

ESPECIACIÓN DE SELENIO EN MUESTRAS DE PEZ ESPADA MEDIANTE HPLC-ICP-MS. INFLUENCIA DEL PROCESO DE COCINADO

David Vicente-Zurdo, Beatriz Gómez-Gómez, María Teresa Pérez-Corona y Yolanda Madrid
Dpto. de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.

Introducción

El selenio es un nutriente esencial para muchos organismos, incluido el hombre, siendo su deficiencia la responsable de ciertas enfermedades como son la enfermedad de Keshan, miocardiopatía, enfermedad de Kashin-Beck, osteopatía, etc., que provocan la degeneración de algunos órganos y tejidos, o una artritis extrema que conduce a la deformación de la estructura ósea y, en algunos casos, cretinismo. Para prevenir dichas enfermedades derivadas de esta deficiencia, se suelen administrar suplementos alimenticios¹ (Kubachka *et al.*, 2017). Por otro lado, altas dosis de selenio pueden ser perjudiciales ya que su administración en exceso implica un alto riesgo de toxicidad, conocida como “selenosis”. De ésta existen dos tipos: la selenosis aguda, que provoca la muerte súbita sin ningún síntoma previo, y que en dosis más bajas puede producir anorexia, ataxia y conducir también a la muerte; y la selenosis crónica, que provoca lesiones epiteliales, como la pérdida de pelo² (Raisbeck *et al.*, 2000).

Los niveles para considerar al selenio deficiente o tóxico están muy cercanos entre sí, siendo por tanto su intervalo saludable muy estrecho.

Este “comportamiento bipolar” del selenio, entre esencial y tóxico, depende además y, fundamentalmente, de su forma química. Entre dichas formas cabe destacar las especies inorgánicas, como el selenito (Se(IV)) y el seleniato (Se(VI)), y las especies orgánicas, como la selenometionina (SeMet), la selenocistina (SeCys₂) y la selenometilselenocisteína (SeMetSeCys). En términos generales el selenio inorgánico es mucho más tóxico que sus formas orgánicas³ (Nagy *et al.*, 2015). Dichas especies orgánicas tienen diferentes propiedades beneficiosas para la salud. En el caso de la selenometionina, es la forma más asimilable del selenio, y por eso se suele utilizar en los suplementos alimenticios; la selenocistina forma parte de las selenoproteínas y tiene ciertas características antioxidantes; y a la selenometilselenocisteína se le asignan propiedades quimiopreventivas. Por todos estos motivos es muy importante controlar en qué forma química se encuentra presente el selenio y, obviamente, en qué concentración.

La principal fuente de selenio en los seres humanos es a través de la dieta, siendo los cereales, los productos cárnicos, y especialmente los pescados, los principales responsables de su ingesta. Este trabajo se ha centrado en el análisis de un alimento como es el pez espada, que se encuentra en lo alto de la cadena trófica en los sistemas

acuáticos y presenta elevados niveles de selenio debido a procesos de biomagnificación. Además se ha evaluado cómo el proceso de cocinado puede afectar a la distribución de las especies⁴ (Schmidt *et al.*, 2015).

Objetivo

En consecuencia a lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este trabajo fue la determinación del contenido total de selenio y de sus especies en muestras de músculo de pez espada, así como el estudio del efecto de diferentes procesos de cocinado, plancha y horneado, en la distribución de las especies de selenio.

Procedimientos

Determinación de selenio total

El contenido total de selenio se determinó mediante la técnica ICP-MS tras una digestión ácida por microondas de las muestras. Esta digestión se realizó mediante la pesada de 1 g de muestra (n=3) y en medio HNO₃:H₂O₂ en proporción 5:1. Las condiciones del microondas fueron una rampa de 20 min hasta 130 °C y con un tiempo de permanencia de 10 min a esa temperatura. Las disoluciones resultantes se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua de calidad Milli-Q. Para su análisis por ICP-MS las muestras se filtraron con filtros de nylon de 0.22 µm, y se hizo una dilución 1:10 para reducir su elevado contenido de ácido, no aconsejable para el equipo, antes de su análisis. En caso necesario, si el análisis no es inmediato, las muestras pueden ser conservadas a -20 °C hasta su análisis. La cuantificación se llevó a cabo mediante una calibración externa, siendo las condiciones de medida las que se detallan en la Tabla 1.

Determinación de especies de selenio

Para la determinación de las especies de selenio presentes en las muestras de pescado, se empleó el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

En relación a la separación de especies, se utilizaron dos mecanismos de separación cromatográficos diferentes, fase inversa e intercambio aniónico, para evitar la identificación errónea de las mismas. Para la extracción de las especies se empleó una sonda de ultrasonidos, aplicada a las muestras en presencia de proteasa. La metodología fue la siguiente: se pesó 1 g de muestra (n=3), se añadieron 20 mg de proteasa y 3 mL de Tris-HCl 30 mM, para finalmente someterse a la sonda de ultrasonidos durante 6 min y una amplitud del 60%.

