



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Especiación de Selenio en alimentos de origen vegetal

Alumno/a: Isabel Navío González

Julio, 2021



**UNIVERSIDAD
DE JAÉN**



Trabajo Fin de Grado

Especiación del Selenio en alimentos de origen vegetal



Alumna: Isabel Navío González

Jaén, Junio, 2021



1.	OBJETIVO DEL TRABAJO.....	6
2.	INTRODUCCIÓN.....	6
2.1.	Importancia del selenio	6
2.1.1.	Valores de referencia de selenio.....	8
2.2.	Fuentes de selenio	9
2.2.1.	Alimentos de origen animal.....	10
2.2.2.	Alimentos de origen vegetal.....	11
2.2.3.	Suplementos de selenio.....	15
2.3.	Formas de selenio en los alimentos	16
3.	BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	20
4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ESPECIES DE SELENIO EN ALIMENTOS Y SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS	22
4.1.	Métodos de extracción de compuestos de selenio.....	23
4.1.1.	Extracción sólido-líquido	24
4.1.2.	Extracción mediante hidrólisis enzimática (HE)	24
4.1.3.	Extracción asistida por microondas (MAE)	25
4.1.4.	Extracción asistida por ultrasonidos (SAE)	27
4.1.5.	Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	28
4.2.	Determinación del contenido total de selenio.....	29
4.2.1.	Análisis mediante ICP-MS	30
4.3.	Identificación de especies de selenio mediante cromatografía líquida (HPLC)	32
5.	CONCLUSIONES	35
6.	BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	36
	Anexo I: Índice de abreviaturas	39

RESUMEN

El selenio (Se) es un oligoelemento indispensable para el cuerpo humano, ya que es primordial para la realización de diversas funciones vitales, tales como la reproducción, la producción de ADN o la protección del cuerpo frente a infecciones causadas por radicales libres. Sin embargo, al igual que es indispensable un valor mínimo de Se en el cuerpo humano, también lo es el conocimiento de los valores máximos recomendables de Se en el mismo.

Debido a la importancia del estudio del Se presente tanto en el cuerpo humano como en sus posibles fuentes así como de la especiación del mismo es imprescindible estudiar y conocer los procedimientos analíticos que permitan su determinación y cuantificación.

El conocimiento tanto de los valores recomendables de Se en el organismo como de la especiación del mismo en los organismos vegetales nos conduce a una revisión bibliográfica sistemática de los diversos artículos científicos disponibles hasta el momento mediante el uso de tres bases de datos, en las cuales se realizarán múltiples búsquedas con diferentes acotaciones para obtener la información más relevante e interesante publicada en la actualidad.

Palabras clave: Selenio. Especiación. Vegetales. Técnicas Analíticas

ABSTRACT

Selenium (Se) is an essential trace element for the human body, as it is indispensable for various vital functions such as reproduction, DNA production and protecting the body against infections caused by free radicals. The element concentration in the human body, as well as in the natural sources, and its speciation are key factors to understand the importance of Selenium. The knowledge on the different species and concentration values of selenium in natural sources such as food are of the utmost importance. In this work, the methods for the determination of selenium and the speciation of the different Se-compounds are studied.

Key words: Selenium. Speciation. Vegetables. Analytical techniques.

1. OBJETIVO DEL TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo es examinar y analizar la información disponible sobre especiación de Selenio en alimentos de origen vegetal, para proporcionar una visión crítica de los principales aspectos metodológicos de los métodos de especiación de Selenio en alimentos, tratando tanto la parte de preparación de muestra como la etapa de determinación.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Importancia del selenio

Tras numerosos estudios sobre el selenio, se llegó a una dicotomía (López-Bellido y López-Bellido (2013), Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique (2008), Rayman (2000, 2002, 2012)...). El selenio ha sido considerado un elemento altamente perjudicial y contaminante, tanto para seres vivos como para el medio ambiente, y no fue hasta mediados del siglo XX cuando se le comenzaron a atribuir funciones vitales para la salud de humanos y animales (López-Bellido y López-Bellido (2013)).

Aun cuando el selenio se considera esencial en nuestra dieta presenta un margen muy estrecho de concentración, en el cual se puede considerar beneficioso o tóxico (López-Bellido y López-Bellido (2013)).

