

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN QUÍMICA Y QUÍMICA INDUSTRIAL  
(MIQOI)

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA  
(UDC)

**Adriana Mañana López**

***“EXTRACCION Y DETERMINACIÓN DE SELENIO Y SUS  
ESPECIES EN NUECES DE BRASIL”***

*“EXTRACCIÓN E DETERMINACIÓN DE SELENIO E AS SÚAS  
ESPECIES EN NOCES DO BRASIL”*

*“SELENIUM AND SELENIUM SPECIES EXTRACTION AND  
DETERMINATION IN BRAZIL NUT”*

**Isabel Turnes Carou, Elia Alonso Rodríguez, Jorge Moreda Piñeiro**

Departamento de Química Analítica – Facultad de Ciencias

SEPTIEMBRE - Curso **2015/16**



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT .....</b>	<b>Pág 1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>Pág 5</b>
2.1 El Selenio .....	Pág 5
2.2 Compuestos organometálicos de selenio.....	Pág 6
2.3 El Selenio en el metabolismo .....	Pág 6
2.4 El Selenio en suelos y alimentos .....	Pág 7
2.5 Nueces de Brasil.....	Pág 9
2.6 Antecedentes en la extracción del selenio y sus especies .....	Pág 10
<b>2.6.1. Extracción asistida por energía de microondas (MAE).....</b>	<b>Pág 11</b>
<b>2.6.2 Tendencias actuales en la extracción de selenio y sus especies .....</b>	<b>Pág 11</b>
2.6.2.1 Extracción asistida por energía de ultrasonidos (US).....	Pág 12
2.6.2.2 Extracción con fluidos presurizados (PLE) .....	Pág 12
2.6.2.3 Hidrólisis enzimática (HE) .....	Pág 14
2.7 Antecedentes en las técnicas de determinación de selenio .....	Pág 15
2.8 Antecedentes en las técnicas híbridas para la separación y determinación de especies de selenio.....	Pág 18
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>Pág 19</b>
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>Pág 21</b>
4.1 Instrumentación y material.....	Pág 21
<b>4.1.1 Aparatos e instrumentos.....</b>	<b>Pág 21</b>
<b>4.1.2 Material.....</b>	<b>Pág 21</b>
4.2 Reactivos .....	Pág 22
4.3 Obtención de la muestra.....	Pág 24
4.4 Pretratamiento de las muestras.....	Pág 24
4.5 Digestión ácida asistida por energía de microondas (MAE).....	Pág 26
4.6 Hidrólisis enzimática asistida por fluidos presurizados (HE-PLE).....	Pág 27
4.7 Determinación de selenio por plasma de acoplamiento inductivo - espectrometría de masas (ICP-MS).....	Pág 29
4.8 Determinación de especies de selenio por cromatografía de líquidos de alta resolución-plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (HPLC- ICP-MS) .....	Pág 30

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	Pág 33
5.1 ``Screening`` de las variables implicadas en la extracción HE-PLE .....	Pág 33
<b>5.1.1 Selección de las variables a estudio</b> .....	Pág 33
<b>5.1.2 Estudio de dispersantes</b> .....	Pág 36
<b>5.1.3 Diseño de experiencias Plackett-Burman</b> .....	Pág 37
<b>5.1.4 Valores de referencia</b> .....	Pág 39
<b>5.1.5 Recuperación analítica</b> .....	Pág 40
<b>5.1.6 Cartas Pareto de orden uno y orden dos</b> .....	Pág 41
5.2. Optimización de variables de un método de extracción HE-PLE.....	Pág 44
5.3 Efecto del disolvente y del activador enzimático.....	Pág 45
5.4 Características analíticas .....	Pág 45
<b>5.4.1 Rectas de calibrado y adición</b> .....	Pág 45
<b>5.4.2 Límites de detección y de cuantificación</b> .....	Pág 47
<b>5.4.3 Precisión y repetibilidad</b> .....	Pág 48
<b>5.4.4 Exactitud</b> .....	Pág 50
5.5 Aplicación a otras muestras .....	Pág 51
<b>6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS</b> .....	Pág 53
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	Pág 57
<b>8. ANEXO</b> .....	Pág 61

## 1. RESUMEN

### *EXTRACCION Y DETERMINACIÓN DE SELENIO Y SUS ESPECIES EN NUECES DE BRASIL*

Hoy en día, la importancia del selenio en la salud humana y la nutrición está ampliamente reconocida; esto es debido a que ciertas especies de selenio (selenoproteínas) participan en importantes procesos fisiológicos. Las nueces de Brasil son uno de los alimentos que contienen los niveles más altos de selenio ( $30 \mu\text{g g}^{-1}$ ). La ingesta diaria de una sola nuez puede ser suficiente para compensar las necesidades de un adulto ( $55 \mu\text{g día}^{-1}$ ). El selenio presente en las nueces de Brasil se encuentra formando parte de diferentes aminoácidos como la selenometionina y la selenocisteína. La selenometionina, especie altamente biodisponible, representa el 75-96% de la concentración de selenio total.

En este trabajo se estudia la viabilidad de la hidrólisis enzimática combinada con la extracción con líquidos presurizados (HE-PLE) para la extracción de selenio y sus especies en nueces de Brasil. El contenido de selenio total se determina por plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICP-MS) y las especies de selenio por cromatografía de intercambio iónico-espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS). La importancia estadística de las variables implicadas en el procedimiento de extracción por HE-PLE (temperatura, tiempo estático, presión, masa de la proteasa y DTT (activador enzimático), pH y concentración de TRIS) se evaluó simultáneamente mediante la aplicación de un diseño experimental Plackett-Burman ( $2^8 * 3/64$ ). La temperatura de extracción resultó estadísticamente significativa y fue optimizada mediante una aproximación univariante.

Las características analíticas del método de extracción y cuantificación (rectas de calibrado y adición, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y exactitud) fueron estudiadas. Finalmente, el método se aplicó a otros alimentos ricos en oligoelementos (baya Inca del Perú, fruto del açai y palmitos).

## 1. RESUMO

### *EXTRACCIÓN E DETERMINACIÓN DE SELENIO E AS SÚAS ESPECIES EN NOCES DO BRASIL*

Hoxe en día, a importancia do selenio na saúde humana e na nutrición é amplamente recoñecida; isto débese a que certas especies de selenio (selenoproteínas) participan en importantes procesos fisiolóxicos. As noces do Brasil son un dos alimentos que conteñen maiores niveis de selenio ( $30 \mu\text{g g}^{-1}$ ). A inxestión diaria dunha única noz pode ser suficiente para compensar as necesidades dun adulto ( $55 \mu\text{g día}^{-1}$ ). O selenio nas noces de Brasil atópase en diferentes aminoácidos como selenometionina e selenocisteína. A selenometionina, é unha especie altamente biodisponíbel, representando un 75-96% da concentración total de selenio.

Neste traballo estúdase a viabilidade da hidrólise enzimática combinada coa extracción con líquidos presurizados (HE-PLE) para a extracción de selenio e das súas especies en noces do Brasil. O contido de selenio total determínase por espectrometría de masas con plasma de acoplamento inductivo (ICP-MS) e as especies de selenio por cromatografía de intercambio iónico-espectrometría de masas con plasma de acoplamento inductivo (HPLC-ICP-MS). A importancia estatística das variables implicadas no proceso de extracción HE-PLE (temperatura, tempo estático, presión, masa de proteasa e DTT (activador de encima), pH e concentración de TRIS) foi avaliada simultaneamente pola aplicación dun deseño experimental Plackett-Burman ( $2^8 * 3/64$ ). A temperatura de extracción foi estatisticamente significativa e optimizouse mediante unha aproximación univariante.

As características analíticas do método de extracción e cuantificación (rectas de calibrado e adición, límites de detección e cuantificación, repetibilidade e exactitude) foron estudadas. Finalmente, o método aplicouse a outros alimentos ricos en oligoelementos (baga Inca do Perú, froito do açá e palmito).

## 1. ABSTRACT

### *“SELENIUM AND SELENIUM SPECIES EXTRACTION AND DETERMINATION IN BRAZIL NUT”*

Nowadays, the importance of selenium in human health and nutrition is widely recognized; this is because certain species of selenium (selenoproteins) involved in important physiological processes. Brazil nuts levels of selenium are high (30  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Daily intake of a single nut is enough to fulfill the needs of an adult (55  $\mu\text{g day}^{-1}$ ). Selenium in Brazil nuts is part of different amino acids as selenomethionine and selenocysteine. Selenomethionine, high bioavailable species, represent 75-96% of the total selenium concentration.

In this paper the feasibility of the enzymatic hydrolysis combined with the pressurized liquid extraction (HE-PLE) for the extraction of selenium and its species in Brazil nuts is studied. Selenium content is determined by inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) and of selenium species is determined by ion exchange chromatography- inductively coupled plasma -mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The statistical significance of variables involved in HE-PLE process (temperature, static time, pressure, protease and DTT (enzyme activator) mass, pH and concentration of TRIS) was evaluated simultaneously by applying a Plackett-Burman design ( $2^8 * 3/64$ ). The extraction temperature was statistically significant and it was optimized by univariate approach.

The analytical characteristics of the method of extraction and quantification (calibration line and addition, limits of detection and quantification, repeatability and accuracy) were studied. Finally, the method was applied to other foods rich in trace elements (Peru Inca berry, açai fruit and palmito).



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El Selenio

El selenio se descubrió en el año 1818 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius. El selenio es un no metal con símbolo Se y número atómico 34, localizado en el cuarto período de la tabla periódica en el grupo de los calcógenos. Las propiedades físicas y químicas que presenta se muestran en la tabla 1 [1].

*TABLA 1.- Propiedades atómicas y físicas del selenio.*

<b>Número atómico</b>	34
<b>Peso atómico</b>	78.963 Da
<b>Configuración electrónica</b>	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>4</sup>
<b>Radio atómico</b>	103 pm
<b>Estados de oxidación</b>	-2, 0, +4, +6
<b>Potencial de ionización</b>	Primero: 941.0 kJ mol <sup>-1</sup>
	Segundo: 2045.0 kJ mol <sup>-1</sup>
	Tercero: 2973.7 kJ mol <sup>-1</sup>
<b>Electroafinidad</b>	-4.21 eV
<b>Electronegatividad (escala de Pauling)</b>	2.55
<b>Punto de fusión</b>	494 K, 221 °C
<b>Punto de ebullición</b>	958 K, 685 °C

La masa atómica estándar del selenio corresponde a 78,963 Da y muestra seis isótopos naturales, cinco de los cuáles son estables: <sup>74</sup>Se, <sup>76</sup>Se, <sup>77</sup>Se, <sup>78</sup>Se, <sup>80</sup>Se. En la tabla 2 se recogen los datos relevantes a los isótopos naturales del selenio [1].

*TABLA 2.- Isótopos naturales del selenio*

<b>Isótopo</b>	<b>Masa atómica (Da)</b>	<b>Composición isotópica representativa (%)</b>	<b>Spin nuclear</b>
<sup>74</sup> Se	73.9224746	0.89	0
<sup>76</sup> Se	75.9192120	9.37	0
<sup>77</sup> Se	76.9199125	7.63	1/2
<sup>78</sup> Se	77.9173076	23.77	0
<sup>80</sup> Se	79.9165196	49.61	0
<sup>82</sup> Se	81.9166978	8.73	0

### 2.2. Compuestos organometálicos de selenio

El selenio se puede encontrar en diferentes formas químicas, que determinan la biodisponibilidad, función y toxicidad en la salud humana. Mientras el selenio inorgánico puede encontrarse en diferentes minerales en forma de selenitos o selenatos, las principales formas orgánicas son los selenoaminoácidos, selenopéptidos y selenoproteínas.

Los compuestos organoselénicos se definen como compuestos químicos con enlaces carbono-selenio. En general, estos compuestos tienen mayor biodisponibilidad que las formas inorgánicas de selenio. Además de su baja toxicidad, juegan un papel importante en los procesos bioquímicos como antioxidantes, anticancerígenos y antivirales. Las principales clases de organoselénicos incluyen selenoles, diseleniuros, selenóxidos, ácidos de selenio, haluros de selenio y compuestos selenoheterocíclicos. Las propiedades de los organoselénicos se parecen a las de sus derivados sulfurados. Por lo tanto, selenoles, seleniuros, y selenóxidos corresponden a tioles, sulfuros, y sulfóxidos. Aunque estructuralmente son similares, los compuestos de selenio y de azufre tienen diferente estabilidad y ruta de síntesis.

El enlace C-Se es más fácil de romper por halógenos y agentes oxidantes que el enlace C-S. Por el contrario, los organoselénicos protegen frente a peróxidos y esta protección es más eficiente que la de los análogos de azufre. Esta selectividad se atribuye a la mayor facilidad del selenio para oxidarse en comparación con el azufre [2,3].

### 2.3. El Selenio en el metabolismo

Los estudios experimentales han revelado que la biodisponibilidad del selenio depende de la forma química de este elemento. El selenio llega al organismo a través de los alimentos ingeridos durante la dieta. El porcentaje total del elemento se distribuye en sus especies, en este caso especies orgánicas como la selenometionina (SeMet) y la selenocisteína (SeCys), y especies inorgánicas como los selenitos y los selenatos.

En el organismo, el metabolismo de las diversas especies de selenio es diferente pero el producto final de todas las transformaciones metabólicas son los seleniuros ( $H_2Se$ ), los cuales se emplean para la donación directa de selenio para la síntesis de las selenoproteínas. El selenio de la SeCys se libera directamente como seleniuro, mientras que la SeMet se debe convertir primero en SeCys para poder liberar seleniuros. En el caso de las formas inorgánicas (selenato y selenito), el selenio se reduce a seleniuro a

través de un intermedio de selenodiglutatión (GS-Se-GS) con NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) y glutatión reductasa.

En la actualidad, se conocen más de 30 selenoproteínas o selenoenzimas con funciones vitales en el organismo. Aunque la función de alguna de ellas se desconoce, la mayoría participan en el control de reacciones redox.

En el sistema inmunitario incrementan la producción de anticuerpos, lo que provoca un aumento en la actividad inmunitaria de las células. El papel protector que juega el selenio frente a agentes oxidantes se debe a su presencia en los centros activos de las enzimas antioxidantes. Una de ellas es la glutatión peroxidasa -GPX, que protege al ADN y los lípidos frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otros peróxidos [1,2].

### 2.4. El Selenio en suelos y alimentos

El estudio de los beneficios del selenio ha suscitado mucho interés para la comunidad científica. Los estudios demuestran que hay una gran correlación entre la concentración de selenio en los suelos o cultivos de una zona geográfica con la cantidad de selenio consumida en la dieta.

La distribución del selenio sobre la superficie de la Tierra es desigual. Algunos lugares, como Enshi (China), las amplias zonas de EEUU y Canadá y porciones de Irlanda, Colombia y Venezuela son áreas con grandes concentraciones de selenio en sus suelos (>5 mg Kg<sup>-1</sup>). Sin embargo, las áreas con menor concentración de selenio en sus suelos (<0.05 mg Kg<sup>-1</sup>) incluyen Keshan (China), Dinamarca, Finlandia, Nueva Zelanda, y la región de Siberia (Rusia).

