intestinal, pH del jugo gástrico e intestinal, la flora intestinal o la capacidad de adaptación a variaciones en el aporte de nutrientes), como dietéticos (aporte total del nutriente por las dietas, sus propiedades físico-químicas: pH, quelatación, solubilidad, estado de oxidación, interacción con otros nutrientes o elementos presentes en el alimento, etc.). Todos estos factores pueden influir en la biodisponibilidad de estos elementos, ya sea de forma positiva o negativa.

Las formas mejor asimilables o empleadas como aditivos nutricionales son frecuentemente las más sensibles a las pérdidas en los diferentes procesos de transformación así como en la conservación de los alimentos. Sin embargo, no existen estudios suficientes como para poder dar reglas generales.

Métodos para el estudio de la biodisponibilidad de metales traza

Los métodos para estudiar la biodisponibilidad³ de los elementos traza se pueden clasificar en métodos “in vivo” y métodos “in vitro”, según impliquen la utilización de seres vivos o no, respectivamente. Dentro de estos métodos existen diversas maneras de estimar la biodisponibilidad

Los métodos “in vivo” desarrollados hasta el momento son:

1. Balance químico (metabólico): en este método se mide la ingesta y la excreción del mineral durante un período determinado de tiempo.
2. Grado de repleción (particularmente para el hierro): se mide en un organismo, por ejemplo ratas, al que se le administran distintas fuentes alimenticias del elemento objeto de estudio.

3. Medición en el plasma sanguíneo de un elemento tras la ingestión del mismo en grandes concentraciones, que permiten obtener una curva de tolerancia capaz de ser medida en el plasma.
4. Marcaje isotópico: ya sea con isótopos radioactivos⁴ (prohibido en niños) o estables⁵, son una alternativa en la estimación de la fracción absorbida y excretada de un mineral.

Teóricamente los métodos de digestión “in vivo” son los que dan lugar a resultados más exactos, en cuanto al estudio de la biodisponibilidad pues se tienen en cuenta todas las variables fisiológicas. Sin embargo, existe un gran número de limitaciones en el uso de estos métodos. En primer lugar no es fácil, encontrar un número homogéneo de personas sanas suficientemente grande que se preste a este tipo de experimentos, por lo que se suelen llevar a cabo en su mayor número en animales, normalmente ratas (por ser más económico). Los resultados obtenidos en estos estudios con animales no siempre son extrapolables al hombre, pues existe gran diferencia entre el metabolismo del hombre y el del animal.

Además de esto, hay que tener en cuenta que la reproducibilidad de los resultados es muy baja. El estado fisiológico de una persona y todos los factores externos que influyen en ella varían de un modo importante; variables tan sencillas como la edad, y estado anímico, provocan diferencias en el funcionamiento fisiológico de cada una de las personas.

Por último, estos estudios son muy complicados, muy lentos (requieren un seguimiento exhaustivo durante bastante tiempo) y muy costosos. Estos inconvenientes, además de los ya mencionados, son los que han llevado al desarrollo de un modo alternativo para el estudio de la biodisponibilidad: los métodos de digestión “in vitro”.

Estos se basan en la simulación del proceso de la digestión gastrointestinal organismo a estudio, de modo que se puede estimar el porcentaje de nutrientes capaz

de ser transformado, en el intestino, en forma absorbible. En general, estos métodos se pueden clasificar de la siguiente manera⁶:

1. Los basados en la determinación de los componentes solubles, bajo condiciones fisiológicas simuladas.
2. Los basados en la determinación de los componentes dializables bajo condiciones fisiológicas simuladas.
3. Los basados en la relación molar entre un agente complejante y un mineral de la dieta.

Los métodos de digestión “in vitro” nos permiten de una forma simple, rápida y barata estimar la biodisponibilidad de los nutrientes en el Hombre. Pero estos métodos también tienen sus limitaciones, como el hecho de que no simulan los factores fisiológicos e interacciones que tiene lugar en un organismo vivo, o que no existe un sistema de transporte que elimine las especies absorbibles, lo que altera el equilibrio de diálisis. Esta última limitación se ha visto resuelta con la introducción de métodos dinámicos^{7,8} que permiten reproducir mejor las condiciones de absorción del intestino delgado, pues al eliminarse los componentes dializados, se permite que continúe el paso de minerales y elementos traza.

4.1.1 ESTUDIOS DE LA BIODISPONIBILIDAD DE ELEMENTOS TRAZA BASADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES SOLUBLES, BAJO CONDICIONES FISIOLÓGICAS SIMULADAS

En estos métodos se lleva a cabo la simulación gastrointestinal y posteriormente mediante diversos procedimientos como la filtración o centrifugación se recoge la porción soluble en la cual se determina el contenido metálico para obtener así la estimación de la biodisponibilidad. Dentro de estos estudios cabe destacar los siguientes:

En 1985, Crews y col.⁹ desarrollaron un método para determinar la solubilidad de varios elementos traza, en diversos alimentos, mediante una digestión enzimática. En dicho método los alimentos se mezclan con enzimas, simulando la digestión gástrica, y se determinaban las cantidades de cadmio, cinc, cobre, hierro y plomo solubles. La digestión se desarrolla en dos etapas, una con pepsina a pH 2 y otra con pancreatina y amilasa a pH 7. En cada una de estas etapas se mantienen las muestras en un baño de agua con agitación a 37°C. Después de cada una ellas, se lleva a cabo una centrifugación y la fase soluble (sobrenadante) es analizada mediante espectrometría de absorción atómica para la determinación de los elementos traza estudiados.

En 1989, Lönnerdal y col.¹⁰ aplicaron un método de digestión “in vitro” usando radioisótopos, a la determinación de hierro, cinc y manganeso en las fases solubles de leche y fórmulas infantiles. Se realizó una digestión gástrica con pepsina a diferentes pHs (2, 3, 4 y 5) y una digestión intestinal con pancreatina durante diferentes tiempos (15, 30 y 60 min.), para mimetizar las condiciones de digestión en los niños.

Los mismos autores en 1993, Lönnerdal y col.¹¹ aplicaron de nuevo este método para determinar la solubilidad de magnesio en leche materna, leche de vaca y fórmulas infantiles.

Vázquez y col.¹² (1994) estudiaron las fracciones solubles de selenio, cobre y cinc en mejillones, usando un método de digestión “in vitro” de simulación de la digestión gastrointestinal humana en el que seleccionaron pH 3 para la digestión gástrica (37°C, 4 horas, agitación), y pH 6 para la digestión intestinal (37°C, 4 h, agitación). Las fracciones solubles las obtienen después de cada una de las etapas de la digestión, centrifugando a 3500 y 15000 rpm durante una hora tras la digestión gástrica e intestinal respectivamente.

En 1996, Cabrera y col.¹³ llevaron a cabo la digestión “in vitro” de productos lácteos, para hacer una determinación de la biodisponibilidad de cromo, cobre,

hierro, manganeso, selenio y cinc. Mediante centrifugación se separó la fracción soluble del digerido, determinando los distintos metales en dicha fracción.

Crews y col.¹⁴ (1996) en este mismo año, aplicaron un método similar para llevar a cabo la especiación de selenio en extractos de la digestión gastrointestinal de bacalao.

Alegria y col.¹⁵ (1996) usaron un método similar para determinar la biodisponibilidad mediante una digestión “in vitro” del cobre, cinc y hierro en fórmulas infantiles suplementadas con diferentes sales de cobre.

P. Bermejo y col.¹⁶ (2002) Desarrollaron un método de digestión “in vitro” para estudiar la biodisponibilidad del cinc y hierro en leches de vaca, leche humana y fórmulas infantiles tomando como base el trabajo de Lönnnerdal¹¹ para simular las condiciones de digestión de los niños.

4.1.2 ESTUDIOS DE LA BIODISPONIBILIDAD DE ELEMENTOS TRAZA BASADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS MISMOS EN LOS DIALIZADOS, BAJO CONDICIONES FISIOLÓGICAS SIMULADAS

De igual forma que en los métodos basados en la solubilidad, en los estudios de dializabilidad se simula el proceso de digestión gastrointestinal y posteriormente se separan los elementos traza mediante un equilibrio de diálisis. La proporción de nutrientes que difunden a través de una membrana semipermeable durante la etapa intestinal, se usa como predicción de la biodisponibilidad de un elemento tras el análisis del contenido de éste en el interior del tubo de diálisis. El proceso de diálisis de un soluto a través de una membrana, se basa en la diferencia de concentración del soluto en las disoluciones de ambos lados de la membrana, de modo que habrá una migración del soluto de la disolución en que esté más concentrado a la zona en que esté más diluido. En la diálisis in vitro, la migración del soluto se hace del alimento

que tiene un contenido de elementos traza hacia el interior de la membrana de diálisis (que simula el intestino).

En 1981, Miller y col.¹⁷ desarrollaron un método de digestión, el cual se puede tomar como punto de partida de este tipo de métodos, mediante el cual determinaron la dializabilidad del hierro en alimentos. Este método consiste en una primera digestión (gástrica) ácida con la enzima pepsina; las muestras se mantienen en un baño de agua a 37°C, durante dos horas. En segundo lugar se lleva a cabo la digestión intestinal; varios segmentos de tubo de diálisis se cortan y llenan con 25mL de agua y la cantidad de bicarbonato sódico necesaria para tener un pH igual a 7,5. Estos tubos se introducen en los vasos que contienen las muestras y se agitan a 37°C en un baño de agua, el tiempo necesario para que el pH sea 5 (30 minutos aproximadamente) a continuación se añade la enzima pancreatina y los vasos se mantienen en el baño de agua dos horas. Finalmente, los tubos se lavan con agua y se pesan. La determinación de hierro en el contenido de los tubos (dializados) se llevó a cabo mediante el método de la batofenantrolina. Los resultados obtenidos mediante este método demuestran que existen buenas correlaciones con los objetivos obtenidos mediante estudios “in vivo”. Debido a esta alta correlación este método, desarrollado por Miller, ha sido utilizado como punto de partida por muchos investigadores en sucesivos trabajos.

Shen y col.¹⁸(1993) aplicaron el método desarrollado por Miller¹⁷ para llevar a cabo una estimación de biodisponibilidad de selenio en leche de vaca. Posteriormente estos investigadores usaron un método de diálisis en flujo continuo⁷, similar al usado por Minihane y col.⁸, de modo que el dializado se elimina del interior de la membrana a medida que transcurre el proceso. Otra importante modificación fue realizar un ajuste gradual del pH (30 min. aproximadamente) antes de la diálisis. Este método fue aplicado para determinar la biodisponibilidad del cinc y calcio de fórmulas basadas en leche de vaca y en proteínas de soja. En 1995¹⁹ estos autores aplicaron de nuevo el método de Miller¹⁷ con una ligera modificación al estudio de la biodisponibilidad de cinc y calcio en leche humana, leche de vaca, de cabra y de oveja. El mismo método lo aplicarían un año más tarde (1996)²⁰ con el

objetivo de estudio de la biodisponibilidad de selenio en leche humana, leche de vaca, de cabra y de oveja, encontrando una mayor biodisponibilidad del selenio en leche humana.

En 1994, Vaquero y col.²¹ llevaron a cabo un estudio de dializabilidad de cobre en alimentos consumidos habitualmente en desayunos, usando una modificación del método desarrollado por Miller¹⁷. Se realizó una digestión gástrica a pH 2 durante dos horas y a continuación se llevo a cabo la diálisis durante la etapa de digestión intestinal, con membranas de 12 kDa. Se recogieron los dializados a 30 min., 1, 2, 3 y 4 horas para su posterior análisis.

Pérez-Llamas y col.²² (1996) aplicaron el método de Miller¹⁷ con ligeras modificaciones al estudio del efecto del tipo de cantidad de proteína presente (carne de vaca, cerdo y semilla de soja). La diálisis se llevo a cabo usando tubos de diálisis de 6-8 kDa. Se midieron las concentraciones de hierro y cinc en los dializados.

Alegría y col.²³ (1996) usaron un método similar para determinar la biodisponibilidad de cobre, cinc y hierro en fórmulas infantiles suplementadas con diferentes sales de cobre.

En 1998, García y col.⁶ llevaron a cabo un estudio de la dializabilidad de cobre, cinc y hierro de distintos tipos de fórmulas infantiles comercializadas en España.

En 1999, Roig y col.²⁴ usaron la dializabilidad del calcio como una medida de la biodisponibilidad del mismo. Estos autores²⁵ compararon los métodos de diálisis y solubilidad aplicados al estudio de la biodisponibilidad del calcio en leche humana, fórmulas infantiles y leche de vaca. Una comparación de los resultados obtenidos con este método de digestión “in vitro” con los obtenidos mediante métodos “in vivo” mostró que los valores obtenidos por el método de la solubilidad eran más elevados. Además encontraron que en la digestión de las fórmulas infantiles, el método de diálisis era más adecuado, pues mediante el método de la solubilidad no se separa bien la fracción soluble, debido a interacciones que tienen lugar entre la nata, el suero y la caseína.

Jovani y col.²⁶ (2000) estudiaron las interacciones entre calcio, cobre, cinc y hierro en fórmulas de base láctea y de soja. La biodisponibilidad se estimó en función del porcentaje de dializabilidad mediante un método “in vitro” basado en el método de Miller¹⁷. Estos autores²⁷ en el 2000 estudiaron también el efecto de las proteínas, el fitato, el ácido ascórbico y el ácido cítrico en la dializabilidad del calcio, cobre, cinc y hierro en fórmulas basadas en la proteína de soja.

También usaron este método Guillem y col.²⁸ que determinaron la dializabilidad de cinc de siete sales diferentes usadas en la fortificación de fórmulas infantiles. Encontraron una mayor dializabilidad en la sal del óxido, ligeramente menor para el gluconato, y la menor con el sulfato.

P. Chaiwanon²⁹ (2000) aplicaron el método de Miller¹⁷ para el estudio de la biodisponibilidad de calcio en leche de soja tras la fortificación de la leche con carbonato cálcico.

Bosscher y col.³⁰ (2000) usaron el método de diálisis de flujo continuo desarrollado por Minihane⁸ y modificado por Shen⁷ y lo aplicaron al estudio de la biodisponibilidad de calcio, cinc y hierro en fórmulas infantiles y leche humana. Estudiaron también la influencia de la incorporación de carbohidratos digeribles en la biodisponibilidad de esos metales en los alimentos estudiados. Un año más tarde³¹ desarrollaron un método para la determinación de calcio, cinc y disponible, hierro y cinc biodisponible en fórmulas infantiles después de llevar a cabo un proceso gastrointestinal “in vitro”. Este método emplea las condiciones de la etapa de digestión adaptadas a las condiciones gastrointestinales de niños con edades inferiores a seis meses de edad y llevan a cabo un a diálisis de flujo continuo en la etapa intestinal. Desarrollan igualmente un estudio de la biodisponibilidad de estos elementos a pH 2 y pH 4 en la digestión gástrica. En el 2003 estos mismos autores³² estudian la biodisponibilidad del calcio, cinc y hierro en fórmulas infantiles. Además, estudian como afecta la biodisponibilidad de estos elementos la adición de fibra usando para ello un método de diálisis en flujo continuo, y como afecta a la biodisponibilidad de estos metales la inclusión de la fibra.

E. Peña y col³³ (2004) desarrollan un método “in vitro” comparando la influencia del pH en la biodisponibilidad del cobre en leches maternas y fórmulas infantiles. Estudian como afecta a la primera etapa del proceso gastrointestinal, un pH 2 simulando las condiciones de la digestión gástrica de un adulto y un pH 5 simulando la digestión gástrica de un neonato.

4.2 OBJETIVO

El objetivo de este estudio es comparar la biodisponibilidad del selenio en leche de vaca obtenidas tras la fortificación de la alimentación del ganado con diferentes tipos (inorgánico y orgánico) y niveles de concentración de selenio.

Igualmente se estudiará la influencia del nivel de fortificación de los forrajes empleado en la alimentación de las vacas en la biodisponibilidad del selenio en la leche.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 PROCEDIMIENTO DIGESTIÓN “IN VITRO”

El método de digestión “in vitro” llevado a cabo en este estudio tiene como base el método de Miller¹⁷.

Básicamente, el método desarrollado se divide en dos etapas, en primer lugar se simula la digestión gástrica, que tiene lugar en el estómago del Hombre y posteriormente se realiza la digestión intestinal. La etapa gástrica de la digestión “in vitro”, se lleva a cabo pipeteando una alícuota de 20 g de muestra en un erlenmeyer. Para cada muestra se preparan cinco réplicas y un blanco. Se le añaden 6 g de la disolución gástrica (16 g de pepsina en ácido clorhídrico 0,1M) y se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico 2M. Seguidamente, estas muestras se tapan y se incuban a 37°C durante 2 horas con agitación orbital-vaivén a 120 rpm. De este modo, se simula la etapa gástrica de la digestión. Una vez transcurrido este tiempo, la digestión gástrica se detiene introduciendo tanto las muestras como los blancos en un baño de agua-hielo para interrumpir la actividad enzimática. El esquema de este proceso se muestra en la Figura 1.

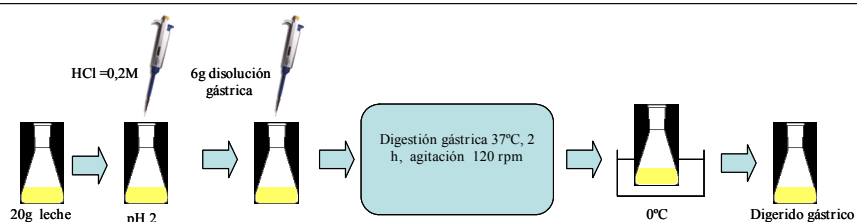


Figura 1. Etapa gástrica de la digestión “in vitro”

Antes de comenzar la segunda etapa (digestión intestinal) se lleva a cabo el cálculo de la acidez valorable, ésta se define³⁴ como la cantidad de equivalentes de hidróxido sódico necesarios para ajustar el pH de las muestras a siete. Para realizar

este cálculo se utiliza una de las cinco réplicas de cada una de las muestras, siendo finalmente desechada la réplica empleada.

En este momento se realiza la simulación de la digestión intestinal añadiendo a los erlenmeyers que contienen los digeridos gástricos (muestras y blancos) 5 g de la disolución intestinal (0,4 g de pancreatina y 2,5 g de extractos biliare preparada en 100 mL de bicarbonato sódico 0,1 M). Se cortan segmentos de los tubos de diálisis de aproximadamente 15 cm y se les hace un nudo en los extremos. Se lavan varias veces con agua MilliQ y se dejan dentro de un vaso de precipitados con agua MilliQ hasta su uso sin dejar que se sequen.

Una vez preparados los tubos de diálisis se llenan con 25 mL de una disolución que contenga el número de equivalentes de bicarbonato sódico igual al número de equivalentes de hidróxido sódico calculados anteriormente. Se cierran con una pinza de plástico, se pesan en una balanza analítica y se introducen en los matraces erlenmeyer que contienen el digerido gástrico y la disolución intestinal.

Los matraces tapados se incuban a 37°C durante 2 horas con agitación orbital-vaivén a 130 rpm.

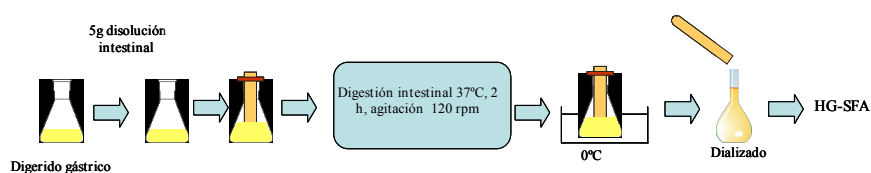


Figura 2. Etapa intestinal de la digestión in vitro

Una vez finalizado el proceso de digestión intestinal (Figura 2), se sacan los tubos de diálisis y se pesan nuevamente. Posteriormente, tanto el dializado como el digerido enzimático se guardan en viales perfectamente etiquetados, y se congelan hasta el día en el que se lleve a cabo la determinación del contenido de selenio en los mismos.

4.3.2 DETERMINACIÓN DE SELENIO EN LOS DIALIZADOS Y DIGERIDOS GASTROINTESTINALES

Una vez tenemos los dializados y el digerido enzimático para llevar a cabo la determinación de selenio en los mismos, éstos se someterán a un proceso de pretratamiento de la muestra, la digestión ácida desarrollada para la leche en el capítulo 2.

La concentración de metal en los dializados nos permitirá conocer, sabiendo el contenido total en cada una de las muestras, la dializabilidad del selenio. La dializabilidad (%D) es una estimación de la biodisponibilidad del analito en la muestra. Calcularemos la dializabilidad (%D) como el porcentaje del analito, selenio, en el dializado. Para ello aplicaremos la siguiente ecuación, donde $ng_{dializado}$ es la masa de analito en nanogramos en el dializado, ng_{leche} es la masa de analito en la muestra de leche. Si usamos la ecuación en función de las concentraciones, $[]_{dializado}$ es la concentración de analito en el dializado, $[]_{leche}$ es la concentración de analito en la muestra de leche, $V_{dializado}$ es el volumen que se encuentra dentro de los tubos de diálisis y V_{leche} es el volumen de la muestra de leche.

$$\% D = \frac{ng_{Dializado}}{ng_{Leche}} \times 100 = \frac{[]_{Dializado} \times V_{Dializado}}{[]_{Leche} \times V_{Leche}} \times 100$$

4.3.2.1 Optimización de métodos para la determinación de selenio en muestras de leche, dializados y digeridos gastrointestinales

A continuación se desarrollan métodos analíticos para la determinación de selenio en distintas muestras de leche, dializados y digeridos gastrointestinales

mediante generación de hidruros- espectroscopía fluorescencia atómica, generando el hidruro de modo continuo.

Se utilizarán para ello los diseños de experiencias ya explicados en el capítulo anterior (capítulo 2). Para la determinación de las variables significativas se utilizarán los diseños de experiencias Plackett-Burman, mientras que la optimización de variables significativas se llevará a cabo mediante diseños composicionales (capítulo 1). En nuestro estudio, la matriz nos la proporciona el paquete estadístico Statgraphics Plus 5,0.

Estos estudios se realizan con 400 ng L^{-1} de selenio (IV). Fijamos las condiciones instrumentales del sistema recomendadas, (Tabla 1), que no vamos a estudiar por no tener interés para la mejora de nuestro estudio.

Tabla 1. Condiciones instrumentales para la determinación de selenio por HG-AFS

Condiciones instrumentales	Valor establecido
Ganancia	1000
Intensidad de corriente lámpara	20,0 / 25,0
Longitud de onda	196,0

Identificación de las variables significativas

Como se ha mencionado en el apartado anterior, para identificar las variables críticas en la generación del hidruro se usaron los diseños de experiencias de Plackett-Burman. En este trabajo se ha optado por un diseño de ocho variables con tres grados de libertad, a dos niveles.

Se trabajará con máxima ganancia (1000) debido a que con el uso de otras ganancias el equipo resulta muy poco sensible.

A la hora de plantear el diseño de experiencias es necesario elegir las variables a estudiar teniendo en cuenta su posible influencia sobre el resultado final del análisis. En este sentido el caudal de ácido clorhídrico, no se podrá variar, ya que es bombeado por la misma bomba que impulsa la muestra, y su modificación implicaría alterar el caudal de muestra, con lo que el diseño quedaría distorsionado y nos podría llevar a conclusiones erróneas. Dichos caudales vienen dados por las condiciones experimentales de la bomba peristáltica utilizada y los diámetros de los tubos empleados y mantendrán un valor fijo que será de 10 mL min^{-1} .

Las variables a estudiar para una mejor generación del hidruro serán las concentraciones de ácido clorhídrico, de borohidruro sódico y el caudal de borohidruro sódico. Además también se tendrán en cuenta el flujo de argón y los tres tiempos en los que divide el proceso de determinación (Figura 3) que son:

- Tiempo de demora: es el tiempo requerido para un llenado completo de todas las conducciones.
- Tiempo de análisis: el tiempo requerido para realizar el análisis.
- Tiempo de memoria: el tiempo necesario para que la señal de la muestra decaiga hasta el valor de la línea base.

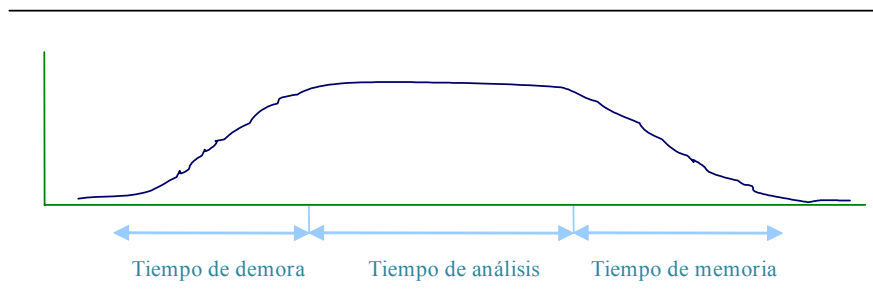


Figura 3. Esquema de la forma de un pico en HG-AFS

Según esto tendremos siete variables a optimizar, con lo cual necesitaremos incluir una variable a mayores, que denominaremos “variable fantasma” para poder realizar el diseño de ocho variables. Igualmente a la metodología en la optimización utilizada en los capítulos anteriores se seleccionan las variables que consideramos que pueden afectar a nuestro sistema y fijamos un intervalo de trabajo para cada una de ellas. En la Tabla 2 se muestran las variables elegidas y los intervalos de trabajo estudiados para cada una de ellas seleccionados a partir de posibles limitaciones instrumentales y datos bibliográficos consultados. Entre las limitaciones instrumentales está la necesidad de tener una cantidad mínima de hidrógeno para mantener encendida la llama argón-hidrógeno que se utiliza para atomizar el selenio. Esto se subsana introduciendo una corriente adicional directamente al separador gas-líquido de hidrógeno. Los tiempos de demora y memoria, también son limitantes, debido a que es necesario un tiempo mínimo de demora para que todas las conducciones estén completamente llenas y llegue la muestra al separador antes del análisis, y un tiempo mínimo de memoria para poder alcanzar de nuevo el valor de la línea base.

Tabla 2. Variables seleccionadas para el diseño de experiencias Plackett-Burman para la determinación de selenio por HG-AFS

Código	Variable	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	[HCl] / M	2,5	5,0
B	[NaHB ₄] / % (m/v)	0,8	1,2
C	Caudal de NaHB ₄ / mL min ⁻¹	5	10
D	Caudal de argón / mL min ⁻¹	2	4
E	Tiempo de demora /s	20	40
F	Tiempo de análisis /s	20	40
G	Tiempo de memoria /s	30	60
H	Variable “fantasma”	-1	1

La matriz resultante de los diseños de experimentos planteados, correspondiente a un diseño Plackett-Burman $2^8 \cdot 3/64$ implicando 12 experiencias y con 3 grados de libertad, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz del diseño Plackett-Burman empleado para la optimización de la determinación de selenio por HG-AFS

	Variables							
Experienci a	A	B	C	D	E	F	G	H
1	+	-	+	-	-	-	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	+	-	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-	-
5	+	+	-	+	+	-	+	-
6	+	+	+	-	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	+	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+
9	-	-	-	+	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-

A continuación se llevan a cabo todas las experiencias del diseño de experimentos de acuerdo a la matriz correspondiente y se obtienen los resultados que se recogen en la Tabla 4. Una vez obtenida la respuesta para cada uno de los experimentos (intensidad de fluorescencia), se aplica el diseño Plackett Burman elegido con el paquete estadístico, Statgraphics plus versión 5,0, y se obtiene la información necesaria para evaluar la importancia de cada una de las variables en la

determinación de selenio por generación de hidruros- espectroscopía fluorescencia atómica.