En la gráfica de la Figura 1 puede verse la relación existente entre la respuesta biológica y la cantidad diaria ingerida de selenio. Representa como, estando fuera de los márgenes diarios, se produciría deficiencia o toxicidad, ambas perjudiciales.

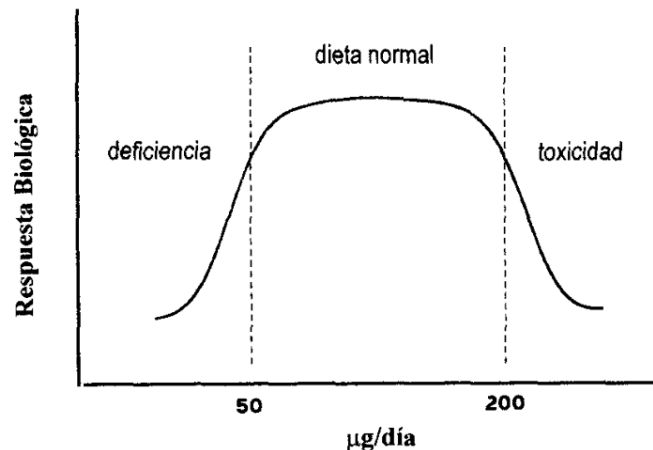


Figura 1. Respuesta biológica del ser humano frente a la ingesta diaria de selenio (Figura 4., Quijano Nieto, M. Á. (2003).

Desde una perspectiva biológica, el selenio es un oligoelemento esencial para el metabolismo de humanos y animales, ya que presenta función enzimática y estructural. Forma parte de las llamadas selenoproteínas. Se han identificado varias selenoproteínas, entre ellas la glutatión peroxidasa (GPx), con actividad antioxidante, la selenocisteína (SeCys) o la tioredoxina reductasa, a las que se les atribuye una función inmunológica. (López-Bellido y López-Bellido (2013)).

Como se mencionó anteriormente, además de que su excesiva ingesta a través de alimentos que poseen altas cantidades de selenio puede provocar efectos tóxicos (selenosis, alteraciones en el metabolismo de la selenocisteína, algunos de sus síntomas son la pérdida de pelo y uñas, lesiones cutáneas, caída de los dientes...), su deficiencia en la alimentación diaria afecta a la salud humana de diferentes formas, por ejemplo, la enfermedad de Keshan o la enfermedad de Kaschin-Beck, siendo la primera una miocardiopatía en niños y la segunda una osteoartritis en adolescentes. (Rayman (2000, 2002, 2012)).

Trabajos de la catedrática en Medicina Nutricional, Margaret P. Rayman (Rayman (2000, 2002, 2012)), muestran que el selenio está implicado en diversos aspectos de la salud humana, entre ellos:

- El correcto funcionamiento del sistema inmune. La disminución de la virulencia y el avance de infecciones virales (como la progresión de VIH al SIDA).
- Influye en la fertilidad masculina y reduce el riesgo de aborto espontáneo.

- Interviene en la regulación del estado anímico y en varios neurotransmisores del cerebro (reduce la depresión, la confusión mental, Alzheimer...).
- Sirve como antioxidante y antiinflamatorio (es beneficioso frente a la artritis reumatoide, el asma...), tiene función tiroidea y se le atribuye acción en la prevención de enfermedades cardiovasculares, aunque esto último no está confirmado.

2.1.1. Valores de referencia de selenio

Los niveles de selenio en sangre, suero o plasma se utilizan para valorar la especie y la cantidad ingerida de selenio de un individuo o una población determinada. Estas concentraciones de selenio se correlacionan con el correcto funcionamiento de las seleno-proteínas. No existe consenso sobre las concentraciones de selenio apropiadas, utilizando el nivel adecuado para una correcta actividad de las seleno-proteínas como punto de partida.