El nivel de selenio en el suelo no es el único factor que determina el contenido de selenio en alimentos. Las diferentes condiciones fisicoquímicas de los suelos como el pH o el potencial redox son también importantes. Las especies mayoritarias en suelos son el selenito y el selenato. La proporción de cada una de ellas viene determinada según las características del mismo [4].

El selenito es menos biodisponible que el selenato porque se absorbe fuertemente por óxidos de oro y/o hidróxidos. En suelos ácidos, el selenio normalmente se encuentra como selenito férrico, que tiene una solubilidad extremadamente baja y no está disponible para las plantas. En suelos alcalinos, el selenio puede oxidarse a selenato, que es soluble en agua y de esta manera, encontrarse disponible para las plantas. Sin

embargo, no es tan sencillo aumentar el pH, por lo que se recurre a otras opciones como el uso de fertilizantes enriquecidos con selenio [5].

Otro factor importante es la capacidad de las diferentes especies de cultivos o plantas para asimilar y acumular el selenio. Según esta característica, se clasifican en: no acumuladoras, acumuladoras secundarias de selenio y acumuladoras de selenio. La única planta acumuladora de selenio es la *Bertholletia excelsa*, un árbol que produce nueces de Brasil, considerado como el alimento más rico en selenio (800 a 8300  $\mu\text{g}$  por 100 g). *Brassica* (mostaza India, colza, brócoli, y repollo), *Allium* (ajo, cebolla, puerro, y ajopuerro) y algunas especies de setas, pueden clasificarse como acumuladores secundarios de selenio. Los cultivos de cereales como trigo, avena, centeno y cebada, se clasifican como no acumuladores de selenio y por tanto, no son fuentes de selenio.

El contenido típico de selenio en diferentes alimentos se muestra a continuación, en la tabla 3:

**TABLA 3** [6].- *Contenido de selenio total en diferentes alimentos.*

<b>Alimento</b>	<b>[Se] / <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>
<i>Vísceras</i>	
<i>Carnes</i>	0.12 a 3.1
<i>Huevos</i>	
<i>Pescados</i>	
<i>Lácteos</i>	<0.001 a 0.30
<i>Cereales (menos el pan)</i>	0.01 a 0.55
<i>Pan</i>	0.06 a 0.16
<i>Frutas y vegetales</i>	0.001 a 0.02

Las especies principales de selenio en plantas y alimentos de origen animal son selenometionina, selenocisteína, metilselenocisteína y selenato.

El problema que surge es que al cocinar determinados alimentos se reduce el contenido de selenio. Por ejemplo, vegetales como los espárragos y las setas pueden perder hasta 50% del contenido total cuando se cuecen [6].

### 2.5. Nueces de Brasil

Las nueces de Brasil son frutos procedentes de un árbol tropical de la familia de las Lecythidaceae (*Bertholletia excelsa* y *nobilis*) originario de la zona del Amazonas. Los árboles producen más de 150 kg de frutos, de los que cada uno pesa aproximadamente 1 kg y contiene entre 12-20 nueces. Las nueces de Brasil tienen una longitud de entre 3 a 5 cm. El aspecto del fruto y de las nueces de Brasil se muestra en la figura 1.



**FIGURA 1**<sup>[7]</sup>. - A la izquierda se muestra el fruto y a la derecha la nuez de Brasil.

Las cualidades nutricionales a destacar de las nueces son su alto contenido en selenio, magnesio, aminoácidos derivados de azufre, y ácidos grasos esenciales, por lo que podría clasificarse como un alimento con gran potencial nutricional [8]. La composición química que presentan corresponde a un 50-70% de lípidos, 10-20% de proteínas, y un 10-20% de carbohidratos.

Estas nueces contienen concentraciones superiores a  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  de selenio debido a que proceden de la región central de Brasil (Manaos de Belem), donde los suelos son muy ricos en este elemento ( $500 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Otros frutos secos no poseen niveles tan altos de selenio. En la tabla 4 se indica el contenido de selenio total en anacardos, avellanas, cacahuets, nueces comunes, nueces de pecan o nueces de macadamia [9].

**TABLA 4** <sup>[9]</sup>.- Contenido de selenio total en diferentes frutos secos.

Alimento	[Se] / $\mu\text{g g}^{-1}$
<i>Anacardos</i> ( <i>Anacardium occidentale</i> )	0.27
<i>Nueces de macadamia</i> ( <i>Macadamia whelanii</i> )	0.07
<i>Nueces</i> ( <i>Juglans regia</i> )	0.03
<i>Cacahuetes</i> ( <i>Arachis hipogea</i> )	0.04
<i>Avellanas</i> ( <i>Corylus avellana</i> )	0.02
<i>Nueces de pecan</i> ( <i>Carya pecan</i> )	0.02

El consumo de una nuez al día cubre las necesidades básicas de un adulto (en torno a  $55 \mu\text{g día}^{-1}$ ). Por el contrario, comienza a ser tóxico cuando se produce una ingesta prolongada de  $2400\text{-}3000 \mu\text{g día}^{-1}$ . Los síntomas por intoxicación se observan en la fragilidad de las uñas y del pelo, erupciones cutáneas, irritabilidad, náuseas o vómitos. Estos efectos se manifestaron en un 10% de la población China, en la que se llegan a consumir más de  $1000 \mu\text{g día}^{-1}$ .

La especie mayoritaria en las nueces es la selenometionina, correspondiente a un 75-96% de la concentración de selenio total presente en la muestra. Este hecho presenta una gran ventaja, ya que se trata de la especie más biodisponible de las anteriormente descritas [10].

## 2.6. Antecedentes en la extracción de selenio y sus especies

La preparación de muestra se considera como la etapa crítica del análisis. Esta etapa es crucial para aislar los analitos de la matriz. Los problemas principales que pueden ocurrir durante esta etapa son la pérdida de los analitos y la contaminación durante la etapa de preparación de muestra.

A continuación, se muestra el apartado correspondiente a la “extracción ácida asistida por energía de microondas” para la extracción de selenio total, así como; el apartado

relacionado con las “tendencias actuales para la extracción de selenio y sus especies en diferentes matrices”.

### **2.6.1 Extracción ácida asistida por energía de microondas (MAE)**

La energía de microondas es una radiación no ionizante que causa el movimiento de las moléculas debido a la migración de iones y a la rotación dipolar, pero no causa cambios en la estructura molecular. Estos mecanismos permiten la transformación de la energía en forma de calor. En disolventes polares, el calentamiento ocurre por rotación de los dipolos. Estos disolventes se caracterizan por altos coeficientes de pérdida dieléctrica, lo que origina una elevación muy importante de la temperatura. Cuando se trabaja con reactores cerrados, la temperatura alcanzada es mayor que el punto de ebullición del disolvente a presión atmosférica lo que da lugar a altas presiones. Ambos factores, temperatura y presión, afectan a la eficacia y velocidad de la extracción. Se debe monitorizar la temperatura de los reactores por cuestiones de seguridad, evitando la posible explosión del Reactores. La variable temperatura es muy importante ya que aumenta la solubilidad de los analitos, y acelera la desorción del analito de la matriz [11].

La extracción ácida asistida por energía de microondas es un método oficial comúnmente empleado para la determinación de metal total u otros elementos inorgánicos (como el selenio) en diferentes alimentos (nueces de Brasil, pescados, moluscos, algas...) [9-10, 12-14]. Este método de extracción, no se puede aplicar para especiación debido a que se emplean como extractantes mezclas oxidantes, que destruyen la matriz orgánica de la muestra. Su aplicación para especiación, sólo es posible sustituyendo los ácidos por otros extractantes afines con la parte orgánica de los analitos.

### **2.6.2 Tendencias actuales en la extracción de selenio y sus especies de diferentes matrices**

Las nuevas tendencias en química analítica tratan de cumplir las premisas planteadas en la química verde. Los principios de la química verde sirven para formular las principales características de la química analítica verde. Las prioridades son: la eliminación (o al menos, la reducción significativa) de los reactivos, en particular de los disolventes orgánicos, de los procedimientos analíticos; reducción de emisiones de vapores y gases,

así como los residuos líquidos y sólidos generados en el laboratorio; eliminación de reactivos altamente tóxicos de los procedimientos; y reducción del consumo de energía [16].

A continuación, se describen tres métodos afines a los principios de la química analítica verde: hidrólisis enzimática, extracción asistida por energía de ultrasonidos y la extracción asistida por fluidos presurizados.

Estos métodos de extracción se consideran verdes, ya que se emplea la mínima cantidad posible de muestra y de reactivos, no se emplean disolventes tóxicos, y la cantidad de residuos generados es mínima.

### ➤ 2.6.2.1 Extracción asistida por energía de ultrasonidos (US)

La sonicación ultrasónica es una técnica muy empleada debido a que favorece la penetración del extractante en la muestra, incrementando la eficacia de la extracción debido al fenómeno de cavitación. Este fenómeno permite la disminución de la cantidad de muestra, la reducción de disolvente y la minimización del tiempo extracción. Además, permite la extracción de analitos temolábiles.

La radiación de ultrasonidos (25-40 Hz) se desarrolla como una alternativa a la agitación simple. Este tipo de radiación provoca la vibración de las moléculas aumentando la eficacia de los choques entre ellas, por lo que el disolvente difunde fácilmente en la muestra, facilitando el contacto entre las fases [17].

La extracción asistida por energía de ultrasonidos se ha empleado como método de extracción para la determinación del contenido de selenio y sus especies en proteínas de levaduras biofortificadas, empleando agua como fluido extractor [18].

### ➤ 2.6.2.2 Extracción con fluidos presurizados (PLE)

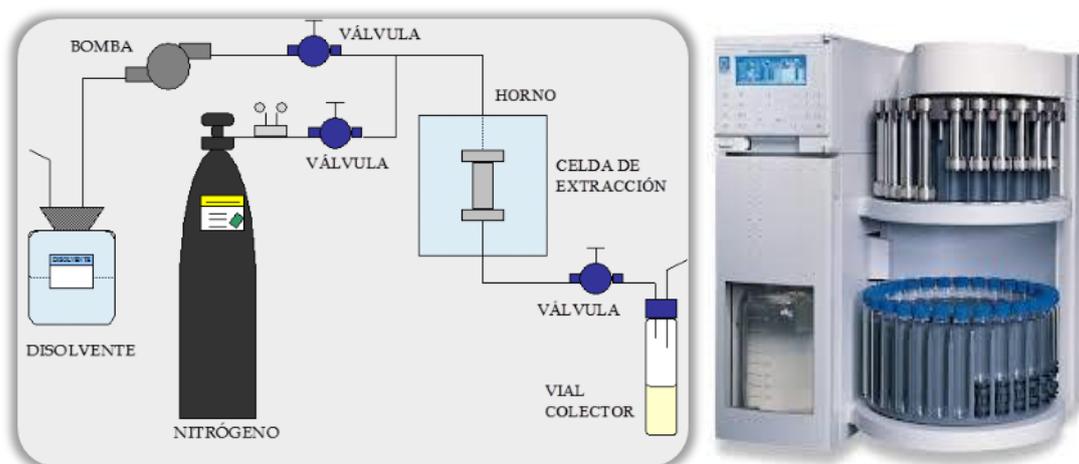
La extracción con fluidos presurizados (PLE) se basa en la extracción de un analito presente en un sólido o semisólido a un líquido que se encuentra a una presión y temperatura elevada.

Las etapas de proceso de extracción son (Figura 2):

1. Llenado de la celda de muestra.
2. Introducción del disolvente y presurización.
3. Calentamiento de la celda, manteniendo la presión constante.
4. Etapa de extracción estática.

5. Transferencia del extractante al vial colector sellado e introducción de nuevo disolvente para lavar la muestra.
6. Purga de la celda con nitrógeno presurizado.
7. Carga de la próxima muestra.

El sistema carga automáticamente las celdas de extracción que contienen la muestra pesada en su interior, y alcanza alta presión para sellar la celda. El disolvente es bombeado a través de la celda hasta que se detecta un pequeño volumen en el vial de recogida. A continuación, se cierra la válvula estática y continúa el bombeo hasta que se alcanza la presión de extracción programada. La presurización de la celda de la muestra durante el calentamiento es controlada abriendo periódicamente la válvula estática y el extracto fluye al vial de recogida. A través del sistema se pasa disolvente puro para limpiar la celda y la línea. Finalmente, se pasa gas a presión para purgar el disolvente que queda en la celda y en la línea, con lo que el sistema queda preparado para proceder a la extracción de la siguiente muestra [19].



**FIGURA 2** [19].- Esquema de los componentes de un extractor de fluidos presurizados.

Este método de extracción también se aplicó a las nueces de Brasil para extraer selenio y sus especies. Para ello, se realizaron ensayos con diferentes agentes extractantes como agua, etanol, metanol y hexano (diferente polaridad para conseguir la extracción de las diversas especies). El rango de temperaturas empleado oscila entre 30 °C y 120 °C (disolventes sobrecalentados) en función del disolvente empleado. Las presiones con las que se trabaja son muy elevadas en torno a los 1500 psi, lo que permite que los disolventes se encuentren en estado líquido a altas temperaturas. Esta característica

también permite que el proceso de extracción se acelere consiguiendo alcanzar tiempos de extracción en torno a 7-10 min en algún caso [20].

Otra aplicación de la técnica, corresponde a la extracción de selenio y sus especies en levaduras biofortificadas. Para ello, emplearon como fluido extractante una mezcla (1:1, v:v) de H<sub>2</sub>O:MeOH a 1600 psi y 160°C. El tiempo de extracción se fijó en 10 minutos [21].

### ➤ 2.6.2.3 Hidrólisis enzimática (HE)

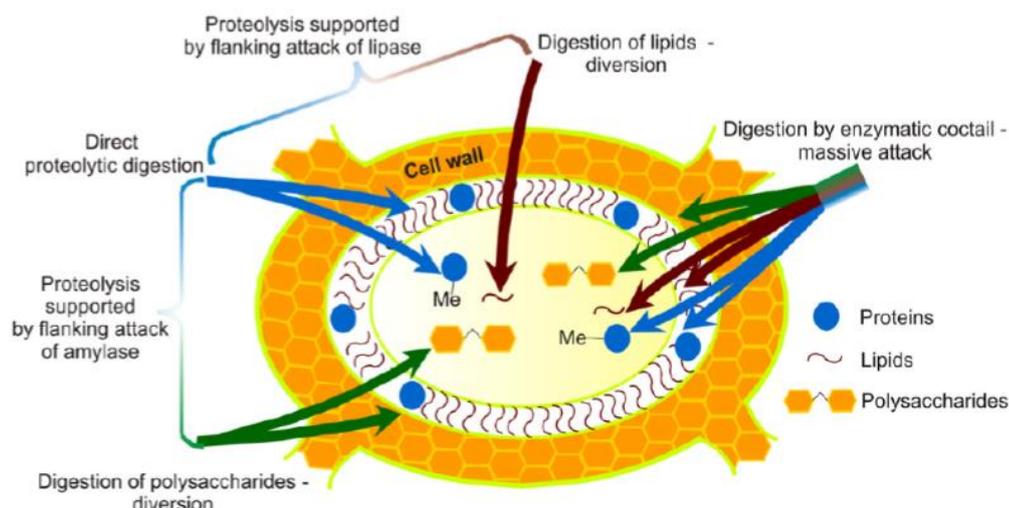
La hidrólisis enzimática (HE) abarca un grupo de procedimientos que consisten en la hidrólisis de biomoléculas por rotura de ciertos enlaces permitiendo la liberación de los analitos de interés de la matriz de la muestra.