Tabla 4. Resultado de los experimentos programados en nuestra matriz Plackett-Burman

Experiencia	Intensidad de fluorescencia
1	285
2	435
3	162
4	262
5	459
6	123
7	185
8	133
9	233
10	317
11	181
12	192

Una vez obtenidas los diferentes valores de la variable respuesta, sus valores se introducen en el diseño Plackett-Burman y obtenemos la información necesaria para evaluar la importancia de cada variable en nuestro sistema. El análisis de la importancia de cada una de las variables se lleva a cabo con ayuda de la carta Pareto estandarizada para un nivel de confianza de un 95%. Dicha carta Pareto se muestra a continuación en la Figura 4 y en ella se puede observar que las variables que afectan de forma significativa a nuestro sistema son la concentración de ácido clorhídrico y el caudal del borohidruro sódico.

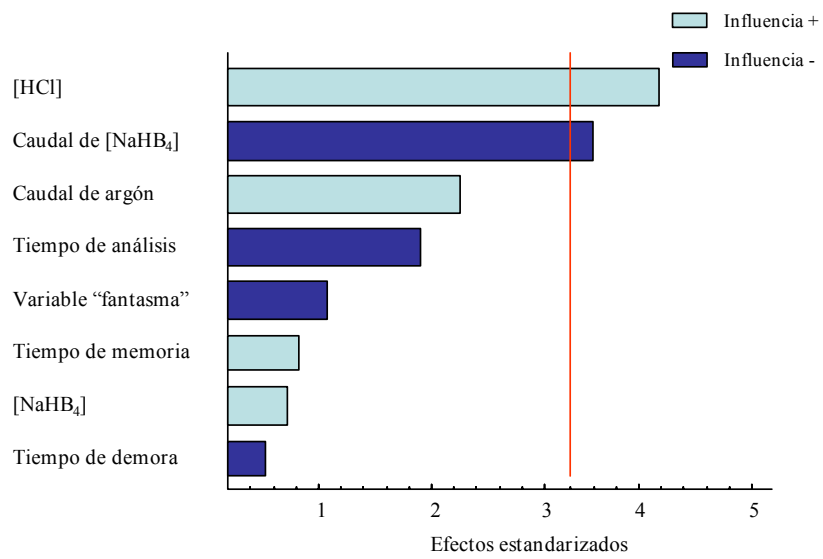


Figura 4. Carta Pareto de primer orden para la determinación de selenio por HG-AFS

Igualmente vamos a estudiar las cartas Pareto de orden dos con un nivel de significación del 95% para poder estimar si el efecto debido a posibles interacciones entre dos variables afecta a nuestro sistema de forma significativa. Se estudian las interacciones de segundo orden, tomando las variables de tres en tres, eliminando las restantes que pueden tergiversar los resultados finales y llevarnos a tomar decisiones equivocadas.

Las cartas Pareto de orden dos nos vuelven a indicar que las dos únicas variables que afectan de forma significativa al sistema son la concentración de ácido clorhídrico y el caudal del borohidruro sódico. Esto se refleja en una de las cartas Pareto mostradas en la Figura 5.

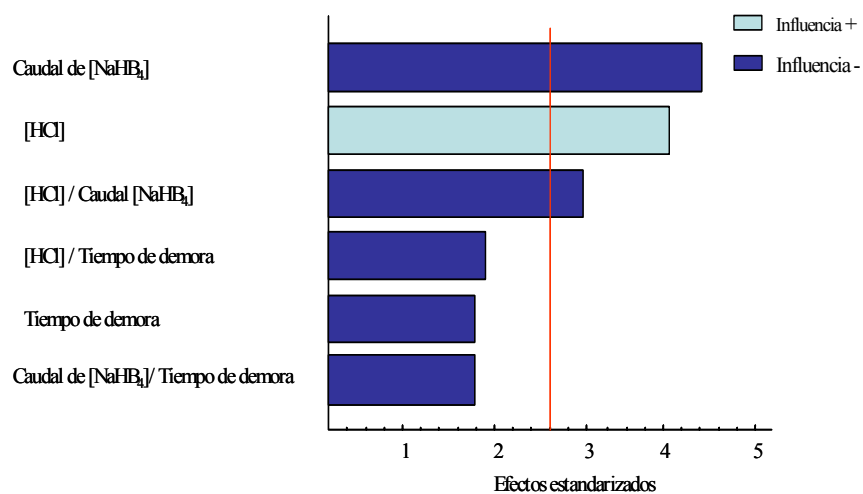


Figura 5. Carta Pareto de segundo orden para la determinación de selenio por HG-AFS

Una vez comprobado que las restantes variables no afectan de forma significativa a la señal analítica se fija el valor que creamos apropiado para nuestro estudio, intentado conseguir el mínimo consumo de reactivos, ahorro económico, y tiempos de análisis cortos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores fijados para las variables que no resultan significativas en la determinación de selenio mediante HG-AFS

Código	Variable	Valor adoptado
B	[NaHB ₄] / % (m/v)	0,8
D	Caudal de argón / mL min ⁻¹	2,5
E	Tiempo de demora /s	20
F	Tiempo de análisis /s	30
G	Tiempo de memoria /s	30

A continuación se lleva a cabo la búsqueda del valor óptimo de las dos variables que resultaron significativas mediante un diseño compositivo.

Optimización de las variables significativas

En el presente apartado se aborda la optimización de las variables que resultan significativas para la determinación de selenio mediante generación de hidruros-espectroscopía fluorescencia atómica.

Dichas variables se optimizan mediante un diseño compositivo $2^2 +$ estrella, estableciendo un intervalo de estudio para cada variable de la misma forma que se hizo a la hora de realizar el diseño Plackett-Burman y empleando el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5,0.

Para la realización del diseño compositivo, se establece el mismo intervalo de estudio para cada una de las dos variables que el utilizado en el diseño de Plackett-Burman llevado a cabo con anterioridad. En la Tabla 6 se muestran los valores superior (+) e inferior (-) así como los valores intermedios (K_0) y superior axial ($+\alpha$) e inferior axial ($-\alpha$) alrededor de los valores límites del intervalo de cada una de las variables que hemos fijado.

Tabla 6. Intervalo de estudio en el diseño compositivo para la determinación de selenio por HG-AFS

Valores	Variables	
	[HCl]/ M	Caudal de NaHB_4 / mL min^{-1}
+	5,0	5
-	2,5	10

Ko	0,2	7,5
+α	0,368	5,68
-α	0,032	0,31
Ko es el valor medio de la variable; $\pm \alpha$ es el valor estrella para cada variable		

La matriz resultante de los diseños experimentales planteados, correspondiente a un diseño un diseño composicional $2^2 +$ estrella, el cual, duplicado implica 20 experiencias. Se lleva a cabo por duplicado ya que esto no conlleva un gran número de experiencias y se obtienen unos resultados más robustos. Esta matriz se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Matriz de diseño composicional $2^2 +$ estrella para la determinación de selenio por HG-AFS

Experiencia	[HCl]/M	Caudal de NaHB₄ / mL min⁻¹
1	Ko	Ko
2	-	-
3	+	-
4	-	+
5	+	+
6	- α	Ko

7	+ α	Ko
8	Ko	- α
9	Ko	+ α
10	Ko	Ko
11	Ko	Ko
12	-	-
13	+	-
14	-	+
15	+	+
16	- α	Ko
17	+ α	Ko
18	Ko	- α
19	Ko	+ α
20	Ko	Ko

Dichas experiencias se realizarán con una concentración de selenio de 200 ng L⁻¹. Una vez creada la matriz del diseño se lleva a cabo las medidas y se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados obtenidos para el diseño compositacional para la determinación de selenio por HG-AFS

Experiencia	Intensidad de fluorescencia
1	203
2	197
3	219
4	166
5	187
6	191
7	219
8	273
9	192

10	217
11	212
12	187
13	212
14	169
15	182
16	196
17	210
18	282
19	199
20	211

Una vez obtenidos estos datos, se introducen en el diseño composicional que nos ayudará a obtener el óptimo para cada una de las dos variables. A continuación se muestran las superficie de respuesta (Figura 6) obtenida como producto del análisis de los datos introducidos en la matriz del diseño composicional para la determinación de selenio mediante generación de hidruros-espectrometría de fluorescencia atómica.

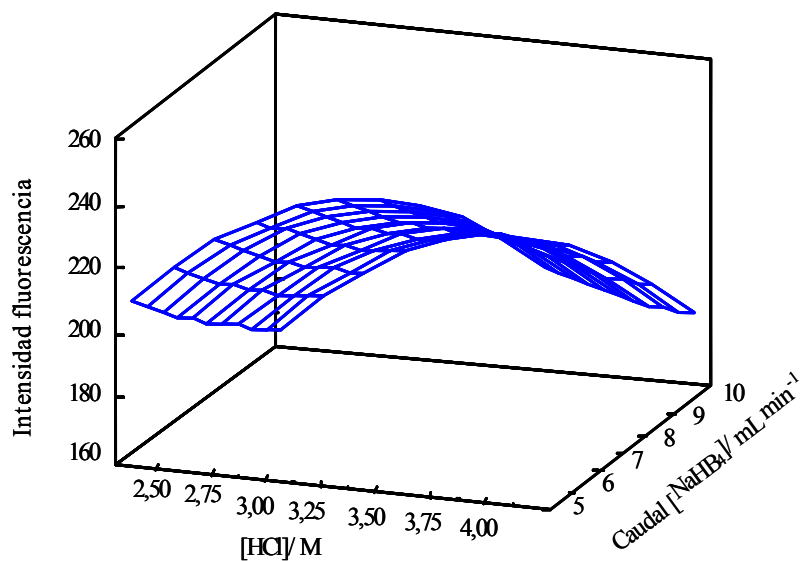


Figura 6. Superficie de respuesta obtenida para la determinación de selenio por HG-AFS

Como era de esperar y a la vista de la superficie de respuesta obtenidas encontramos los valores óptimos de nuestras variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente hemos estudiado. Así que podemos fijar los valores óptimos de nuestras variables para llevar a cabo una buena generación del hidruro de selenio. Estos valores óptimos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores óptimos para las variables significativas en la generación del hidruro de selenio

Código	Variable	Valor óptimo
A	[HCl]/ M	3,0
B	Caudal de NaHB ₄ / mL min ⁻¹	5,0

4.3.2.2 Características analítica del método

Se van a evaluar las características analíticas del método desarrollado para la determinación de selenio en leche, dializados de leche y digeridos gastrointestinal, estudiando el efecto matriz comparando las rectas de calibrado y adición, la sensibilidad, precisión y exactitud.

Rectas de Calibrado y Adición

Las rectas de calibrado y adición se han obtenido para concentraciones comprendidas entre 0,00 y 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$. El calibrado se realiza utilizando ácido clorhídrico 3M. La adición se ha realizado añadiendo el patrón de selenio a 2,5 mL de digerido ácido, tanto de la leche, digerido gastrointestinal como de los dializados, y enrasados a 25 mL con ácido clorhídrico 3M. Las pendientes de las rectas de calibrado y adición de cada uno de los componentes, leche, dializado y digerido gastrointestinal difieren significativamente (test t, nivel de confianza 99,5%) por lo que hay que utilizar para cada una de las medidas de selenio total en leche, dializado y digerido gastrointestinal las rectas de adición. Mientras que las rectas de adición para los tres tipos de matriz, leches, dializados y los digeridos gastrointestinales no difieren significativamente entre ellas, con lo que se puede utilizar indistintamente cualquiera de las adiciones para llevar a cabo la determinación de selenio (test t, nivel de confianza 99,5%). Las ecuaciones de las rectas de calibrado y adición de cada uno de los componentes se muestran en la Tabla 10 y pueden verse gráficamente en la Figura 7.

Tabla 10. Pendientes de las rectas de calibrado y adición, $t_{\text{experimental}}$ y crítica ($t_{\text{crítica}}$) después de realizar un test t (nivel de confianza 99,5%)

Curva	Pendiente	Adición dializado		Adición digerido		Adición leche	
		t_{exp}	t_{teo}	t_{exp}	t_{teo}	t_{exp}	t_{teo}
Calibrado	1552	791	1,96	794	1,96	872	1,96
Adición dializado	1054	-----	-----	1,04	3,2	2,1	3,20

Adición digerido	1052	1,04	3,2	-----	-----	1,25	3,20
Adición leche	1048	2,1	3,2	1,25	3,20	-----	-----

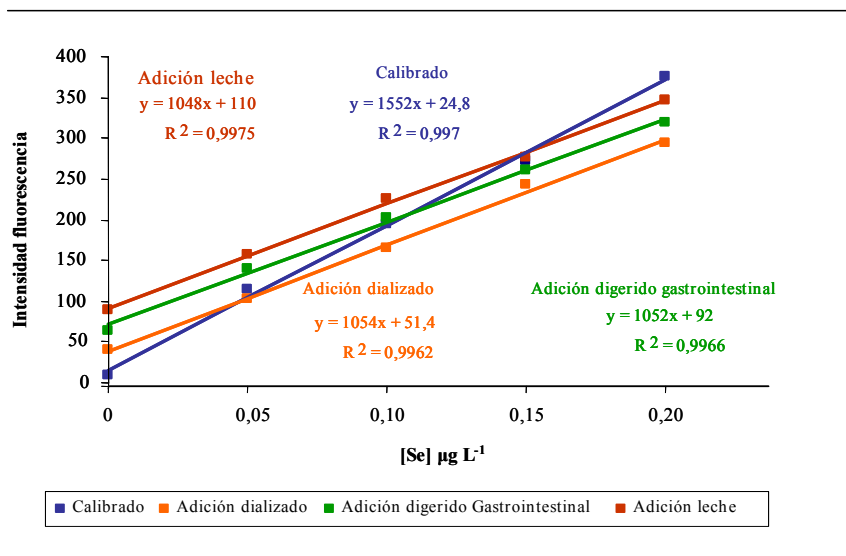


Figura 7. Rectas de calibrado y adición para la determinación de selenio en leche, digerido gastrointestinal y dializado de la leche de vaca por HG-AFS

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad de los métodos desarrollados, se estudió a partir de dos parámetros: límites de detección y cuantificación definidos en el capítulo 2. Los resultados obtenidos para cada una de las matrices se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Limite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para determinación de selenio en leche, digerido gastrointestinal y dializado de la leche de vaca por HG-AFS

Muestra	LOD $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$
Dializado	0,04	0,12

Digerido gastrointestinal	0,04	0,14
Leche	0,03	0,11

Precisión

La precisión de las medidas, expresada como el coeficiente de variación (% CV), fue estudiada para el procedimiento digestión ácida de los dializados y la leche para luego llevar a cabo la medida por generación de hidruros-espectrometría de fluorescencia atómica.

Se tomaron cuatro alícuotas de un dializado (2,5 mL), cuatro alícuotas de un digerido gastrointestinal (2,5 mL) y cuatro alícuotas de una leche (2,5 mL) y se le añadió 50, 100 y 200 ng L⁻¹ respectivamente a tres de las alícuotas de cada tipo de muestra. Se lleva a cabo la digestión ácida de cada una de las alícuotas y se miden 11 veces cada una de las disoluciones resultantes por espectrometría de fluorescencia atómica. Se calculó la media y desviación estándar para cada uno de los valores obtenidos para cada una de las alícuotas de las diferentes matrices. Con estos datos se calcula el coeficiente de variación para los diferentes niveles tanto de los dializados, digerido gastrointestinal como de la leche. Los valores medios obtenidos fueron 6,7, 6,9 y 7,4 % para la leche, dializados y digerido gastrointestinal respectivamente.

Exactitud

Se estudió la exactitud del método utilizando para ello un material de referencia, Certified Reference Material 8435 (whole milk powder) con selenio total certificado de $0,131 \pm 0,014 \mu\text{g L}^{-1}$. Con este material pudimos certificar que el método de digestión ácida utilizado y la medida por generación de hidruros-espectrometría de fluorescencia atómica se realizaban correctamente para las muestras de leche. Los valores encontrados tras el análisis del material de referencia con nuestro método fue de $0,128 \pm 0,009 \mu\text{g L}^{-1}$. Como el pretratamiento de la muestra y medida fueron las

mismas en los dializados y digeridos gastrointestinales y llevadas a cabo de forma simultánea a las medidas de la leche se toma como buenas las medidas de selenio por espectrometría de fluorescencia atómica en estas matrices al ser exacta la medida en las leches.

Estudio del balance de masas

Para evaluar la determinación de selenio en los dializados y digeridos gastrointestinales se llevó a cabo un balance de masas en cuatro réplicas de una muestra de leche obtenido tras la fortificación de los forrajes al nivel de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ con selenio orgánico. Los niveles de selenio fueron determinados en la leche, los dializados y el digerido gastrointestinal. Los resultados de estos análisis se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Balance de masas de la digestión gastrointestinal

Muestra	Masa Se (ng)
Leche	1156 ± 41
Dializado	$74,15 \pm 4,5$
Digerido gastrointestinal	1087 ± 50

Con estos valores se llevó a cabo los cálculos del balance de masa, sumando la masa encontrada en el digerido gastrointestinal y el dializado y dividiendo por la masa encontrada en la leche. El resultado encontrado fue $100,41 \pm 1,15$.

A la vista de los resultados, decidimos llevar a cabo el análisis de selenio total en la leche y los dializados con el fin de establecer el porcentaje de dializabilidad del selenio que se encuentra en las muestras de leche que vamos a estudiar.

4.3.3 ESTUDIO DE LA DIALIZABILIDAD DEL SELENIO EN LECHE DE VACA

Con el fin de conocer la dializabilidad de selenio en las distintas muestras de leche obtenidas tras la suplementación de los forrajes utilizados en la alimentación de las vacas con distintos niveles de selenio orgánico, y con selenio inorgánico, se determinó la concentración de selenio en la leche y en los dializados obtenidos de las mismas tras el proceso de digestión “in vitro” previamente descrito. Este estudio se ha realizado con cinco muestras de leche diferentes para cada uno de los tipos y niveles de suplementación de los forrajes. De las cinco muestras empleadas, una de ellas se ha utilizado como testigo en el proceso de diálisis, las cuatro muestras restantes fueron analizadas por triplicado por generación de hidruros-espectrometría de fluorescencia atómica empleando el método de adición estándar. En el caso de las muestras de leche, el análisis se ha realizado con nueve medidas para cada uno. Los resultados de concentración de selenio obtenidos en los dializados y en la leche se muestran en la Tabla 13 expresados como concentración de selenio (ng g^{-1}) \pm desviación estándar.

Tabla 13. Niveles de selenio encontrados en los dializados y leches obtenidas tras la fortificación de los forrajes con distintas cantidades de selenio orgánico

[Se] ng g⁻¹		
Nivel de suplementación	Dializado	Total
Con selenio inorgánico		
0,3 µg g ⁻¹	2,1± 0,25	22,5 ± 0,42
	2,5± 0,21	
	2,0± 0,41	
	2,3± 0,10	
Con selenio orgánico		
0,0 µg g ⁻¹	1,9 ± 0,3	19,4± 0,41
	1,8 ± 0,2	
	1,8 ± 0,2	
	1,9 ± 0,2	
0,2 µg g ⁻¹	2,9 ± 0,3	28,1 ± 0,35
	2,8 ± 0,3	
	2,7 ± 0,3	
	2,8 ± 0,2	
0,3 µg g ⁻¹	3,2 ± 0,2	32,1 ± 0,51
	3,1 ± 0,2	
	3,1 ± 0,2	
	3,0 ± 0,3	
0,4 µg g ⁻¹	3,8 ± 0,1	36,0 ± 0,42
	4,0 ± 0,2	
	3,9 ± 0,3	
	3,7 ± 0,4	
0,5 µg g ⁻¹	4,7 ± 0,2	40,8 ± 0,53
	4,5 ± 0,2	
	4,5 ± 0,2	
	4,4 ± 0,3	

Como puede verse en la Figura 8 la concentración media de selenio en los dializados de la leche obtenidos tras el uso de la suplementación de selenio en su

forma inorgánica ($2,2 \pm 0,21$) es menor que la obtenida para el mismo nivel de suplementación con selenio orgánico ($3,2 \pm 0,11$). En cuanto a la suplementación de los forrajes con selenio orgánico se observa que a medida que aumenta el nivel de suplementación también aumenta la concentración de selenio en los dializados de la leche.

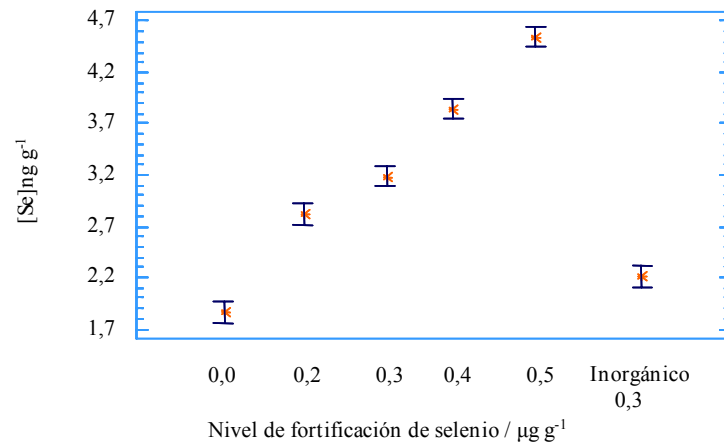


Figura 8. Concentración de selenio en los dializados de las leches obtenidas tras la suplementación de los forrajes a distintos niveles de selenio orgánico, y con selenio inorgánico

Tras hacer un análisis de varianza con el Test de Cochran, podemos concluir que no hay diferencias significativas (95% nivel de confianza) entre las desviaciones estándar de la concentración de selenio en los dializados de leche entre los diferentes niveles estudiados. A continuación se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA una vía) y se comprobó que existen diferencias significativas (95% nivel de confianza) entre los contenidos de selenio en los dializados de leche a distintos niveles de suplementación de los forrajes con selenio, tal como se apreciaba gráficamente.

Para conocer entre que niveles de suplementación existen diferencias estadísticamente significativas (95% nivel de confianza) se llevo a cabo un Test de rango múltiple que utiliza el método de Fisher para discriminar (95% nivel de confianza) entre las concentraciones medias de selenio en los dializados de las leches obtenidas a diferentes niveles de suplementación (Tabla 14). El resultado de este análisis estadístico nos muestra que existen diferencias significativas entre los contenidos de selenio en las distintas muestras de leche estudiadas.

Tabla 14. Resultados del Test de rango múltiple usando el método de Fisher (95% nivel de confianza) para la concentración de selenio en los dializados de leche de vaca

Nivel de Suplementación / $\mu\text{g g}^{-1}$	Media/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Grupo homogéneo
0,0	1,86	X
Inorgánico (0,3)	2,20	X
0,2	2,82	X
0,3	3,19	X
0,4	3,85	X
0,5	4,55	X
Limites (\pm)	Contraste	Diferencia
0,2056	0 – 0,2	*-0,96

	0 – 0,3	*-1,33
	0 – 0,4	*-1,99
	0 – 0,5	*-2,68
	0 – inorgánico	*-0,34
	0,2 – 0,3	*-0,37
	0,2 – 0,4	*-1,03
	0,2 – 0,5	*-1,72
	0,2 – inorgánico	*0,61
	0,3 – 0,4	*-0,66
	0,3 – 0,5	*-1,36
	0,3 – inorgánico	*0,98
	0,4 – 0,5	*-0,70
	0,4 – inorgánico	*1,64
	0,5 – inorgánico	*2,34
* Existen diferencias significativas entre los niveles comparados		

Dializabilidad

Con los datos de concentración de selenio obtenidos en la leche y sus dializados (Tabla 13), y usando la fórmula descrita en el apartado 4.3.2 calcularemos la dializabilidad del selenio para cada tipo y nivel de fortificación de selenio en los forrajes tras el proceso de digestión “in vitro”. El porcentaje de selenio dializado (% Dializabilidad) obtenido en cada uno de los casos se encuentra en la Tabla 15.

Tabla 15. Dializabilidad del selenio en leches de vaca obtenidas tras la fortificación de los forrajes con distintas cantidades de selenio orgánico

Nivel de suplementación	% Dializabilidad
Con selenio inorgánico	
0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$	9,4
	11,0
	8,7
	10,1
Con selenio orgánico	
0,0 $\mu\text{g g}^{-1}$	9,68
	9,47
	9,17
	9,94

0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$	10,34
	9,99
	9,74
	10,02
0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$	10,03
	9,63
	9,69
0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$	10,41
	10,57
	11,02
0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$	10,71
	10,30
	11,56
	10,98
Inorgánico 0,3	11,10
	10,83

Como puede verse en la Figura 9 parece existir una tendencia a aumentar el porcentaje de dializabilidad en función del nivel de suplementación de selenio orgánico. Dado que, a diferencia de lo observado para la concentración de selenio en los dializados de la leche, no existe una evidencia clara de esto se procedió a la realización de un análisis estadístico que nos clarifique la existencia o no de dicha tendencia.

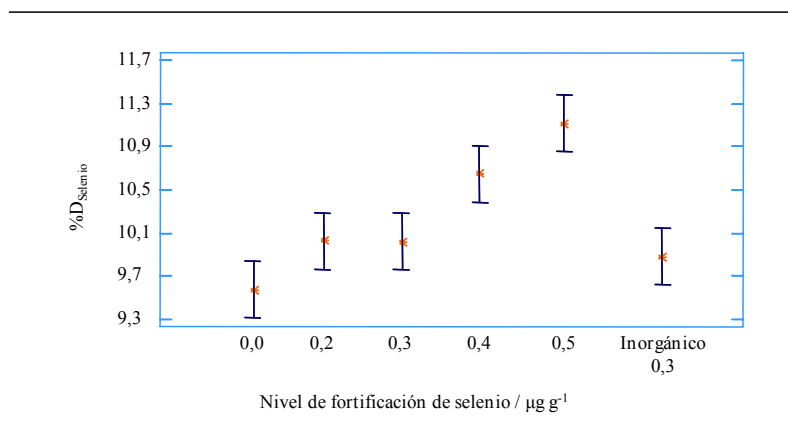


Figura 9. Superficies de medias para la dializabilidad de selenio en muestras de leche de vaca obtenidas tras la fortificación de los forrajes con distintas cantidades de selenio orgánico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA una vía) y se encontró la existencia de diferencias significativas para un 95 % nivel de confianza entre las medias de la dializabilidad del selenio a los distintos niveles y tipos de suplementación empleados en la alimentación de las vacas.

Para conocer entre que niveles de suplementación existen diferencias estadísticamente significativas (95% nivel de confianza) se llevo a cabo un Test de rango múltiple (95% nivel de confianza) con las dializabilidades medias de selenio a diferentes suplementaciones (Tabla 16) El resultado de este análisis estadístico nos muestra la existencia de dos grupos homogéneos en dializabilidad que presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Uno de los grupos está formado por las leches obtenidas tras la alimentación con forrajes sin suplementar, suplementados con selenio inorgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$) y con selenio orgánico de $0,2$ y $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ mientras que el otro está formado por las leches obtenidas tras la fortificación de los forrajes con $0,4$ y $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de selenio orgánico.