Según el instituto nacional de salud (NIH, por sus siglas en inglés) de EE.UU. (Selenio, datos en español (2019)), la ingesta diaria recomendada de selenio está se relaciona con la edad, tal y como se detalla en la Tabla 3.1.:

Tabla 3.1. Valores de referencia del selenio según el NIH (Selenio, datos en español (2019))

Etapas de la vida	Cantidad recomendada
Bebés hasta los 6 meses de edad	15 µg
Bebés de 7 a 12 meses de edad	20 µg
Niños de 1 a 3 años de edad	20 µg
Niños de 4 a 8 años de edad	30 µg
Niños de 9 a 13 años de edad	40 µg
Adolescentes de 14 a 18 años de edad	55 µg
Adultos de 19 a 70 años de edad	55 µg
Adultos de 71 o más años de edad	55 µg
Mujeres y adolescentes embarazadas	60 µg

2.2. Fuentes de selenio

El selenio se incorpora a través de la alimentación para su actividad en el cuerpo humano. Los alimentos presentan concentraciones variables de selenio en función de su naturaleza y además de que la zona geográfica y la riqueza del suelo pueden influir en las concentraciones finales de selenio en estos.

Las razones de que los valores ingeridos varíen se relacionan, no solo con el contenido de selenio del suelo en el que se cultivan los alimentos y el forraje del que se alimentan los animales, sino también con las diferentes especies de selenio. Un ejemplo de como la especie influye se da en los granos de cereal, el selenio en forma de selenato ($Se^{6+} \rightarrow SeO_4^{2-}$) o selenito ($Se^{4+} \rightarrow SeO_3^{2-}$) es absorbido por las plantas y se transforma en selenometionina (SeMet). La absorción de Se^{6+} es mayor que la de Se^{4+} (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique (2008), Rayman (2000)). También influye el pH. En suelos ácidos, el selenio está presente principalmente como selenito, que tiene muy baja solubilidad y una mayor disponibilidad en las plantas. En suelos alcalinos, se oxida a selenato, que es más soluble y está más disponible para ser absorbido por los vegetales (Goyer y Clarkson (1996)).

Asimismo, hay ciertos factores orgánicos e inorgánicos, como la presencia de iones en el medio. Estos pueden favorecer la formación de complejos con el selenio o el mercurio presente en alimentos marinos que puede reducir la biodisponibilidad del selenio de dichos alimentos. De igual manera ocurre con la humedad, la salinidad del suelo, las aguas de drenaje o las condiciones climáticas. (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique (2008)).

Es tal la influencia de la concentración de selenio en suelos que en ciertas regiones de China, Finlandia y Nueva Zelanda donde las concentraciones de selenio en el suelo son muy bajas (inferiores a 0,05 ppm); se observa un aumento de las enfermedades producidas por la deficiencia de selenio son ampliamente conocidas (Dumont et al. (2006)). En contraposición, en aquellas regiones donde la concentración de selenio en el suelo es alta (superiores a 5 ppm), como en Canadá, Irlanda, etc. (Dumont et al. (2006), Zhang et al. (1993)).

La importancia de las técnicas para la determinación del contenido de selenio radica en la falta de homogeneidad de la concentración de este elemento en los alimentos.

Como hemos visto, el contenido de selenio pasa por no ser constante y depende del lugar de procedencia, del posible procesamiento y cocinado e incluso de la época de recolección.

2.2.1. Alimentos de origen animal

La carne, el cerdo, el pollo, el pescado y los huevos (Figura 2), al ser alimentos que contienen muchas proteínas, son ricos en selenio. Según varias fuentes consultadas ((Díaz-Alarcón et al., 1996a, Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique (2008)), los niveles pueden variar desde 87,6 a 737 ng/g. otros de los alimentos que parece que presentan una mayor concentración de selenio son los huevos y los peces. En la leche se han encontrado concentraciones variables de selenio dependiendo del animal, siguiendo este orden: humano > oveja > cabra > vaca. (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique (2008)).



Figura 2. Alimentos de origen animal con contenido en selenio

Nota: Alimentos y nutrientes: ¿qué nutrientes nos aporta cada alimento de nuestra dieta?
(2017) *Carnes, huevos y pescado* [fotografía]. Recuperado de: <https://palomasala.com>
Fecha de consulta: 29/06/21

Los resultados obtenidos por investigadores de la Universidad de Granada tras analizar el contenido de selenio de carnes, vísceras y embutidos del sureste de España mostraron altas concentraciones de selenio en riñones (1,196 µg/g, peso fresco), hígado (0,638 µg/g) y lomo (0,383 µg/g, peso fresco) de cerdo y las menores en el cordero (0,028 µg/g, peso fresco) y en los sesos de cerdo (0,033 µg/g, peso

fresco). En embutidos, el valor medio obtenido en su estudio fue de 0,151 µg/g (Díaz-Alarcón *et al.*, 1996a).