Posteriormente se centrifugaron a 12600 g, 25°C y 25 min. Los extractos se filtraron y se analizaron ese mismo día

para evitar la degradación de las especies. Asimismo, se determinó el contenido total de selenio en el extracto para evaluar la eficiencia del proceso enzimático de extracción. La cuantificación de las especies se realizó por el método de adiciones estándar. Como se ha comentado anteriormente, el análisis de especies implicó el uso de dos mecanismos cromatográficos, siendo las columnas empleadas para ello la columna Hamilton PRP-X100 (intercambio aniónico, AEX) y la columna Zorbax C8 (fase inversa, RP). Las condiciones de medida se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de medida de ICP-MS y de HPLC-ICP-MS.

Condiciones de medida	
<i>Parámetros ICP-MS</i>	
Poder de RF (W)	1550
Caudal de gas plasmógeno (L·min ⁻¹)	15.0
Caudal de gas auxiliar (L·min ⁻¹)	1
Caudal de gas portador (L·min ⁻¹)	1
Nebulizador	Meinhard
Cámara de nebulización	Scott
Modo de adquisición	Continuo
Isótopos monitorizados	⁷⁴ Se, ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se
Réplicas	3
Gas de reacción	H ₂
Gas de reacción (mL H ₂ ·min ⁻¹)	4
<i>Parámetros cromatográficos RP</i>	
Columna	Zorbax C8 (250 x 4.6 mm, 5 μm)
Fase móvil	2% MeOH, 0.1% TFA (pH=2.20)
Modo	Isocrático
Flujo (L·min ⁻¹)	1
Volumen de inyección (μL)	100
<i>Parámetros cromatográficos AEX</i>	
Columna	Hamilton PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 μm)
Fase móvil	Citrato de amonio 10 mM, 2% MeOH (pH= 5.00)
Modo	Isocrático
Flujo (L·min ⁻¹)	1
Volumen de inyección (μL)	100

Para evaluar el efecto del procesado del alimento sobre las especies de selenio se sometió el pez espada fresco a dos procesos de cocinado: a la plancha y horneado. El

cocinado a la plancha se realizó sobre una sartén con una mínima cantidad de aceite de oliva, y una vez cocinado se intentó eliminar la grasa superficial con papel adsorbente. El horneado se simuló en una estufa a 180 °C durante 45 min. El posterior análisis de las muestras se realizó con los procedimientos descritos anteriormente.

Resultados y discusión

El análisis de selenio total en el músculo de pez espada (la parte comestible) proporcionó un resultado de 0.68 ± 0.11 (mg Se·kg⁻¹ peso fresco). Para la determinación de las especies de selenio, se realizó un proceso de extracción con Tris-HCl y proteasa, empleando para ello la sonda de ultrasonidos.

Las condiciones de extracción se optimizaron empleando herramientas quimiométricas. Concretamente se llevó a cabo un diseño experimental con tres factores (tiempo de extracción, amplitud de la sonda y cantidad de proteasa) con dos niveles cada uno y la respuesta estudiada fue el porcentaje de selenio extraído, como se muestra en la Tabla 2. Por tanto se realizaron en total ocho experimentos, con un diseño factorial completo 2^k (k=3) con tres réplicas cada uno.

Tabla 2. Porcentajes de extracción de selenio para las ocho condiciones de extracción estudiadas en el diseño experimental.

Condición	Tiempo (min)	Amplitud (%)	Proteasa (mg)	[Se] _{Extraído} (%)
1	2	40	20	34±4
2	2	40	40	31±4
3	2	60	20	40±3
4	2	60	40	39±7
5	6	40	20	49±4
6	6	40	40	42±10
7	6	60	20	93±10
8	6	60	40	97±11

Resultados expresados como la media ± SD; n= 3.

Además se realizó una representación gráfica de la superficie de respuesta, Figura 1. Como se aprecia tanto en la Tabla 2 como en la Figura 1, la extracción es máxima cuando el tiempo de extracción y la amplitud adquieren su máximo valor. Por tanto se eligió la condición número 7 como la óptima, ya que minimizaba el uso de proteasa y por tanto el coste del método.