Tabla 16. Resultados del test de rango múltiple usando el método de Fisher (95% nivel de confianza) para la dializabilidad de selenio en muestras de leche de vaca

Nivel de Suplementación / $\mu\text{g g}^{-1}$	Media / %	Grupo homogéneo
0,0	9,57	X
Inorgánico (0,3)	9,88	X
0,2	9,94	X
0,3	10,02	X
0,4	10,65	X
0,5	11,12	X
Limites (\pm)	Contrastan	Diferencia
0,5267	0 – 0,2	-0,4575
	0 – 0,3	-0,375
	0 – 0,4	*-1,085
	0 – 0,5	*-1,5525
	0 – Inorgánico	-0,31
	0,2 – 0,3	0,0825
	0,2 – 0,4	*-0,6275

	0,2 – 0,5	*-1,095
	0,2 – Inorgánico	0,1475
	0,3 – 0,4	*-0,71
	0,3 – 0,5	*-1,1775
	0,3 – Inorgánico	0,065
	0,4 – 0,5	-0,4675
	0,4 – Inorgánico	*0,775
	0,5 – Inorgánico	*1,2425
* Existen diferencias significativas entre los niveles comparados		

4.4 CONCLUSIONES

- Se ha realizado un estudio sobre el efecto que produce el aumento de selenio en la leche de vaca, a través de la fortificación de los forrajes empleados en la alimentación de las vacas, en la biodisponibilidad del mismo para el ser humano. El método utilizado para estudiar la biodisponibilidad ha sido un método de digestión “in vitro” con diálisis, siendo la dializabilidad el parámetro escogido para estudiar la diferente biodisponibilidad del selenio presente en las leches de vaca.
- Los contenidos de selenio en los dializados de la leche de forma proporcional a medida que aumenta el nivel de fortificación con selenio orgánico de los forrajes. La suplementación con $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de selenio inorgánico da lugar a niveles de selenio en los dializados muy próximos al nivel de los dializados de la leche obtenida sin suplementar.
- La dializabilidad del selenio en leches de vaca obtenida tras la alimentación con forrajes sin suplementar, suplementados con selenio inorgánico ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$) y con selenio orgánico de $0,2$ y $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ no presenta diferencias estadísticamente significativas.
- La dializabilidad del selenio en las leches obtenidas tras la fortificación de los forrajes con $0,4$ y $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de selenio orgánico presentan un mayor porcentaje de dializabilidad con respecto a las anteriores y no presentan diferencias significativas entre ellas.

4.5 BIBLIOGRAFIA

1. W. G. Manson, W. A. Corward, M. Harding, L. T. Weaver, *Archs Dis Child Fetal Neonatal*, 1999, **80**, F183-F187.
2. M. Hamosh, *Clinics in Perinatology* 1996, **23** (82), 191-209.
3. M.V. Ibáñez, F. Rincón, B. Martínez, A. Acosta, *Alimentaria*, 2000, **37** (312), 39-42.
4. R. F. Hurrell, L. Davidson, M. Reddy, P. Kastenmayer, J. D. Cook, *British Journal of Nutrition*, 1998, **79**, 31-36.
5. M. L. Pabón, B. Lönnerdal, *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2000, **14**, 146-153.
6. R. García, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, *Biological Trace Elements Research*, 1998, **65** (1), 7-17.
7. L. H. Shen, J. Luten, H. Robberrecht, J. Bindels, H. Deelstra, *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1994, **199**, 442-445.
8. A. M. Miniham, T. E. Fox, S. J. Fairweather-Tait, *Bioavailability'93: Nutritional Chemical and Food Processing Implications of nutrient Availability*, Ed. Schlemmer, 1993, 175-179.
9. H. Crews, J. A. Burrell, D. J. Mc Weeny, *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1985, **180**, 221-226.
10. B. Lönnerdal, C. Glazier, *Biological Trace Elements Research*, 1989, **19** (1-2), 57-69.
11. B. Lönnerdal, M. Yuen, C. Glazier, R. E. Litov, *The American Journal of Clinical Nutrition.*, 1993, **58**, 392-397.
12. M. S. Vázquez, A. M. Guitiérrez, M. M. Gómez, M. A. Palacios, *Química Analítica*, 1994, **13**, 144-147.
13. C. Cabrera, M. L. Lorenzo, C. de Mena, M. C. López, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1996, **47**, 331-339.

-
14. H. M. Crews, P. A. Clarke, D. J. Lewis, L. M. Owen, P. R. Strutt, A. Izquierdo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, **11**, 1177-1182.
 15. A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, A. Mandín, *Metal Ions in Biology and Medicine*, 1996, **4**, 9-11.
 16. P. Bermejo, E. Peña, R Domínguez, A. Bermejo, J. A. Cocho, J. M. Fraga, *Food Chemistry*, (2002), **77** (3), 361-369.
 17. D. D. Miller, B. R. Schricker, R. R. Rasmussen, D. van Campen, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1981, **34**, 2248-2256.
 18. L. Shen, P. van Dael, H. Deelstra, *Z. Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1993, **197**, 342-345.
 19. L. Shen, P. van Dael, J. Luten, H. Deelstra, *Biological Trace Elements Research*, 1995, **49**, 107-118.
 20. L. Shen, P. van Dael, J. Luten, H. Deelstra, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1996, **47** (1), 75-81.
 21. M. P. Vaquero, M. Veldhuizen, W. Van Dokkum, C. J. A. van der Hamer, G. Schaafsma, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1994, **64**, 475-481.
 22. F. Pérez-Llamas, M. G. E. Diepenmaat-Wolters, S. Zamora, *British Journal of Nutrition*, 1996, **76**, 727-741.
 23. A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, A. Mandín, *Metal Ions in Biology and Medicine*, 1996, **4**, 9-11.
 24. M. J. Roig, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, *Food Chemistry*, 1999, **64**, 403-409.
 25. M. J. Roig, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, *Food Chemistry*, 1999, **65** (3), 353-357.
 26. M. Jovani, M.le Masle, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, G. Clemente, *Nahrung*, 2000, **6** (1), 25-31.
 27. M. Jovani, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, G. Clemente, "Nahrung, 2000, **44** (2), 114-117.

-
28. A. Guillem, A. Alegría, R. Barberá, *Biological Trace Elements Research*, 2000, **75** (1-3), 11-19.
29. P. Chaiwanon, P. Puwastien, A Nitithamyong, P. P. Sirichakwal, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2000, **13** (4), 319-327.
30. D. Bosscher, M. van Caillie-Bertrand, K. van Dyck, H. Robberecht, R. van Cauwenbergh, H. Deelstra, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2000, **30** (4), 373-378.
31. D. Bosscher, Z. Lu, R. Van Cauwenbergh, M. Van Caillie-Bertrand, H. Robberecht, H. Deelstra, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2001, **52** (2), 173-182.
32. D. Bosscher, Z. Lu, R. Van Cauwenbergh, M. Van Caillie-Bertrand, H. Robberecht, H. Deelstra, *Nutrition*, 2003, **19** (7/8), 641-645
33. E. Peña, R Domínguez, A. Bermejo, J. A. Cocho, J. M. Fraga, P. Bermejo, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52** (15), 4887-4892.
34. J. Luten, H. Crews, A. Flynn, P. Van Dael, P. Kastenmayer, R. Hurrell, H. Deelstra, L-H. Shen, S. Fairweather-Tait, K. Hickson, R. Farre, U. Schlemmer and W. Frohlich, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, **72** (4), 415-424.

5.1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se ha establecido que la biodisponibilidad del selenio y el impacto en el comportamiento fisiológico y distribución en el organismo humano, depende en gran medida de la forma química en que éste se encuentre en la dieta. La forma química en que es ingerido un elemento esencial condiciona la absorción del mismo. Esto ha sido descrito en el caso del selenio por C.D. Thomson¹, quien comenta que la absorción del selenio en forma de selenoaminoácidos, tal como selenometionina, es del 95%, mientras que en las formas inorgánicas, tales como selenio (IV) y selenio (VI), la absorción es del 90 y 60% respectivamente. Por otra parte, mientras la selenometionina es absorbida por un transporte activo en el lugar de la metionina, el selenio (VI) es absorbido por un transporte de difusión simple². Ésta es la razón, por lo que las formas orgánicas de selenio encontradas en los alimentos naturales son absorbidas en mayor extensión que las formas inorgánicas usadas habitualmente en los suplementos alimenticios.

Asimismo, la toxicidad del selenio también depende de la forma química en que se ingiere. Por lo tanto, es de gran importancia llevar a cabo la especiación de selenio en los alimentos y complementos dietéticos utilizados habitualmente en la alimentación del ser humano, con objeto de conocer la mayor o menor biodisponibilidad del selenio en la dieta.

5.1.1 MÉTODOS UTILIZADOS EN LA ESPECIACIÓN DE SELENIO

La especiación de metales en matrices biológicas necesita una estrategia de trabajo determinada para obtener unos resultados satisfactorios. Esta estrategia debe tener una serie de etapas como extracción de los elementos de la muestra, separación, detección, identificación y cuantificación de las especies. Otras etapas, como la preconcentración o la limpieza, se pueden incluir según sea el analito y la muestra objeto de estudio. Estas etapas se pueden ver en la Figura 1.

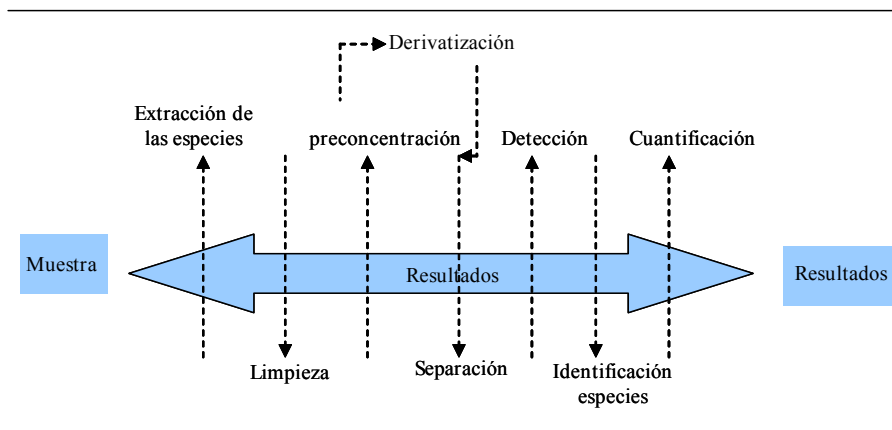


Figura 1. Estrategia secuencial para la especiación de elementos en muestras biológicas

5.1.1.1 Extracción de las diferentes especies de selenio

El primer paso necesario para llevar a cabo la especiación de cualquier analito es su extracción de la matriz a la que se encuentre ligado. Cuando lo que se busca es la determinación de especies de un determinado metal, las técnicas empleadas para la preparación de la muestra, han de ser menos agresivas que las empleadas en la determinación del contenido total de este metal, donde el objetivo es la destrucción total de la matriz en la que se encuentra el metal a determinar. Este proceso de preparación de la muestra para la posterior especiación de selenio va a depender de la técnica analítica que se vaya utilizar para llevar a cabo el análisis y de la naturaleza de dicha muestra. Requiere una serie de etapas como la liberación de los analitos de la muestra, en algunos casos preconcentración, filtración para eliminar residuos que puedan dañar el equipo o el sistema de separación y hasta posibles reacciones de derivatización para poder ser analizadas por las técnicas de que se dispongan en el laboratorio. Y todo ello teniendo como objetivo una máxima eficiencia y procesos rápidos y baratos.

Los desafíos que presenta el pretratamiento de la muestra para la especiación química y biológica son:

- Estabilidad de las especies. Las especies pueden modificarse a menudo cuando alteramos el equilibrio fisicoquímico en que se encuentran en su origen. Por ejemplo, la selenocisteína presenta una baja estabilidad en los extractos y se transforma rápidamente en otras especies.
- Debido a la alta complejidad de las matrices en que se encuentran las especies se necesitan métodos de pretratamiento sencillos que no las modifiquen³ y no hagan muy complejo su análisis.
- Desarrollo de instrumentación para llevar a cabo la extracción y posterior determinación de las diferentes especies. Normalmente la concentración de las especies organometálicas son muy bajas y necesitan detectores muy sensibles y selectivos.

En el caso de selenio, deben tenerse en cuenta las diferentes características que pueden presentar los distintos compuestos en que se encuentran. Este elemento forma parte de especies orgánicas (selenocisteína, selenocistina y selenometionina) y especies inorgánicas (selenio (IV) y selenio (VI)), pero algunas de sus especies orgánicas, como los selenio-aminoácidos, poseen enlaces covalentes formando parte de proteínas o péptidos que hay que tener en cuenta para llevar a cabo su extracción y su posterior análisis.

En la bibliografía encontramos distintos métodos de extracción de estas especies:

- La extracción con agua fue utilizada para obtener las especies de selenio en diferentes muestras, pero la eficacia de estas extracciones es baja, con recuperaciones entre un 10-40 %^{4,5}.
- La hidrólisis de proteínas para liberar los diferentes aminoácidos, hidrólisis ácida, normalmente con ácido clorhídrico^{6,7,8,9}, o la hidrólisis alcalina llevada a cabo con amoniaco^{10,11} o hidróxido de tetrametilamonio^{8,9} se han utilizado con gran éxito aunque la utilización de estos tratamientos agresivos puede

provocar la degradación de las diferentes especies de selenio como describe Mackey y col.¹²

- La mezcla de disolventes orgánicos también se ha utilizado para la extracción de selenio inorgánico y selenoaminoácidos, usando mezclas como cloroformo/alcohol¹³, agua/metanol/cloroformo^{14,15}. Estas técnicas usan agitación mecánica y trabajan a distintas temperaturas lo que puede facilitar la extracción, pero tienen el riesgo de producir daños en la estabilidad de las distintas especies.
- Extracción Soxhlet, es empleada en muestras sólidas, por ejemplo en nueces¹⁶, presenta altas recuperaciones. Al utilizar disolventes orgánicos es necesario evaporarlos en la mayoría de las técnicas analíticas usadas para la determinación del selenio debido a que provoca problemas su introducción en el plasma cuando las medidas se llevan a cabo por técnicas de plasma acoplado por inducción, o provoca la inhibición de la generación del hidruro de selenio si se utiliza esta técnica.
- La microextracción en fase sólida se utiliza para la extracción de compuestos volátiles y su posterior análisis por cromatografía de gases^{17,18}. Es una técnica muy poco aplicada y desarrollada en los últimos años para el estudio de especies de selenio mediante cromatografía de gases tras una etapa de derivatización.
- La hidrólisis enzimática es el método más utilizado en la actualidad para la especiación de selenio en diferentes matrices^{19,20,21}. La utilización de este pretratamiento de la muestra se justifica debido a que el selenio se encuentra formando parte de compuestos de alto peso molecular en las paredes de la célula, mitocondrias, microsomas, ácidos nucleicos y sustituye al azufre en algunos aminoácidos que forman parte de las proteínas. Por tanto para separar los distintos selenoaminoácidos que conforman las distintas proteínas se utilizan enzimas proteolíticas específicas como la tripsina o pepsina, o no específicas como las pronasas. Estas enzimas rompen los enlaces peptídicos de

las proteínas y liberan los aminoácidos. Este procedimiento de tratamiento de la muestra presenta altas recuperaciones próximas al 100%.

5.1.1.2 Separación de las diferentes especies de selenio

La necesidad de identificar las diferentes especies de selenio en muestras biológicas hace que en los últimos años se hallan desarrollados numerosas técnicas de separación. A continuación se describen los métodos de separación más comunes empleados en la separación de selenio en muestras biológicas. En la especiación de selenio, las técnicas de separación utilizadas son la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC) y electroforesis capilar (CE). Estas técnicas se acoplan con detectores selectivos como los de absorción atómica (AAS), emisión atómica (AES), espectrometría de fluorescencia atómica (SFA), plasma acoplado por inducción acoplado a espectrometría de masas (ICP-MS) y en los últimos trabajos encontrados en bibliografía, utilizan la técnica del electrospray acoplado a espectrometría de masas (ES-MS).

Cromatografía de gases

Actualmente, la cromatografía de gases es una técnica poco utilizada en la especiación de los compuestos de selenio. Las ventajas que presenta esta técnica son su rapidez y sensibilidad y su facilidad para ser acoplada a detectores de plasma ya que las especies se encuentran en fase gas y no es necesario eliminar el disolvente como es el caso de la cromatografía líquida, lo cual permite llegar a niveles de concentración muy bajos. Pero esta técnica presenta la limitación de que sólo es válida para sustancias volátiles, por lo que los compuestos de selenio, para su determinación por cromatografía de gases, necesitan una etapa previa de derivatización. En esta etapa de derivatización se han utilizado varios reactivos que forman especies volátiles como el 1,2-diamino-4-trifluorometilbenceno²², 4-nitro-o-fenilendiamina¹⁸, 4-cloro-o-fenilendiamina²³, los cuales mediante reacciones químicas dan lugar a un compuesto volátil de selenio llamado piazio-selenol.

Otra forma de convertir las especies de selenio en compuestos volátiles está basada en la formación de hidruros¹⁸. Tras la reacción de selenio (IV) con hidrógeno nascente. Otra reacción encontrada en bibliografía para la especiación de selenio por cromatografía de gases fue la transformación de la selenocistina y selenometionina en su correspondiente N-etoxicarbonil etil éster tras la derivatización con etilcloroformato²⁴. Igualmente, en la separación de los dos enantiómeros de la selenometionina, se han derivatizado con cloruro de propano-2-acetilo y anhídrido trifluoroacético para su posterior separación²⁵.

Cromatografía líquida

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el uso de cromatografía de gases para separar los diferentes compuestos de selenio presenta la limitación de que la mayoría de las especies no son volátiles y necesitan una etapa previa para su transformación en compuestos volátiles. Ambos procesos están sujetos a numerosas interferencias y aumentan considerablemente la manipulación de la muestra incrementando los riesgos de pérdida del analito, contaminación o transformación de especies en otras. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite la separación de mezclas líquidas que por su baja volatilidad o inestabilidad térmica que no pueden separarse mediante cromatografía de gases. La versatilidad de esta técnica hace que su campo de aplicación sea muy extenso. Por todo esto, la cromatografía líquida de alta resolución es la técnica más utilizada en la especiación de selenio en las diferentes matrices estudiadas. Además, la gran variedad de fases móviles y fases estacionarias que es posible utilizar nos permiten trabajar con un amplio intervalo de posibilidades para obtener una buena separación de las especies. Esta técnica presenta la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre- y post-columna en compuestos que presentan problemas en su detección. De los diferentes tipos de cromatografía líquida, la de intercambio iónico y fase reversa han sido los más aplicados en la especiación de compuestos de selenio. También existen trabajos en este campo con otros tipos de cromatografía líquida como la de exclusión por tamaño de partículas o la cromatografía quiral²⁵.

La cromatografía de intercambio iónico ha sido la más empleada para la determinación de las diferentes especies de selenio^{26,27,28,29,30}. Los trabajos desarrollados han utilizado tanto columnas catiónicas^{31,32} como columnas aniónicas^{29,30,33}. Las fases móviles más usadas con estas columnas son acuosas y normalmente disoluciones reguladoras, siendo las más utilizadas las fases acuosas de sales de fosfato^{25,34}, aunque también se pueden encontrar algunos trabajos con fases móviles orgánicas³². Con este tipo de cromatografía acoplado a un gran número de detectores se ha llevado a cabo con éxito la determinación de compuestos de selenio en diferentes matrices como agua^{28,30}, algas³¹, moluscos³², orina³³, etc.

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa también ha sido empleada con éxito en la determinación de las diferentes especies de selenio. En esta modalidad se han desarrollado trabajos tanto en su forma convencional^{35,36} como en la cromatografía en fase reversa con par iónico^{6,21,37,38}. Con este tipo de cromatografía acoplado a diferentes detectores se ha aplicado a la especiación de selenio en diferentes matrices como en levaduras^{21,30}, pescados³⁵, etc.

Otras modalidades de cromatografía líquida utilizada en la especiación de selenio en diferentes matrices es la cromatografía de exclusión por tamaño^{9,39} y en los últimos años se empieza a utilizar la cromatografía quiral^{25,40}.

Electroforesis capilar

Aunque la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución son las dos técnicas de separación fundamentales en la especiación de selenio, en los últimos años se ha desarrollado una técnica alternativa que es la electroforesis capilar. La electroforesis capilar es una técnica que se basa en el transporte iónico a través de un disolvente que se encuentra dentro de una columna capilar bajo un campo eléctrico. Esta técnica se caracteriza por su elevada capacidad analítica, debido a su alta capacidad de separar compuestos y cuantificarlos en cortos periodos de tiempo. Las primeras y principales aplicaciones de esta técnica fue la separación de péptidos, proteínas y secuencias de ADN^{41,42,43}. Sin embargo, cada vez se ha ido

aplicando a otros campos como en la especiación de compuestos de selenio en diferentes matrices^{44,45,46,47}. Cabe resaltar que se pueden encontrar trabajos que utilizan esta técnica de separación de las distintas especies de selenio en leche^{48,49,50} obteniendo resultados satisfactorios.

5.1.1.3 Detección de los compuestos de selenio

Una vez separadas las especies es necesario determinar el contenido de cada una de ellas por las distintas técnicas de separación citadas en el apartado anterior.

Espectrometría de absorción atómica

La espectrometría de absorción atómica como detector para el análisis de compuestos de selenio no ha sido muy utilizada acoplada generalmente a la cromatografía líquida. G. A. Pedersen et al.²⁷ proponen la espectroscopía de absorción atómica con llama como detector tras llevar a cabo la separación de las especies de selenio debido a la facilidad de acoplar dichas técnicas. El problema que presenta este acoplamiento es su falta de sensibilidad (alcanza miligramos por litro) lo que hace que no sea una técnica adecuada para la determinación de selenio en muestras reales. Mejores resultados se obtienen cuando se acopla la cromatografía líquida de alta resolución a la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica^{10,19,51,52}. Con esta técnica se consigue un aumento considerable de la sensibilidad obteniendo respuesta para concentraciones del orden microgramos por litro. La generación de hidruros tras la separación de los compuestos y posterior detección por espectroscopía de absorción atómica ha sido utilizada en mayor medida dentro de las técnicas de espectrometría de absorción atómica para llevar a cabo la especiación de selenio^{53,54,55,56,57}. Esta técnica alcanza igualmente niveles de microgramos por litro. Aunque los resultados obtenidos alcanza valores adecuados para la especiación de selenio en muestras reales estas técnicas no han sido ampliamente utilizadas debido a la dificultad de llevar a cabo el acoplamiento entre la técnica de separación y el detector.

Generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica

La generación de hidruros acoplada a la espectroscopía de fluorescencia atómica es una técnica muy utilizada en trabajos de especiación de selenio llevados a cabo en los últimos años^{28,30,34,36,37}. Presenta una gran facilidad para acoplarse a la cromatografía líquida de alta resolución. La técnica ofrece la ventaja de su alta sensibilidad pero requiere la transformación de todas las especies de selenio a su forma inorgánica, selenio (IV), ya que sólo esta especie da lugar al hidruro. Esto provoca que este paso sea de gran importancia ya que si la transformación no es completa o se pierde nos llevaría a resultados erróneos.

Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción

Esta técnica combina la habilidad de la técnica del plasma acoplado por inducción para romper la muestra en átomos con el poder de la espectrometría de masas para distinguir partículas con diferente relación carga masa. Presenta gran sensibilidad para la determinación de las especies de selenio y además presenta una gran facilidad para ser acoplada a las técnicas empleadas en la separación de las especies. Por todo ello, la espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción es el detector más utilizado en estudios de especiación de selenio^{4,6,35,58,59}. Pero esta técnica presenta interferencias espectrométricas y no espectrométricas para la determinación de selenio, aunque en los últimos años estas se han disminuido considerablemente. Otro inconveniente es el alto coste de esta técnica que hace que no todos los laboratorios puedan acceder a ella.

Electrospray-espectrometría de masas y electrospray-espectrometría de masas-espectrometría de masas

En los últimos años los avances que se han llevado a cabo en las técnicas de separación y los límites de detección alcanzados permiten determinar nuevas sustancias que anteriormente no se habían identificado. La espectrometría de masas-espectrometría de masas permite también la determinación de la secuencia de aminoácidos. Se selecciona un ión por la masa en un primer espectrómetro y se fragmenta por colisión con un gas y los fragmentos se analizan en un segundo espectrómetro. Puede utilizarse con una fuente de ionización tipo MALDI o ESI. En

la ionización mediante electrospray los iones se forman a partir de una muestra en disolución, que se vaporiza haciéndola pasar a través de una fina aguja a la que se aplica una alta diferencia de potencial. Las gotas cargadas pasan a una zona de potencial más bajo, y son desolvatadas, adquiriendo protones las moléculas. Las primeras aplicaciones de ionización con electrospray fueron desarrolladas por Ganem et al.^{60,61} para el estudio de complejos no covalentes. Posteriormente es aplicada en gran medida a estudios donde se trata de identificar nuevas especies de los diferentes analitos estudiados. Éste es el caso del selenio donde, debido a los niveles de detección encontrados con las técnicas desarrolladas se busca identificar las nuevas especies detectadas, como por ejemplo, γ -glutamyl-Selenio-metilselenocisteína o el Selenio–adenosylhomocisteína, en distintas matrices, como orina^{62,63}, cebollas⁶⁴, agua³¹, levaduras⁶⁵, etc.

5.2 OBJETIVO

Dadas las diferencias existentes en la biodisponibilidad de las especies de selenio en la leche se considera necesario el estudio de dichas especies. Por ello se pretende desarrollar un método analítico para poder llevar a cabo la especiación de selenio en leche de vaca mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica.

Por otra parte se estudiará si el empleo de selenio orgánico o selenio inorgánico en la suplementación de los forrajes usados en la alimentación de las vacas produce variación en las distintas especies de selenio encontradas en la leche.

5.3 PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el desarrollo de un método de especiación de selenio en muestras de leche, este estudio toma como punto de partida el método desarrollada por Vilano y col.³⁴ aplicado a dos materiales de referencia de aguas.

El procedimiento podemos dividirlo en tres etapas de trabajo, la separación cromatográfica, una etapa de reducción y finalmente la detección.

El estudio de la separación de las distintas especies de selenio se ha realizado mediante cromatografía de intercambio iónico, la cual es utilizada en el trabajo de Vilano y col.³⁴. Para ello se ha empleado un cromatógrafo modelo 625 LC de WATERS equipado con una columna Hamilton PRP X-100. La separación cromatográfica se lleva a cabo inyectando la muestra en un bucle de 100 μl y es transportado por la fase móvil (fosfato amónico 0,015M, pH=7,0, 1 mL min^{-1}) a través de la columna cromatográfica. Después de la separación, se le añade ácido clorhídrico 3M y se introduce en el craqueador UV, formado por una lámpara de radiación ultravioleta a 254 nm rodeada por el tubo de teflón de 0,5 mm de diámetro interno y longitud 12 m. Tras salir del craqueador UV, se mezcla con la corriente de borohidruro sódico (0,8% (m/v), (borohidruro sódico en 1% (m/v) hidróxido sódico) para generar el hidruro de selenio y medirlo mediante espectroscopía de fluorescencia atómica. El esquema de trabajo se puede observar en la Figura 2.

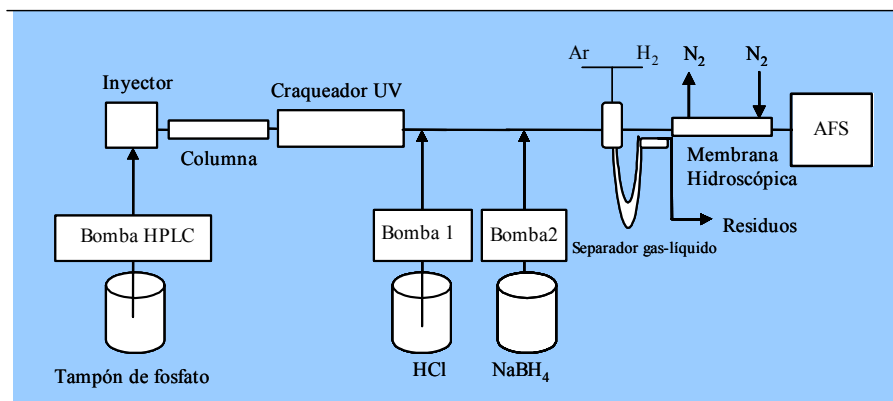


Figura 2. Esquema del montaje utilizado inicialmente para la especiación de selenio por HPLC-UV-HG-AFS

Los resultados que se obtienen bajo estas condiciones no son satisfactorios para realizar la especiación de selenio en muestras de leche ya que la sensibilidad encontrada para las distintas especies tiene valores superiores al contenido de estas en la leche. Además, bajo estas condiciones, no conseguimos reducir el selenio (VI) y la selenometionina a selenio (IV), por tanto no se genera el hidruro de esta especie y no se detecta. El cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra en la Figura 3. Por todo ello, se va a optimizar del sistema, separación cromatográfica, etapa de prerreducción y sistema de detección.