La principal ventaja es su selectividad debido a que las enzimas actúan sólo en ciertos enlaces químicos, lo que permite distinguir fracciones de elementos unidos a diferentes componentes de la matriz de la muestra. En la figura 3 se indica un esquema de la hidrólisis enzimática de biomoléculas en la célula.

Los factores que influyen en la eficacia de la digestión enzimática son el pH, la temperatura, la proporción enzima/cantidad de muestra, la fuerza iónica, el tiempo y las condiciones de almacenaje de la enzima, la presencia de activadores e inhibidores, y la homogenización de la enzima/disolución tampón mezclada con la muestra [11].

La enzima debe ser seleccionada cuidadosamente basándose en la naturaleza de la muestra, en función de su contenido en proteínas (enzimas proteolíticas), grasas (lipasas) o carbohidratos (amilasa y celulasa). En este trabajo, la enzima empleada es la proteasa, ya que se encontraron evidencias bibliográficas acerca de la presencia de selenio enlazado a las proteínas de las nueces. Esta enzima hidroliza los enlaces peptídicos de proteínas y péptidos, reduciéndolos a aminoácidos.

La hidrólisis enzimática se ha empleado para diferentes alimentos como el arroz, pescados y moluscos, frutos secos, leche o patatas [22-26].



**FIGURA 3 [11].**-Esquema de la hidrólisis enzimática de biomoléculas.

La principal limitación de la hidrólisis enzimática es el tiempo necesario para que la extracción sea cuantitativa. La mayoría de las hidrólisis presentan unos tiempos de incubación de 16-24 horas.

La combinación de la hidrólisis enzimática con otras técnicas de extracción como extracción asistida por energía de ultrasonidos y microondas o fluidos presurizados, resulta muy atractiva debido a que se acelera la cinética de extracción, alcanzando extracciones cuantitativas en minutos. Esta reducción del tiempo es debida fundamentalmente a la rápida y eficiente ruptura de las membranas o paredes celulares, lo que permite un rápido ataque de la enzima a los componentes liberados.

La combinación de hidrólisis enzimática con la energía de microondas ha sido aplicada para la extracción de selenio y sus especies en arroz y pescados [27, 28]. Esta misma combinación con la energía de ultrasonidos se ha empleado en levaduras biofortificadas [29]. Por el contrario, no se ha encontrado bibliografía en la que se recoja la combinación de la hidrólisis enzimática con fluidos presurizados.

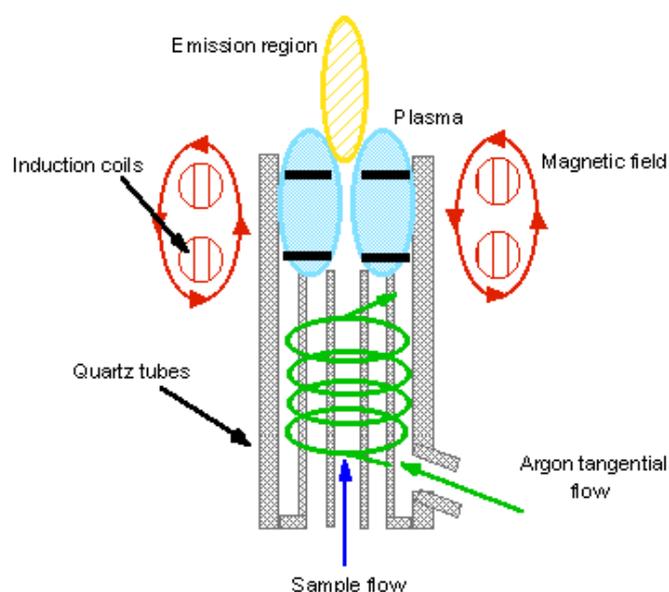
## 2.7. Antecedentes en las técnicas de determinación de selenio

Se han empleado diversas técnicas de detección para la determinación del contenido total de selenio. Entre ellas se pueden citar: Generación de hidruros-Espectrometría de fluorescencia atómica (HG-AFS), Generación de Hidruros-Espectrometría de Absorción atómica (HG-AAS), Plasma de Acoplamiento Inductivo- Espectrometría de masas (ICP-MS), etc [30].

El ICP-MS es la técnica de detección más empleada para el análisis de elementos inorgánicos en alimentos. Esta técnica instrumental posee grandes beneficios debido a la gran sensibilidad y selectividad que presenta para análisis multielemental. Pese a ello, presenta algunos inconvenientes, como el alto coste de la instrumentación y la validez exclusiva para extractos o muestras líquidas.

La introducción de la muestra se realiza mediante la aspiración a una cámara de nebulización, donde por efecto Venturi se convierte en un aerosol con partículas finas en suspensión. Posteriormente, se arrastran al plasma mediante la corriente de argón.

El plasma es de un gas inerte como el argón, siendo los cationes de argón y los electrones las principales especies conductoras. Los iones de argón son capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura a un nivel tal que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente; alcanzando la temperatura hasta 10000 K. La fuente de energía empleada es la de generadores de radiofrecuencias porque es la que proporciona mayor sensibilidad y menor número de interferencias. En la figura 4 se muestra un esquema de la generación de un plasma mediante energía de radiofrecuencia.



**FIGURA 4** <sup>[31]</sup>.- Antorcha del plasma de argón

El inconveniente más relevante de esta técnica reside en la presencia de interferencias poliatómicas y/o isobáricas debidas al efecto matriz o a la formación de especies con el argón. El uso de espectrómetros de doble enfoque con alta resolución es una buena alternativa para salvar las interferencias de ICP-MS, aunque el uso de analizadores tipo cuadrupolo en combinación con celdas de colisión-reacción es la opción más

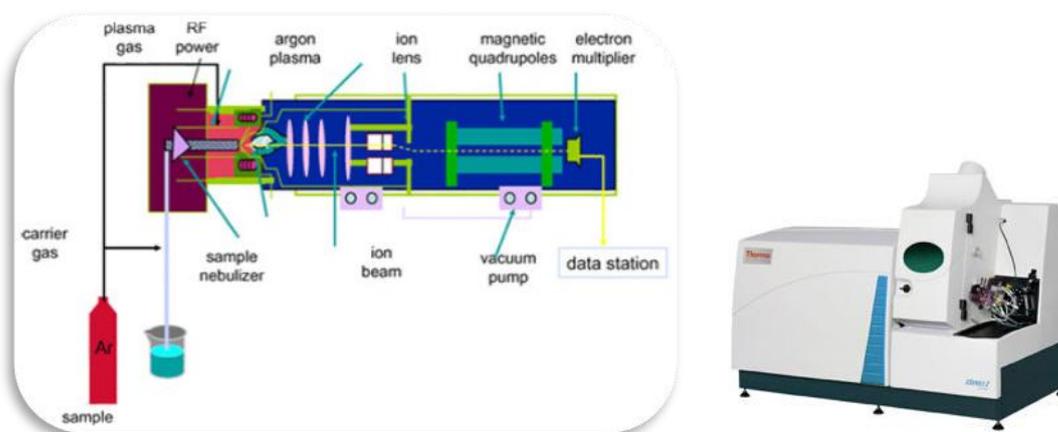
## 2. INTRODUCCIÓN

comúnmente empleado en los análisis de rutina en los laboratorios. En este caso, la optimización del flujo del gas de colisión-reacción es importante para reducir las interferencias poliatómicas en el plasma.

A continuación, los iones se introducen en el analizador (cuadrupolo) del espectrómetro de masas a través de unos conos metálicos (interfase). Se trabaja siempre en condiciones de alto vacío hasta la detección para que no se desvíe la trayectoria de los iones y que sólo se separen en función de su relación masa/carga.

El sistema puede permitir el paso al detector de una sola relación  $m/z$  o de varias mediante la variación continua del intervalo de radiofrecuencias. En la figura 5 se muestra un esquema de los componentes del equipo de ICP-MS.

El detector está compuesto por multiplicadores de electrones y su función es convertir el haz de iones en una señal eléctrica proporcional. Los iones cuando llegan al primer dínodo arrancan electrones debido a que se aplica en la superficie un potencial de 2 kV, generándose cada vez más electrones en cada impacto [30].



**FIGURA 5** [32].-Plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas. A la izquierda se muestra un esquema del interior del equipo y a la derecha se muestra el equipo comercial.

## **2.8. Antecedentes en las técnicas híbridas para la separación y determinación de especies de selenio**

La identificación y cuantificación de diferentes especies elementales, se suele llevar a cabo mediante técnicas analíticas acopladas. Estas técnicas se denominan híbridas debido a que el proceso de separación y detección ocurre on-line. El proceso de separación es, por lo general, algún tipo de cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada a un detector que ofrezca la selectividad y sensibilidad que se requiere en los estudios de especiación. En el caso de la cuantificación de elementos traza, se recurre a la combinación con las técnicas de espectrometría de masas atómica. Estas técnicas han sido aplicadas a la especiación de selenio en levaduras biofortificadas. Entre ellas, se puede citar la combinación HPLC-HG-MP-AES [33], HPLC-HG-AFS [34] y HPLC-ICP-MS.

El acoplamiento HPLC-ICP-MS es el más empleado en la especiación de selenio en diferentes alimentos (arroz, frutos secos, pescados y moluscos, leche...) [22-26].

La separación de las especies mediante HPLC se suele realizar con columnas de intercambio aniónico PRP-X-100, aunque otros autores han empleado otro tipo de columnas, como las de intercambio catiónico PRP-X-200 o las columnas Xterra MS C18. Así mismo, las fases móviles más utilizadas son citrato amónico (pH=5), dihidrogenofosfato amónico (pH=7), TEACl (Cloruro de tetraetilamonio) (pH=4.5), acetato amónico (pH=7) y formiato de pirimidina (pH=2.8) [35-41].

### 3. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo se centra en la optimización de un método de extracción del selenio y sus especies en nueces de Brasil mediante HE y PLE. En primer lugar, se lleva a cabo la selección de las variables que influyen en el proceso de extracción mediante un método que combina la hidrólisis enzimática con la extracción con fluidos presurizados (HE-PLE). El *screening* de variables se realiza mediante un diseño de experiencias Plackett-Burman (PBD) con el fin de seleccionar aquellas variables estadísticamente más importantes. La variable respuesta seleccionada es el porcentaje de recuperación analítica, empleando como "valor verdadero" la concentración de selenio obtenida por un método de extracción ácida asistida por energía de microondas (MAE). La influencia de cada una de las variables se evalúa mediante la representación de las cartas Pareto de orden uno y orden dos. Posteriormente, se realiza la optimización de aquella(s) variable(s) estadísticamente significativas.

Se comprueba la existencia de efecto matriz, realizando comparaciones estadísticas entre las rectas de calibrado y las de adiciones estándar (ambas con Ge como patrón interno para compensar las fluctuaciones instrumentales). Se obtienen las características analíticas del método correspondientes a estudios de exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y límites de cuantificación.

Por último, se realiza la aplicación del método a otros alimentos de la zona amazónica como bayas incas del Perú, fruto del açai y palmito peruano.



## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Instrumentación y material

#### 4.1.1 Aparatos e instrumentos

- Balanza electrónica AND modelo ER-180A, de precisión  $\pm 0.0001$ g (Thebarton SA, Australia).
- Balanza granataria GRAM modelo SV-510ix, de precisión  $\pm 0.001$ g (Barcelona, España).
- Medidor de pH GLP21 Crison (Barcelona, España).
- Micropipetas Eppendorf de volumen fijo y variable (Hamburgo, Alemania).
- Molinillo de café doméstico Moulinex (Alençon, Francia).
- Tamiz de acero inoxidable con perforación cuadrada de luz 0.50 mm, Retsch (Düsseldorf, Alemania).
- Rotavapor Büchi R-3000 (Postfach, Suiza).
- Soxhlet Büchi B-811.
- Microondas Anton Paar Multiwave, Perkin-Elmer (Graz, Austria), provisto de un sistema de 6 reactores Anton Park de alta presión de teflón.
- ASE-200 Dionex (Sunnyvale, CA, EEUU) equipado con celdas de acero inoxidable de 11 mL y filtros de celulosa (D28, 1.983 cm diámetro, Dionex).
- ICP-MS Thermo Finnigan X series 2 (Waltham, MA, EEUU).
- HPLC UltiMateO 3000 LC de Dionex, equipado con una bomba de gradiente GP50 (Dionex), un compartimento termal AS50 (Dionex) y un automuestreador AS50 (Dionex). Columna de intercambio aniónico Hamilton PRP X-100 (250 mm, 4.1 mm i.d.) acoplada a una precolumna (25 mm, 2.3 mm i.d.) (Reno NV, USA).

#### 4.1.2 Material

- Material volumétrico de vidrio de clase A.
- Espátulas de plástico.
- Embudos de plástico.
- Cartuchos de celulosa para Soxhlet, previamente lavados con hexano.

## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Papel filtrante Whatman grado 40.
- Botes de plástico de 25 mL para conservar los extractos.
- Mortero de Ágata con mano de 10 cm de diámetro exterior.

El material de uso general en el laboratorio (botes, espátulas, embudos y material volumétrico) se deja sumergido en un baño de HNO<sub>3</sub> al 10% (V/V) durante 48 horas para eliminar la contaminación metálica. Una vez hecho esto, se enjuaga con abundante agua Milli-Q.

### 4.2 Reactivos

- Extracción de la grasa (pretratamiento de la muestra):
  - n-Hexano UniSolv®, para análisis de trazas orgánicas, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Digestión ácida:
  - HNO<sub>3</sub> concentrado, 69-70%, J.T.Baker (Phillipsburg, PA, EEUU).
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33%, (Panreac, Barcelona, España).
- Hidrólisis enzimática:
  - Octadecyl-functionalized silica gel, 60-100 mesh, Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EEUU).
  - Nitrógeno X50S 99.9999% (Carburos metálicos, Barcelona, España).
  - Proteasa de *Streptomyces griseus*, tipo XIV, Sigma-Aldrich.
  - DL-Ditiotreitol (DTT) ≥99.5%, BioUltra, para biología molecular, SigmaAldrich.
  - Se prepararon las siguientes disoluciones tampón:
    - Disolución tampón TRIS-HCl de [TRIS]=30mM y pH=8
    - Disolución tampón TRIS-HCl de [TRIS]=30mM y pH=7
    - Disolución tampón TRIS-HCl de [TRIS]=60mM y pH=8
    - Disolución tampón TRIS-HCl de [TRIS]=60mM y pH=7

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Para la preparación de estas disoluciones tampón se emplearon los reactivos:
  - $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hidroximetil)-metilamina (TRIS) 99.9%, ultrapuro, Sigma-Aldrich.
  - HCl 36.5-38%, J.T.Baker.
- Disoluciones patrón:
  - Disolución estándar de SeCys<sub>2</sub> (1000 g L<sup>-1</sup>) preparada disolviendo la cantidad apropiada de SeCys<sub>2</sub> (seleno-L-cistina 95%), Sigma Aldrich.
  - Disolución estándar de SeMet (1000 g L<sup>-1</sup>) preparada disolviendo la cantidad apropiada de SeMet (seleno-D,L-metionina 99%), Sigma Aldrich.
  - Preparación de disolución patrón a partir de disoluciones madre de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Se, SCP SCIENCE (Canadá).
  - Patrón interno de Ge e Y de  $10 \pm 2$  mgL<sup>-1</sup>, Panreac.
- Cromatografía de líquidos:
  - Ácido cítrico 99%, Merck (Poole, UK).
  - Amoniac 25%, Panreac.
  - Metanol gradient grade, Merck.
- Agua Milli-Q con resistencia superior a 18 M $\Omega$ cm<sup>-1</sup> obtenida mediante el dispositivo Milli-Q purification, Millipore Co (Bedford, MA, EEUU).
- HNO<sub>3</sub> al 10% (v/v) para el lavado del material general preparado a partir de HNO<sub>3</sub> concentrado, 69-70%, J.T.Baker.