La mayor concentración de selenio en la carne la proporcionan la SeMet y SeCys. Sin embargo, el contenido total y las especies dependen principalmente de la dieta de los animales. En los peces, son la SeMet y el selenito/selenato; en los huevos, la SeCys, la SeMet y selenito, siendo la SeMet y la SeCys las especies predominantes en la clara y la yema de huevo, respectivamente; y en la leche de vaca la SeCys y el selenito (Frairweather-Tait *et al.* (2011)).

2.2.2. Alimentos de origen vegetal

Dentro de los alimentos de origen vegetal se encuentra un amplio rango de concentraciones de selenio. Las frutas, por ejemplo, presentan concentraciones bajas de selenio. Una de las posibles explicaciones para esta baja concentración puede ser la poca cantidad de proteínas que presentan (Dumont *et al.* (2006)). Sin embargo, hay hortalizas, como la mostaza, especies de brócoli, coles de Bruselas, repollo, coliflor, berza, colinabo, col rizada, el ajo, el cebollino y la cebolla (Figuras 3 y 4), que tienden a contener altas concentraciones de Se (Dumont *et al.* (2006)). Además, la cebolla y el ajo, al consumirse habitualmente en la dieta mediterránea, son una buena fuente diaria de selenio, el ajo presenta un contenido en selenio <0,5 mg/kg, sin embargo, tanto el ajo como las cebollas o el brócoli, cuando se cultivan en suelos ricos en selenio, pueden acumular selenio, obteniendo un enriquecimiento de selenio desde <0,5 mg/kg hasta 140–300 mg/kg (Frairweather-Tait *et al.* (2011)). Las especies principales de selenio en verduras son el selenato, la SeMet, la γ-Glu-MeSeCys, la MeSeCys y selenato (Frairweather-Tait *et al.* (2011)).

Las plantas con alto contenido en azufre, como la cebolla, el ajo... pueden formar análogos sustituyendo éste por selenio, por lo que tendría niveles más altos de selenio. Manjusha *et al.* (2007) hallaron un alto contenido de selenio en hongos (1340 ng/g), lo que se debe a que algunos tipos de setas tienen a acumular selenio, pudiendo relacionarse con su alto contenido de compuestos azufrados. El champiñón común es uno de los hongos más comúnmente estudiados para fines de especiación de selenio

y es el hongo más consumido en Europa y EEUU. Otro hongo que acumula selenio es la seta comestible u hongo blanco (Dumont *et al.* (2006)).



Figuras 3 y 4. Diversas verduras y hortalizas

Nota: Ajos y cebollas: variedades, características y usos en la cocina (2019) Ajos, cebollas, chalotas y cebolleta [Fotografía]. Recuperado de: <https://www.micasarevista.com/>; Cuida tu circulación con brócoli, coliflor y repollitos (2018) Coliflor, repollo y brócoli [Fotografía] Recuperado de: <https://holadoctor.com/es>. Fecha de consulta: 29/06/21

Estos alimentos vegetales que acumulan Se pueden usarse como fuente natural de suplementos minerales tanto para animales como para seres humanos, especialmente en áreas con deficiencia de selenio.

En lo referente a legumbres y frutos secos, las cantidades de selenio son variables. La concentración de selenio en leguminosas se ha reportado con valores entre 24,4 y 443,9 ng/g, (Pappa *et al.* (2006)) siendo las lentejas (Figura 5) la legumbre que presentaba mayor concentración. Los frutos secos ricos en proteínas, como los pistachos y las nueces, presentan una mayor concentración de selenio; en las nueces se ha llegado a detectar una concentración de entre 7 y 32,27 ng/g (Dumont *et al.* (2006), Pappa *et al.* (2006)). Se ha reportado la presencia de altos contenidos de selenio en las nueces de Brasil, Manjusha *et al.* (2007) hallaron un contenido medio de selenio de 3800 ng/g, por lo que una sola nuez ya supera la dosis diaria recomendada de selenio. Esto se debe a que las proteínas de las nueces de Brasil, (Figura 6), son muy ricas en aminoácidos que tienen selenio, sobre todo en SeMet.