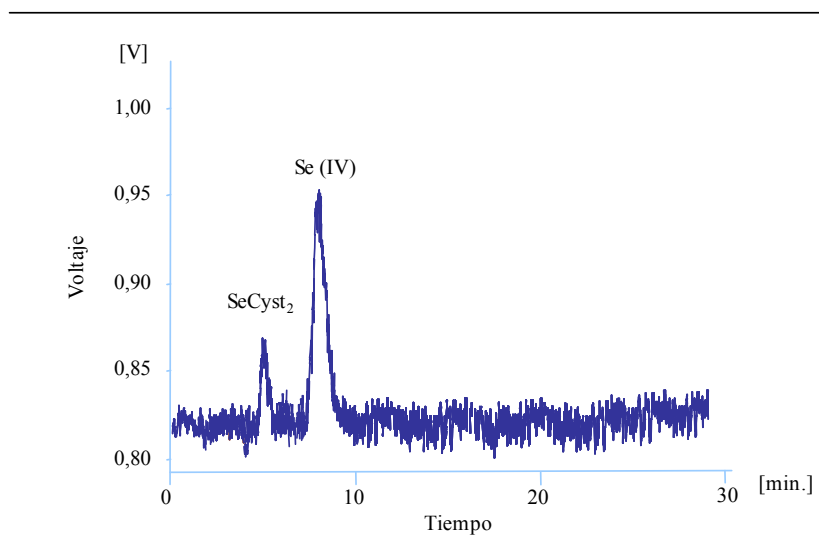


Figura 3. Cromatograma obtenido bajo las condiciones iniciales

5.3.1.1 Optimización de los parámetros experimentales

Con el objetivo de obtener una máxima intensidad y estabilidad en las señales analíticas correspondientes a cada una de las especies de selenio, los diferentes parámetros experimentales han sido estudiados y optimizados para el sistema cromatográfico en línea utilizado (Figura 2). Sólo el selenio (IV) puede formar el hidruro, por lo que todos los compuestos tienen que ser convertidos en primer lugar a este estado de oxidación para la posterior generación del hidruro. Este paso tiene una gran importancia para obtener un buen análisis de las especies de selenio por generación de hidruros-espectrometría de fluorescencia atómica. Debido a esto nuestro estudio de optimización lo vamos a comenzar por la optimización de la etapa de reducción y posteriormente estudiaremos las demás etapas del sistema.

5.3.1.1.1 Optimización de la etapa de reducción

En este estudio se desarrollaron dos procedimientos para llevar a cabo la reducción de las diferentes especies de selenio (selenio (VI), selenometionina y

selenocistina) mediante el uso de dos fuentes distintas de radiación, UV y radiación microondas, con el fin de disminuir el tiempo necesario para llevar a cabo la reducción de las especies y aumentar la efectividad de esta etapa.

Reducción de las especies de selenio a selenio (IV) mediante radiación ultravioleta

Dado los resultados no satisfactorios obtenidos con el sistema propuesto por Vilano y col.³⁴, seleccionado como punto de partida para este estudio, se decidió introducir en el sistema una fuente de calor para mejorar la destrucción de la materia orgánica y la reducción de selenio (VI) a selenio (IV) tal y como proponen I. Ipolyi et col³⁰. Para ello se ha diseñado un sistema de calentamiento que consiste en una resistencia eléctrica con termostato formada por dos bloques de aluminio unidos por dos barras también de aluminio. Estas barras se calientan al conectar la resistencia a la corriente eléctrica. El termostato del sistema nos permite controlar la temperatura de los bloques y barras de aluminio entre una temperatura ambiente a 200°C. Alrededor de las barras de aluminio se ha colocado un tubo de teflón de diez metros de longitud y un diámetro interno 0,8 mm para calentar la disolución. Este sistema (Ilustración 1) se ha acoplado al craqueador de radiación ultravioleta de forma que la disolución proveniente de éste es calentada a la temperatura seleccionada.



Ilustración 1. Sistema de calentamiento empleado para la reducción de las especies de selenio para llevar a cabo la especiación por HPLC-UV-HG-AFS

Con objeto de enfriar la disolución a la salida del bloque de calentamiento también se añadió al sistema inicial un baño de hielo. Este enfriamiento es necesario, dado que si se introduce la disolución caliente en el separador gas-líquido ésta provoca una gran inestabilidad en la línea de base producida por la llama de hidrogeno-argón usada en el sistema de determinación (espectrometría de fluorescencia atómica). El nuevo sistema utilizado se muestra en la Figura 4.

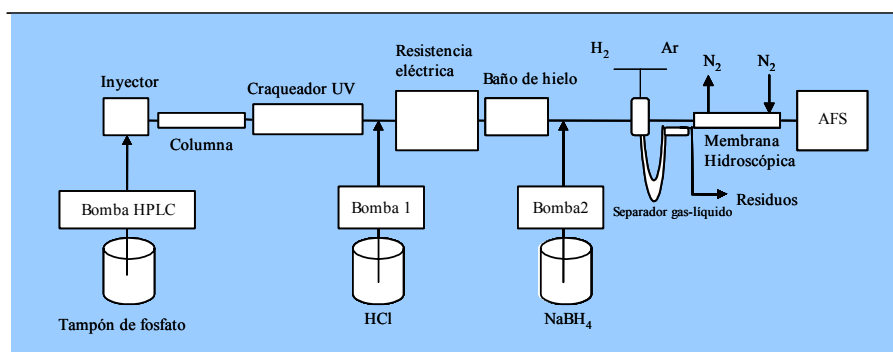


Figura 4. Esquema del montaje utilizado para la especiación de selenio por HPLC-UV-HG-AFS

Para llevar a cabo la optimización de los distintos parámetros involucrados en la etapa de reducción mediante radiación ultravioleta-calor se crea un diseño composicional $2^2 +$ estrella con el paquete estadístico “Statgraphics Plus 5,0”⁶⁶. Las dos variables estudiadas fueron la temperatura alcanzada en el sistema de calentamiento y la concentración de ácido clorhídrico, que va a ser utilizado como reductor y portador al mismo tiempo. La radiación ultravioleta se mantuvo constante durante todo el proceso. No se puede variar debido a limitaciones instrumentales, que sólo nos permite tenerlo encendido con una intensidad prefijada por el fabricante. En la Tabla 1 se muestran los valores superior (+) e inferior (-), así como los valores intermedios (Ko) y superior axial (+ α) e inferior axial (- α) alrededor de los valores límites del intervalo de cada una de las variables fijados por nosotros.

Tabla 1. Intervalo de estudio en el diseño composicional para la reducción de las especies de selenio inducida por radiación ultravioleta

Valores	Variables	
	[HCl] / M	Temperatura / °C
+	7,5	200
-	2,5	50
Ko	5	125
+ α	2,3	205,9
- α	7,7	44,1

Ko es el valor medio de la variable; $\pm \alpha$ es el valor estrella para cada variable

La matriz resultante de los diseños experimentales planteados (Tabla 2), correspondiente a un diseño composicional $2^2 +$ estrella, el cual, duplicado implica 20 experiencias. Se lleva a cabo por duplicado ya que esto no conlleva un gran número de experiencias y se obtienen unos resultados más robustos.

Tabla 2. Matriz de diseño composicional $2^2 +$ estrella para la determinación de selenio tras la reducción con radiación ultravioleta

Experiencia	[HCl]/M	Temperatura / °C
1	Ko	Ko
2	-	-
3	+	-
4	-	+
5	+	+
6	- α	Ko
7	+ α	Ko
8	Ko	- α
9	Ko	+ α
10	Ko	Ko
11	Ko	Ko
12	-	-

13	+	-
14	-	+
15	+	+
16	$-\alpha$	Ko
17	$+\alpha$	Ko
18	Ko	$-\alpha$
19	Ko	$+\alpha$
20	Ko	Ko

Dichas experiencias se realizarán con una concentración de selenio (VI) de 30 ng L⁻¹. Se lleva a cabo el estudio sólo con el selenio (VI) debido a que es la especie que presenta una mayor dificultad en la reducción de las diferentes especies estudiadas. Una vez creada la matriz del diseño se llevan a cabo las experiencias y se obtienen los resultados de intensidad de fluorescencia en altura de pico mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos para el diseño composicional para la determinación de selenio tras la reducción con radiación ultravioleta

Experiencia	Intensidad de fluorescencia
1	188
2	0
3	0
4	122
5	171
6	117
7	178
8	0
9	228
10	190
11	185
12	0
13	0

14	129
15	175
16	116
17	170
18	0
19	235
20	185

Una vez obtenidos estos datos, se introducen en el diseño composicional que nos ayudará a obtener el óptimo para cada una de las dos variables. A continuación se muestran las superficie de respuesta (Figura 5 y Figura 6) obtenida como producto del análisis de los datos introducidos en la matriz del diseño composicional para la determinación de selenio mediante generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica.

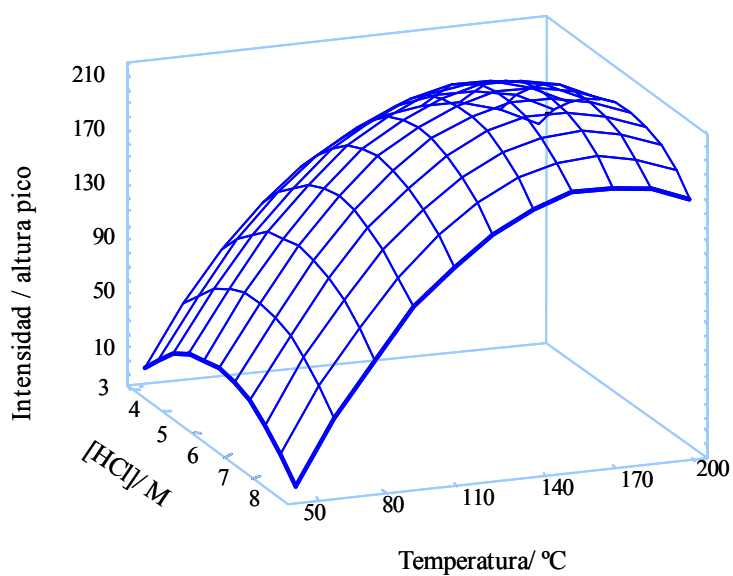


Figura 5. Superficie de respuesta obtenida para la optimización de la etapa de reducción de selenato a selenito inducida por radiación ultravioleta

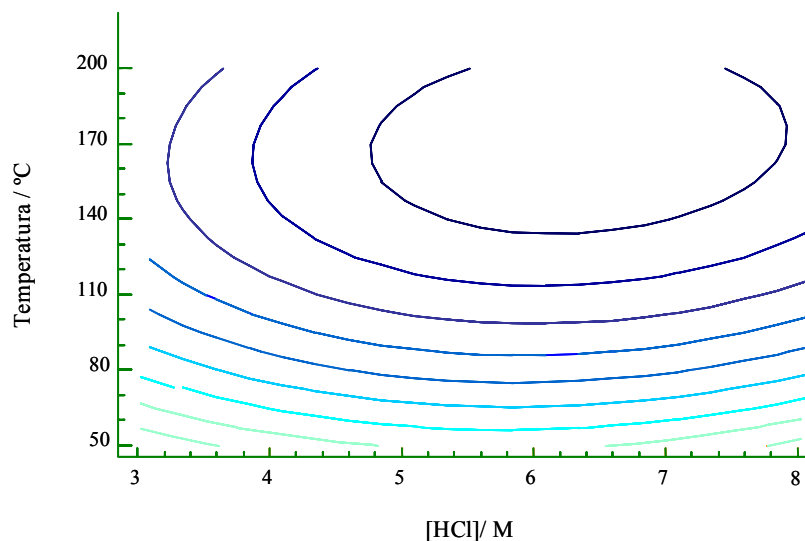


Figura 6. Superficie de contorno para la respuesta obtenida en la optimización para la reducción de selenato a selenito inducida por radiación ultravioleta

Con estos resultados se puede concluir que es necesario introducir el sistema de calentamiento para obtener la reducción óptima de las diferentes especies de selenio a selenio (IV) ya que a temperaturas inferiores a 100°C no se produce la reducción del selenio (VI) a selenio (IV). Otro resultado que se puede extraer de las experiencias realizadas para el diseño compositivo es que la reducción de selenio se puede llevar a cabo con ácido clorhídrico únicamente, el cual también se utiliza para la generación del hidruro, por lo que no es necesario utilizar mezclas reductoras que pueden introducir nuevas interferencias en la generación del hidruro. En las superficies de respuesta obtenidas encontramos los valores óptimos de nuestras variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente hemos establecido. Con ayuda de las superficies de respuesta podemos fijar los valores óptimos de la concentración de ácido clorhídrico y temperatura para llevar a cabo la reducción de

selenio (VI) a selenio (IV) inducida por radiación ultravioleta. Estos valores óptimos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores óptimos para las variables significativas en la reducción de selenio (VI) a selenio (IV) inducida por radiación ultravioleta

Variable	Valor óptimo
[HCl]/ M	6,0
Temperatura/ °C	180

Como la reducción de las especies de selenio se hace en línea tras la separación cromatográfica y ha de realizarse con unos valores fijos en las dos variables (temperatura y concentración de ácido clorhídrico) debido a las limitaciones instrumentales, se va a estudiar si las condiciones obtenidas para la reducción del selenio (VI) son válidas para reducir las dos especies orgánicas de selenio, selenocistina y selenometionina. Para ello se prepara una mezcla de patrones de selenocistina y selenio (IV) de 10 ng L⁻¹ y de selenometionina y selenio (VI) de 20 ng L⁻¹ y se inyectan en nuestro sistema. Esta experiencia se realiza con las condiciones cromatográficas propuestas inicialmente y las de la etapa de reducción optimizada en este apartado. Bajo estas condiciones se obtienen buenos resultados para todas las especies estudiadas, como se puede observar en el cromatograma mostrado en la Figura 7.

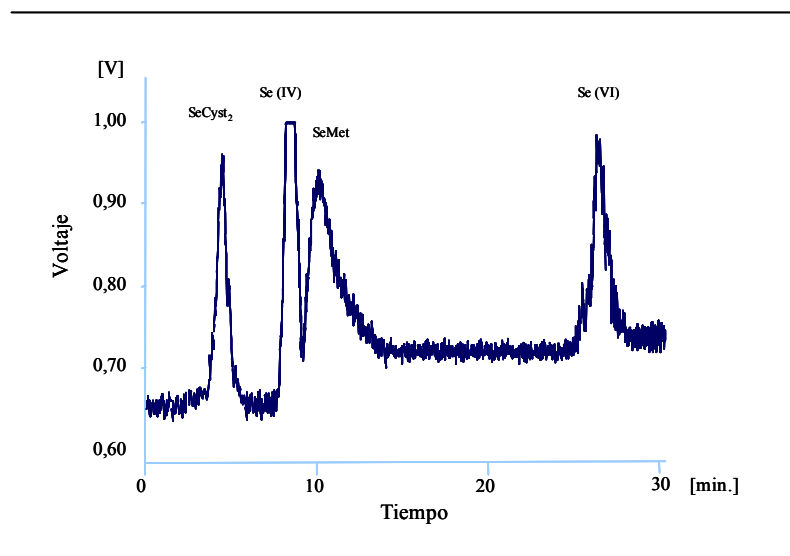


Figura 7. Cromatograma obtenido empleando las condiciones optimizadas de la fase de reducción inducida con radiación ultravioleta

Reducción de las especies de selenio a selenio (IV) mediante radiación con energía de microondas

Este estudio se llevó a cabo siguiendo el mismo esquema de trabajo empleado en el estudio realizado con radiación ultravioleta con el sistema de calentamiento acoplado. En este caso la lámpara de UV y el sistema de calentamiento fueron sustituidos por un horno microondas de uso doméstico (Figura 8).

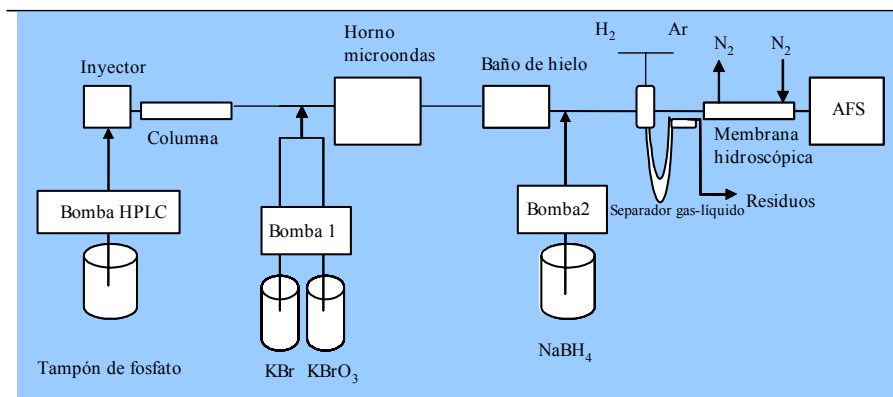


Figura 8. Esquema del montaje utilizado para la especiación de selenio por HPLC-MW-HG-AFS

En primer lugar se aborda la optimización de las variables que resultan significativas en la reducción de las especies de selenio a selenio (IV). Estas variables fueron la potencia de la energía de microondas y la concentración de los reactivos que conforman la mezcla redox (bromuro potásico y bromato potásico), tomando como referencia para fijar nuestro intervalo de trabajo los resultados obtenidos por E. Dumont y col.²¹.

La optimización de las tres variables se llevo a cabo mediante un diseño composicional central 2^{3+} estrella, ortogonal con seis grados de libertad por duplicado que implica 32 experiencias. Se estableció un intervalo de estudio para cada variable (Tabla 5) y se crea la matriz de experiencias con ayuda del paquete estadístico “Statgraphics Plus 5,0”⁶⁶ (Tabla 6). Dichas experiencias se realizarán con una concentración de selenato de 30 ng L^{-1} igual que en la optimización de la reducción mediante radiación ultravioleta.

Tabla 5. Intervalo de estudio en el diseño composicional para la reducción de las especies de selenio mediante radiación de microondas

Variables

Valores	[Br ⁻] / % (p/v)	[BrO ₃ ⁻] / mM	Potencia microneas / W
+	50	30	450
-	30	10	200
Ko	40	20	325
+α	56,81	36,82	150
-α	23,18	3,20	535
Ko es el valor medio de la variable; ± α es el valor estrella para cada variable			

Tabla 6. Matriz de diseño composicional 2³ + estrella para la determinación de selenio tras la reducción con radiación ultravioleta

Experiencia	[Br ⁻] / % (p/v)	[BrO ₃ ⁻] / mM	Potencia microneas / W
1	Ko	Ko	Ko

2	-	-	-
3	+	-	-
4	-	+	-
5	+	+	-
6	-	-	+
7	+	-	+
8	-	+	+
9	+	+	+
10	$-\alpha$	Ko	Ko
11	$+\alpha$	Ko	Ko
12	Ko	$-\alpha$	Ko
13	Ko	$+\alpha$	Ko
14	Ko	Ko	$-\alpha$
15	Ko	Ko	$-\alpha$
16	Ko	Ko	Ko
17	Ko	Ko	Ko
18	-	-	-
19	+	-	-
20	-	+	-
21	+	+	-
22	-	-	+
23	+	-	+
24	-	+	+
25	+	+	+
26	$-\alpha$	Ko	Ko
27	$+\alpha$	Ko	Ko
28	Ko	$-\alpha$	Ko
29	Ko	$+\alpha$	Ko
30	Ko	Ko	$-\alpha$
31	Ko	Ko	$-\alpha$
32	Ko	Ko	Ko

Del mismo modo que en el apartado anterior, trabajamos con las condiciones cromatográficas tomadas inicialmente y para cada experiencia se adoptan los valores que nos indica la matriz de experiencias.

Una vez obtenidos los resultados para cada una de las experiencias (Tabla 7), estos se introducen en el diseño compositivo que nos ayudará a obtener el valor óptimo para cada una de las tres variables estudiadas. A continuación se muestran

las superficies de respuesta (Figura 9) y la superficie de contorno (Figura 10) obtenida como producto del análisis de los datos introducidos en la matriz del diseño compositivo para la determinación en continuo de las distintas especies de selenio mediante generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica.

Tabla 7. Resultados obtenidos para el diseño compositivo para la determinación de selenio tras la reducción con radiación microondas

Experiencia	Intensidad de fluorescencia
1	114
2	80
3	77
4	70
5	72
6	60
7	58
8	55
9	56
10	122
11	117
12	89

13	74
14	79
15	56
16	116
17	112
18	78
19	79
20	68
21	70
22	55
23	53
24	50
25	58
26	128
27	121
28	85
29	70
30	83
31	54
32	119

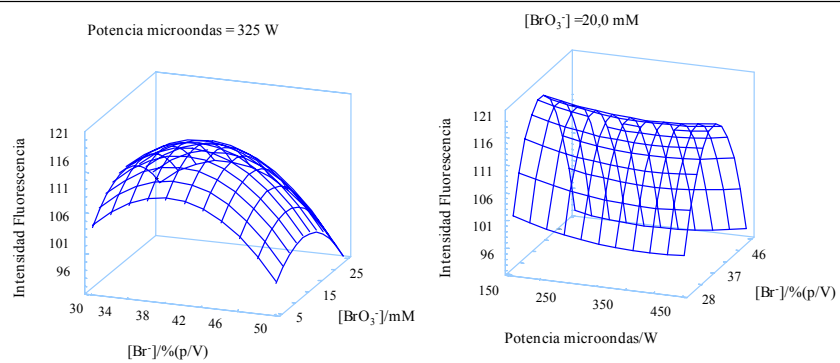


Figura 9. Superficie de respuesta obtenida para la optimización de la etapa de reducción de selenio (VI) a selenio (IV) inducida por radiación de microondas

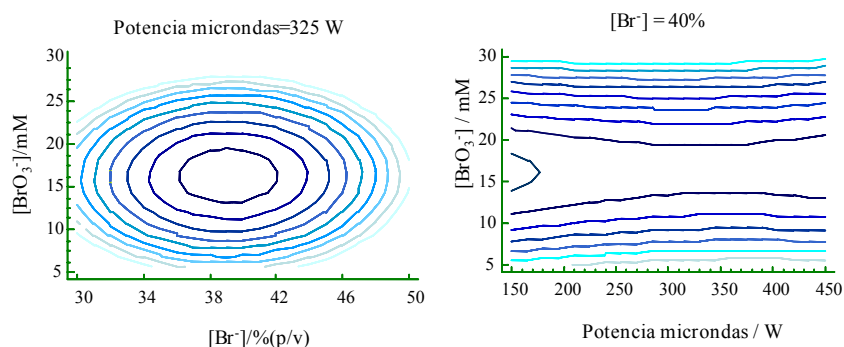


Figura 10. Superficie de contorno para la respuesta obtenida en la optimización para la reducción de selenio (VI) a selenio (IV) inducida por radiación de microondas

Con los resultados obtenidos se puede fijar los valores de la concentración de la mezcla redox, ya que los óptimos de concentración, bromuro potásico y bromato potásico, se ven claramente en la superficie de respuesta y superficie de contorno. En cambio, la potencia de microondas no presenta un óptimo en el intervalo que hemos estudiado. Esta variable presenta una ligera tendencia a que menor potencia mejor resultado. Igualmente se puede comprobar que esta variable presenta poca influencia sobre el resultado. No se puede trabajar con potencias inferiores debido a limitaciones instrumentales, ya que el microondas utilizado tiene 150 W como potencia mínima.

Después de este análisis podemos fijar los valores óptimos de las tres variables objeto a estudio (Tabla 8) para la reducción de las diferentes especies de selenio a selenio (IV) inducida por energía de microondas.

Tabla 8. Valores óptimos para las variables significativas en la reducción de selenato a selenito inducida por radiación de microondas

Variable	Valor óptimo
[Br ⁻] / (p/v)	40
[BrO ₃ ⁻] / mM	17,5

Potencia microondas/W	150
-----------------------	-----

De igual modo que se llevó a cabo en la optimización de la reducción inducida por radiación ultravioleta, se va a comprobar si las condiciones obtenidas para la reducción del selenio (VI) a selenio (IV) son igualmente válidas para obtener la reducción de la selenocistina y selenometionina. Para ello se emplea una mezcla de patrones de selenocistina y selenio (IV) de 10 ng L^{-1} y de selenometionina y selenio (VI) de 20 ng L^{-1} , la cual se inyecta en el sistema cromatográfico bajo las condiciones seleccionadas como óptimas. Se puede observar en la Figura 11 que todas las especies de selenio estudiadas presentan una respuesta satisfactoria. Por todo ello podemos adoptar los valores óptimos encontrados para la reducción de selenio (VI) a selenio (IV) como valores satisfactorios para la reducción de las otras dos especies.

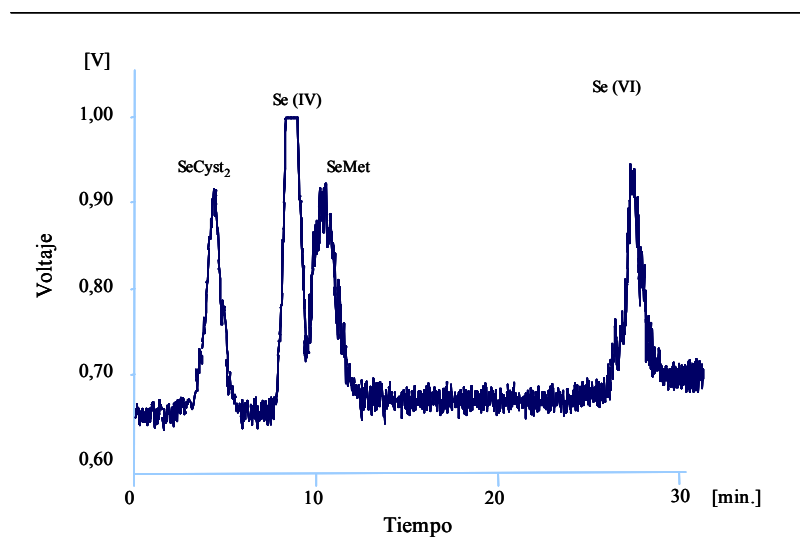


Figura 11. Cromatograma obtenido tras la optimización de la fase de reducción inducida con energía microondas

Dado que los cromatogramas obtenidos utilizando las dos etapas de reducción optimizadas, con radiación ultravioleta (Figura 7) y con radiación microondas (Figura 11) son prácticamente iguales nos hemos decantado por la radiación ultravioleta acoplado al sistema de calentamiento previamente descrito como sistema de reducción. Esta decisión fue tomada en base a no introducir nuevos reactivos como el bromuro potásico y bromato potásico, que además de encarecer el análisis dan lugar a bromo el cual es muy tóxico y corrosivo lo que acortará la vida del sistema. Además, que introducir estos nuevos reactivos conlleva la introducción de nuevos tubos y conexiones que complican el sistema respecto al utilizado en la reducción con ultravioleta.