### 4.3 Obtención de la muestra

Las muestras son frutos procedentes de la zona del Amazonas. Esta región es muy destacada por la riqueza de selenio en sus tierras. Algunos de estos alimentos son exportados a España, donde se pueden adquirir en supermercados locales o tiendas especializadas en este tipo de productos.

La nuez de Brasil es la matriz seleccionada para llevar a cabo la optimización del método debido a su reconocimiento como el alimento más rico en selenio. Así mismo, se aplicará el método a otros alimentos ricos en oligoelementos como el fruto del açai (*Euterpe oleracea*), el palmito peruano (*Euterpe edulis*) o la baya inca del Perú (*Physalis peruviana*).



**FIGURA 6** <sup>[42]</sup>. - En orden de izquierda a derecha: fruto del açai, baya inca del Perú y palmito peruano.

### 4.4 Pretratamiento de las muestras

En primer lugar, para obtener una muestra representativa se trocean con un cuchillo de acero inoxidable nueces de Brasil procedentes de dos paquetes diferentes y a continuación, se introducen en un molinillo en el que se tritura a pulsos. La pasta resultante una vez homogeneizada se almacena en un recipiente de plástico, conservando en la nevera la cantidad que se vaya a desgrasar y congelando la cantidad restante para otros estudios.

La baya Inca del Perú se tritura y homogeniza. Los palmitos peruanos (figura 7) se cortan con el cuchillo, se liofilizan hasta eliminar toda la humedad (90%, m/m), se trituran y se tamizan, obteniéndose un polvo fino. El fruto del açai no requiere de ningún pretratamiento previo porque ya se comercializa en polvo.

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



**FIGURA 7.-** Muestra de palmito peruano, palmito tras ser troceado y palmito liofilizado.

Posteriormente, se desgrasan los alimentos (nuez de Brasil y baya Inca del Perú) en un Soxhlet. Para llevar a cabo la extracción de la grasa, la muestra se pesa en el interior de un cartucho de celulosa lavado y seguidamente, se sitúa en el cuerpo de un Soxhlet automático. El disolvente seleccionado se introduce en los vasos de vidrio de la parte inferior del cuerpo, llenándolos hasta  $3/4$  de su contenido total. Basándose en la experiencia del grupo de investigación, se emplea como disolvente hexano, por su menor toxicidad frente al indicado en las normas UNE 55016 [43] y UNE 55030 [44] que recomienda el uso de éter de petróleo para muestras de piensos y de aceitunas. El programa empleado se basa en la realización de 20 ciclos de extracción en el Soxhlet automático y una duración aproximada de 14 horas.

Al finalizar el proceso de extracción, se obtienen las muestras desgrasadas, que posteriormente son tamizadas a través de una luz de malla de 0.50 mm. Se conserva a temperatura ambiente en un recipiente de plástico.

Por otra parte, se obtiene la fracción grasa de los alimentos disuelta en el hexano empleado. El disolvente de extracción se evapora en rotavapor a una presión en torno a 150 bar y se conserva la grasa en un recipiente de plástico en la nevera ( $4^{\circ}\text{C}$ ). El aspecto de las muestras desgrasadas y su fracción grasa se muestra en la figura 8.

La masa de grasa se calcula mediante la diferencia entre el peso del matraz con la grasa y el matraz vacío. El porcentaje de grasa se determina dividiendo la masa de grasa entre la masa de muestra depositada en el cartucho.

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de grasa en las nueces de Brasil es elevado ( $60 \pm 0.6 \%$ ), lo que coincide aproximadamente con la información nutricional indicada en la etiqueta del producto ( $65 \%$ ). Por otro lado, el contenido graso de la baya inca del Perú es muy inferior ( $6 \pm 0.7 \%$ ).



**FIGURA 8.-** (A) Muestra de nuez de Brasil, fracción desgrasada y fracción grasa obtenida tras extracción Soxhlet. (B) Muestra de Baya inca del Perú y su fracción grasa obtenida tras extracción Soxhlet.

#### **4.5 Digestión ácida asistida por energía de microondas (MAE)**

La digestión ácida se emplea para obtener la concentración de selenio en las diferentes fracciones de las muestras (muestra sin desgrasar, muestra desgrasada y su grasa), con el objetivo de tener valores de referencia para comparar las concentraciones de selenio obtenidas mediante el método de estudio (HE-PLE). En primer lugar, se deben lavar los reactores con agua regia antes de introducir la muestra para evitar contaminación. A continuación, se pesan réplicas de aproximadamente 0.3 g en el interior de los reactores de teflón del microondas, y se adiciona la cantidad correspondiente de agua Milli-Q, peróxido de hidrógeno y ácido nítrico. Las proporciones de muestra y reactivos se indican en la tabla 5.

TABLA 5.- Condiciones de la digestión ácida y programa de microondas empleado.

<b>DIGESTIÓN ÁCIDA</b>				
<b>Reactor</b>	<b>Masa de muestra (g)</b>	<b>V<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> (mL)</b>	<b>V<sub>HNO<sub>3</sub></sub> (mL)</b>	<b>V<sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mL)</b>
<b>R1</b>	0.3	2	4	3
<b>Blanco</b>	-	2	4	3
<b>PROGRAMA DEL MICROONDAS</b>				
<b>Potencia (W)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Potencia (W)</b>	<b>Ventilador</b>	
<b>0</b>	2.50	450	1	
<b>450</b>	6.00	700	1	
<b>700</b>	5.00	1000	1	
<b>1000</b>	10.00	1000	1	
<b>0</b>	40.00	0	3	

Una vez finalizado el programa, se trasvasan los extractos a matraces aforados de 25 mL y se enrasa con agua Milli-Q. Posteriormente, se depositan las disoluciones obtenidas en botes de plástico y se conservan en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.6 Hidrólisis enzimática asistida por fluidos presurizados (HE-PLE)**

Se pesan aproximadamente 0.25 g de muestra desgrasada y se trasladan a un mortero de ágata. A continuación, se añaden 25 mg de proteasa y 25 mg de DTT y se homogeniza. Posteriormente, se añaden 1.25 g de agente dispersante (C18) y se homogeniza la mezcla para que las pequeñas partículas de muestra queden rodeadas de dispersante, favoreciendo el proceso de extracción del analito. La mezcla de dispersante-muestra se introduce en una celda de acero inoxidable de 11 mL y se sitúa en el carrousel del Dionex ASE-200 (figura 9).

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



**FIGURA 9.-** Esquema del procedimiento de llenado de celdas del Dionex ASE-200.

Por último, se introduce el fluido extractor seleccionado (TRIS-HCl) en el reservorio del equipo y se programa con el software la temperatura, la presión y el tiempo. Las proporciones empleadas de reactivos, así como las condiciones de la extracción, se indican en la tabla 6.

**TABLA 6.-** Condiciones de la extracción de hidrólisis enzimática asistida por fluidos presurizados (HE-PLE).

Código	Variable	Valor	Unidades
A	Temperatura	40	°C
B	Tiempo de extracción	5	min
C	Presión	1000	psi
D	Masa de proteasa	0.025	g
E	pH	8.0	
F	[TRIS]	60	mM
G	Masa de DTT	0.025	g
<b>Masa de dispersante (C18)</b>		1.25	g
<b>Masa de muestra</b>		0.25	g
<b>Número de ciclos</b>		1	
<b>Tiempo de purga (N<sub>2</sub>)</b>		60	s

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los extractos obtenidos en cada una de las experiencias se filtran con ayuda de embudos de plástico y papeles de filtro Whatman de grado 40. Los filtrados se recogen directamente sobre matraces aforados de 25 mL y se enrasan con agua Milli-Q. Posteriormente, se depositan las disoluciones obtenidas en botes de plástico y se conservan en el congelador a -20°C. Una alícuota de las disoluciones se filtra a través de Syringe-driven filter unit de Millex de 0.45  $\mu\text{m}$  y se introduce en viales para cromatografía.

Una vez finalizada la etapa de extracción, el lavado de las celdas se realiza con metanol a 100 °C mediante 1 ciclo de 5 minutos por celda.

#### **4.7 Determinación de selenio por plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICP-MS)**

La determinación de la concentración de selenio total presente en los extractos (ácidos y enzimáticos) se realiza mediante ICP-MS. La medida de los extractos se lleva a cabo tras una dilución 1:2.5, para ello se pipetea 3960  $\mu\text{L}$  de extracto, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado, 20  $\mu\text{L}$  de patrón interno ( $\text{Ge}^{72}$ , 10  $\text{mgL}^{-1}$ ), y se completa hasta 10 mL con agua Milli-Q (6000  $\mu\text{L}$ ). Si se observa turbidez en alguna réplica, se debe filtrar para evitar que se ensucien los conos del equipo. Es importante recalcar que en el caso de las digestiones ácidas es más relevante la dilución, porque no se puede introducir ácido concentrado en el atomizador (es necesario realizar diluciones para mantener el nivel de ácido nítrico por debajo del 15%).

Para la cuantificación de selenio, se realizó un calibrado acuoso y adiciones estándar. Los rangos de calibración van desde 0 a 2000  $\mu\text{gL}^{-1}$  (n=11) para los isótopos  $^{76}\text{Se}$  y  $^{82}\text{Se}$ . La cuantificación se realizó por el método de adiciones estándar (utilizando Ge como patrón interno, 10  $\text{mgL}^{-1}$ ) al existir efecto matriz.

Previo a la determinación se realiza una comprobación de la intensidad de la señal de una disolución patrón (TUNE) para la medida de metales con masas bajas, altas y medias, así como los porcentajes de los posibles interferentes. El número de cuentas de cada uno de los metales y el porcentaje máximo de interferentes viene indicado por el fabricante, en caso de que se superen deben modificarse las condiciones de trabajo hasta alcanzar los valores óptimos. Las condiciones seleccionadas para la determinación de selenio se incluyen en la tabla 7.

TABLA 7.- Condiciones óptimas de trabajo en ICP-MS.

ICP-MS	
<b>GENERAL</b>	
Poder de radiofrecuencia (W)	1380
Velocidad de la bomba peristáltica (rpm)	0,45
Tiempo de estabilización (s)	35
Número de réplicas	4
Tipo de nebulizador	Micromist
<b>FLUJO DE GAS (Ar)</b>	
Plasma (Lmin <sup>-1</sup> )	17
Gas auxiliar (Lmin <sup>-1</sup> )	1,65
Flujo tangencial (Lmin <sup>-1</sup> )	0,27
Nebulizador (Lmin <sup>-1</sup> )	0,98
<b>ALINEAMIENTO DE LLAMA</b>	
Distancia del inyector a la antorcha (mm)	7
<b>ELEMENTO/MASA</b>	Se <sup>78</sup> y Se <sup>82</sup>
<b>PATRÓN INTERNO</b>	Ge <sup>72</sup>

#### 4.8 Determinación de especies de selenio por cromatografía de líquidos de alta resolución-plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS)

El método de separación de las especies de selenio (selenocisteína, selenometionina, selenometilcisteína, selenito y selenato) mediante HPLC y detección ICP-MS utilizado en este trabajo fue desarrollado en el año 2015 en el grupo de investigación QANAP [45]. Tras la realización de varios experimentos con disoluciones patrón de las diferentes especies de selenio (con una concentración de 50 µg L<sup>-1</sup>) y empleando un volumen de inyección de 25µL, se seleccionaron como condiciones más adecuadas para la separación de las especies de selenio las indicadas en la tabla 8. Así mismo, se muestra en la figura 10 un cromatograma de un patrón de SeCys<sub>2</sub> y SeMet y en la figura 11 el cromatograma de un extracto enzimático de nuez de Brasil desgrasada. Se puede observar que ambas especies están presentes en la muestra y que la especie selenometionina es la mayoritaria.

Para la cuantificación de especies de selenio, se realizó un calibrado acuoso y adiciones estándar. Los rangos de calibración van desde 0 a 200 µg L<sup>-1</sup> (n=5) para la selenocistina

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

y de 0 a 2000  $\mu\text{gL}^{-1}$  (n=5) para la selenometionina. La cuantificación se realizó por el método de calibrado acuoso (utilizando Ge como patrón interno, 10  $\text{mgL}^{-1}$ ) al no existir efecto matriz.