Figura 5. Lentejas



Figura 6. Nueces de Brasil

Nota: Figura 5. Legumbres, beneficios y consejos para consumirlas (2016) *Lentejas* [Fotografía]. Recuperado de: <https://www.hsnstore.com>; Figura 6. Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) (2019) *Nueces de Brasil* [Fotografía]. Recuperado de: <https://www.jardineriaon.com> Fecha de consulta: 29/06/21

Pappa *et al.* (2006) reportaron concentraciones medias de selenio en el pan que oscilaban entre 70,0 y 131,8 ng/g. Además se observó un mayor contenido del elemento en el pan integral. Dumont *et al.* (2006) vieron que las concentraciones de selenio que presentaban los cereales oscilaba entre 10,0 y 550,0 ng/g. Las especies predominantes de selenio en el trigo, y por tanto en el pan son SeMet, SeCys y selenato (Frairweather-Tait *et al.* (2011)).

Según un estudio sobre el contenido de selenio en cereales, legumbres y frutos secos (Díaz-Alarcón *et al.* (1996b)), en Andalucía se obtuvieron los resultados recogidos en la Tabla 3.2.

En la Figura 7 se muestra una comparativa de los valores de selenio recogidos en la Tabla 3.2., para poder hacerse una idea de las diferentes concentraciones de selenio encontradas. En rojo se observan aquellos alimentos con concentraciones de selenio menores a 100 ng/g, en amarillo aquellos concentraciones de 100 ng/g a 200 ng/g, en azul los que se encuentran entre 200 ng/g y 400 ng/g, y por último, en verde los que su tienen más de 400 ng/g de contenido en selenio.

Tabla 3.2. Concentraciones de Se en cereales, legumbres y frutos secos en el sureste de España
(Díaz-Alarcón *et al.* (1996b))

	Muestra	Rango (ng/g)	Media (ng/g)
Cereales	Maíz	2,1 – 7,6	4,6
	Trigo	31,7 – 39,4	35,5
	Pan de trigo	31,5 – 77,9	60,3
	Harina de trigo	-	32,2
	Galleta de trigo	8,2 – 44,9	28,2
	Macarrones de trigo	19,4 – 19,4	19,4
	Fideos de trigo	27,0 – 32,1	29,5
	Espagueti de trigo	22,3 – 26,8	24,5
	Arroz blanco	12,0 – 24,0	18,0
Legumbres	Guisantes	152,1 – 268,7	210,4
	Garbanzos	94,0 – 110,0	104,0
	Lentejas	17,9 – 23,9	20,9
Frutos secos	Cacahuete	162,0 – 538,0	350,0
	Almendras	71,0 – 112,0	92,0
	Pistachos	144,0 – 192,0	168,0
	Nueces	-	406,0