5.3.1.1.2 Optimización de la separación cromatográfica de los compuestos de selenio mediante cromatografía líquida de alta resolución

Una vez desarrollada la etapa de reducción para las diferentes especies de selenio a selenio (IV) vamos a estudiar la etapa de separación cromatográfica. En este estudio vamos a aplicar los dos tipos de cromatografía líquida más ampliamente empleados en la especiación de compuestos de selenio, intercambio iónico y fase reversa. Se llevará a cabo la optimización de las dos técnicas cromatográficas para obtener una buena separación de las distintas especies de selenio, tanto las inorgánicas (selenio (IV) y selenio (VI)), como las especies orgánicas (selenocistina y selenometionina) y posteriormente realizaremos un estudio comparativo entre las dos técnicas para evaluar su eficacia a la hora de separar las cuatro especies objeto de estudio y ver si sus resultados son comparables.

Separación de los compuestos de selenio mediante cromatografía líquida de intercambio iónico

Para llevar a cabo la separación cromatográfica de intercambio iónico se ha utilizado una columna PRP-X100 de 25 centímetros de longitud, 4,1 mm de diámetro y 10 μm de tamaño de partícula y una precolumna Hamilton PRP-X100 de

2,1 cm de longitud, 4,1 mm de diámetro y 10 μm de tamaño de partícula para evitar que se estropee la columna por el paso de sustancias que deterioren la misma. La fase estacionaria presenta grupos de amonio cuaternarios que van a interactuar con las especies iónicas de selenio, es decir el selenio (IV) y selenio (VI). Por otro lado la base polimérica de la fase estacionaria va a interactuar con los aminoácidos, permitiéndonos así la separación de la selenocistina y selenometionina. De ahí la necesidad de llevar a cabo una optimización de los diferentes parámetros de la fase móvil que nos lleven a obtener una buena separación de las distintas especies. Uno de los principales inconvenientes que presenta la determinación de las distintas especies de selenio mediante un sistema en continuo HPLC-HG-SFA es la naturaleza de las fases móviles. Se ha seleccionado una disolución reguladora de fosfato como fase móvil y se procedió a la optimización de los diferentes parámetros que pueden afectar a la separación cromatográfica (concentración de fosfato, pH y flujo de la fase móvil).

Se ha descartado el uso de un diseño de experimentos, en este caso, debido a la imposibilidad de obtener una variable independiente que nos pueda indicar la mejora de nuestro sistema cromatográfico. Ya que si adoptamos una variable como puede ser la resolución nos puede llevar a resultados erróneos, ya que se puede perder sensibilidad o el tiempo total del cromatograma y el diseño indicarnos que estamos en un óptimo en resolución, lo mismo ocurre al seleccionar otra variable.

La optimización de la concentración, pH y flujo de la fase móvil se ha realizado mediante un método de aproximación. Para ello fijamos todas las variables objeto de estudio, excepto una. Estos valores pueden ser escogidos al azar o ser fijados por conocimientos adquiridos con anterioridad. En nuestro caso los fijaremos basándose en los valores propuestos por M. Vilano y col.³⁴ y que se han utilizado para llevar a cabo la optimización de la etapa de reducción. Como se puede ver en las Figura 7 y Figura 11, con las condiciones iniciales ya se obtienen una separación de las cuatro especies objeto de estudio. Pero también observamos que los resultados no son del todo satisfactorios debido a que necesitamos aproximadamente treinta minutos para llevar a cabo la separación del selenio (VI).

Optimización de la concentración de la fase móvil

Se prepara una serie de seis fases móviles dentro del intervalo de concentraciones 10-35 mM de una disolución reguladora de dihidrógenofosfato ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Todas las medidas realizadas para llevar a cabo la optimización de la separación cromatográfica se efectuaron con la etapa de reducción inducida con radiación ultravioleta-calor, previamente optimizada. Para la generación del hidruro se usa el ácido clorhídrico utilizado en la reducción, es decir ácido clorhídrico 6M y borohidruro sódico al 0,8% (p/v) en una disolución de hidróxido sódico del 1%. Se fija el pH a 7 y un flujo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Las concentraciones de fosfatos en la fase móvil estudiadas fueron 5, 10, 15, 20, 25 30 y 35 mM. Se inyecta una mezcla de patrones de las diferentes especies de selenio y se observan los cromatogramas obtenidos con cada una de las fases móviles. Tras observar los cromatogramas (Figura 12) se puede concluir que al aumentar la concentración de fosfato se obtiene una mejor resolución entre los picos de selenocistina, selenio (IV) y selenometionina y disminuye un poco el tiempo de retención del selenio (VI). Además el aumento de fosfato provoca una leve mejoría en la sensibilidad de cada una de las especies aunque a partir de concentraciones superiores a 25mM el aumento del ruido también es considerable.

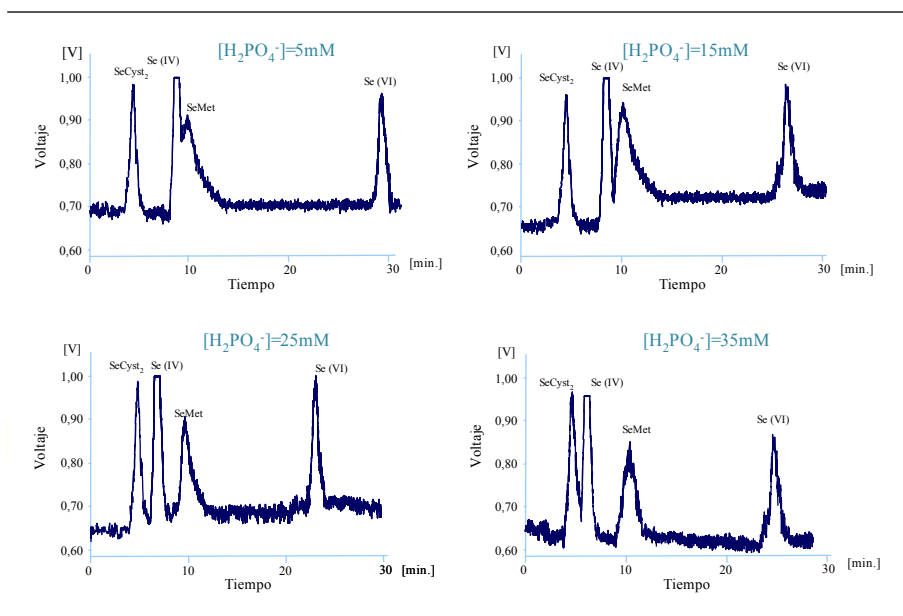


Figura 12. Influencia de la concentración de fosfato amónico en la fase móvil en la separación de las especies de selenio

Por todo ello, nos hemos decantado por utilizar a partir de este momento una fase móvil de una disolución de fosfato con una concentración 25 mM.

Optimización del flujo de fase móvil

Para llevar a cabo la optimización de la influencia del flujo de fase móvil en la separación de las diferentes especies de selenio se estudia el intervalo comprendido entre un $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ a $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ (máximo flujo recomendado por el fabricante de la columna). Tras este estudio se mostró, que es necesario un flujo por debajo $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para obtener una buena resolución de la selenocistina, selenito y selenometionina. Con un flujo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, el pico de selenato se obtiene a tiempos próximos a los 20 minutos. Si en vez de trabajar a flujo constante durante todo el proceso, se trabaja con flujo variable, aumentando éste tras la salida de la

selenometionina hasta $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, el selenato presenta un tiempo de retención de 16 minutos. Pero esto provoca una serie de problemas, ya que al variar el flujo se provoca un cambio en la línea base que se vuelve menos estable y presenta valores próximos a la saturación de la señal de respuesta. Por otro lado, al trabajar con flujos altos se produce un aumento de la presión en el sistema cromatográfico el cual en algunos casos no es tolerado por nuestro sistema que tiene una limitación instrumental de 4000 psi. Además, este aumento de la presión disminuye la vida media de la columna. La disminución del flujo no afecta de forma significativa a la resolución de los picos, la cual se puede considerar buena en todo el intervalo estudiado aunque si puede provocar un ensanchamiento de los mismos.

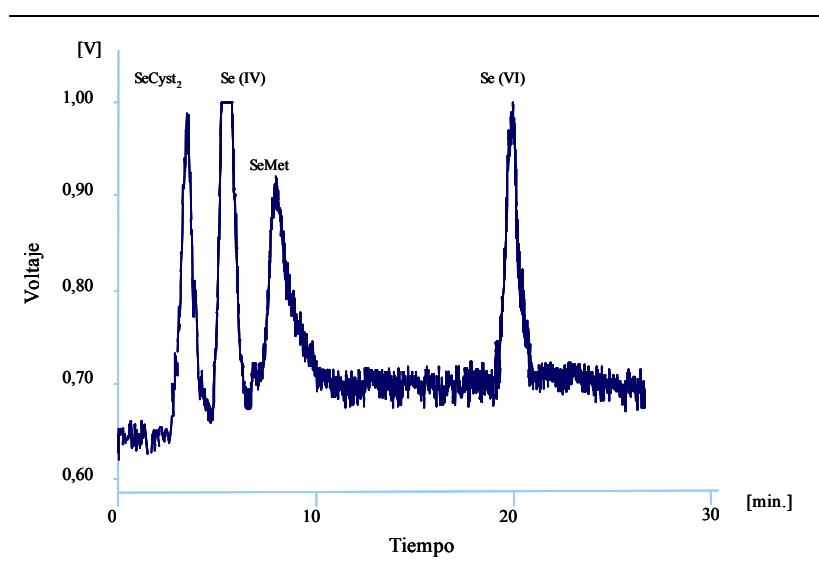


Figura 13. Cromatograma obtenido con un flujo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ de la fase móvil

Por todo ello se decide trabajar a un flujo constante de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Con estas condiciones y concentración de la fase móvil $0,25 \text{ mM}$ de dihidrógenofosfato amónico y pH 7 se obtiene el cromatograma mostrado en la Figura 13.

Optimización del pH de fase móvil

Se ha estudiado la influencia del pH de la fase móvil sobre la elución de las distintas especies de selenio. El intervalo objeto de estudio fue entre pH 4,5 y pH 7,5. En este intervalo los selenoaminoácidos se encuentran como especies zwitterionicas y al variar el pH dentro de este rango sus tiempos de retención no se ven afectados mientras que las especies inorgánicas si se ven afectadas por la variación del pH de la fase móvil. Cuando se utilizan pH inferiores a 5,5, el selenio (IV) eluye más rápidamente y se solapa con la selenocistina, mientras que a pH 6,0 ó superiores el tiempo de retención aumenta lo que conlleva una buena separación de las especies. Igualmente sucede con el selenio (VI), cuyo tiempo de elución no se ve prácticamente alterado al variar el pH. Un aumento de pH mejora la sensibilidad para el selenio (VI). La evolución de la separación cromatográfica se puede ver en la Figura 14, en la cual el primer cromatograma obtenido usando una fase móvil con un pH inferior a 5,5 presenta mala resolución para la selenocistina y selenio (IV), y en el cromatograma obtenido para una fase móvil cuyo pH es superior a 5,5 la resolución es buena y aumenta la señal del selenio (VI).

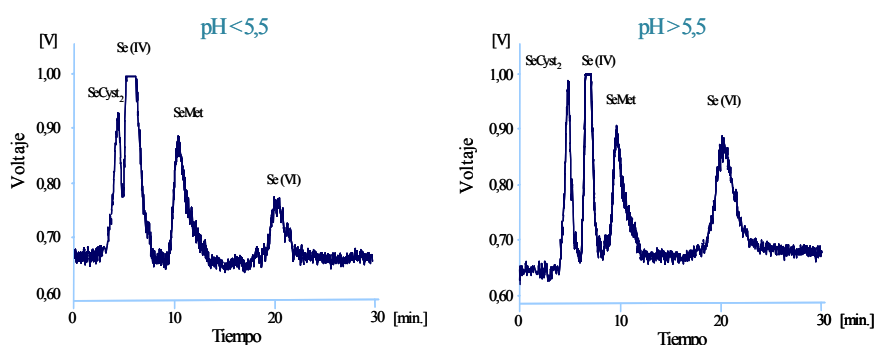


Figura 14. Influencia del pH de la fase móvil en la separación de las distintas especies de selenio

En función de los resultados obtenidos hemos decidido tomar como óptimo para el pH 7.

Tras el estudio de las variables que afectan al sistema, los valores adoptados para cada uno de estos parámetros se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones para la separación de las especies de selenio en cromatografía líquida de intercambio iónico

Columna	Hamilton PRP-X100 4,1mm x 250mm, 10 μ m
Fase móvil	25mM
pH	7
Flujo	1,2 mL min ⁻¹
Loop de muestra	100 μ L

Separación de los compuestos de selenio mediante cromatografía líquida en fase reversa con par iónico

Algunas de las ventajas de la cromatografía en fase reversa son su gran reproducibilidad, tiempos de retención cortos, velocidad de muestreo alta, sistema cromatográfico simple y amplio campo de aplicación. Por todo esto nos hemos decantado por estudiar la separación cromatográfica utilizando la cromatografía en fase reversa con el fin de ver si podemos mejorar la separación llevada a cabo con la cromatografía de intercambio iónico empleada en el anterior apartado.

Para ello se ha utilizado una columna de fase enlazada μ Bondapack C₁₈ de 30 cm de longitud, 3,9 mm de diámetro y 10 μ m de tamaño de partícula. La fase estacionaria es apolar e interacciona con la especies no cargadas de selenio, aunque debido a que presenta grupos silanoles libres pueden actuar sobre especies catiónicas. Igual que en la optimización de la separación mediante cromatografía de intercambio iónico se va llevar a cabo un estudio de las variables que pueden afectar a nuestro sistema con un método de aproximación.

Elección de la fase móvil

Cuando se trabaja en fase reversa se suelen utilizar fases móviles que presentan una polaridad alta. Las fases móviles más utilizadas son el acetonitrilo y metanol. También sabemos que el uso de disolventes orgánicos suprime la generación del hidruro de selenio (IV). Por todo ello, vamos a utilizar una disolución acuosa como fase móvil. Sin embargo, esta elección puede provocarnos una serie de problemas con los compuestos más hidrófobos como selenocistina y selenometionina, la cuales se pueden retener fuertemente en la columna C_{18} convencional cuando no se utilizan disolventes orgánicos como el metanol en la fase móvil. La fase móvil de partida estudiada fue el agua ultrapura de resistividad $18\text{ M}\Omega\text{ cm}$. Usando esta fase móvil y un flujo de $0,8\text{ mL min}^{-1}$ se obtiene el cromatograma mostrado en la Figura 15.

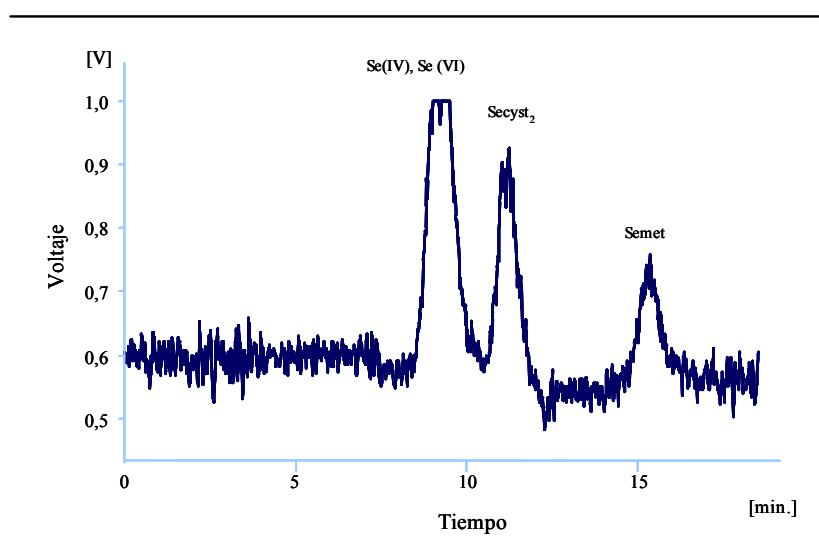


Figura 15. Cromatograma obtenido con agua ultrapura de resistividad $18\text{ M}\Omega\text{ cm}$ como fase móvil

Como se puede observar en el cromatograma (Figura 15) se obtienen tres picos, los cuales corresponden al selenio inorgánico, selenocistina y selenometionina.

Como cabía esperar, los iones de selenio (IV) y selenio (VI) no interaccionan con la fase estacionaria de la columna y salen rápidamente con el frente de la fase móvil. Otro aspecto que puede observarse y que es positivo es que la selenometionina no presenta ningún problema a la hora de eluir aunque no introduzcamos un disolvente orgánico en la fase móvil.

Debido a esto, se decidió introducir un par iónico para poder separar las dos especies inorgánicas de selenio. El par iónico que introducimos fue el cloruro de tetraetilamonio, el cual fue utilizado con este fin anteriormente^{21,67}. Además, el cloruro de tetraetilamonio no produce inhibición de la generación del hidruro de selenio (IV), y permite la separación de las dos especies de selenio inorgánico.

Optimización del pH de fase móvil

Antes de estudiar la concentración y flujo de la fase móvil se ha estudiado la influencia del pH sobre la elución de las distintas especies de selenio. Hemos estudiado primeramente el pH debido a que éste juega un papel muy importante en la formación del par iónico puesto que las distintas especies de selenio pueden estar presentes como cationes, aniones o especies zwitterionicas bajo diferentes pHs. El ácido selenoso presenta dos constantes de acidez ($pK_1= 2,46$, $pK_2=7,31$) pudiendo estar presente en la disolución con una o dos cargas según sea el pH del medio en que se encuentre. Igualmente, la selenocistina ($pK_1= 1,68$, $pK_2=2,15$, $pK_3= 8,07$, $pK_4=8,94$), selenometionina ($pK_1= 2,19$, $pK_2=9,05$) y ácido selénico ($pK_1= 1,7$). En vista de los valores mencionados fijamos un intervalo de pHs entre pH 3,5 y pH 7,0. No se estudiaron pHs superiores debido a las limitaciones propias de la columna, ya que las columnas C_{18} no admiten trabajar a pHs alcalinos.

Se preparó una serie de cuatro fases móviles con una concentración del 0,1% de cloruro de tetraetilamonio con diferentes pHs. Los pHs estudiados fueron 4, 5, 6 y 7. Se preparó una mezcla de los cuatro patrones de las diferentes especies de selenio y se inyectaron en un flujo de fase móvil de 1 mL min^{-1} obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 16. Las medidas se realizaron usando los mismos parámetros para la fase de reducción y detección que los empleados en el estudio de la

separación cromatográfica de intercambio iónico. Esto se lleva a cabo así para que las variaciones obtenidas sean debidas al uso de la nueva fase móvil o columna que se utilice en este nuevo sistema cromatográfico.

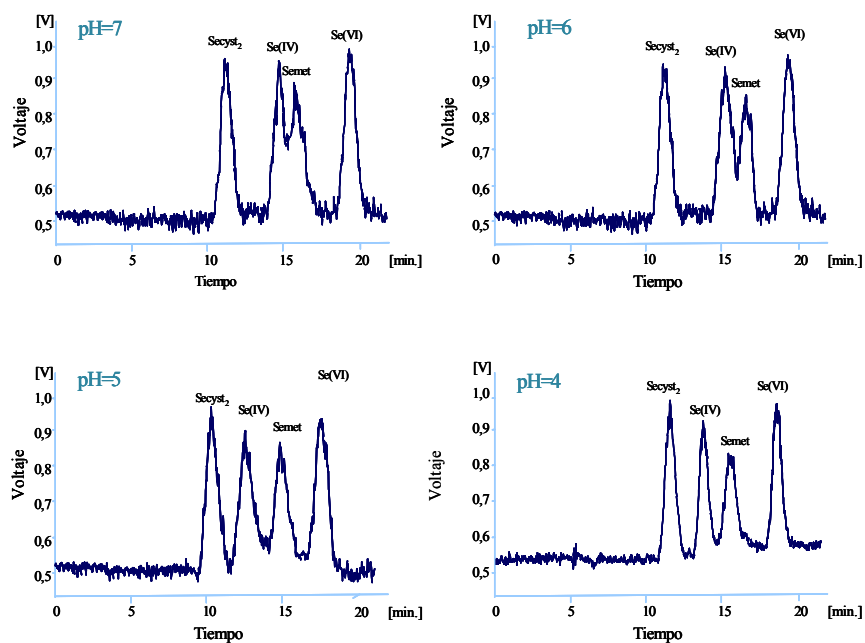


Figura 16. Influencia del pH de la fase móvil en la separación de las distintas especies de selenio

Observando los cromatogramas recogidos en la Figura 16 podemos concluir que el pH óptimo para llevar a cabo la separación de los compuestos de selenio fue de 4.

Optimización de la concentración de la fase móvil

El ión-par invertido del sistema cromatográfico que se va a utilizar en este estudio para la separación de compuestos de selenio es el ión tetraetilamonio, empleado para conseguir separar las dos especies de selenio inorgánico objeto de estudio. El efecto de la concentración de cloruro de tetraetilamonio en la separación cromatográfica, se ha estudiado realizando una serie de diferentes fases móviles preparadas en un intervalo de concentraciones de este compuesto entre 0,05 y 0,2% (p/v). La formación de pares iónicos entre el ión tetraetilamonio y la especie de selenio (selenio (IV), selenio (VI)) y los grupos carboxilos cargados negativamente de los selenoaminoácidos (selenocistina y selenometionina), provoca variación en los tiempos de retención de las diferentes especies de selenio respecto a las encontradas cuando este ión no se encuentra en disolución. Se evidenció, igualmente, que una disminución de la concentración de ión tetraetilamonio en la fase móvil, provoca una disminución en los tiempos de retención. Tras realizar la inyección de una mezcla de patrones de selenocistina y selenio (IV) de 10 ng L⁻¹ y de selenometionina y selenio (VI) de 20 ng L⁻¹ para cada una de las diferentes composiciones de la fase móvil, se encontró que se obtenía un resultado satisfactorio para la concentración más baja aunque el selenio (IV) y la selenometionina se solapaban. Por ello se decidió realizar una nueva experiencia con una concentración de cloruro tetraetilamonio de 0,075 % (p/v). Esta composición de la fase móvil provocó igualmente que los tiempos de retención disminuyeran respecto a las concentraciones superiores y la resolución entre las cuatro especies fuera buena. Esto se puede observar en los cromatogramas mostrados en la Figura 17. En consecuencia se adoptó como concentración óptima de tetraetilamonio en la fase móvil 0,075 % (p/v).

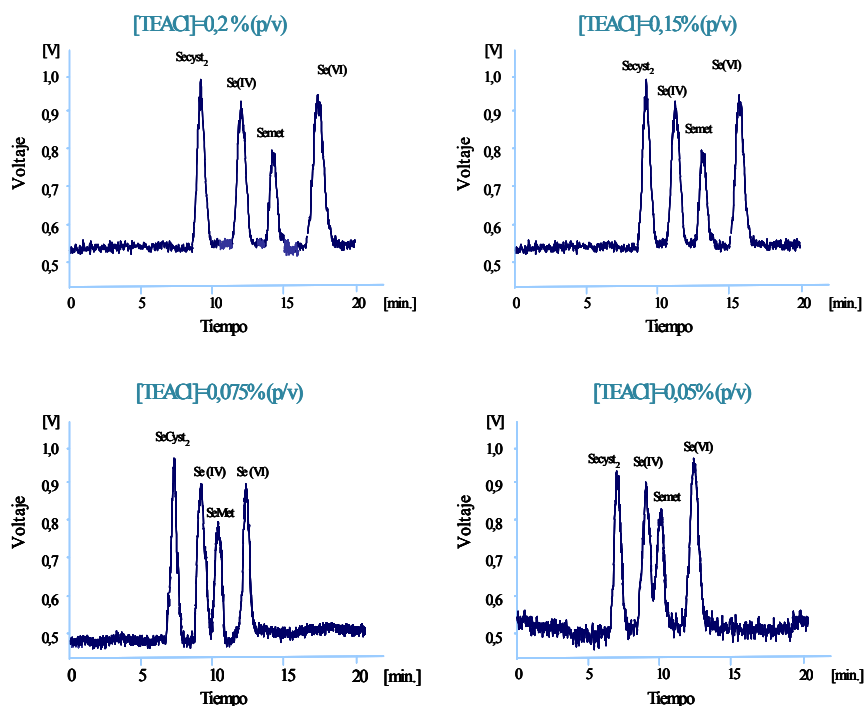


Figura 17. Influencia de la concentración de cloruro de tetraetilamonio en la fase móvil para la separación de las distintas especies de selenio

Optimización del flujo de fase móvil

Por último se ha llevado a cabo la optimización del flujo de la fase móvil para la separación de las distintas especies de selenio. Para ello vamos a realizar un estudio de flujos dentro de un intervalo comprendido entre un $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ a $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Tras este estudio se comprobó que la variación en el flujo no provoca cambios significativos en los tiempos de retención de cada una de las especies ni una mejor resolución de los picos. En consecuencia se decidió mantener un flujo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ como el flujo óptimo, ya que se consiguió una separación completa en 13 minutos y la presión y estabilidad del sistema son buenas. Tras el estudio de las

variables que afectan al sistema los valores adoptados para cada uno de los parámetros que afectan a la separación de las distintas especies de selenio mediante cromatografía líquida en fase reversa con par iónico se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones para la separación de las especies de selenio en cromatografía líquida en fase reversa con par iónico

Columna	μ Bondapack C ₁₈ 3,9mmx 300mm, 10 μ m
Fase móvil	0,075 % TEACl
pH	4
Flujo	1,0 mL min ⁻¹
Loop de muestra	100 μ L

5.3.1.1.3 Comparación de los resultados obtenidos con los dos tipos de cromatografía empleados en la separación de los diferentes compuestos selenio en leche de vaca

Una vez optimizadas las dos técnicas cromatográficas con las dos tipos de columna empleadas para separar las cuatro especies de selenio hemos realizado un estudio comparativo para determinar que método nos resulta más óptimo para realizar la especiación de selenio en leche de vaca. Para ello vamos a estudiar las características analíticas de ambos métodos.

Rectas de calibrado

Las rectas de calibrado se han obtenido para concentraciones comprendidas entre 0 y 15 μ g L⁻¹ para la selenocistina y selenio (IV) y entre 0 y 30 μ g L⁻¹ para la selenometionina y selenio (VI).

Las rectas de calibrado para cada uno de las especies se obtienen representando la altura de los picos de cada una de las especies frente a la concentración añadida de cada una de las especies. Las rectas de calibrado se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Pendientes de las rectas de calibrado para la especiación de selenio por HPLC-AFS

Especie	Técnica cromatográfica	
	Intercambio iónico	Fase reversa (par iónico)
SeCyst ₂	264	625
Se (IV)	438	646
SeMet	189	304
Se (VI)	286	545

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad de los métodos desarrollados, se estudió a partir de dos parámetros: límites de detección y cuantificación utilizados durante esta tesis doctoral. Los resultados obtenidos para cada una de las especies de selenio utilizando las dos técnicas cromatográficas se muestran en la Tabla 12.

Los límites de detección y cuantificación se expresan en función de la concentración de cada una de las especies mínima detectada o cuantificada y no en función de la concentración de selenio.