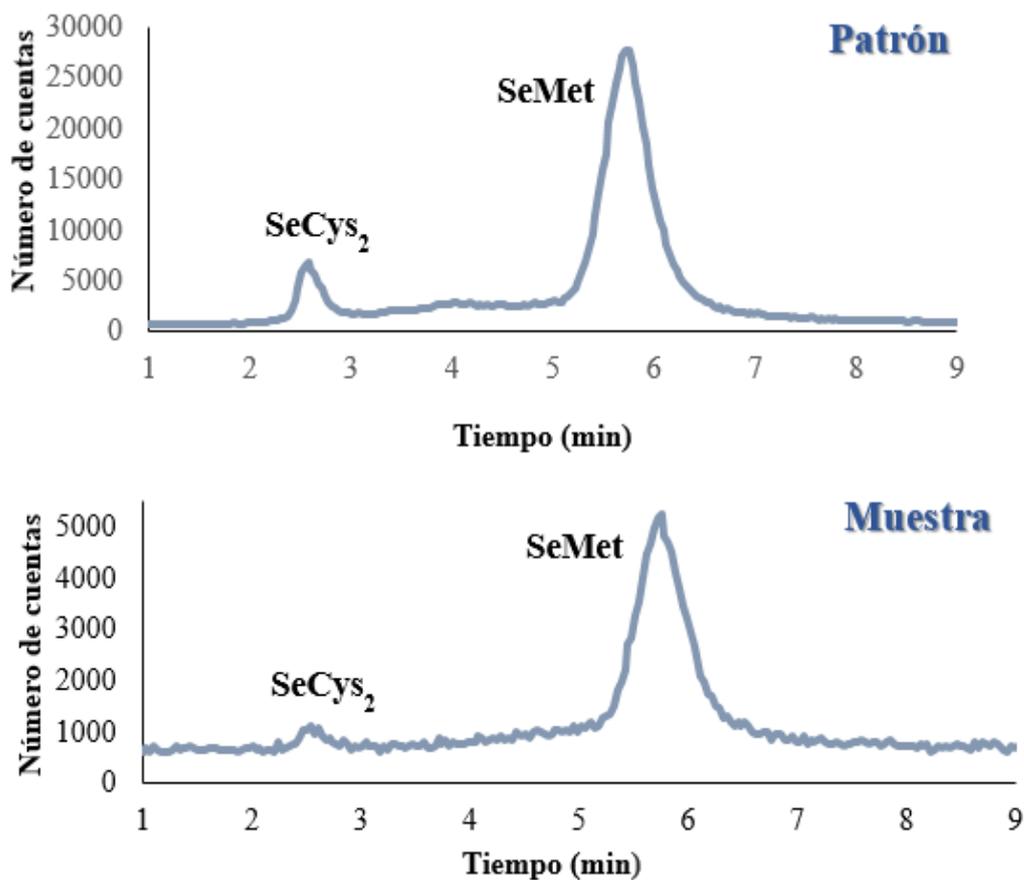
**TABLA 8<sup>[45]</sup>.**- *Parámetros de la fase móvil y de la fase estacionaria para la separación de las especies de selenio.*

---

<b>HPLC</b>	
<b>PARÁMETROS DE LA FASE MÓVIL</b>	
Fase Móvil A	Agua Milli-Q
Fase Móvil B	25 mM Ácido cítrico, 2.0% (v/v) MeOH (pH=5)
	t=0 min; 100% A, 0% B
	t=4 min; 0% A, 100% B
Gradiente	t=9 min; 100% A, 0% B
	t=13 min; 100% A, 0% B
Flujo de la Fase Móvil	0.9 mL min <sup>-1</sup>
Inyección	25 $\mu\text{L}$
<b>PARÁMETROS DE LA FASE ESTACIONARIA</b>	
Hamilton PRP X-100 (250 x 4 mm d.i.) columna de intercambio aniónico y precolumna (25mm x 2.3mm d.i.)	

---

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



**FIGURA 10 y 11.-** (A) Cromatograma de un patrón de las especies de selenio SeCys<sub>2</sub> ( $t_R = 2.5$  min) y SeMet ( $t_R = 5.8$  min). (B) Cromatograma de las especies SeCys<sub>2</sub> ( $t_R = 2.5$  min) y SeMet ( $t_R = 5.8$  min) presentes en la muestra.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ``Screening`` de las variables implicadas en la extracción mediante HE-PLE

Actualmente, la estadística es una herramienta fundamental para interpretar los resultados obtenidos a partir de un método analítico, así como para determinar las variables más importantes del mismo y su posible optimización. Algunas de las variables pueden ser evidentes, pero hay posibilidad de que existan otras menos aparentes que tengan una influencia notable en la respuesta. La solución más eficaz es recurrir a diseños de experiencias como Plackett-Burman, basado en un método estadístico que reduce el número de experimentos a realizar y produce datos de gran utilidad [46].

#### 5.1.1 Selección de las variables a estudio

Las variables que influyen en la extracción, así como los rangos de trabajo empleados, se han basado en búsquedas bibliográficas. Las variables a estudio seleccionadas mediante este criterio, han sido: temperatura, tiempo, presión, masa de proteasa y de activador enzimático (DTT), pH y concentración de TRIS. Las variables fijadas para el estudio, corresponden a: número de ciclos, ratio (masa dispersante/masa muestra) y tiempo de purga. En la tabla 9, se muestran las variables a estudio con sus valores alto y bajo [47-50].

**TABLA 9**<sup>[47-50]</sup>.- Selección de las variables a estudio para el método de extracción por HE-PLE.

<b>Código</b>	<i>Variables</i>	<i>Valor bajo (-)</i>	<i>Valor alto (+)</i>	<i>Unidades</i>
<b>A</b>	Temperatura	20	40	°C
<b>B</b>	Tiempo	5	15	min
<b>C</b>	Presión	1000	2000	psi
<b>D</b>	Masa de proteasa	0.025	0.050	g
<b>E</b>	pH	7	8	
<b>F</b>	[TRIS]	30	60	mM
<b>G</b>	Masa de DTT	0	0.025	g
<b>H</b>	Variable fantasma	-1	+1	

➤ **Variables a estudio**

La **temperatura de extracción (A)** afecta a los coeficientes de distribución y a la cinética de la extracción; la temperatura permite la ruptura de las interacciones analito-matriz, el proceso de desorción se mejora, y se reduce la viscosidad del disolvente. Esto permite mayor penetración en las partículas de la matriz y la aceleración del proceso de difusión. Las temperaturas mínima y máxima permitidas en el sistema PLE son la temperatura ambiente y 200 °C, respectivamente [47-48]. La variable temperatura se estudia en el rango de temperaturas de 20 a 40 °C, ya que la actividad enzimática ocurre a temperaturas relativamente bajas.

El **tiempo de extracción (B)** afecta al rendimiento de la extracción. Cuando el tiempo aumenta, el porcentaje también mejora hasta que se alcanza el valor máximo, a partir de ese momento se mantiene constante. El tiempo se estudia entre 5-15 minutos [47-48].

La **presión (C)** mantiene al disolvente en estado líquido a elevadas temperaturas y ayuda al disolvente a penetrar en los poros de la matriz. La mínima y la máxima presión permitida en PLE corresponden a 500 y 3000 psi, respectivamente. La variable presión se estudia en el rango de 1000 a 2000 psi [47-48].

La **masa de proteasa (D)** se estudia entre 0.025 g y 0.050 g. Es la cantidad de enzima empleada en la reacción de hidrólisis. A la hora de estudiar este parámetro hay que tener en cuenta que el uso de cantidades elevadas de enzima puede disminuir la respuesta de

los instrumentos analíticos. La proporción de enzima/cantidad de muestra que se suele emplear suele ser 10 g de enzima/100 g de muestra [50].

El **pH (E)** se estudia en el rango de 7 a 8. Las enzimas pueden dividirse en tres grupos: activas en disolución ácida, neutra o alcalina. Se prefieren disoluciones neutras o alcalinas por ser 7.4 el pH del citosol (matriz citoplasmática de la célula) [49].

La **concentración de TRIS (F)** se estudia entre 30 mM y 60 mM. El Tris es un compuesto orgánico que se utiliza para preparar las disoluciones tampón. Es frecuentemente empleado cuando se trabaja con enzimas y medios biológicos, ya que tampona en un rango de pH fisiológico [49].

La **masa de activador enzimático (G)** se estudia entre 0 g y 0.025 g. El DTT es capaz de romper los enlaces Se-S y Se-Se en las estructuras de las proteínas, y por lo tanto permite una rápida acción de la proteasa [50].

Otros factores que influyen en la eficacia de la hidrólisis enzimática son la fuerza iónica del medio, la presencia de inhibidores enzimáticos y las condiciones de almacenaje de la enzima [11].

La **variable fantasma (H)** es una variable imaginaria para la que un cambio de un nivel a otro no supone ningún cambio físico. Es comúnmente empleada para evaluar posibles errores sistemáticos y/o la presencia de alguna variable importante que no hubiese sido considerada [47-48].

### ➤ **Variables fijadas**

La lixiviación completa del analito puede no completarse en una única etapa, por lo que es altamente recomendable realizar varios **ciclos de extracción (S)**. La variable número de ciclos se fija en 1, ya que la enzima sólo actuará durante el primer ciclo [47-48].

El **ratio (masa dispersante/masa muestra) (R)** es una condición inherente al sistema PLE porque requiere que la muestra esté dispersada en un medio de dispersión inerte antes de la extracción. Mezclar la muestra con un material inerte asegura su dispersión uniforme y mayor contacto disolvente-muestra dentro de la celda, evitando la

agregación de las partículas de muestra; de lo contrario se reduciría notablemente la eficacia de la extracción. La capacidad de las celdas de extracción (11 mL) permite como máximo 2.5 g de mezcla muestra-dispersante. La variable ratio se fija 5 (0.25 g muestra/ 1.25 g de dispersante) [47-48].

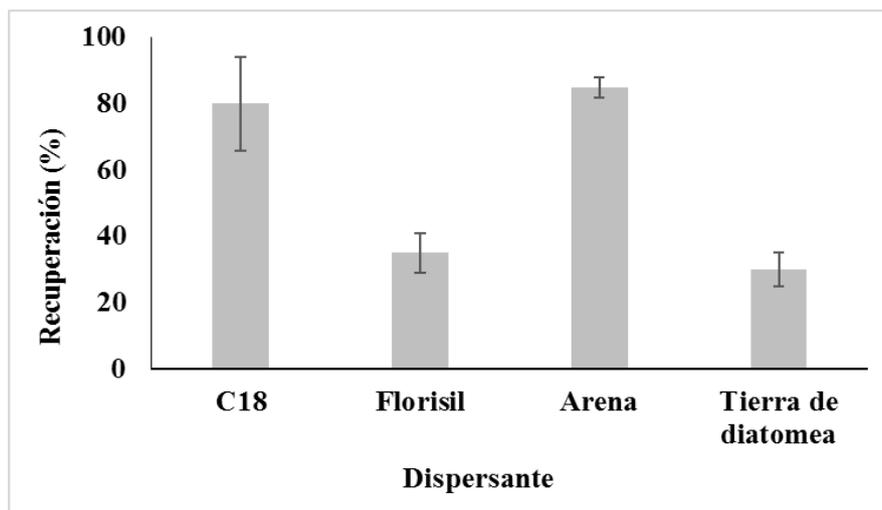
El **tiempo de purga (p)** es el tiempo en que el nitrógeno presurizado fluye a través del sistema para eliminar el exceso de disolvente y para limpiar el sistema. La variable tiempo de purga se fija en 60 segundos [47-48].

### 5.1.2 Estudio de dispersantes

Previa a la realización del diseño de experiencias, se realizó una prueba preliminar de dispersantes (C18, florisil, alúmina y tierra de diatomea) para seleccionar el más adecuado para la extracción de selenio (y sus especies) en este tipo de matriz. Las condiciones experimentales de estos ensayos se muestran en la tabla 10. Para cada dispersante se han realizados dos réplicas y un blanco. Los resultados obtenidos para el selenio total se recogen en la figura 12.

**TABLA 10.-** Condiciones experimentales de la prueba de dispersantes.

<b>Código</b>	<b>Variable</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>
<b>A</b>	Temperatura	40	°C
<b>B</b>	Tiempo de extracción	10	min
<b>C</b>	Presión	1500	psi
<b>D</b>	Masa de proteasa	0.025	g
<b>E</b>	pH	7.5	
<b>F</b>	[TRIS]	40	mM
<b>G</b>	Masa de DTT	0.025	g
<b>Masa de dispersante (C18)</b>		1.25	g
<b>Masa de muestra</b>		0.25	g
<b>Número de ciclos</b>		1	
<b>Tiempo de purga (N<sub>2</sub>)</b>		60	s



**FIGURA 12.-** Estudio de dispersantes para la extracción de selenio.

Se puede observar que tanto el C18 como la arena de mar son dispersantes adecuados para la extracción de selenio (total y especies) en nueces de Brasil, ya que ambos presentan porcentajes de recuperación elevados (80%). Se selecciona el C18 como el dispersante más idóneo debido a que el tamaño de partícula es más pequeño y la dispersión resulta más homogénea.

### 5.1.3 Diseño de experiencias Plackett-Burman

En este método, la matriz de diseño se construye partiendo de una primera fila dada en el trabajo original de Plackett-Burman en el que están disponibles los diseños para N experiencias, siendo N múltiplo de cuatro para mantener la condición de ortogonalidad. La primera fila (generador), se desplaza cíclicamente en una posición,  $N-2$  veces, hasta que se completa la matriz. En el caso de que el número de variables no sea el adecuado para construir el experimento, se deben añadir variables asociadas a efectos falsos (variables fantasmas). A continuación, se muestra en la tabla 11 los generadores de matriz de los diseños factoriales de Plackett-Burman para 8,12,16,24,32 y 44 experiencias [51-53].

**TABLA 11**<sup>[53]</sup>.- *Generador de matriz de los diseños factoriales de Plackett-Burman*

<b>Experiencias</b>	<b>Generador</b>
N=8	+ + + + - + - -
N=12	+ + - + + + - - - +
N=16	+ + + + - + - + + - - - -
N=20	+ + - - + + + + - + - + - - - + + -
N=24	+ + + + + - + - + + - - + + - - - + - - - -
N=32	- - - - + - + - + + + + - + + - - - + + + + - - + + - - - +
N=44	+ + - - + - + - - - + + + - + + + + - - - - + - + + + - - - - + - - - + + - - - + + -

Las variables que influyen en la extracción, como los valores alto/bajo con los que se construye la matriz experimental, se corresponden con los indicados en el apartado anterior. En la tabla 12 se incluyen las condiciones de cada una de las experiencias llevadas a cabo en un diseño de experiencias Plackett-Burman  $2^{8*3}/64$ , el cuál consta de 12 experiencias y 4 grados de libertad. De cada experiencia se realizan dos réplicas y un blanco.

**TABLA 12.-** Diseño de experiencias realizado para la extracción de selenio y sus especies en nueces de Brasil por PLE-HE.

Experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Presión (psi)	Masa de proteasa (g)	pH	[TRIS] (mM)	Masa de DTT (g)	Variable fantasma
1	40	5	2000	0.025	7	30	0.025	1
2	40	15	1000	0.05	7	30	0	1
3	20	15	2000	0.025	8	30	0	-1
4	40	5	2000	0.05	7	60	0	-1
5	40	15	1000	0.05	8	30	0.025	-1
6	40	15	2000	0.025	8	60	0	1
7	20	15	2000	0.05	7	60	0.025	-1
8	20	5	2000	0.05	8	30	0.025	1
9	20	5	1000	0.05	8	60	0	1
10	40	5	1000	0.025	8	60	0.025	-1
11	20	15	1000	0.025	7	60	0.025	1
12	20	5	1000	0.025	7	30	0	-1

**Masa de dispersante (C18):** 1.25 g (ratio de 5)

**Masa de muestra:** 0.25 g

**Número de ciclos:** 1

**Tiempo de purga (N<sub>2</sub>):** 60 s

#### 5.1.4 Valores de referencia

Para evaluar la aplicabilidad de la extracción de selenio en nueces de Brasil mediante HE-PLE, se podría utilizar un material de referencia de esta matriz con valores certificados de las diferentes especies de selenio. Dado que no se dispone de dicho material, se emplean como concentraciones de referencia los niveles de selenio obtenidos para las nueces de Brasil después de un proceso de extracción ácida asistido por energía de microondas. Este método de extracción con posterior cuantificación en ICP-MS fue validado mediante su aplicación a diversos materiales de referencia, tales como: lechuga de mar (BCR-279) [12], atún (BCR-627) [13], tejido de mejillón (GBW-0871) [14], hojas de aceitunas (BCR-62) [14] y pelo humano (GBW07601) [15].

El valor de selenio total (<sup>82</sup>Se) obtenidos mediante MAE en nueces de Brasil desgrasada corresponde a  $79.2 \pm 12 \mu\text{g g}^{-1}$ . Este valor se ha obtenido mediante el cálculo de la

media de las concentraciones de selenio obtenidas en dos réplicas (n=5) medidas por cuadruplicado.