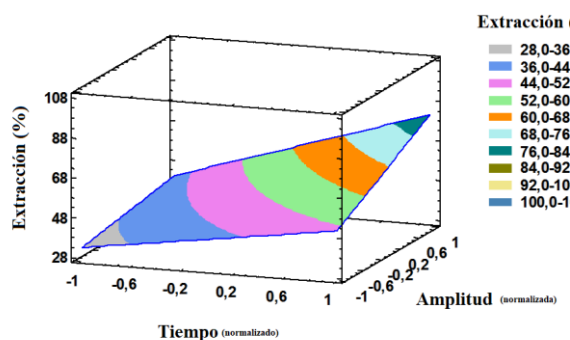


Figura 1. Gráfico de la superficie de respuesta estimada con valores variables de tiempo y amplitud normalizados entre -1 (valor mínimo) y 1 (valor máximo) sobre el porcentaje de extracción.

Aplicando las condiciones de extracción mencionadas se obtuvo un rendimiento de la extracción comprendido entre el 95-98%.

Los extractos obtenidos se analizaron posteriormente por HPLC-ICPMS empleando dos mecanismos de separación, intercambio iónico (columna PRP-X100) y fase inversa (columna Zorbax C8) con el fin de mejorar la separación e identificación de las especies de selenio en los extractos. La Figura 2 muestra el cromatograma obtenido en el análisis de los hidrolizados de músculo de pez espada. Las especies identificadas (por comparación con el tiempo de retención de los patrones y adición de patrones) fueron la selenocistina (SeCys_2), la selenometionina (SeMet) y la selenometilselenocisteína (SeMetSeCys). Uno de los problemas de la identificación en la columna (intercambio aniónico), es que las especies SeCys_2 y selenometionina oxidada (SeMetOx) coeluyen, apareciendo en el volumen muerto de la columna (Figura 2.a). Con el fin de discernir entre ambas se utilizó una columna de fase inversa. Como se aprecia en la Figura 2.b, las especies mayoritarias seguían siendo las mismas, confirmándose la presencia de SeCys_2 en este tipo de pescado. Los valores de concentración de cada especie de selenio conjuntamente con el balance de masas aparecen recogidas en la Tabla 3. Como se pone de manifiesto, las especies mayoritarias fueron la SeMet y SeCys_2 . Estos resultados indican que el selenio se encuentra en la muestra de pescado en forma de selenio orgánico, especies menos tóxicas que el selenio inorgánico y de mayor importancia nutricional. El balance de masas proporcionó un valor de recuperación del 70%, lo que pone de manifiesto que el proceso de separación fue prácticamente cuantitativo, no existiendo pérdidas de las especies durante el proceso de separación.

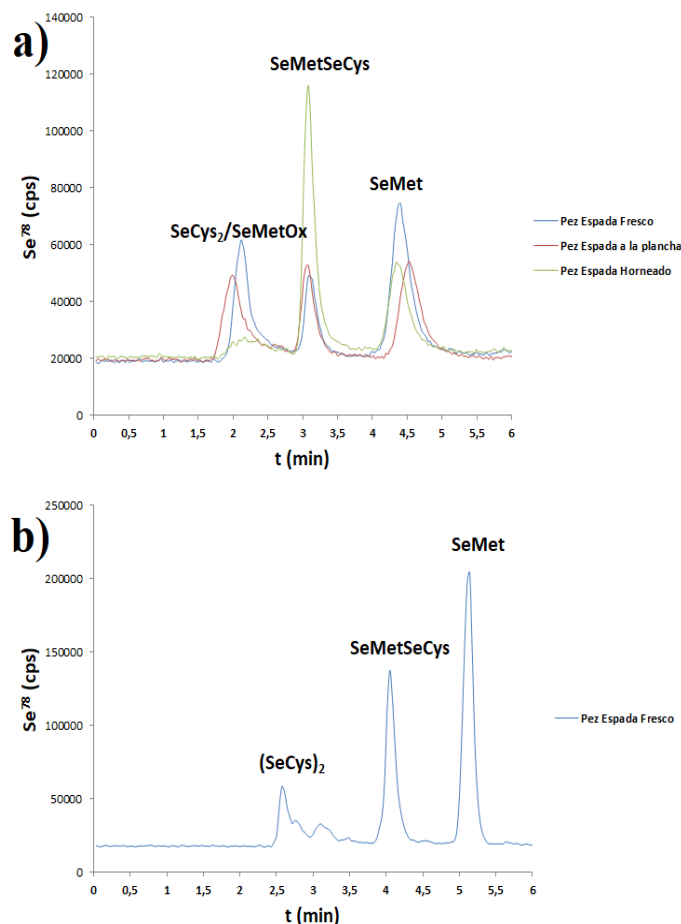


Figura 2. Cromatograma de las especies de selenio presentes en el extracto enzimático de músculo de pez espada obtenidos por dos mecanismos de separación: (a) de intercambio aniónico (PRP-X100) y (b) de fase inversa (Zorbax C8).

Tabla 3. Concentración de las especies de selenio en el músculo de pez espada fresco.