Tabla 12. Limite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para la especiación de selenio por HPLC-AFS

Especie	Técnica cromatográfica			
	Intercambio iónico		Fase reversa (par iónico)	
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SeCyst ₂	2,4	8,1	0,7	2,3

Se (IV)	1,5	4,9	0,6	2,0
SeMet	3,9	13,0	1,9	9,5
Se (VI)	4,5	14,9	1,2	3,7

Precisión y reproducibilidad

La precisión de las medidas, expresada como el coeficiente de variación (%CV) se evaluó para los métodos desarrollados de separación cromatográfica. Para ello, bajo las condiciones óptimas para cada uno de los métodos se realizaron cinco inyecciones diferentes de una mezcla que contiene todas las especies de selenio estudiadas en una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Una vez obtenidos los diferentes cromatogramas se promedian los valores de retención de cada una de las especies de selenio estudiadas y se calcula la desviación estándar cada una y para cada método. Con estos datos se calcula el coeficiente de variación. Los resultados de la precisión del método se muestran en la Tabla 13. En todos los casos se obtuvo una buena precisión para las cuatro especies de selenio.

Para evaluar la reproducibilidad es necesario preparar nuevas fases móviles y una nueva mezcla de las especies de selenio. La nueva mezcla se analiza otra vez cinco veces empleando las nuevas fases móviles en un día diferente. Se vuelven a tomar los tiempos de retención y se calcula el valor medio y desviación estándar obtenidos con las nuevas fases móviles. Una vez obtenidos estos valores se comparan los valores medios obtenidos con las diferentes fases y las dos mezclas utilizadas para este estudio. Los resultados de la reproducibilidad de los métodos se muestran en Tabla 13, en todos los casos el coeficiente de variación es inferior al 5%.

Tabla 13 Precisión y reproducibilidad para la especiación de selenio por HPLC-UV-HG-AFS

HPLC-UV-HG-AFS										
	Día 1			Día 2			Reproducibilidad			
	Especie	Tr _{1med} (min)	Sd	CV (%)	Tr _{2med} (min)	Sd	CV (%)	Media (min)	Sd	CV (%)
Intercambio iónico	SeCyst ₁	6,61	0,08	1,21	6,41	0,08	1,24	6,51	0,11	1,69
	Se (IV)	7,78	0,06	0,77	7,62	0,05	0,66	7,70	0,08	1,04
	SeMet	9,26	0,13	1,40	9,38	0,10	1,06	9,32	0,11	1,18
	Se (VI)	20,2	0,10	0,5	20,2	0,12	0,59	20,2	0,13	0,65
(FR-Par iónico)	SeCyst ₂	9,85	0,11	1,12	9,74	0,12	1,23	9,80	0,14	1,43
	Se (IV)	10,98	0,08	0,73	10,93	0,08	0,73	10,96	0,09	0,72
	SeMet	12,24	0,09	0,73	12,29	0,12	0,98	12,27	0,12	0,98
	Se (VI)	13,78	0,10	0,73	13,71	0,09	0,66	13,75	0,12	0,87

Tras estudiar las características analíticas de ambos métodos podemos decantarnos por utilizar la cromatografía en fase reversa con par iónico para llevar a cabo la especiación de selenio en leches de vaca. Esta decisión se ha adoptado ya que los límites de detección y cuantificación son más bajos en el caso de la cromatografía en fase reversa respecto a la de intercambio iónico, presentando ambos métodos una precisión y reproducibilidad estadísticamente igual para un nivel de confianza del 95 %.

5.3.1.1.4 Generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica

En esta etapa no se llevó a cabo un nuevo estudio para optimizar la generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica debido a que las condiciones empleadas durante todo el estudio han sido las optimizadas en el capítulo 4 excepto la concentración de ácido clorhídrico que se varió debido a que necesitamos una mayor concentración en la etapa de reducción. El caudal de argón, la concentración de borohidruro sódico y su caudal no se modificaron. Los tiempos de demora, análisis y memoria al trabajar en continuo no existen ya que en todo momento se está introduciendo fase móvil y cuando llegan las especies de selenio el sistema genera el hidruro y es detectado dando lugar al pico en el cromatograma.

Por ello, las condiciones elegidas para llevar a cabo el análisis de las diferentes especies de selenio son las mostradas en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores fijados para las variables que afectan en la generación del hidruro-espectroscopía de fluorescencia atómica

Parámetros generación del hidruro	
[HCl] / M	6,0
[NaHB ₄] / % (m/v)	0,8
Caudal de NaHB ₄ / mL min ⁻¹	5,0
Parámetros espectroscopía de fluorescencia atómica	
Ganancia	1000
Intensidad de corriente lámpara / mA	20/25
Longitud de onda	196,0
Caudal de argón / mL min ⁻¹	250
Caudal de hidrogeno / mL min ⁻¹	60
Caudal de nitrógeno / mL min ⁻¹	2500

5.3.1.2 Pretratamiento de la muestra para la especiación de selenio en leche

Una vez desarrollada la metodología para llevar a cabo la separación y cuantificación de especies de selenio se estudiará el pretratamiento de las muestras de leche de vaca para poder aplicar esta técnica a muestras reales.

Se ha utilizado una digestión enzimática como método de pretratamiento para las muestras de leche. La mayoría de los aminoácidos, inclusive los aminoácidos que contienen selenio en sustitución de átomos de azufre, existen en la leche unidos por enlaces peptídicos formando las proteínas. Para conseguir los aminoácidos libres, es necesario romper estos enlaces. Esto se trata de obtener mediante una digestión enzimática. Para un estudio de una digestión completa se usaron dos enzimas: la pronasa E y la lipasa. La Pronasa E es una mezcla de endo y exo-proteinasas. Esta enzima ataca casi todos los tipos de enlaces peptídicos y tiene un intervalo pH óptimo de actividad entre 7-8. Dado que 10 % del selenio total de la leche se encuentra en la parte grasa de la misma se ha utilizado también la lipasa. Esta enzima digiere los lípidos, y presenta un intervalo de pH óptimo de actividad entre 7-7,7.

La preparación de la muestra para su posterior inyección en el sistema cromatográfico se llevó a cabo usando 20 mg de pronasa E y 10 mg de lipasa disueltos en 4 mL de fase móvil a pH 7. Esta mezcla de enzimas se añade a 10 mL de leche. Se han elegido estas cantidades teniendo en cuenta la optimización llevada a cabo por Casiot y col.⁹ para la especiación de compuestos de selenio en levaduras selenizadas. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 24 h. Tras la digestión enzimática se toma el digerido y se ultracentrifuga a 31000 rpm (160000 * g) durante 60 minutos a 4°C para eliminar las macromoléculas y grasas que no hayan sido destruidas tras la digestión enzimática (Figura 18). La disolución resultante está preparada para ser introducida en el sistema cromatográfico desarrollado en este estudio.

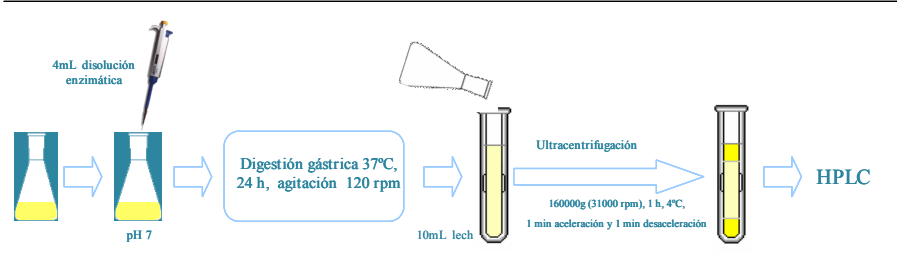


Figura 18. Pretratamiento de la muestra para llevar a cabo la especiación de selenio en muestras de leche

5.3.1.3 Características analíticas del método propuesto

En este apartado, una vez se han realizado los estudios de optimización del sistema de análisis y desarrollado un método de pretratamiento de la muestra, se va a evaluar la calidad del método analítico propuesto para la especiación de especies de selenio en muestras de leche. Para ello vamos a estudiar la linealidad del método para las distintas especies de selenio, límites de detección y cuantificación de cada uno de ellas, así como la precisión de la cuantificación de cada una de las especies.

Rectas de calibrado y adición

Las rectas de calibrado y adición se han obtenido para concentraciones comprendidas entre 0 y 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de la especie para la selenocistina, selenio (IV) y selenio (VI) mientras que para la selenometionina se estudia entre 0 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de la especie. Las rectas de adición se llevaron a cabo añadiendo las concentraciones de cada nivel al digerido enzimático obtenido tras la preparación de la muestra, descrito en el apartado 5.3.1.2. Las rectas de calibrado y adición para cada uno de las especies se obtienen representando el área de los picos de cada una de las especies frente a la concentración añadida de cada una de las especies.

La respuesta ha sido lineal en todos los casos en los intervalos de concentración estudiados para cada una de las cuatro especies y presentan coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0,997.

Las pendientes de las rectas de calibrado y adición obtenidas (Tabla 15) para las cuatro especies difieren de forma significativa (test t, nivel de confianza 99,5%) por lo que en posteriores análisis se utilizará la recta de adición para llevar a cabo la cuantificación de las cuatro especies de selenio en la leche de vaca.

Tabla 15. Pendientes de las rectas de calibrado y adición para la especiación de selenio en muestras de leche por HPLC-UV-AFS

Especie	Calibrado	Adición
SeCyst ₂	625	601
Se (IV)	646	623
SeMet	304	274
Se (VI)	545	503

Precisión

La precisión de las medidas, expresada como el coeficiente de variación (%CV), fue estudiada para el procedimiento completo, desde el procedimiento de tratamiento de la muestra y su posterior separación de las especies por cromatografía líquida de par iónico y cuantificación por generación de hidruros-espectrometría de fluorescencia atómica. Para este estudio se prepararon cuatro réplicas para cada uno de los niveles de concentración de cada una de las especies de selenio. Las concentraciones de selenocistina, selenio (IV), selenometionina y selenio (VI) que se estudiaron fueron las empleadas para realizar las rectas de calibrado y adición, es decir para la selenocistina, selenio (IV) y selenio (VI) se añadieron 5, 10 y 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ y para la selenometionina se añadieron 10, 20 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Una vez añadidas las cantidades de las distintas especies de selenio a las muestras de leche de vaca para obtener las concentraciones anteriormente citadas se sometieron al proceso de digestión enzimática y posterior ultracentrifugación. Los extractos obtenidos se inyectaron por triplicado en el sistema cromatográfico acoplado al sistema de reducción de la muestra mediante UV-calor y generación de hidruros-espectrometría

de fluorescencia atómica optimizado. Los valores de precisión se van a calcular para los valores de concentración de cada una de las especies encontrados para cada uno de los niveles de concentración que vamos estudiar. Los valores de precisión encontrados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16 Precisión para la especiación de selenio en muestras de leche de vaca por HPLC-UV-HG-AFS

Especie	Nivel 1			Nivel 2			Nivel 3		
	I _{media}	Sd	CV (%)	I _{media}	Sd	CV (%)	I _{media}	Sd	CV (%)
SeCyst ₂	5,45	0,34	6,24	9,91	0,52	5,25	14,85	0,54	3,64
Se (IV)	4,98	0,25	5,02	10,25	0,48	4,68	14,90	0,63	4,23
SeMet	11,24	0,83	7,38	21,30	1,12	5,26	30,94	1,58	5,11
Se (VI)	6,08	0,29	4,77	11,01	0,49	4,45	15,78	0,92	5,83

Tras este estudio puede decirse que los valores de precisión, para cada una de las especies de selenio estudiadas, son buenos en todos los casos.

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad del método propuesto para llevar a cabo la especiación de selenio en leche de vaca se estudió a partir de los parámetros, límite de detección y cuantificación, definidos en el capítulo 2. Debido a que las rectas de calibrado y adición presentan diferencias significativas los cálculos se realizan tomando la pendiente de las rectas de adición de cada uno de los compuestos. Los resultados obtenidos para cada una de las especies de selenio se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Limite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para la especiación de selenio en muestras de leche por HPLC-UV-AFS

Especie	LOD($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SeCyst ₂	1,1	3,5
Se (IV)	0,9	3,0
SeMet	2,9	9,7
Se (VI)	1,7	5,5

Recuperación de la columna

Uno de los objetivos marcados en este trabajo es la cuantificación de las diferentes especies de selenio presentes en muestras de leche de vaca, lo cual hace indispensable el cálculo de la recuperación de la columna empleada con vistas a poder afirmar que los resultados obtenidos para el selenio son debidos a este compuesto y que no hay interferencias de otras sustancias, ni de forma positiva ni de forma negativa.

Para calcular este parámetro, la columna ha sido previamente estabilizada con la fase móvil a usar, y a continuación se ha inyectado un blanco el cual es sometido a la separación cromatográfica y se cuantifica mediante la generación de hidruros acoplado a la espectrometría de fluorescencia atómica. Esta misma operación se repite cinco veces con el blanco y cinco veces con tres réplicas de una misma muestra formada por una mezcla de los cuatro patrones con una concentración conocida añadida al extracto obtenido tras el pretratamiento de la muestra. Posteriormente utilizando la ecuación mostrada a continuación calculamos la recuperación obtenida para cada una de las especies de selenio utilizadas.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{[\text{Especie selenio}]_{\text{obtenida}}}{[\text{Especie selenio}]_{\text{real}}} \times 100$$

Los porcentajes de recuperación obtenido para cada una de las especies son) y próximo al 100% en todos los casos, (Tabla 18); este dato nos permite emplear nuestro método de especiación para la cuantificación de los diferentes compuestos de selenio en muestras de leche de vaca.

Tabla 18. Porcentajes de recuperación de las especies de selenio en muestras de leche por HPLC-UV-AFS

Especie	% Recuperación
SeCyst ₂	98
Se (IV)	99
SeMet	96
Se (VI)	97

5.3.2 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE LECHE DE VACA

Una vez que hemos desarrollado y optimizado el método para la especiación de selenio en muestras de leche, éste se va aplicar a distintas muestras de leche de vaca.

Durante este estudio hemos utilizado numerosas muestras de leche de vaca, con diferentes orígenes, leche de vaca obtenido tras alimentar las vacas con forrajes de selenio orgánico, leche de vaca obtenido tras alimentar las vacas con forrajes de selenio inorgánico, leche de vaca obtenido tras alimentar las vacas con forrajes sin suplementos de selenio y leches comerciales más compradas en Galicia.

Para llevar a cabo la determinación de las diferentes especies de selenio en muestras de leche de vaca hemos seleccionado dos leches de vaca obtenidas tras

alimentar las vacas con forrajes de selenio orgánico, una leche de vaca obtenida tras alimentar las vacas con forrajes de selenio inorgánico, una leche de vaca obtenida tras alimentar las vacas con forrajes sin suplementar con selenio y cuatro leches comerciales de las marcas más conocidas, Feiraco, Larsa, Pascual y CLAS.

A las distintas muestras se le aplica la digestión enzimática y posterior ultracentrifugación con el fin de liberar las distintas especies de selenio de la matriz láctea para su posterior inyección en el sistema cromatográfico optimizado. Igualmente se ha determinado el contenido de selenio total en el digerido enzimático para establecer que porcentaje de selenio hemos obtenido tras llevar a cabo el pretratamiento de la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19 y en la Figura 19 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

Tabla 19. Concentración de las especies de selenio en muestras de leche de vaca por HPLC-UV-HG-SFA

Muestra	SeCyst ₂ µg L ⁻¹	Se (IV) µg L ⁻¹	SeMet µg L ⁻¹	Se (IV) µg L ⁻¹	Se _{total} extraído µg L ⁻¹	Se _{total} Leche µg L ⁻¹
Leche obtenida tras suplementar los forrajes con Se orgánico 1	9,9 ± 0,6	6,7 ± 0,4	8,0 ± 0,7	< LOD	30,8 ± 0,2	37,3 ± 0,3
Leche obtenida tras suplementar los forrajes con Se orgánico 2	9,2 ± 0,7	6,4 ± 0,5	7,5 ± 0,6	< LOD	29,1 ± 0,3	35,4 ± 0,4
Leche obtenida tras suplementar los forrajes con Se inorgánico	7,7 ± 0,8	6,1 ± 0,6	< LOD	< LOD	17,2 ± 0,3	21,3 ± 0,4
Leche obtenida tras alimentar sin suplementar con Se	6,9 ± 0,5	5,6 ± 0,5	< LOD	< LOD	16,5 ± 0,2	19,4 ± 0,3
Feiraco	6,2 ± 0,7	4,1 ± 0,4	< LOD	< LOD	13,3 ± 0,2	16,2 ± 0,2
Larsa	5,7 ± 0,6	4,8 ± 0,5	< LOD	< LOD	14,5 ± 0,1	17,2 ± 0,3
Pascual	7,1 ± 0,6	5,3 ± 0,4	< LOD	< LOD	16,5 ± 0,2	20,1 ± 0,3
CLAS	6,1 ± 0,5	4,3 ± 0,6	< LOD	< LOD	13,8 ± 0,3	17,3 ± 0,4

Tanto estudiando los datos recogidos en la Tabla 19 como observando los cromatogramas mostrados en la Figura 19 se encuentra que sólo las muestras de leche obtenidas tras suplementar la alimentación con levaduras ricas en selenio orgánico se puede observar pico de selenometionina, mientras que en las restantes leches sólo aparecen los picos correspondientes a la selenocistina y selenio (IV).

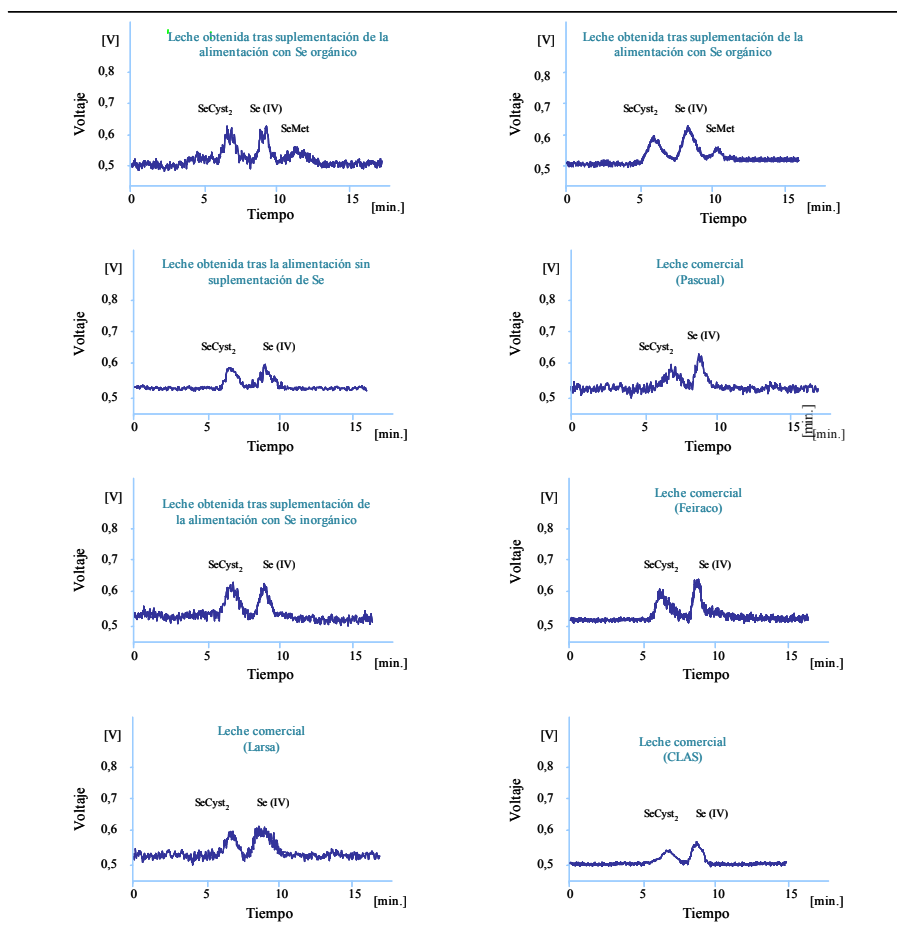


Figura 19. Cromatogramas obtenidos para las diferentes muestras de leche analizadas por HPLC-UV-HG-AFS

5.4 CONCLUSIONES

- El acoplamiento instrumental basado en la separación por cromatografía líquida de alta resolución de par iónico, craqueador ultravioleta-calor, generación de hidruros y detección con espectrometría de fluorescencia atómica nos permite la especiación de selenocistina, selenio (IV), selenometionina y selenio (VI) en muestras de leche de vaca.
- La introducción de una fuente de calor es necesario para poder obtener una buena reducción de las diferentes especies de selenio a selenio (IV) lo que permite a su vez bajar de forma ostensible los límites de detección de éstas especies.
- Con este procedimiento propuesto se pueden determinar la selenocistina, selenio (IV), selenometionina y selenio (VI) en muestras de leche de vaca en concentraciones superiores a 1,1, 0,9, 2,9 y 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente con una precisión inferior al 7,5 %.
- Se ha llevado a cabo una digestión enzimática para llevar a cabo el pretratamiento de la muestras de leche obteniendo un porcentaje superior al 80 % de las especies de selenio liberadas en el extracto que se introduce en el sistema cromatográfico.
- Las muestras de leche de vaca cuya alimentación se ha suplementado con selenio orgánico presenta un perfil cromatográfico que presenta tres especies, selenocistina, selenio (IV), selenometionina.
- Las muestras de leche de vaca cuya alimentación se ha suplementado con selenio inorgánico, vacas alimentadas sólo con forrajes sin ninguna especie de selenio y las leches comerciales presenta un perfil cromatográfico que presenta dos especies, selenocistina, selenio (IV).

5.5 BIBLIOGRAFÍA

1. C. D. Thomson, *Analyst*, 1998, **123** (5), 827-831.
2. P. B. Moser-Veillon, A. R. Mangels, K. Y. Patterson, C. Veillon, *Analyst*, 1992, **117** (3), 559-562.
3. B. Welz, *Mikrochimica Acta*, 1992, **109**, 13-21.
4. S. M. Bird, P. C. Uden, J.F. Tyson, E. Block, E. Denoyer, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, **12**, 785-788.
5. M. Dernovics, Zs. Stefanka, P. Fodor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, **372**, 473-480.
6. M. Montes-Bayón, E. G. Yanes, C. Ponce de León, K. Jayasimhulu, A. Stalcup, J. Shann, J. A. Caruso, *Analytical Chemistry*, (2002), **74** (1), 107-113.
7. M. Montes-Bayón, D. L. Leduc, N. Terry, J. A. Caruso, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, **17**, 872-879.
8. C. B'Hymer, J. A. Caruso, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, **15**, 1531-1539.
9. C. Casiot, J. Spuznar, R. Lobinski, M. Potin-Gautier, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, **14**, 645-650.
10. H. Emteborg, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *Analyst*, 1998, **123** (5), 893-898.
11. M. Johansson, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *Analyst*, 2000, **125**, 273-279.
12. L. N. Mackey, T. A. Beck, *Journal of Chromatography*, 1982, **240** (2), 455-461.
13. J. L. Martin, M. L. Gerlach, *Analytical biochemistry*, 1969, **29** (2), 257-264.
14. H. Emteborg, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *Analyst*, 1998, **123** (5), 245-253.
15. N. Gilon, M. Astruc, A. Astruc, M. Potin-Gautier, *Applied Organometallic Chemistry*, 1995, **9**, 623-627.
16. E.T. Bodó, Zs. Stefanka, I. Ipolyi, C. Sörös, M. Dernovics, P. Fodor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, **377**, 32-38.
17. C. Dietz, J. Sanz Landaluze, P. Ximénez-Embún, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, **19**, 260-266.
18. M. Guidotti, G. Ravaioli, M. Vitali, *Journal of High Resolution Chromatography*, 1999, **22**, 414-416.
19. N. Gilon, M. Potin-Gautier, M. Astruc, *Journal of Chromatography A*, 1996, **750**, 327-334.

-
20. C. B'Hymer, J. A. Caruso, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, **15**, 71-78.
 21. E. Dummont, K. de Cremer, M. Van Hulle, C. Cyrille, C. F. Vanhaecke, R. Cornelis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, **19**, 167-171.
 22. S. M. Gallus, K. G. Heumann, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, **11**, 887-892.
 23. L. Gómez-Ariza, J. A. Pozas, I. Giráldez, E. Morales, *Talanta*, 1999, **49**, 285-292.
 24. B. Iscioglu, E. Henden, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **505**, 101-106.
 25. S. Pérez Méndez, M. Montes-Bayón, E. Blanco González, A. Sanz-Medel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, **14**, 1333-1337.
 26. H. M. Crews, P. A. Clarke, D. J. Lewis, L. M. Owen, P. R. Strutt, A. Izquierdo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, **11** (12), 1177-1182.
 27. G. A. Pedersen, E. H. Larsen, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **358** (5), 591-598.
 28. J. L. Gómez-Ariza, D. Sánchez-Rodas, E. Morales, O. Herrgott, I. L. Marr, *Applied Organometallic Chemistry*, 1999, **13**, 783-787.
 29. D. Wallschläger, R. Roehl, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, **16**, 922-925.
 30. I. Ipolyi, W. Corns, P. Stockwell, P. Fodor, *Journal Automated Methods & Management in Chemistry*, 2001, **23** (6), 167-172.
 31. E. H. Larsen, M. Hansen, T. Fan, M. Vahl, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, **16**, 1403-1408.
 32. P. Moreno, M. A. Quijano, A. M. Gutiérrez, M. C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, **16**, 1044-1050.
 33. A. Chatterjee, Y. Shibata, M. Morita, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, **15**, 913-919.
 34. M. Vilano, R. Rubio, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, **15**, 177-180.
 35. V. Díaz-Huerta, M. L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, **19**, 644-648.

-
36. L. Gómez-Ariza, M.A. Caro de la Torre, I. Giráldez, E. Morales, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **524** (1-2), 305-314.
 37. I. Ipolyi, Zs. Stefanka, P. Fodor, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **435**, 367-375.
 38. J. Ruiz-Espinar, R. Ruzik, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Spuznar, *Analyst*, 2003, **128**, 220-224.
 39. A. Chatterjee, Y. Shibata, H. Tao, A. Tanaka, M. Morita, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1042**, 99-106.
 40. J. L. Gómez-Ariza, V. Bernal-Daza, M. J. Villegas-Portero, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **520**(1-2), 229-235.
 41. T. J. Kasper, M. Melera, P. Gozel, R. G. Brownlee, *Journal of chromatography*, 1988, **458**, 303-312.
 42. H. Drossman, J. A. Luckey, A. J. Kostichka, J. D'Cunha, L. M. Smith, *Analytical chemistry*, 1990, **62** (9), 900-903.
 43. A. Paulus, J.I. Ohms, *Journal of chromatography*, 1990, **507**, 113-123.
 44. D. Schlegel, J. Mattusch, R. Wennrich, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1996, **354** (5-6), 535-539.
 45. M.L. Magnuson, J.T. Creed, C.A. Brockhoff, *Analyst*, 1997, **122** (10), 1057-1061.
 46. B. Michalke, P. Schramel, *Electrophoresis*, 1998, **19** (2), 270-275.
 47. B. Gammelgaard, L. Bendahl, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, **19** (1), 135-142.
 48. B. Michalke, P. Schramel, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **351**, 670-677.
 49. B. Michalke, P. Schramel, *Journal of Chromatography A*, 1998, **807** (1), 71-80.
 50. B. Michalke, P. Schramel, *Journal of Chromatography A*, 1996, **750** (1+2), 51-62.
 51. F. Laborda, M. V. Vicente, J. M. Mir, J. R. Castillo, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **357** (7), 837-843.
 52. I. Farkasovska, M. Zemberyova, *Chemicke Listy* (1999), **93** (10), 633-638.
 53. T. Lei, W. D. Marshall, *Applied Organometallic Chemistry*, 1995, **9** (2), 149-58.
 54. J. M. Marchante-Gayón, J. M. González, M. L. Fernández, E. Blanco, A. Sanz-Medel, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **355**, 615-622.