### 5.1.5 Recuperación analítica

La evaluación del diseño factorial se realiza mediante el cálculo de la recuperación analítica. La selección de esta variable respuesta se debe a que se trata de una medida robusta, ya que se referencia a un "valor verdadero", considerado en este trabajo como la concentración de selenio total obtenida mediante MAE.

El cálculo del porcentaje de recuperación (R%), se halla mediante la división de la concentración obtenida en la extracción con hidrólisis enzimática asistida por fluidos presurizados ( $[ ]_{HE-PLE}$ ) como selenio total o como suma de especies entre la concentración obtenida en la digestión ácida en microondas ( $[ ]_{MAE}$ ). La fórmula se recoge en la ecuación 1 y los resultados en la tabla 13.

$$R(\%) = \frac{[ ]_{HE-PLE}}{[ ]_{MAE}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

**TABLA 13.-** Recuperación analítica del selenio y sus especies de cada una de las experiencias del diseño Plackett-Burman.

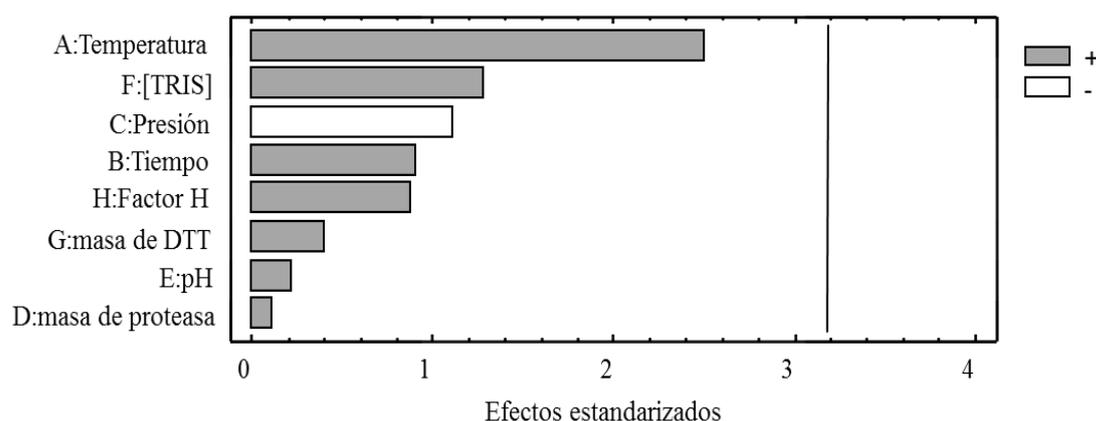
Experiencia	Porcentaje de recuperación* (R (%))	
	Selenio total	Suma de especies (SeMet + SeCys <sub>2</sub> )
1	89.5 ± 1.1	39.6 ± 14
2	100 ± 15	73.1 ± 15
3	68 ± 11	53 ± 11
4	92.6 ± 7.2	57 ± 13
5	99.7 ± 12	67 ± 16
6	89.2 ± 12	48.8 ± 1
7	61.1 ± 0.04	47.2 ± 19
8	50.9 ± 10	38.7 ± 1
9	87.5 ± 12	53.9 ± 12
10	100 ± 2	68.2 ± 8
11	100 ± 13	64.2 ± 1
12	37.7 ± 6	17.1 ± 20

\*n=2

## 5.1.6 Cartas Pareto de orden uno y orden dos

Cuando se obtienen los valores de las variables respuesta, se introducen en el diseño Plackett-Burman seleccionado en el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0, obteniendo la información necesaria para evaluar la influencia de cada una de las variables. El análisis se realiza con ayuda de las cartas Pareto, en las que la longitud de las barras representadas corresponde al valor absoluto del efecto estimado de cada variable, lo que indica la influencia positiva o negativa de cada una de ellas. En las gráficas también se muestra una línea que representa el mínimo valor “t” para el 95 % de confianza a partir del cual se considera que las variables son estadísticamente significativas. El valor de t se denomina  $t_{\text{crítico}}$  [46, 52].

En la figura 13 se muestra la carta Pareto de orden uno correspondiente al análisis del diseño de experiencias aplicado a las variables implicadas en la extracción mediante HE-PLE.



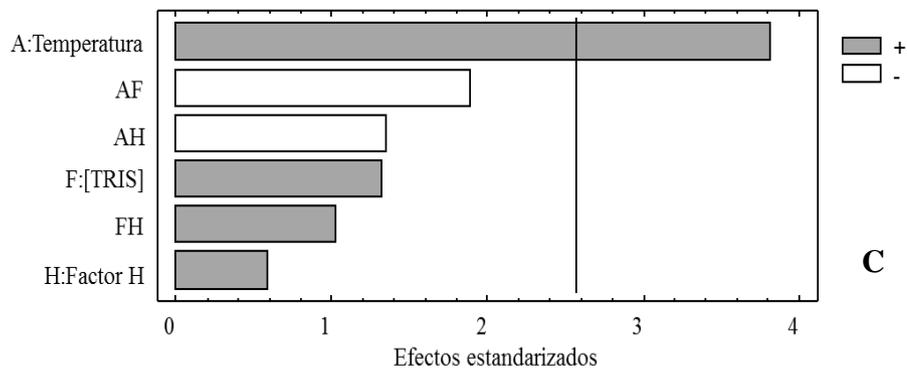
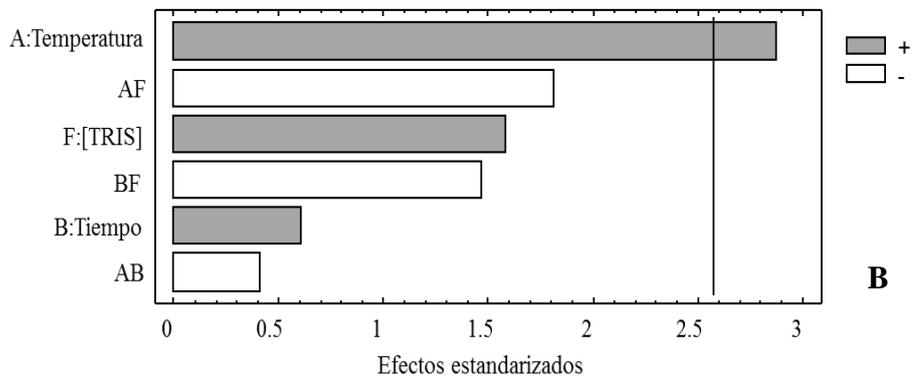
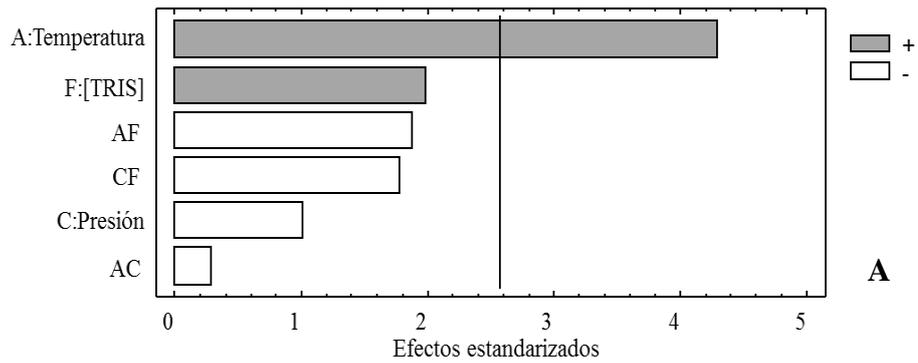
**FIGURA 13.-** Carta Pareto de orden uno para selenio total.

En la carta Pareto de orden uno (para selenio total) no se observa ninguna variable estadísticamente significativa debido a que  $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$  (al 95% de confianza). Por consiguiente, se recurre a las cartas Pareto de orden dos para evitar posibles efectos de “confusión” por interacción entre variables. Este hecho se produce debido a la reducción del número de experimentos respecto del factorial completo, por lo que se pierden grados de libertad y esto provoca el efecto de “confusión”. Lo mismo ocurre con las variables falsas y, por lo tanto, el coeficiente evaluado para ellas también incluirá efectos de interacción con las demás. Esto significa que  $t_{\text{experimental}}$  de cada una de las variables analíticas, puede no ser debido exclusivamente a una variable, sino que puede incluir el efecto debido a la combinación de variables. Por este motivo, se

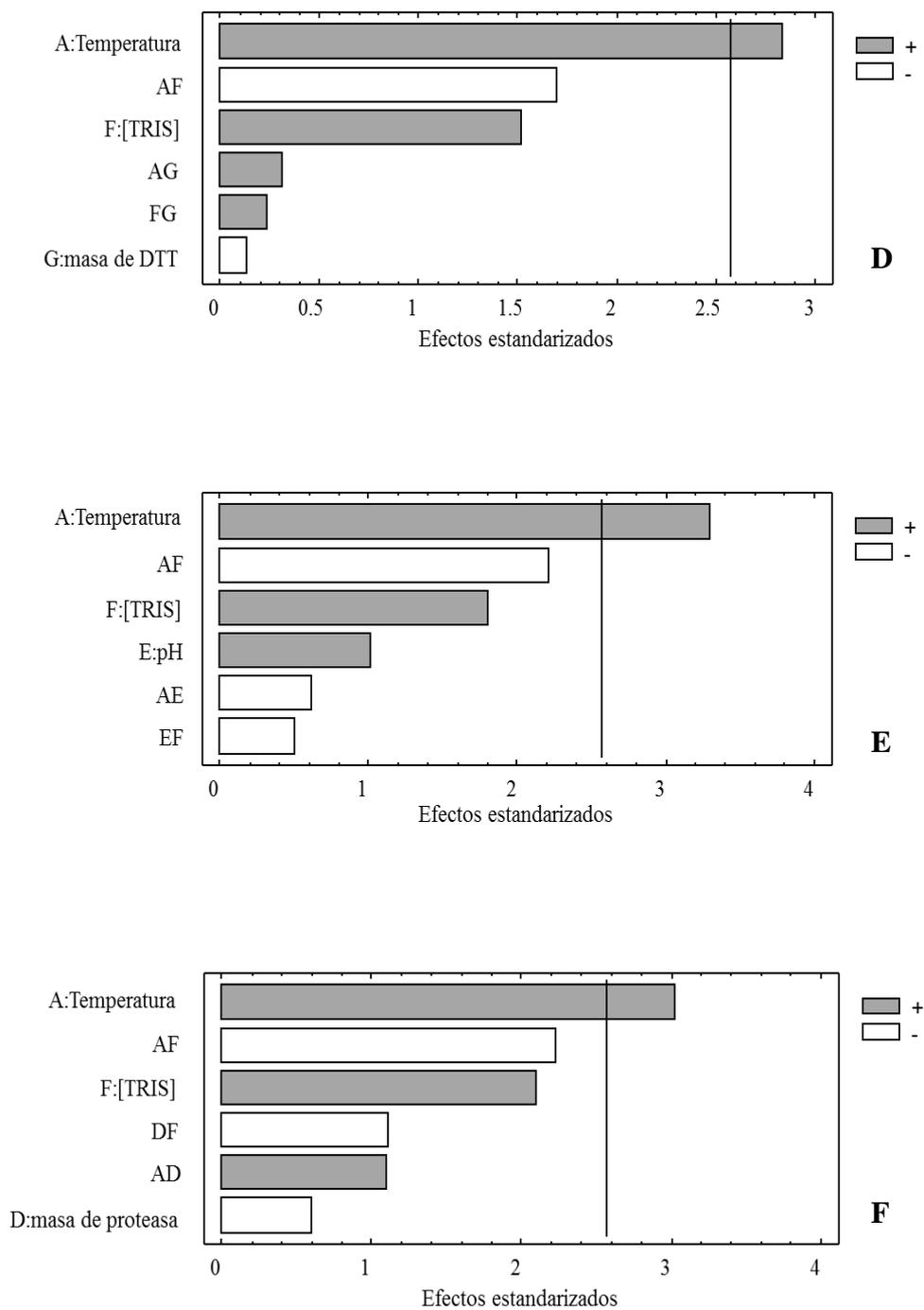
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estudian las cartas Pareto de segundo orden, eliminando las variables que puedan enmascarar los resultados finales [46,52].

En las figuras 14 (A-F) se muestran las cartas Pareto de orden dos para Se total correspondientes al análisis del diseño de experiencias aplicado a las variables de HE-  
PLE.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



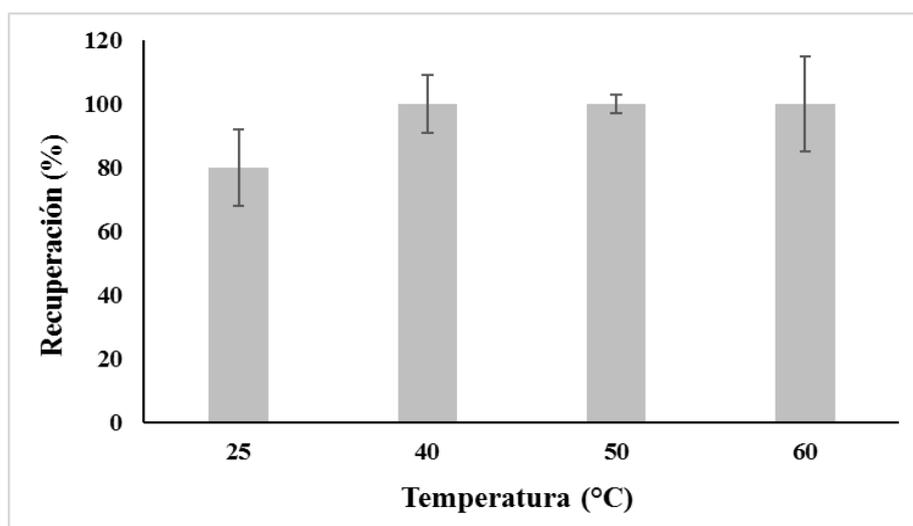
**FIGURA 14 (A-F).**- Cartas Pareto de orden dos para selenio total.

En las cartas Pareto de orden dos, se determina que la única variable estadísticamente significativa es la temperatura, ya que  $t_{exp} > t_{crit}$  (al 95% de confianza). Esta variable se debe optimizar debido a que su valor es crítico. Esta misma conclusión se obtiene cuando utilizamos como variable respuesta la recuperación de selenio como suma de especies.

Para las variables que no son estadísticamente significativas, se seleccionan sus valores más adecuados conforme a factores económicos y ambientales. Los valores seleccionados son los indicados en la tabla 4 (página 24).

## 5.2 Optimización de la temperatura extracción

La optimización de la variable temperatura se realizó de manera univariante. Para ello, se realizaron experiencias a 25°C, 40°C, 50°C y 60°C. En la figura 15 se muestra la variación de la variable respuesta con la temperatura.



**FIGURA 15.-** Estudio de optimización de la variable temperatura para la extracción de selenio total.

Los resultados obtenidos para selenio y sus especies, se pueden justificar en función de la actividad enzimática. A 25 °C la extracción no es completa debido que la enzima no actúa; a 40°C se produce la activación de la enzima, por lo que la extracción es cuantitativa; a partir de esta temperatura la señal permanece constante.