Pez espada fresco	
Especies	[Se] _{Especie} (mg·kg ⁻¹)
SeCys_2	0.17 ± 0.04
SeMetSeCys	0.079 ± 0.005
Se(IV)	<LOD
SeMet	0.21 ± 0.02
Se(VI)	<LOD
[Se] _{Suma especies} (mg·kg ⁻¹)	0.46 ± 0.06
[R] (%)	70 ± 9

Resultados expresados como la media ± SD; n= 3.

LOD= 0.0043 mg·kg⁻¹ LOQ= 0.0081 mg·kg⁻¹.

R calculado como la suma de las especies en relación al selenio total

El pescado es frecuentemente consumido cocinado (a la plancha o al horno). El procesado puede modificar la distribución de las especies de selenio o transformar unas en otras. Con este propósito se llevó a cabo el cocinado del alimento según los procedimientos descritos anteriormente. En primer lugar se llevó a cabo la determinación del contenido total de selenio en el músculo del pescado una vez cocinado con el objetivo de

poder calcular eficiencia de extracción y realizar balances de masas. La concentración total de selenio en los pescados una vez cocinados fueron 1.31 ± 0.25 y 3.29 ± 0.08 mg Se·kg⁻¹ para el pescado a la plancha y al horno, respectivamente. La concentración de selenio más elevada se debe fundamentalmente a la pérdida de agua y otros componentes del alimento durante el cocinado. Análogamente, la extracción de las especies se llevó a cabo en los pescados procesados mediante hidrólisis enzimática, obteniéndose una eficiencia de la extracción del 98%.

Los cromatogramas obtenidos en el análisis de los extractos se recogen en la Figura 2.a. Análogamente a en el caso del pescado fresco se llevó a cabo la cuantificación de las especies. La Tabla 4 ilustra el porcentaje de cada una de las especies en relación a la concentración de selenio total para los distintos pescados: crudo y procesados.

Tabla 4. Porcentaje de selenio en relación a la concentración de selenio total

Procesado	SeCys ₂ (%)	SeMetSeCys (%)	SeMet (%)
Pescado Fresco	37 ± 5	17 ± 7	46 ± 4
Pescado Plancha	37 ± 4	21 ± 5	42 ± 6
Pescado Horno	8 ± 3	65 ± 6	27 ± 3

Resultados expresados como la media ± SD; n= 3.

El pescado cocinado al horno incrementa notablemente su concentración en SeMetSeCys (65% del selenio total) en comparación con su concentración en el fresco (17%). Este aumento va acompañado de una notable disminución de los porcentajes de SeCys₂ y SeMet (en comparación al fresco). La SeMetSeCys es un aminoácido no proteogénico muy interesante desde el punto de vista nutricional que se metaboliza por la enzima liasa a metilselenol que se considera un compuesto importante dentro del efecto quimioprotectivo del selenio.

En lo referente al pescado cocinado a la plancha los porcentajes de las especies de selenio permanecen similares con respecto al fresco. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el proceso de cocinado afecta a la distribución de especies. No han aparecido nuevas especies, pero sí se ve afectada la relación entre las mismas.

Conclusiones

El contenido de selenio encontrado en el pez espada es suficientemente elevado como para suponer un aporte importante de selenio en nuestra dieta. Las especies presentes en este pescado fueron determinadas mediante HPLC-ICP-MS utilizando mecanismos cromatográficos de intercambio aniónico y de fase inversa, previa extracción enzimática empleando proteasa. Estas especies, identificadas como SeCys₂, SeMet y SeMetSeCys son importantes en cuanto a que son especies que proporcionan un beneficio adicional para la salud, dando un valor añadido al alimento objeto de estudio.

Como se ha comentado en la introducción el selenio es un elemento esencial y tóxico en un intervalo de concentración muy pequeño. Las especies orgánicas son toleradas en mayor concentración por los seres vivos y algunas tienen un efecto beneficioso. Por eso, en el caso particular del selenio y para una correcta evaluación del riesgo/beneficio de un producto es indispensable llevar a cabo la identificación de las especies

Por último, se ha demostrado que el proceso de cocinado afecta a la distribución de las especies de selenio en el pescado. En este caso, el horneado del pez espada provocó la presencia de una elevada concentración de selenometilselenocisteína en relación a las otras especies.

Agradecimientos:

La ejecución del presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación por parte del Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto CTQ2014-54801-C2-1-R, así como del proyecto de la Comunidad de Madrid (AVANSECAL), S2013/AB1-3028.

Referencias

1. Kubachka, K. M. *et al.* Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chem.* **218**, 313–320 (2017).
2. Raisbeck, M. F. Selenosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **16**, 465–480 (2000).
3. Nagy, G. *et al.* Cellular and nephrotoxicity of selenium species. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **30**, 160–170 (2015).
4. Schmidt, L. *et al.* Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish. *Food Control* **47**, 413–419 (2015).