-
55. M. Vilano, A. Padro, R. Rubio, G. Rauret, *Journal of Chromatography A*, 1998, **819** (1+2), 211-220.
 56. M. Raessler, B. Michalke, P. Schramel, S. Schulte-Hostede, A. Kettrup, *American Environmental Laboratory*, 1998, **10** (6), 14-15.
 57. P. Moreno, M. A. Quijano, A. M. Gutiérrez, A. M. Pérez-Conde, M. C. Cámara, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, **374** (3), 466-476.
 58. J. M. González Lafuente, M. Dlaska, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz-Medel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, **13** (5), 423-429.
 59. N. Jakubowsky, D. Stuewer, D. Klockow, C. Thomas, H. Emons, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, **16** (2), 135-139.
 60. B. Ganem, Y. T. Li and J. D. Henion, *Journal of the American Chemical Society*, 1991, **113** (16), 6294-6296.
 61. B. Ganem, Y. T. Li and J. D. Henion, *Journal of the American Chemical Society*, 1991, **113** (20), 7818-7819.
 62. B. Gammelgaard, K. Grimstrup Madsen, J. Bjerrum, L. Bendahl, O. Jons, J. Olsen, U. Sidenius, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003, **18**(1), 65-70.
 63. Y. Ogra, K. Ishiwata, J. Ruiz Encinar, R. Lobinski, K. T. Suzuki, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, **379** (5), 861-866.
 64. M. Shah, S. S. Kannamkumarath, J. C. A. Wuilloud, R. G. Wuilloud, J. A. Caruso, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, **19** (3), 381-386.
 65. C. Casiot, V. Vacchina, H. Chassaingne, J. Szpunar, M. Potin-Gautier, R. Lobinski, *Analytical Communications*, 1999, **36** (3), 77-80.
 66. *Statgraphics plus version 5.0, reference manual Manugistics Inc.*, Rockville, MD USA. 1992.
 67. J. Zheng, Y. Shibata, N. Furuta, *Talanta*, 2003, **59** (1), 27-36.

6.1 INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades más comunes en la sociedad desarrollada destacan las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, siendo muchos los factores de riesgo que se han asociado a su desarrollo, y entre ellos se encuentra la acción de las sustancias oxidantes. El ritmo de vida que se lleva en esta sociedad conlleva un aumento del estrés oxidativo y su asociación con trastornos neurológicos que provocan un aumento del daño oxidativo en los distintos órganos del ser humano, los cuales han aumentado el interés en un conjunto de sustancias que anteriormente no se les reconocía su importancia, los antioxidantes.

La vitamina E es una de las sustancias que ha cobrado mayor interés, considerándose como un factor protector en dichas enfermedades por sus acciones fundamentales como agente antioxidante y en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares.

Su funcionamiento como antioxidante ha sido relacionado con el selenio y se han llevado a cabo estudios epidemiológicos¹, en los que a un grupo de hombres sanos en edad de riesgo se les administró vitamina E y selenio en la dieta para comprobar los efectos preventivos sobre el cáncer de próstata en los individuos a estudio. En dicho trabajo se concluyó que el consumo de estas sustancias de forma conjunta disminuye en mayor medida los riesgos de contraer cáncer de próstata que si se toma solamente una sustancia de éstas. Igualmente en estudios realizados con animales se comprobó que un consumo mayor en conjunto de vitamina E y selenio provocaba una disminución en los riesgos de enfermedades generadas por sustancias oxidantes en los diferentes tejidos del animal^{2,3,4}. De ello se desprende que un consumo adecuado de estos dos micronutrientes reduce en un grado considerable los riesgos de sufrir daños en los tejidos y con ello gran número de enfermedades que tienen como origen reacciones de oxidación. Por todo ello vamos a estudiar si el aumento de selenio provocado por el cambio de alimentación de las vacas provoca una variación en el contenido de vitamina E en las leches obtenidas.

El interés de determinar este contenido de vitamina E es que si conseguimos una variación positiva en los niveles de vitamina E provocaría que al tomar está leche por el individuo aumentaríamos de forma conjunta el consumo de estos dos nutrientes. Esto a su vez tomando como partida los trabajos médicos^{1,2,3,4} supondrían un aumento del efecto preventivo de un gran número de enfermedades que tienen como origen el daño producido por las numerosas reacciones de oxidación en los tejidos del individuo, que conlleva a su vez una mejora de su salud.

La vitamina E

La vitamina E es el antioxidante más abundante en la naturaleza. El término vitamina E aglutina al menos ocho isómeros estructurales de tocoferoles y tocotrienoles. Entre ellos, el α -tocoferol es el más estudiado y el que tiene mayor actividad antioxidante⁵. Debido a su alta liposolubilidad, la vitamina E se asocia a membranas ricas en lípidos, como la membrana mitocondrial, la del retículo plasmático o la membrana plasmática. Aunque habitualmente la cantidad de vitamina E en las membranas es baja, la suplementación dietética de esta vitamina puede aumentar su contenido⁵.

La acción antioxidante de la vitamina E reside en su capacidad para neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas, además de ser capaz de romper la reacción en cadena de lipoperoxidación que ocurre en el daño oxidativo a las membranas⁶. Además, mantiene la integridad de la membrana celular la cual previene un daño severo a las células por todo el cuerpo. Se cree que esta vitamina es el antioxidante más importante en el cuerpo porque es fácilmente absorbido y almacenado. Otras funciones de la vitamina E incluyen la regulación de varias rutas metabólicas igual que la síntesis y metabolismo de una gran variedad de compuestos.

La vitamina E es importante para mantener la salud del hígado y los músculos, e influye en la mejora de la fertilidad animal y humana. La resistencia a ciertas

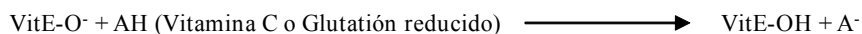
enfermedades se mejora con la ingesta de vitamina E porque estimula la formación de inmunoglobulinas.

Relación del selenio con la vitamina E

La vitamina E impide la propagación de las reacción de peroxi oxidación mediante la cesión de un grupo hidrofílico del tocoferol al radical peróxido (ROO[•]), con lo que rompe la cadena de la peroxidación. Y posteriormente los hidroperóxidos formados se descomponen en sustancias no tóxicas para la salud por acción de la glutatión peroxidasa.



Esta neutralización por la vitamina E de un radical provoca la formación del radical vitamina E, disminuyendo el contenido celular de vitamina E^{5,6,7}. Por su parte el radical vitamina E es muy estable, no obstante éste puede ser reciclado a vitamina E a costa de diversos antioxidantes, como el glutatión, el cual está relacionado con el selenio debido a la presencia de éste en la glutatión peroxidasa en forma de la selenocisteína, o la vitamina C^{6,7}. En estos trabajos se indica que la vitamina C regenera la vitamina E por una vía no enzimática, mientras que el glutatión utiliza una vía enzimática.



Se ha sugerido que la interacción con la vitamina C ocurre entre moléculas solubles en agua y lípidos de las membranas en la interfase membrana-citosol, lo cual pudiera funcionar también “in vivo” para la reparación de la vitamina E unida a la membrana. El radical tocoferoxil puede ser reducido a tocoferol por reacción con el glutatión catalizado por una isoenzima específica de la membrana: la hidroperóxido glutatión peroxidasa, la cual es selenodependiente. Así, el selenio además de su papel como antioxidante formando parte de las selenoenzimas que

llevan a cabo la eliminación de productos de la peroxidación de los lípidos, tiene un papel directo en el reciclaje de la vitamina E aumentando el efecto antioxidante que esta vitamina proporciona ya por si sola.

6.1.1 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA E

Las vitaminas liposolubles como la vitamina A, E, D y β -caroteno son esenciales para la vida humana y éstas se obtienen por el individuo a través de la dieta. Por ello la importancia de determinar estos compuestos en los alimentos para asegurar así, que las personas, consiguen las cantidades adecuadas a través de la cadena alimenticia. Además en los últimos años, con el fin de un aporte correcto de vitaminas en la dieta, se ha llevado a cabo la suplementación de los alimentos con estos nutrientes, pero estos deben de ser controlados. Por consiguiente, se necesitan procedimientos analíticos capaces de determinar los contenidos de vitaminas en los alimentos para poder establecer y comprobar la ingesta diaria de dichos nutrientes.

El procedimiento analítico convencional para la determinación de la vitamina E y las restantes vitaminas liposolubles en alimentos consiste en una extracción con disolventes orgánicos tras llevar a cabo una saponificación en la muestra, y su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución⁸. La dificultad del análisis de la vitamina E en alimentos viene dado por la alta complejidad de las matrices de dichos alimentos. Es más, la vitamina E es sensible a la temperatura, la luz, oxígeno y al pH extremo⁹. Por lo que a la dificultad de llevar a cabo las extracciones hay que sumar los riesgos de la degradación de la vitamina durante el proceso. En algunos estudios se sugiere introducir un patrón interno que presente los mismos riesgos de degradación que la vitamina E para poder calcular las pérdidas ocasionadas en el análisis por este motivo. Para prevenir los procedimientos de degradación por contacto con el aire, es decir sustancias oxidantes, se agrega un antioxidante antes de realizar la extracción de dicha vitamina^{10,11,12,13}. Por todo ello, el análisis de la vitamina E en alimentos es muy tedioso. Además, las extracciones con disolvente orgánicos son muy difíciles de automatizar¹⁴ para poder llevar a cabo los análisis rutinarios que son necesarios en la industria alimentaria.

El uso de disolventes orgánicos, a menudo disolventes con altos riesgos para la salud humana y el impacto medioambiental, hace que en estos años se busquen nuevas metodologías para llevar a cabo la extracción de las vitaminas liposolubles. La tendencia en los estudios recientes, aunque en muchos casos se siguen utilizando disolventes orgánicos, es el empleo de la extracción con fluidos supercríticos (SFE). Esta técnica es más fácil de automatizar, ofrece un caudal de la muestra superior y además, usando los fluidos supercríticos el consumo de disolventes orgánicos puede reducirse. La extracción con fluidos supercríticos ha sido aplicado para la determinación de vitaminas liposolubles como la vitamina E en numerosos estudios con alimentos^{15,16,17}.

Una vez llevada a cabo la extracción, el método de separación más utilizado es la cromatografía líquida, la cual no se discute y en general es la técnica escogida por la mayoría de los investigadores^{10,11,12,14}. Se pueden encontrar otros trabajos que usan otra técnica de separación como la cromatografía de gases^{18,19} o cromatografía electrocinética²⁰, pero en ningún caso pueden competir con el número de trabajos publicados en los que se emplea la cromatografía líquida. En la determinación por cromatografía líquida de alta resolución se utilizan distintos detectores siendo el más empleado por su sencillez el ultravioleta visible^{10,21,22,23}, también se usa la detección con sistemas electroquímicos^{11,12}, los cuales presentan límites de detección más bajos que los detectores ultravioleta visibles. Pero uno de los sistemas de detección que presenta mejores resultados, debido a la alta sensibilidad y selectividad, es la detección por fluorescencia^{24,25,26,27}.

El uso analítico de la quimioluminiscencia ha experimentando un creciente interés en los últimos años, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los métodos basados en detecciones mediante reacciones de quimioluminiscencia suponen una herramienta analítica de gran utilidad. Dentro de las reacciones utilizadas en el análisis se presenta la reacción del luminol con un peróxido, el cual lleva a cabo la reacción de oxidación del luminol provocando una

emisión de luz. Este método, basado en la medida de la intensidad de la luz generada por la reacción quimioluminiscente, está siendo muy utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante total de muchos alimentos^{28,29}. La caída de la señal quimioluminiscente es proporcional a la cantidad de antioxidante presente en la muestra el cual inhibe la reacción de oxidación provocada por el oxidante. Esta reacción quimioluminiscente del luminol ya se ha utilizado para la determinación de vitamina E en alimentos³⁰ pero nunca en la determinación de ésta en la leche.

La determinación de vitamina E en la leche, debido al importante papel que desempeña este alimento y sus derivados en la dieta de los seres humanos, tiene una gran importancia, de ahí que en bibliografía se puedan encontrar numerosos estudios de esta vitamina en muestras de leche^{11,12,14,31,32,33} utilizando los detectores como el UV-visible, fluorescencia, etc.

Fundamento del método utilizado para la detección de vitamina E

Para evaluar la concentración de vitamina E en la leche, se va usar la reacción quimioluminiscente del luminol con un oxidante. Para ello usa el peróxido de hidrógeno que lleva a cabo la oxidación a velocidad constante en presencia de luminol cuya oxidación puede ser medida en forma continua por un espectrofluorímetro, tras provocar esta reacción la emisión de luz. Al adicionar la muestra conteniendo la vitamina E a dicha reacción, el consumo de oxígeno, es decir la oxidación, se detiene hasta que toda la vitamina E es oxidada.

6.2 OBJETIVO

En el presente trabajo se usa la Cromatografía Líquida de Alta Resolución teniendo como detector la reacción del luminol con el peróxido de hidrógeno para la determinación y cuantificación de la vitamina E en muestras de leche. En primer lugar se lleva a cabo la optimización de la reacción quimioluminescente, del luminol con peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima microperoxidasa en metanol, para posteriormente ser utilizada como detector para cuantificar la concentración de vitamina E en la leche. Mediante el uso de patrones de vitamina E de concentración conocida se realizará la puesta a punto del sistema, se determinará la linealidad, la sensibilidad (límites de detección y cuantificación), la precisión y la exactitud. Finalmente se aplicará a muestras de leche obtenidas tras alimentar las vacas con forrajes suplementados con selenio. Ello se realiza para comprobar si el aumento que se experimenta en la concentración de selenio provoca o no una variación del contenido de vitamina E.

6.3 PARTE EXPERIMENTAL

6.3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN QUIMIOLUMINESCENTE DEL LUMINOL-PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Identificación de las variables que afectan de forma significativa al sistema

Se ha llevado a cabo la optimización de la reacción quimioluminescente del luminol-peróxido de hidrógeno en continuo, teniendo como fin obtener una luz con una intensidad suficiente para poder usar esta reacción como sistema detector de la vitamina E en muestras de leche de vaca. Para ello vamos a utilizar los diseños de experimentos. En un primer paso se llevará a cabo una identificación de las variables que afectan de forma significativa a la generación de la luz mediante un diseño Plackett-Burman de ocho variables con tres grados de libertad, con lo que al ser a dos niveles resulta una matriz de doce experimentos. A la hora de plantear el diseño de experiencias es necesario elegir las variables a estudiar teniendo en cuenta su posible influencia sobre el resultado final.

Las variables consideradas a la hora de realizar el estudio de la reacción del luminol con el peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima microperoxidasa (MP-11), han sido las concentraciones de luminol, peróxido de hidrógeno y MP-11, caudal de luminol, caudal de peróxido de hidrógeno, pH, y a mayores una variable “fantasma” para ver si existen factores que no hayamos considerado que puedan afectar a nuestro sistema como la temperatura, que en principio se pueden considerar que no van a afectar a nuestro sistema de forma significativa debido a que datos de esta reacción en bibliografía no dan importancia a esta variable. Igualmente, utilizamos un espectrofotómetro de fluorescencia como detector con la fuente apagada, debido a que solamente nos interesa el sistema de detección del instrumento. Fijamos las condiciones instrumentales del espectrofotómetro de fluorescencia (Tabla 1), las cuales no vamos a estudiar por no tener interés para la mejora de este estudio.

Tabla 1. Condiciones instrumentales del espectrofotómetro de fluorescencia

Condiciones instrumentales	Valor establecido
Tiempo de respuesta	0,4 s
Voltaje tubo fotomultiplicador	700 V
Rendija	20 nm
Longitud de onda	425nm

Las variables que se han considerado en el estudio, así como los dos niveles elegidos, seleccionados a partir de datos bibliográficos³⁴ consultados se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Variables seleccionadas para el diseño de experiencias Plackett-Burman para la obtención de luz a partir de la reacción luminol- H₂O₂

Código	Variable	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	[luminol] / g L ⁻¹	0,05	1,0
B	[H ₂ O ₂] / mL L ⁻¹	2,0	8,0
C	[MP-11] / mg L ⁻¹	2,5	5,0
D	Flujo Luminol / mL min ⁻¹	4	8
E	Flujo H ₂ O ₂ / mL min ⁻¹	5	10
F	pH	8,0	12
G	Variable “fantasma”	1	2

La matriz resultante de los diseños de experiencias planteados, correspondiente a un diseño Plackett-Burman 2⁷*3/32 implicando doce experiencias y con tres grados de libertad se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz del diseño Plackett-Burman empleado para la optimización de la reacción luminol- H₂O₂

Experiencia	Variables						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	+	-	-	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	-	+	+	-	+	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-
5	+	+	-	+	+	-	+

6	+	+	+	-	+	+	-
7	-	+	+	+	-	+	+
8	-	-	+	+	+	-	+
9	-	-	-	+	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-

A continuación se llevaron a cabo todas las experiencias del diseño de experimentos de acuerdo a la matriz correspondiente y se obtuvieron los resultados que se recogen en la Tabla 4. Una vez obtenida la respuesta para cada uno de los experimentos (Intensidad de luz emitida), se aplica el diseño Plackett Burman elegido con el paquete estadístico, Statgraphics plus versión 5,0, y se obtiene la información necesaria para evaluar la importancia de cada una de las variables en la obtención de luz mediante la reacción luminol- peróxido de hidrógeno.

Tabla 4. Resultado de los experimentos programados en nuestra matriz Plackett-Burman para la optimización de la reacción luminol –H₂O₂

Experiencia	Intensidad de luz emitida
1	2212
2	2000
3	1243
4	2600
5	2677
6	5000
7	3500
8	500

9	712
10	2800
11	3615
12	634

Una vez obtenidos los diferentes valores de la variable respuesta, sus valores se introducen en el diseño Plackett-Burman y obtenemos la información necesaria para evaluar la importancia de cada variable en nuestro sistema. El análisis de la importancia de cada una de las variables se llevó a cabo con ayuda de la carta Pareto estandarizada para un nivel de confianza de un 95%. Dichas carta Pareto se muestran a continuación en la Figura 1.

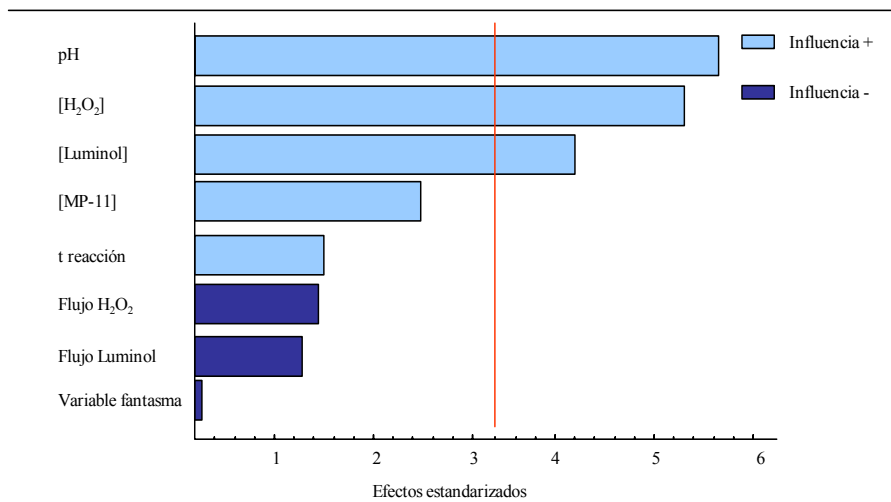


Figura 1. Carta Pareto de primer orden, obtenida tras estudiar el diseño Plackett-Burman en la optimización de la reacción luminol- H₂O₂

A la vista de los resultados obtenidos se concluye que las tres variables que presentan una influencia significativa sobre nuestro sistema son: El pH, la

concentración de luminol y la concentración de oxidante, es decir peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos son los esperados, ya que se comprueba que lo importante en la reacción son la concentración de las sustancias que intervienen en la reacción y el pH del medio. El catalizador es importante pero llega con su presencia, si lo eliminamos la reacción marcha pero la luz emitida es muy baja. Los flujos no afectan de forma significativa pero se ve que afectan de forma negativa al aumentar la velocidad del flujo. Tras obtener estos resultados vamos a fijar los valores de las restantes variables y se llevará a cabo la búsqueda del valor óptimo de las tres variables que resultaron significativas mediante un diseño composicional.

Optimización de las variables significativas

Para llevar a cabo la optimización de las variables que han resultado significativas en la generación de luz en el diseño Plackett-Burmann, se establecieron los intervalos objeto de estudio para cada una de las variables. Los valores que se han adoptado para las variables que no resultan significativas, se escogieron teniendo en cuenta las tendencias de las variables dadas por el diseño Plackett-Burmann, pero también criterios económicos. Así el valor adoptado, para la concentración del catalizador fue el más bajo estudiado, aunque en la carta Pareto (Figura 1) se ve que la tendencia es a mayor concentración mejor resultado, pero esta enzima es muy cara y a nosotros no nos interesa una luz espectacular sino que sea suficiente para utilizar esta reacción como detector de la vitamina E en muestras de leche. Los valores fijados para estas variables se muestran en la Tabla 5. Este último criterio también se empleó a la hora de fijar los intervalos de trabajo de cada una de las variables significativas (Tabla 6), ya que se podría ampliar las concentraciones de los reactivos.

Tabla 5. Valores adjudicados a las variables que no resultaron para la obtención de luz a partir de la reacción luminol-H₂O₂

Variable	Valor adjudicado
[MP-11] / mg L ⁻¹	2,5

Flujo Luminol / mL min ⁻¹	5
Flujo H ₂ O ₂ / mL min ⁻¹	6

Tabla 6. Intervalo de estudio en el diseño compositacional para la obtención de luz a partir de la reacción luminol- H₂O₂

Código	Variable	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	[luminol] / g L ⁻¹	0,05	1,0
B	[H ₂ O ₂] / mL L ⁻¹	2,0	8,0
C	pH	8	12

Una vez fijados los valores superiores e inferiores para el intervalo a estudiar en cada uno de los sistemas se creará la matriz del diseño compositacional 2³ + estrella. En este caso las variables no sólo tomarán los valores superior e inferior adjudicados por nosotros, sino que tomarán un valor central en el intervalo de cada variable y valores alrededor de los valores superior e inferior.

La matriz resultante de los diseños de experiencias planteados se muestra en la Tabla 7. Mientras que en la Tabla 8 se recogen los valores que adoptan los niveles superior (+) e inferior (-), así como los valores intermedios (K₀) y superior axial (+ α) e inferior axial (- α) alrededor de los valores límites del intervalo de cada una de las variables fijados por nosotros.

Tabla 7. Matriz del diseño compositivo llevado a cabo para la optimización de la reacción luminol- H₂O₂

Experiencia	[luminol]/ g L ⁻¹	[H ₂ O ₂] mL L ⁻¹	pH
1	Ko	Ko	Ko
2	-	-	-
3	+	-	-
4	-	+	-
5	+	+	-
6	-	-	+
7	+	-	+
8	-	+	+
9	+	+	+
10	-α	Ko	Ko
11	+α	Ko	Ko
12	Ko	-α	Ko
13	Ko	+α	Ko
14	Ko	Ko	-α
15	Ko	Ko	-α
16	Ko	Ko	Ko

Tabla 8. Valores que adoptan las variables en el diseño compositivo 2³ + estrella para la obtención de luz a partir de la reacción luminol- H₂O₂

Valores	Variables		
	[luminol]/ g L ⁻¹	[H ₂ O ₂] mL L ⁻¹	pH
+	1,00	8,0	12,0
-	0,05	2,0	8,0
Ko	0,53	5,0	10,0
+α	1,14	8,9	12,6
-α	0,03	1,1	7,4

Ko es el valor medio de la variable; ± α es el valor estrella para cada variable

Dichas experiencias se llevan a cabo en disoluciones de luminol en metanol tamponada con bórax 0,5M, incorporando la concentración fijada de enzima a esta disolución en todos los casos. El pH se consiguió añadiendo a la disolución de

metanol ácido para llevarlo a pHs inferiores a 9 e hidróxido sódico para llevarlo a pHs superiores a 10. El peróxido de hidrógeno se preparó en una disolución acuosa con la concentración establecida para cada diseño. Tras llevar a cabo las 16 experiencias y medir la intensidad de la luz generada por la reacción quimioluminescente se introdujeron los resultados (Tabla 9) en nuestra matriz del composicional. Los valores óptimos para la tres variables objeto de estudio se encontraron con ayuda de las superficies de respuesta obtenidas (Figura 2 y Figura 3) tras el análisis estadístico de los datos.

Tabla 9. Resultados obtenidos para el diseño composicional de la optimización de la reacción luminol-H₂O₂

Experiencia	Intensidad de luz
1	3028
2	610
3	751
4	635
5	145
6	500
7	400
8	600
9	900
10	100
11	1100
12	1400
13	2600
14	100
15	2000
16	3100

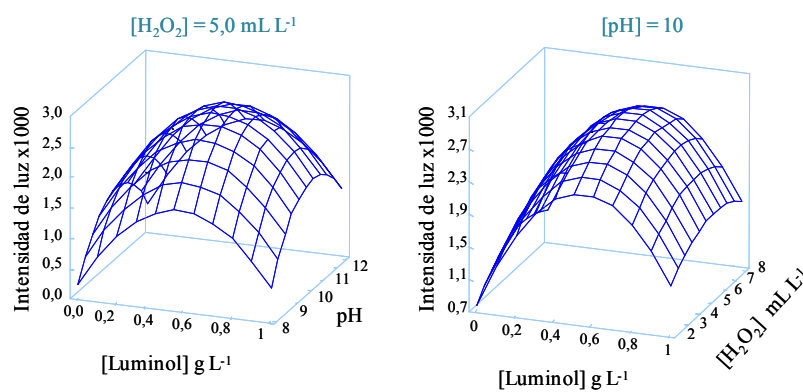


Figura 2. Superficie de respuesta obtenida para la optimización de la reacción luminol-H₂O₂

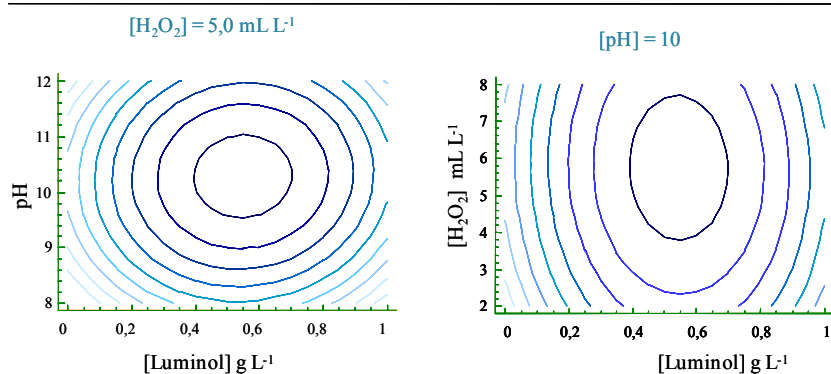


Figura 3. Superficie de contorno para la respuesta obtenida para la optimización de la reacción luminol-H₂O₂

A partir de las superficies de respuesta obtenidas, se han fijado los valores de las tres variables con los valores de las variables (Tabla 10) que presentan el máximo dentro del intervalo estudiado.