Se selecciona una temperatura de 40°C por ser esta más próxima a la temperatura de activación de la enzima utilizada.

### 5.3 Efecto del disolvente y del activador enzimático

Una vez seleccionado el valor más apropiado para cada una de las variables, se realiza un estudio del efecto extractante del TRIS-HCl y el DTT. Para ello, se llevan a cabo experiencias sin enzima y activador enzimático. De la misma forma, se realizan experiencias sin enzima y con activador enzimático para evaluar su efecto sobre la extracción de selenio mediante HE-PLE. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

**TABLA 14.-** Estudio del efecto extractante del disolvente y del activador enzimático.

Experiencia	Porcentaje de recuperación* (R (%))	
	Selenio total	Especies de selenio (SeMet + SeCys <sub>2</sub> )
Sin enzima y sin activador	<LOD	<LOD
Sin enzima y con activador	<LOD	<LOD
<b>Con enzima y con activador</b>	<b>100 ± 13</b>	<b>100 ± 9</b>

\*n=2, LOD=Límite de detección

Como se muestra en la tabla, la presencia de enzima proteasa y activador hace que la extracción sea cuantitativa, alcanzando un porcentaje de recuperación analítica del 100%.

### 5.4 Características analíticas

#### 5.4.1 Rectas de calibrado y adición

En primer lugar, se comprueba la posible existencia de efecto matriz mediante la realización de un calibrado acuoso y otro con adiciones estándar.

Los calibrados tienen cantidades conocidas de patrón que corresponden a los puntos de concentración: 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 250, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{gL}^{-1}$  (n=11) para selenio total; 0, 250, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{gL}^{-1}$  para SeMet; 0, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{gL}^{-1}$  (n=5) para SeCys<sub>2</sub>.

En segundo lugar, se seleccionan los isótopos con mayor estabilidad y abundancia relativa. En tercer lugar, se determina el patrón interno más adecuado para corregir

fluctuaciones instrumentales en la medida de la señal. El patrón interno no debe encontrarse en la muestra y debe poseer características similares a las del analito. Con este criterio se selecciona el  $\text{Ge}^{72}$  para  $\text{Se}^{76}$  y  $\text{Se}^{82}$ . Las rectas de calibrado y adición se muestran en el anexo (Figuras 16-20). En cuarto lugar, se comprueba si hay diferencias significativas entre las pendientes de las rectas mediante la realización test estadísticos.

**TABLA 15.- Recta de calibrado y adición de los extractos ácidos.**

Se/82	
<b>Calibrado acuoso</b>	<b>Señal=0.0013(±0.0035) + 0.00022(±5E-05) [Se]</b>
<b>Adición</b>	<b>Señal=0.0231(±0.0712) + 0.00013(±9E-05) [Se]</b>

<sup>[46]</sup> $F_{\text{crít}}$  (95%,  $n_1-2=8$  gdl,  $n_2-2=9$  gdl) = 3.23;  $F_{\text{exp}}=3.45$ ; por tanto,  $F_{\text{exp}} > F_{\text{crít}}$

El test de Fisher determina que hay evidencias estadísticas para rechazar la hipótesis nula  $H^0$  ( $H^0$ = varianzas comparables). Las varianzas no son comparables.

<sup>[46]</sup> $t'$  (95%,  $n_1+n_2-4= 17$  gdl) = 2.30;  $t_{\text{exp}} = 18.42$ ; por tanto,  $t_{\text{exp}} > t'$

El test-t determina que la cuantificación de selenio en muestra se debería realizar por el método de adiciones estándar. La matriz interfiere en el análisis.

**TABLA 16.- Recta de calibrado y adición de los extractos de HE-PLE.**

Se/82	
<b>Calibrado acuoso</b>	<b>Señal=0.0013(±0.0035) + 0.00022(±5E-05) [Se]</b>
<b>Adición</b>	<b>Señal=0.0185(±0.0029) + 0.00025(±4E-05)[Se]</b>

<sup>[46]</sup> $F_{\text{crít}}$  (95%,  $n_1-2=9$  gdl,  $n_2-2=9$  gdl) = 3.17;  $F_{\text{exp}} = 1.44$ ; por tanto,  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crít}}$

El test de Fisher determina que no hay evidencias estadísticas para rechazar la hipótesis nula  $H^0$  ( $H^0$ = varianzas comparables).

<sup>[46]</sup> $t_{\text{crít}}$  (95%,  $n_1+n_2-4= 18$  gdl) = 2.10;  $t_{\text{exp}} = 9.67$ ; por tanto,  $t_{\text{exp}} > t_{\text{crít}}$

El test-t determina que la cuantificación de selenio en muestra se debería realizar por el método de adiciones estándar. La matriz interfiere en el análisis.

## 5.4.2 Límites de detección y límites de cuantificación

El límite de detección (LOD) corresponde a la mínima concentración o masa de muestra que genera una señal que no puede ser confundida con un blanco (99.7% de confianza) [46]. La fórmula se recoge en la ecuación 2.

$$LOD = \frac{\mu + 3SD}{pendiente} \quad \text{Ecuación 2}$$

El límite de cuantificación (LOQ) corresponde a la mínima concentración de analito que genera una señal que se puede cuantificar de forma fiable (99%.7 de confianza) [46]. La fórmula se recoge en la ecuación 3.

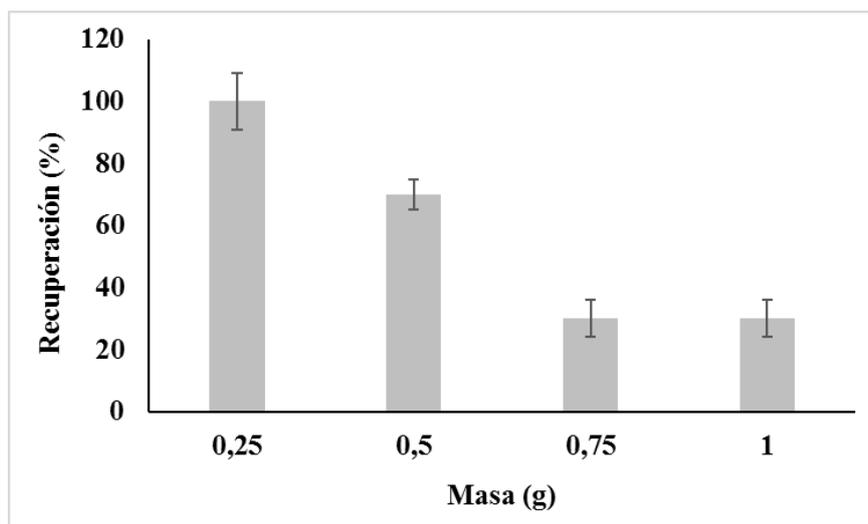
$$LOQ = \frac{\mu + 10SD}{pendiente} \quad \text{Ecuación 3}$$

En el método de calibrado se puede utilizar la señal del blanco de calibrado y su desviación estándar (SD) o los parámetros de las rectas (a, Sa). En el método de adiciones estándar se utiliza la señal del blanco de procedimiento y su desviación estándar. Los límites de detección y de cuantificación del método MAE corresponden a 0.25  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Se y 0.48  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Se, respectivamente. Adicionalmente, en la tabla 17 se muestran los límites de detección (y cuantificación) del método a estudio para el selenio y sus especies.

**TABLA 17.- Límites de detección y de cuantificación del método HE-PLE.**

Número de cuentas			
Réplica	Selenio total	SeCys <sub>2</sub>	SeMet
1	0.000189	4.8	27.8
2	0.00026	2.6	16.2
3	0.000192	4.0	20.8
4	0.000192	3.3	18.3
5	0.000239	4.6	20.8
X <sub>media</sub>	0.000214	3.9	20.7
SD	3,3E-05	0.92	4.38
[Se] / $\mu\text{g g}^{-1}$			
LOD	0.32	0.0689	0.36
LOQ	0.55	0.14	0.70

Con el fin de disminuir los límites de detección del método, se llevó a cabo un estudio del efecto de la cantidad de muestra sobre la recuperación. Para ello, se realizaron experimentos para las cantidades correspondientes a: 0.25 g, 0.5 g, 0.75 g y 1.0 g manteniendo constantes el resto de las variables. Para cada una de ellas, se realizaron dos réplicas. Los resultados obtenidos, se muestran en la figura 21.



**FIGURA 21.-** Estudio de la cantidad de muestra para la extracción de selenio y sus especies.

En la gráfica se observa que la extracción sólo es cuantitativa para 0.25 g de muestra, por lo que no sería posible disminuir los límites de detección del método mediante el aumento de la cantidad de muestra. Además, para cantidades elevadas de muestra (1 g) se observó la formación de precipitados en los extractos. Este problema provoca la adición de una etapa de filtración en el procedimiento, posibilitando la pérdida del analito o la contaminación de los extractos.

#### 5.4.3 Precisión y repetibilidad

La precisión del método se define como “el grado de concordancia de diferentes medidas de una determinada muestra bajo las mismas condiciones” [54]. La evaluación de la precisión, se llevó a cabo mediante la medida de un mismo extracto enzimático 7 veces. Los resultados obtenidos se expresan como desviación estándar relativa (RSD), que se define como:

$$RSD (\%) = \frac{SD}{X_{media}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde la SD es la desviación estándar correspondiente a las concentraciones de selenio de siete extracciones distintas y  $X_{media}$  es el valor medio de concentración de todas ellas. Los resultados se muestran en la tabla 18. Como se puede observar, la RSD del selenio total corresponde a un 1.7% y la RSD para el sumatorio de especies de selenio a un 11.5%. Estos valores son inferiores al 15%, por lo que se demuestra que el método es preciso.

**TABLA 18.- Estudio de la precisión del método.**

Medida	[Se] / $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Selenio total	Suma de especies (SeMet + SeCys <sub>2</sub> )
1	97.8	71.7
2	97.2	75.1
3	96.0	87.0
4	97.0	60.1
5	98.3	73.5
6	100	66.1
7	97.6	74.5
$X_{media}$	98.0	72.6
SD	1.62	8.32
RSD (%)	1.7	11.5

La repetibilidad ( $r$ ) se define como “el grado de mutua concordancia entre dos resultados independientes obtenidos por el mismo trabajador, mismo equipo, mismos reactivos y en condiciones de trabajo idénticas” [54]. El estudio de la repetibilidad se llevó a cabo mediante la realización de 7 extracciones bajo las condiciones óptimas.

El cálculo se realiza siguiendo la ecuación que se muestra a continuación:

$$r(\%) = 2x\sqrt{2} \times RSD_{corto} \quad \text{Ecuación 5}$$

Los resultados se muestran en la tabla 19. Como se puede observar, la  $RSD_{corto}$  del selenio total corresponde a un 11% y la del sumatorio de especies de selenio a un 14.5%. Estos valores son inferiores al 20%, por lo que los resultados obtenidos son adecuados.

TABLA 19.- Estudio de la repetibilidad del método.

Réplica	[Se] / $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Selenio total	Suma de especies (SeMet + SeCys <sub>2</sub> )
1	98.5	75.6
2	72.5	89.6
3	85.0	98.8
4	78.6	80.3
5	82.0	74.5
6	77.0	63.1
7	93.0	89.1
<b>X<sub>media</sub></b>	83.8	81.6
<b>SD</b>	9.21	11.85
<b>RSD (%)</b>	11.0	14.5
<b>r (%)</b>	31.1	41.1

#### 5.4.4 Exactitud

La exactitud, definida como “el grado de acuerdo entre el valor promedio de las muestras medidas y el valor cierto” [54], se puede evaluar empleando un material certificado de referencia (CRM). Como no se dispone comercialmente de un material de referencia de nueces de Brasil con el contenido de selenio certificado, se aplicó el método desarrollado al único CRM disponible (levadura biofortificada con selenio (SELM-1)) con contenido certificado de selenio total y de SeMet. La comparación de los valores certificados con los datos medidos, se muestra en la tabla 20.

TABLA 20.- Estudio de la exactitud del método.

Valor	[Se] / $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Se total	SeMet
Certificado	2031 $\pm$ 70	1284 $\pm$ 104
Medido*	1453 $\pm$ 413	702 $\pm$ 125

\*n=6

El intervalo de confianza ( $\mu$ ) de las medidas realizadas se calcula empleando la ecuación:

$$\mu = X_{media} \pm t \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde t corresponde a la "t de Student" para N-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 95%, SD es la desviación estándar y N es el número de medidas realizadas. Los intervalos obtenidos corresponden a  $\pm 413 \mu\text{g g}^{-1}$  para Se total y  $\pm 125 \mu\text{g g}^{-1}$  para SeMet, como se indica en la tabla.

Como puede observarse los valores obtenidos difieren de los valores certificados. Esto puede ser debido a las diferencias en la composición de la matriz de la levadura y la nuez de Brasil, así como al diferente nivel de concentración de Se y SeMet en ambas. Esto nos permite concluir que la elección del CRM (SELM-1) no es adecuada.

En cualquier caso la exactitud del método optimizado queda demostrada mediante el estudio de las recuperaciones analíticas realizadas y la comparación de los valores de Se total y Se como suma de especies con el valor de Se obtenido mediante MAE.

### 5.5 Aplicación a otras muestra

El método se aplica a otras muestras como la baya Inca del Perú, el palmito peruano y el fruto del açaí. La concentración de selenio (total y especies) obtenida mediante HE-PLE es inferior al límite de detección para las muestras seleccionadas. Estos resultados indican que las muestras analizadas pese a proceder de la misma región que las nueces de Brasil, poseen niveles de selenio mucho más bajos, lo que demuestra que la única planta acumuladora es la *Bertholletia excelsa*.



## 6. CONCLUSIONES

En este apartado se recogen las conclusiones más destacadas del trabajo presentado en esta memoria:

Se ha desarrollado un método de extracción simple, rápido y comprometido con los principios de la química analítica verde. Para ello, se estudiaron las variables estadísticamente significativas para la extracción de selenio (y sus especies) en nueces de Brasil mediante HE-PLE, empleando un diseño factorial Plackett-Burman. La temperatura resultó como única variable estadísticamente significativa (al 95% de confianza). La optimización de la temperatura se llevó a cabo mediante un diseño univariante, resultando como valor óptimo 40°C, alcanzando un 100% de recuperación analítica.

Se han estudiado las características analíticas del método como los límites de detección (0.32  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  para Se total, 0.36  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  para SeMet y 0.0689  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  para SeCys<sub>2</sub>), la repetibilidad (<20% de RSD para selenio total y especies de selenio) y la exactitud.

Por último, se ha llevado a cabo la aplicación del método a otros alimentos de la zona amazónica como bayas incas del Perú, fruto del açai y palmito peruano. Los resultados obtenidos demuestran que pese a proceder de la misma región que las nueces de Brasil, estos alimentos no son acumuladores de selenio.