Tabla 10. Valores óptimos para las variables significativas en la generación del hidruro de selenio

Código	Variable	Valor óptimo
A	[luminol] / g L ⁻¹	0,6
B	[H ₂ O ₂] / mL L ⁻¹	6
C	pH	10

Una vez optimizado el sistema de detección, éste se acopla al sistema cromatográfico el cual está formado por un cromatógrafo modelo 625 LC de Waters equipado con una columna de fase enlazada μ Bondapack C₁₈ de 30 centímetros de longitud, 3,9 mm de diámetro y 10 μ m de tamaño de partícula. Se utiliza una columna C₁₈ para la separación de la vitamina E, ya que es la más utilizada en bibliografía citada anteriormente en el análisis de esta vitamina y además fue la empleada en la especiación de selenio, con lo que con el mismo sistema cromatográfico podemos realizar los dos análisis que nos interesan en este estudio pero con distintos detectores. La fase móvil elegida es el metanol y al sólo analizar vitamina E y el detector ser solo específico para esta sustancia no es necesario estudiar los diferentes parámetros que afectan a la separación cromatográfica, como velocidad de la fase móvil, composición, pH, etc. El flujo de fase móvil elegido fue de 2 mL min⁻¹, el cual no aumenta en demasía la presión del sistema y la señal de la vitamina E puede ser visualizada en menos de cinco minutos.

6.3.2 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LECHE PARA EL ANÁLISIS DE VITAMINA E POR QUIMIOLUMINESCENCIA

Una vez hemos optimizado la reacción de quimioluminescencia utilizada como sistema de detección se necesita desarrollar la extracción la vitamina E de la leche para su posterior cuantificación. La extracción de la vitamina E de las muestras de

leche se llevó a cabo según el método propuesto por D.B. Gomis y col³¹ con pequeñas modificaciones.

Para ello 10 mL de leche se transfirieron a un tubo de centrifuga y se añadieron 2mL de una disolución de etanol con 0,025% de ácido ascórbico (para proteger las vitaminas contra la oxidación) y la mezcla se introdujo durante 2 minutos en un baño de ultrasonidos para romper las membranas de las proteínas y fosfolípidos donde se encuentran encapsulados las vitaminas liposolubles. A continuación se le añadieron 10 mL de hexano y se colocaron en un agitador mecánico durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugan para que la separación de las fases sea más rápida y eficaz ya que debido al alto contenido graso de las leches analizadas la separación de las fases se demora largo tiempo. La fase orgánica fue transferida a otro tubo y el proceso de extracción fue repetido con 5 mL de hexano. Los dos extractos de hexano fueron combinados y se llevó a cabo un lavado con una disolución de metanol-agua (9:1). Esto se realizó con cinco porciones de leche que se combinaron al final del proceso de extracción con el fin de tener un límite de detección adecuado. Tras llevar a cabo el lavado de la fase orgánica ésta se filtró (filtro de 0,45 μm) y se evaporó bajo nitrógeno hasta la sequedad.

El residuo se reconstituyó en 5 mL de metanol el cual posteriormente se introducirá en el sistema cromatográfico.

6.3.3 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Rectas de calibrado y adición

Las rectas de calibrado y adición se han obtenido para concentraciones comprendidas entre 5 y 30 mg L^{-1} . La adición se ha realizado añadiendo el patrón de vitamina E a los extractos de metanol obtenidos en la extracción llevada a cabo. Las pendientes de las rectas de calibrado y adición realizadas no difieren significativamente (test t, nivel de confianza 99,5%). Por ello, a partir de este estudio los análisis del contenido de vitamina E en leche se realizarán utilizando las

rectas de calibrado. Las ecuaciones de la recta de calibrado y adición se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Pendientes de las rectas de calibrado y adición

	Pendiente	Coefficiente de correlación
Recta de calibrado	11,24	0,997
Recta de adición	11,17	0,995

Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad del método para la determinación de la vitamina E en la leche se estudió mediante el límite de detección y cuantificación definidos previamente en el capítulo 2. Para el análisis de vitamina E en leche se ha encontrado un límite de detección de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ y un límite de cuantificación de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$. Estos valores son adecuados para llevar a cabo la determinación de vitamina E en la leche.

Precisión

Se estudió la precisión del método, expresada como la desviación estándar relativa (%CV). Para ello se tomó una muestra de leche y se dividió en cuatro alícuotas de 50 mL, de las cuales tres se dopan con 10, 20 y 30 mg L^{-1} de patrón de vitamina E. Una vez dopadas las muestras se lleva a cabo la extracción propuesta anteriormente. Se realizaron 2 réplicas de cada una de las muestras y se midió cada una de ellas cinco veces por lo que disponemos de diez medidas para calcular el %CV de cada uno de los niveles de concentración de vitamina E añadidas a la leche. Este mismo procedimiento se llevó a cabo posteriormente al cabo de unos días para comprobar igualmente los resultados. Los valores obtenidos se muestran, a continuación, en la Tabla 12.

Tabla 12. Precisión del método para la determinación de vitamina E en leche

	Día 1			Día 2		
[Vit E] mg L ⁻¹	Media µg L ⁻¹	SD	%CV	Media µg L ⁻¹	SD	%CV
Muestra	3,3	0,4	11,5	3,1	0,3	9,7
Muestra +10	13,2	1,3	9,5	12,9	0,9	7,5
Muestra +20	23,4	1,7	7,4	23,8	1,9	7,9
Muestra +30	33,5	2,0	5,9	33,2	2,6	7,6

Los valores encontrados para el coeficiente de variación obtenidos para el proceso de determinación de vitamina E en muestras de leche se pueden considerar satisfactorios tras las numerosas etapas que comprenden el método propuesto y la dificultad que conlleva la medida de las vitaminas liposolubles.

Exactitud

Con el objeto de comprobar la exactitud del análisis de vitamina E en leche de vaca se ha llevado a cabo un estudio de la recuperación analítica de la vitamina E tras añadir ésta a diferentes muestras de leche. Para ello se tomaron cuatro muestras de leche de vaca y cada una de ellas se dividió en cuatro alícuotas de 50 mL. A cada una de las alícuotas de una muestra de leche se le añadió diferentes cantidades de vitamina E, una primera alícuota no se dopó con patrón y a las otras se doparon con patrón de vitamina E para tener una concentración final de ésta de 2, 4 y 6 mg L⁻¹. Una vez dopadas las muestras se sometieron al proceso de extracción y se llevó a cabo la determinación por cromatografía líquida- quimioluminiscencia (luminol-peróxido de hidrógeno).

Una vez obtenidos los valores de concentración para cada una de los niveles y distintas muestras se calculó la recuperación analítica usando la ecuación empleada en el capítulo 2.

Los resultados obtenidos para cada uno de los niveles de concentración de vitamina E en la leche se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Recuperaciones analíticas encontradas para la determinación de vitamina E en leche

[Vit E]añadida / mg L ⁻¹	[Vit E]detectada	Recuperación Analítica %
2	1,89	94,5
4	3,81	95,3
6	5,69	94,8
[Vit E]detectada = [Vit E]nivel dopado - [Vit E]nivel sin dopar		

En la Tabla 13 se puede observar que las recuperaciones analíticas encontradas para la vitamina E son superiores al 94,5% para los tres niveles de concentración estudiados. Con estos datos podemos decir que el método utilizado para medir la vitamina E en leche de vaca por cromatografía líquida- Luminol-peróxido de hidrógeno es exacto.

6.3.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE VITAMINA E EN LECHE DE VACA

Una vez que hemos optimizado el sistema de detección y la metodología necesaria para la extracción de la vitamina E de la leche se lleva a cabo el análisis de está en distintas muestras de leche mediante cromatografía líquida-quimioluminiscencia. Se estudió el contenido de selenio en 10 muestras de leches de vaca, cinco muestras de leche obtenidas tras alimentar a las vacas con forrajes suplementados con 0,3 µg g⁻¹ de selenio inorgánico y otras cinco tras alimentar a las vacas con forrajes suplementados con 0,3 µg g⁻¹ de selenio orgánico. Además se analizó una muestra de leche Feiraco comprada en supermercado y una muestra de leche de CLAS enriquecida con vitamina E. El estudio del contenido de selenio en estas muestras comerciales se llevó a cabo para tener una referencia del contenido de vitamina E de leches de mercado respecto a las analizadas procedentes de las dos granjas. Los resultados obtenidos tras analizar las muestras por cuadruplicado son expresados como valor medio ± desviación estándar y se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones de vitamina E encontradas en diferentes leches. Los resultados se encuentran expresados como media \pm desviación estándar (n=4)

Muestras	[vitamina E] mg L ⁻¹
Feiraco comercial	0,5 \pm 0,07
CLAS (enriquecida vitamina E)	2,8 \pm 0,05
Leche (vacas alimentadas con selenio orgánico) 1	0,6 \pm 0,07
Leche (vacas alimentadas con selenio orgánico) 2	0,6 \pm 0,05
Leche (vacas alimentadas con selenio orgánico) 3	0,7 \pm 0,07
Leche (vacas alimentadas con selenio orgánico) 4	0,7 \pm 0,05
Leche (vacas alimentadas con selenio orgánico) 5	0,6 \pm 0,06
Leche (vacas alimentadas con selenio inorgánico) 1	0,6 \pm 0,04
Leche (vacas alimentadas con selenio inorgánico) 2	0,7 \pm 0,06
Leche (vacas alimentadas con selenio inorgánico) 3	0,7 \pm 0,04
Leche (vacas alimentadas con selenio inorgánico) 4	0,7 \pm 0,05
Leche (vacas alimentadas con selenio inorgánico) 5	0,6 \pm 0,06

La leche de CLAS fortificada con vitamina E tras el proceso de eliminación de la grasa presenta los niveles más altos niveles de vitamina E (2,8 \pm 0,05 mg L⁻¹). Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA una vía) para comprobar que los contenidos de la vitamina E en las diez muestras de leche obtenidas tras llevar a cabo la suplementación de la alimentación de las vacas con las dos diferentes formas de selenio. Tras el análisis se encontró que no existían diferencias significativas (95 % de nivel de confianza) entre las concentraciones de vitamina E en los dos tipos de leche obtenidas tras la suplementación de los forrajes empleados en la alimentación de las vacas con diferentes formas de selenio.

6.4 CONCLUSIONES

- Se ha optimizado un método de análisis de vitamina E en muestras de leche que permiten su determinación mediante cromatografía líquida-quimioluminiscencia (luminol-peróxido de hidrógeno). El método presenta límites de detección de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ y un límite de cuantificación de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ que permiten la detección de esta vitamina en muestras de leche de vaca.
- El método desarrollado ha sido aplicado a 12 muestras de leche y los valores encontrados oscilan entre $0,5-0,7 \text{ mg L}^{-1}$ salvo para una leche comercial fortificada con vitamina E en la cual se encontraron valores considerablemente mayores ($2,8 \text{ mg L}^{-1}$).
- Tras los análisis de las muestras de leche obtenidas tras alimentar las vacas con forrajes fortificados con dos formas químicas de selenio (selenio orgánico y selenio inorgánico) se ve que los niveles de vitamina E no presentan diferencias significativas (95 % nivel de confianza). Por lo que parece el tipo de selenio empleado en la fortificación de la alimentación de las vacas no influye en el contenido de vitamina E de las leches producidas por dichos animales aunque, como hemos visto en el capítulo 3, la utilización de selenio en su forma orgánica producía un aumento considerable de la concentración de selenio en la leche.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

1. E. A. Klein, I. M. Thompson, S. M. Lippman, P. J. Goodman, D Albanes, P. R. Taylor, C. Coltman, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2003, **21**, 59–65.
2. M. Koyuturk, S. Bolkent, S. Ozdil, S. Arbak, R. Yanardag, *Human & Experimental Toxicology*, 2004, **23** (8), 391-398.
3. E. Beytut, M. Erisir, M. Aksakal, *Cell Biochemistry and Function*, 2004, **22** (1), 59-65.
4. M. Naziroglu, A. Karaoglu, A. O. Aksoy, *Toxicology*, 2004, **195** (2-3), 221-230.
5. D. Janero, *Free radical biology & medicine*, (1991), **11** (1), 129-144.
6. G. Burton, M. Traber, *Annual Review of Nutrition*, 1990, **10**, 357-382.
7. J. Packer, T. Slater, R. Wilson, *Nature*, 1979, **278** (5706), 737-738.
8. *AOAC*, (Arlington: AOAC International), 1993, 591-593.
9. E. Miquel, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, G. Clemente, *International Dairy Journal*, 2004, **14**, 1003–1011.
10. S. Abdalá-Hurtado, S. Novella-Rodríguez, M. T. Veciana-Nogués, A. Mariné-Font, *Journal of Chromatography A*, 1997, **778** (1-2), 243-246.
11. M. M. D. Zamarreño, A. S. Pérez, C. G. Pérez, J. Hernández, *Journal of Chromatography A*, 1992, **623** (1), 69-74.
12. M. M. D. Zamarreño, A. S. Pérez, M. Bustamante-Rangel, J. Hernández, *Analytica Chimica Acta*, 1999, **386** (1-2), 99-106.
13. F. I. Chow, S. T. Omaye, *Lipids*, 1983, **18** (11), 837-841.
14. L. Gámiz-Gracia, A. Velasco-Arjona y M. D. Luque de Castro, *Analyst*, 1999, **124** (5), 801–804.
15. C. Turner, J. W. King, L. Mathiasson, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49** (2), 553-558.
16. C. Turner, M. Persson, L. Mathiasson, P. Adlercreutz, J. W. King, *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **29** (2-3), 111-121.
17. E. E. Stashenko, B. E. Jaramillo, J. R. Martinez, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1025** (1), 93-103.
18. C. Maraschiello, J. A. García-Regueiro, *Journal of Chromatography A*, 1998, **818** (1), 109-121.

19. D. C. Liebler, J. A. Burr, A. J. L. Ham, *Methods in Enzymology*, 1999, **299** (Oxidants and Antioxidants, Part A), 309-318.
20. S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, T. Tilander, *Journal of Chromatography A*, 1998, **807** (2), 285-290.
21. C. M. Sancho, R. H. Vanrell, S. Negro, *Journal of Chromatographic Science*, 2004, **42** (1), 43-48.
22. B. L. Lee, J. Su, C. N. Ong, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1048** (2), 263-267.
23. W. M. Stoggl, C. W. Huck, H. Scherz, M. Popp, G. K. Bonn, *Chromatographia*, 2001, **54** (3-4), 179-185.
24. S. L. Abidi, T. L. Mounts, *Journal of Chromatography A*, 1997, **782** (1), 25-32.
25. G. W. Jr. Chase, A. R. Long, *Journal of AOAC International*, 1998, **81** (3), 582-586.
26. J. W. DeVries, K. R. Silvera, *Cereal Foods World*, 2001, **46** (5), 211-215.
27. G. W. Jr. Chase, Y. Lin, V. C. Stoakes, R. R. Eitenmiller, A. R. Long, *Journal of AOAC International*, 2004, **87** (5), 1173-1178.
28. T. Toyooka, T. Kashiwazaki, M. Kato, Maseru, *Talanta*, 2003, **60** (2-3), 467-475.
29. S. Girotti, E. Ferri, F. Fini, L. Bolelli, A. G. Sabatini, R. Budini, D. Sichertova, *Talanta*, 2004, **64** (3), 665-670.
30. B. Lygren, R. Waagbo, *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9** (6), 445-456.
31. D.B. Gomis, M.P. Fernandez, M. D. Gutierrez Alvarez, *Journal of Chromatography A*, 2000, **891** (1), 109-114.
32. P. Ramos-Lledó, S. Vera, M. P. San Andrés, *Fresenius J Anal Chem*, 2001, **369**, 91-95.
33. L. Mathiasson, C. Turner, H. Berg, L. Dahlberg, A. Theobald, E. Anklam, R. Ginn, M. Sharman, F. Ulberth, R. Gabernig, *Food Additives and Contaminants*, 2002, **19** (7), 632-646.
34. T.P. Whitehead, G. H. G. Thorpe, S. R. J. Maxwell, *Analytica Chimica Acta*, 1992, **266** (2), 265-277.

En este último capítulo se van a recoger, en forma de recordatorio, todas las conclusiones que se han podido extraer tras la realización de este estudio en sus diferentes capítulos. Estas se enumeran a continuación:

- Se ha optimizado un método de pretratamiento de muestras de leche que permite la determinación de selenio total mediante generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica y generación de hidruros- espectrometría fluorescencia atómica.
- Se ha determinado el contenido de selenio en leches de granja sin tratar y leches comerciales para establecer el contenido de este elemento traza en dicho alimento, obteniéndose que el contenido en la leche de vaca sin tratar fue de $17,9 \pm 0,59 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en las leches comerciales los valores de concentración de selenio están entre 8,5 y $21 \mu\text{g L}^{-1}$.
- Se ha aplicado un método de separación de los distintos componentes de la leche y se ha determinado el contenido de selenio mediante el método optimizado para la determinación de selenio en leche, obteniéndose la distribución del selenio en los distintos componentes de la misma. Se encontró que los mayores porcentajes de selenio están presentes en el suero lácteo, con valores entre 47,2-73,6 % y los porcentajes mínimos entre 4,8-16,2 % corresponden a la fase grasa.
- Se estableció una relación mediante una ecuación matemática entre el contenido de selenio en la leche y el contenido de selenio en el suero y las micelas de caseína.
- Se realizó un estudio de la posible influencia de la alimentación de las vacas con diferentes suplementos de selenio añadidos a los forrajes, llegando a la conclusión de que las vacas que consumen forrajes suplementados con selenio orgánico producen leche con mayor contenido en selenio que las alimentadas con selenio inorgánico.
- El contenido de selenio en los distintos componentes de la leche de vaca (suero lácteo, micelas de caseína y nata) varía en función del tipo de suplementación

empleada en la alimentación del ganado. En todos los componentes, el contenido de selenio es mayor cuando se utilizan levaduras selenizadas para la fortificación de los forrajes y el menor valor se obtiene cuando no se utiliza suplementación alguna.

- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución porcentual de selenio en el suero lácteo y nata en función del tipo de alimentación empleada. Sin embargo, sí existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles porcentuales de selenio calculados para las micelas de caseína. La alimentación con levaduras ricas en selenometionina produce micelas de caseína con un porcentaje de selenio ligeramente superior que los calculados con las otras dos formas de alimentación.
- La suplementación con selenio procedente de levaduras enriquecidas en selenometionina de los forrajes dan lugar a un aumento proporcional de la concentración de selenio en la leche de las vacas que consumen dichos forrajes
- Tras esta parte del estudio se podría afirmar que es posible conseguir producir leche enriquecida en selenio de forma natural sin adulterar la composición original de la leche, como es habitual en la industria alimentaria donde se realiza la fortificación de diferentes elementos añadiendo estos al producto final en forma de sales inorgánicas. Según los resultados obtenidos en este estudio, la utilización de levaduras enriquecidas en selenometionina parecen ser las más adecuadas dado que, incluso a los mismos niveles de fortificación que el selenito sódico, dan lugar a la producción de leches con un mayor contenido en selenio, lo que demuestra su mayor biodisponibilidad para las vacas. Esto puede implicar que la salud de estos animales se vea mejorada y la producción láctea y rendimiento económico para el granjero sea mayor.
- Los contenidos de selenio en los dializados de la leche aumentan de forma proporcional a medida que aumenta el nivel de fortificación con selenio orgánico de los forrajes. La suplementación con $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de selenio inorgánico da lugar a

niveles de selenio en los dializados muy próximos al nivel de los dializados de la leche obtenida sin suplementar.

- La dializabilidad del selenio en leches de vaca obtenida tras la alimentación con forrajes sin suplementar, suplementados con selenio inorgánico ($0,3 \mu\text{gg}^{-1}$) y con selenio orgánico de $0,2$ y $0,3 \mu\text{gg}^{-1}$ no presenta diferencias estadísticamente significativas.
- La dializabilidad del selenio en las leches obtenidas tras la fortificación de los forrajes con $0,4$ y $0,5 \mu\text{gg}^{-1}$ de selenio orgánico presenta la mayor con respecto a las anteriores y no presentan diferencias significativas entre ellas.
- El acoplamiento instrumental basado en la separación por cromatografía líquida de alta resolución de par iónico, craqueador ultravioleta-calor, generación de hidruros y detección con espectrometría de fluorescencia atómica nos permite la especiación de selenocistina, selenio (IV), selenometionina y selenio (VI) en muestras de leche de vaca.
- La introducción de una fuente de calor es necesaria para poder obtener una buena reducción de las diferentes especies de selenio a selenio (IV), lo que permite a su vez bajar de forma ostensible los límites de detección de estas especies.
- Con este procedimiento propuesto se pueden determinar la selenocistina, selenio (IV), selenometionina y selenio (VI) en muestras de leche de vaca en concentraciones superiores a $1,1$, $0,9$, $2,9$ y $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente con un coeficiente de variación inferior al $7,5 \%$.
- Se ha llevado a cabo una digestión enzimática para llevar a cabo el pretratamiento de las muestras de leche obteniendo un porcentaje superior al 80% de las especies de selenio liberadas en el extracto que se introduce en el sistema cromatográfico.

- Las muestras de leche de vaca cuya alimentación se ha suplementado con selenio orgánico presenta un perfil cromatográfico con tres especies, selenocistina, selenio (IV), selenometionina.
- Las muestras de leche de vaca cuya alimentación se ha suplementado con selenio inorgánico, vacas alimentadas sólo con forrajes sin ninguna especie de selenio y las leches comerciales presenta un perfil cromatográfico con dos especies, selenocistina, selenio (IV).
- Se ha optimizado un método de determinación de vitamina E en muestras de leche mediante cromatografía líquida-quimioluminiscencia (luminol-peróxido de hidrógeno). El método presenta límites de detección de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ y un límite de cuantificación de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ que permiten la detección de esta vitamina en muestras de leche de vaca.
- Tras los análisis de las muestras de leche obtenidas tras alimentar las vacas con forrajes fortificados con dos formas químicas de selenio (selenio orgánico y selenio inorgánico) se ve que los niveles de vitamina E no presentan diferencias significativas (95 % nivel de confianza). Por lo que parece el tipo de selenio empleado en la fortificación de la alimentación de las vacas no influye en el contenido de vitamina E de las leches producidas por dichos animales aunque, como hemos visto en el capítulo 3, la utilización de selenio en su forma orgánica producía un aumento considerable de la concentración de selenio en la leche.

Aparatos y material

Aparatos

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Zeeman 4100 Z equipado con un sistema FIAS 400 Perkin Elmer con una válvula de inyección en flujo de cinco vías (Überlingen, Alemania)
- Cámara de incubación con control de temperatura, Boxcult, J. P. Selecta, equipada con un agitador orbital-vaivén, Rotavit, J. P. Selecta (Barcelona, España)
- Espectrofotómetro de fluorescencia atómica PSA 10.055 Millenium Excalibur PS Analytical, (Sevenoaks, Kent, UK) con llama de difusión de hidrógeno y filtros específicos.
- Espectrofotómetro de fluorescencia modelo F-2500 Hitachi, (Mannheim, F.R., Alemania).
- Automuestreador PSA 20.200, PSA analytical, (Sevenoaks, Kent, UK).
- Sistema de inyección en continuo PSA 10.054 PS Analytical, equipado con un separador gas-líquido tipo B y un sistema de secado Perma Pure, PS Analytical, (Sevenoaks, Kent, UK).
- Craqueador con lámpara ultravioleta PSA 10.570, PS Analytical (Sevenoaks, Kent, UK).
- Bomba para cromatografía líquida de alta resolución Waters 625 LC. (Millford, Massachussets, USA) equipado con una válvula de inyección de seis vías Rheodyne (Cotati, CA, USA).
- Sistema de calentamiento mediante transferencia a bloques de aluminio a partir de una resistencia eléctrica, J. P. Selecta (Barcelona, España) con control de temperatura.

- Balanza electrónica analítica. BP121S. SARTORIUS. (Goettingen, Alemania).
- Horno microondas industrial Ethos Plus (potencia máxima 1000W, temperatura máxima 300 °C) con control de temperatura interno. Milestone (Soriso, Italia).
- Horno microondas de uso doméstico Taurus, (Madrid, España).
- Ultracentrifuga L8 Beckman, (Alaska, USA) equipado con un rotor SW-40.
- Bomba peristáltica Minipuls-3, Gilson, (Michigan, USA).
- Ph-metro. HANNA Instruments 209.

Material

- Columna de fase enlazada μ Bondapak C₁₈ con partículas de diámetro 10 μ m, 300 x 3,9 mm (Millford, Massachusetts, USA).
- Columna de intercambio iónico Hamilton PRP-X100 con partículas de diámetro 10 μ m, 250mmx4,1 mm, (Reno, NV, USA).
- Precolumna Hamilton PRP-X100, con partículas de diámetro 10 μ m, 25mmx4,1 mm, (Reno, NV, USA).
- Micropipetas de volumen fijo y variable, Gilson (Michigan, USA).
- Lámpara de descarga de selenio Perkin Elmer (Überlingen, Alemania).
- Lámpara de cátodo hueco de selenio PHOTRON LAMPS (Cambridge, UK).
- Tubos de diálisis Cellu-sep® de 10 kDa, Membrana Filtration Products (San Antonio, USA). Anchura 45mm y volumen 6,42 mL cm⁻¹.
- Pinzas de nylon para el cierre de los tubos de diálisis Membrana. Filtration Products (San Antonio, USA).
- Bombas de digestión de Teflón con capacidad de 5 mL. Pierce.

- Bombas de digestión de Teflón con capacidad de 100 mL con carcasas de propileno de alta densidad y sistema de seguridad introducida en un rotor segmentado. Milestone (Soriso, Italia).
- Filtros GV de 0,45 μm (Massachusetts, USA).
- Se ha empleado, además, diverso material de vidrio y polietileno, de calidad contrastada, para preparar o almacenar disoluciones y muestras.

Reactivos

- Ácido nítrico (HNO_3) 69-70%, Panreac, (Barcelona, España).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 33% (p/v), Panreac (Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico (HCl) 36.5-38%. Panreac, (Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico (HCl) 36.5%, (Para análisis). Merck (Darmstadt, Alemania).
- Urea, ($\text{N}_2\text{H}_4\text{CO}$) Panreac, (Barcelona, España).
- Tetrahidrobórato sódico (NaBH_4), Panreac, (Barcelona, España).
- Hidróxido sódico (NaOH), Panreac, (Barcelona, España).
- Disolución patrón de SeO_2 , 1000 mg L⁻¹ en ácido nítrico 0,5 M Merck (Darmstadt, Alemania).
- Material de referencia NIST 8435 (leche entera) proporcionado por National Institute of Standards and Technology (NIST), (Gaithersburg, USA).
- Pepsina porcina, Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Pancreatina porcina, Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Bicarbonato sódico (NaHCO_3), Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Seleno-DL-metionina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$), Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Seleno-DL-cisteína ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Se}_2$), Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Selenato sódico, (Na_2SeO_4), Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Selenito sódico, (Na_2SeO_3), Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Pronasa E, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Lipasa, Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, MO, USA).
- Amonio dihidrógeno ortofosfato ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Cloruro de tetraetilamonio mono hidratado ($(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Bromuro Potásico (KBr), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Bromato Potásico (KBrO_3), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Luminol, 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona, ($\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$), Fluka Chimie (Steinheim, Suiza).
- Microperoxidasa (MP-11) Sigma-Aldrich CO., (St. Louis, MO, USA).
- Vitamina E ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$) Fluka Chimie (Steinheim, Suiza).

- Metanol (CH_3OH), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), Panreac (Barcelona, España).
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hexano (C_6H_{14}), Panreac (Barcelona, España).
- Agua ultrapura de resistividad 18 $\text{M}\Omega\text{cm}$. Obtenida mediante un sistema purificador Milli-Q, Millipore Corp., (Massachussets, USA).
- Argón N-50, Air Liquid, (Madrid, España).
- Nitrógeno C-50, Air Liquid, (Madrid, España).
- Hidrógeno N-50, Air Liquid, (Madrid, España).
- Helio C-55, Air Liquid, (Madrid, España).