## 6. CONCLUSIONES

Nesta sección recóllense as principais conclusións do traballo presentado nesta memoria:

Desenvolveuse un método de extracción simple, rápido e comprometido cos principios da química analítica verde. Para iso, estudáronse as variables estatisticamente significativas para a extracción de selenio (e as súas especies) en noces do Brasil mediante HE-PLE, empregando un deseño factorial Plackett-Burman. A temperatura resultou a única variable estatisticamente significativa (95% de confianza). A optimización da temperatura realizouse mediante un deseño univariante, correspondendo o valor óptimo a 40 °C, acadando o 100% de recuperación analítica.

Estudáronse as características analíticas do método como o límite de detección (0.32  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  é total, a 0.36  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  é a SeMet, e 0.0689  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  para SeCys<sub>2</sub>), la repetibilidade (<20% RSD para selenio total e especies de selenio) e a exactitude.

Finalmente, aplicouse o método a outros alimentos da rexión amazónica coma as bagas Incas do Perú, o froito do açai e o palmito peruano. Os resultados amosan que aínda que se atopen na mesma rexión que as noces do Brasil, estes alimentos non son acumuladores de selenio.

## 6. CONCLUSIONS

The main conclusion of the developed method is shown in this section:

A simple, fast and committed to the principles of green analytical chemistry method has been optimised. The statistical significance of variables involved on the selenium (and species) extraction in Brazil nuts by HE-PLE was studied by using a Plackett-Burman factorial design. Temperature was the variable statistically significant (95% confidence). Temperature was optimised by using a univariate design. Results show an optimum value of 40°C for which an analytical recovery of 100 % was assessed.

Analytical characteristics of the method: limit of detection (0.32  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  total, 0.36  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  for SeMet, and 0.0689  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  for SeCys<sub>2</sub>), repeatability (<20% RSD total selenium and selenium species) and accuracy were studied.

Finally, the optimised method was applied to several foods from the Amazon area as such Peru Inca berry, açai fruit and palmito. The results show that despite its amazonic origin proceed in the same region as Brazil nuts, these foods are not selenium accumulators.



## 7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] V. R. Preedy. (2015). *Selenium; chemistry, analysis, Function and Effects*. Cambridge, UK. Royal Society of Chemistry.
- [2] T. G. Back. (2011). *Selenium: organoselenium chemistry*. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry.
- [3] P. O. Amoako, P. C. Uden, J. F. Tyson. (2009). *Analytica Chimica Acta*, 652, 315-323.
- [4] M. P. Rayman. (2004). *British Journal of Nutrition*, 92, 557-573.
- [5] E. Dumont, F. Vanhaecke, R. Cornelis. (2006). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1304-1323.
- [6] M. P. Rayman, H. G. Infante, M. Sargent. (2008). *British Journal of Nutrition*, 100, 238-253.
- [7] <http://www.entrepreneurstoolkit.org> - <http://www.news.bbc.co.uk>
- [8] T. Chunhieng, K. Pétritis, C. Elfakir. (2004). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4318-4322.
- [9] S. S. Kannamkumarath, K. Wrobel, R. G. Wuilloud. (2005). *Talanta*, 66, 153-159.
- [10] E. G. da Silva, L. V. Mataveli, M. A. Zezzi. (2013). *Talanta*, 110, 53-57.
- [11] J. Pawliszyn. (2012). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Amsterdam. Elsevier.
- [12] R. Rey, J. Moreda, E. Rodríguez, P. López. (2012). *Atomic Spectroscopy*, 33 (6).
- [13] J. Moreda, A. Moreda, V. Romarís. (2012). *Food Chemistry*, 134, 339-345.
- [14] A. Moreda, A. Bermejo, P. Bermejo, J. Moreda, E. Alonso. (2007). *Analytical Chemistry*, 79, 1797-1805.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [15] J. Moreda, E. Alonso, P. López, S. Muniategui. (2007). *Analytical and Bionanalytical Chemistry*, 388, 441-449.
- [16] X. Domènech. (2005). *Química Verde*. Barcelona. Rubes.
- [17] C. Cámara, P. Fernández. (2002). *Toma y tratamiento de muestras*. Madrid. Síntesis.
- [18] L. Tastet, D. Schaumloeffel, B. Bouyssiere. (2008). *Talanta*, 75, 1140-1145.
- [19] ASE ® 200 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual. (1999). Dionex Corporation. N° 031149.
- [20] H. K. Kim, D. Y. Choi, G. H. Kim. (2006). *Republic Korean Kongkae Taeho Kongbo*.
- [21] J. L. Gómez-Ariza, M. A. Caro de la Torre, I. Giraldez. (2004). *Analytica Chimica Acta*, 524, 305-314.
- [22] O. M. Naveiro, R. D. González, A. B. Barrera. (2007). *Talanta*. (71), 1587-1593.
- [23] P. Cuderman, I. Kreft, M. Germ. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9114-9120.
- [24] Y. Zhao, J. Zheng, M. Yang. (2011). *Talanta*, 84, 983-988.
- [25] S. Torres, S. Cerutti, J. Roba. (2014). *Food Chemistry*, 159, 407-413.
- [26] M. A. Bryszewska, A. Mage. (2015). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 91-98.
- [27] J. L. Guzman, L. Hinojosa, G. M. Mizanur. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3005-3013.
- [28] L. Hinojosa, J. L. Guzman, G. M. Mizanur. (2009). *Talanta*, 78, 983-990.
- [29] P. Ward, C. Connolly, R. Murphy. *Biological Trace Element Research*, 151, 446-450.

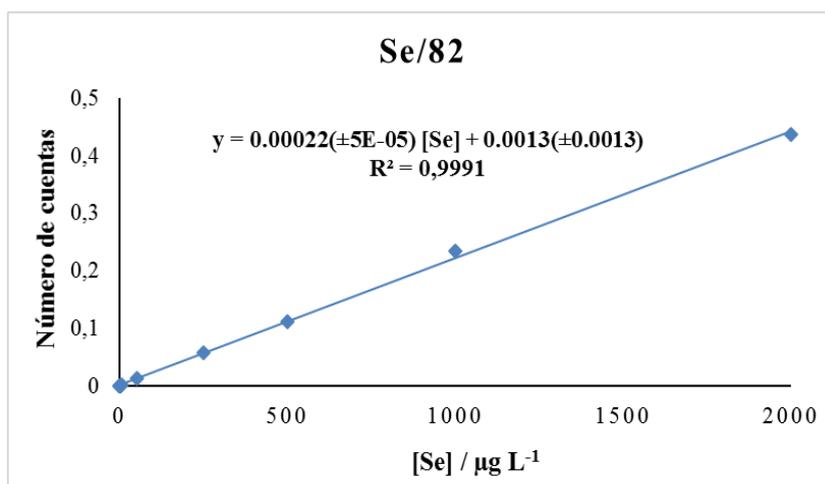
## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [30] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. (2007). *Principios de análisis instrumental*. Santa Fe. Cengage Learning (6ª ED.).
- [31] <http://www.biochem.pepperdine.edu>
- [32] <http://www.merckmillipore.com> - <http://www.perkinelmer.com>
- [33] E. Yañez, K. Wrobel, J.C. Torres. (2015). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31, 203-211.
- [34] X. Zhi-ming, S. Rong, J. Zheng. *Fenxi Huaxue*, 42,1314-1319.
- [35] Z. Pedrero, Y. Madrid, C. Cámara. (2006). *Food Chemistry*, 54, 2412.
- [36] E. Dumont, Y. Ogra, F. Vanhaecke, K. T. Suzuki. (2006). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 1196.
- [37] E. Kápolna, P. Fodor. (2007). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58, 282.
- [38] E. Dumont, F. Vanhaecke, R. Cornelis, (2004). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 504.
- [39] M.Crews , P.A. Clarke, D.J. Lewis. (1996). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11, 1177.
- [40] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara. (2004). *Analytical Chemistry*, 526, 51.
- [41] A. I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara. (2007). *Biological Trace Element Research*. 119, 195.
- [42] <http://www.clarin.com> - <http://www.midzu.es> -<http://www.eldia.com.bo>
- [43] Determinación del contenido en materia grasa total de la aceituna (UNE 55 030).
- [44] Cuerpos grasos. *Éter de petróleo, Características y métodos de ensayo* (UNE 55 016).

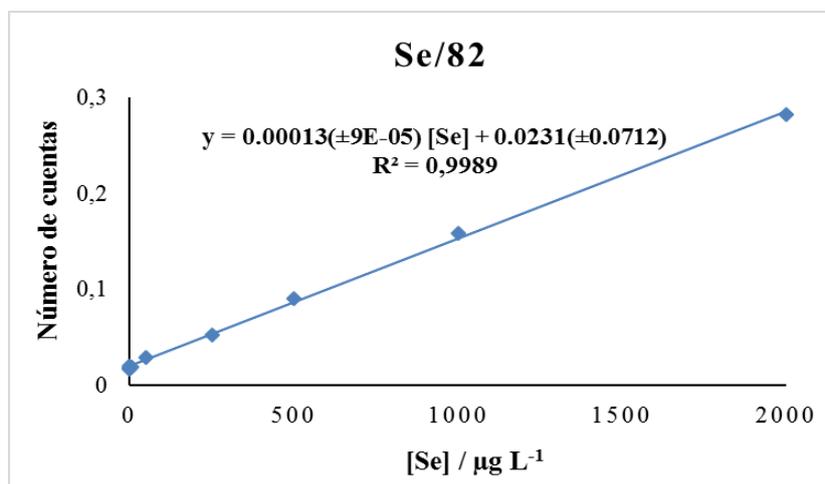
## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [45] M. Pérez, I. Turnes, J. Moreda. (2015). Trabajo Fin de Master (Máster en Ciencia, Tecnología y Gestión Ambiental). *Development of a chromatographic separation method for selenium species by HPLC-ICP-MS*, 17-40.
- [46] J.C.Miller, J.N. Miller. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid. Pearson Educación.
- [47] E. Alonso, J. Moreda, P. López, S. Muniategui. (2007). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 1089-1096.
- [48] C. Moscoso, J. Moreda, P. López, S. Muniategui. (2008). *Journal of Chromatography A*, 1215, 15-20.
- [49] C. Peña, J. Moreda, P. Bermejo, A. Bermejo. (2004). *Talanta*, 64, 671-681.
- [50] A. Moreda, M. C. Barciela, R. Domínguez, E. Peña. (2009). *Spectroscopy Letters*, 42, 397-417.
- [51] S. N. Deming, S. L. Morgan. (1987). *Experimental Design, A Chemometric Approach*. Amsterdam. Elsevier.
- [52] D.C. Montgomery. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. México D.F. Limusa Wiley.
- [53] E. Morgan. (1991). *Chemometrics: experimental design*. Chichester, UK. John Wiley and Sons.
- [54] L. Cuadros, L. Gámiz, A. Carrasco. (2013). *Glosario de Términos Analíticos*. España. GRASEQA (1ª ED.).

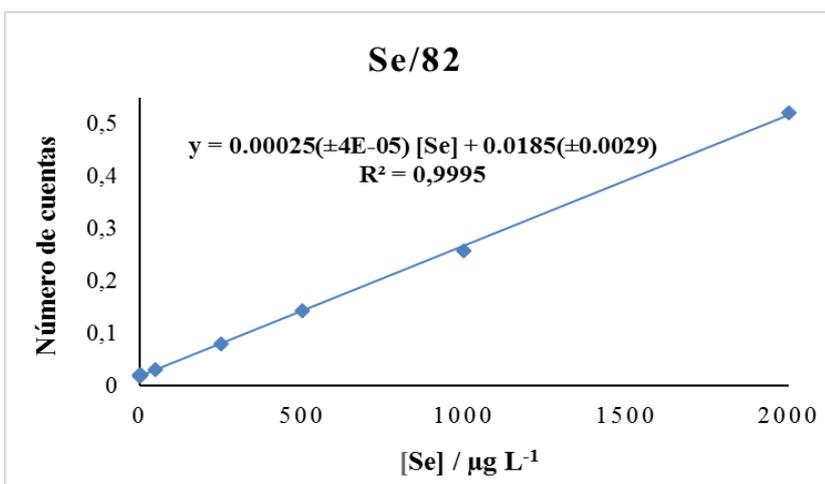
## 8. ANEXO



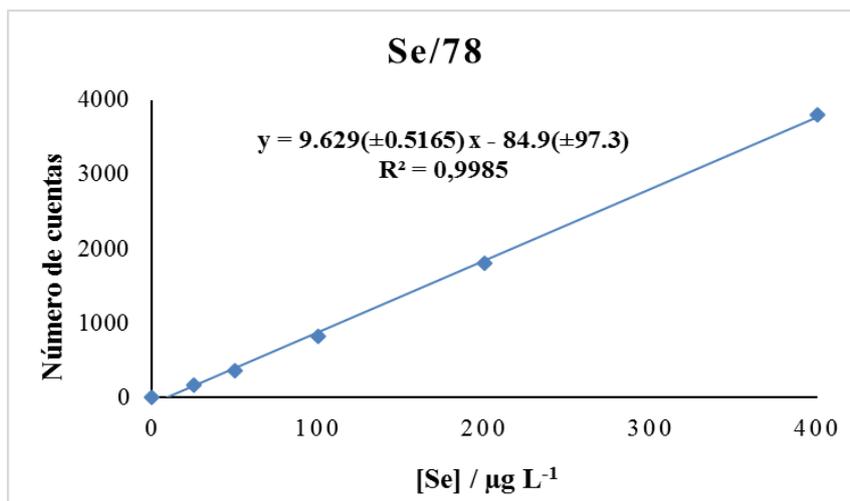
**FIGURA 16.-** Calibrado acuoso para selenio total.



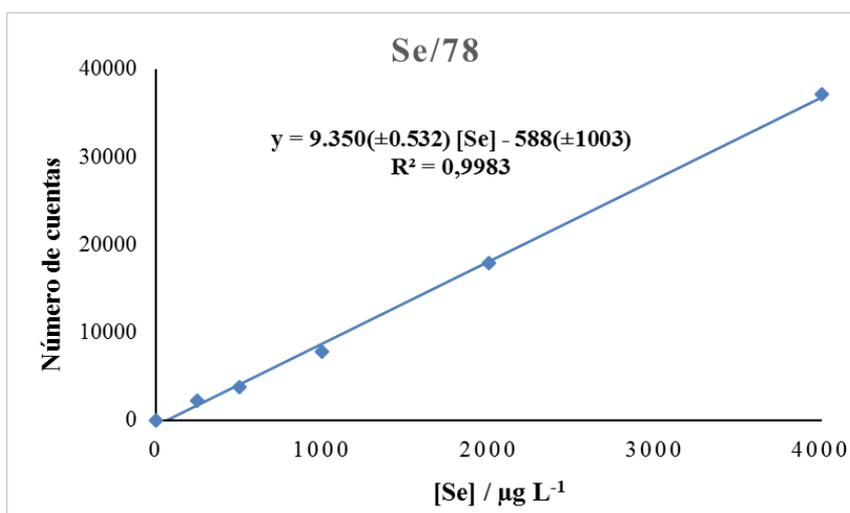
**FIGURA 17.-** Adición estándar de los digeridos para selenio total.



**FIGURA 18.-** Adición estándar de HE-PLE para selenio total.



*FIGURA 19.- Calibrado acuoso de la especie SeCys<sub>2</sub>.*



*FIGURA 20.- Calibrado acuoso de la especie SeMet.*