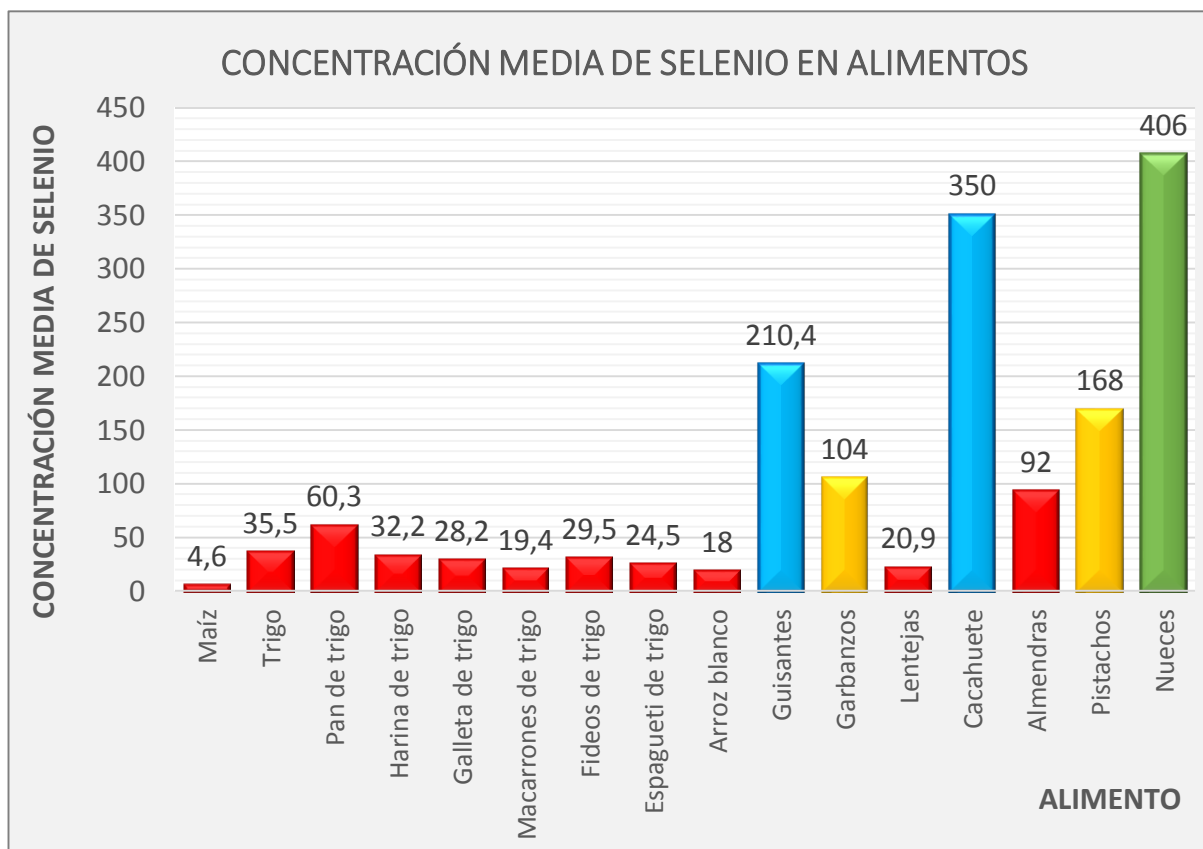


Figura 7. Concentración media de selenio, en ng/g, en alimentos vegetales. (Díaz-Alarcón et al. (1996b))

2.2.3. Suplementos de selenio

Las únicas especies permitidas de selenio que pueden añadirse como suplemento a los alimentos bajo la legislación de la Unión Europea (Reglamento (CE) nº 1925/2006), son el selenato de sodio, el selenito de sodio y el selenito de hidrógeno y sodio, mientras que la especie de selenio predominante en la mayoría de los alimentos no enriquecidos con selenio es la SeMet (Frairweather-Tait *et al.* (2011)).

Puesto que en muchas regiones hay deficiencias de selenio, se ha considerado la suplementación con selenio a diferentes niveles para proporcionarlo a toda la población. Uno de ellos es el uso de fertilizantes enriquecidos con selenio, principalmente añadiendo selenato de sodio. Este compuesto añade valor nutritivo a toda la cadena trófica.

Y, por otra parte, tenemos la ingesta humana de suplementos nutricionales enriquecidos con selenio. Las farmacéuticas han creado dos tipos diferentes de suplementos de selenio: preparaciones multivitamínicas y multiminerales que tienen selenio inorgánico (y otros oligoelementos y vitaminas) y suplementos que usan de base la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 8) (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique (2008)).

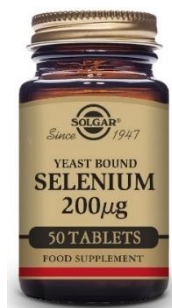


Figura 8. Suplemento de Selenio en levadura 200 µg

Nota Selenio en levadura 200 µg (levadura primaria con alto contenido en selenio) - 50 Comprimidos. [Fotografía] Recuperado de: <https://www.solgar-oficial.es> Fecha de consulta: 29/06/21

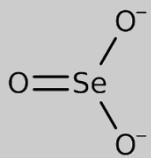
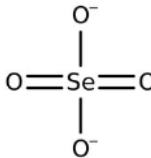
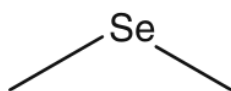
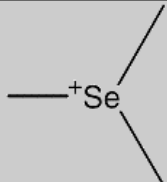
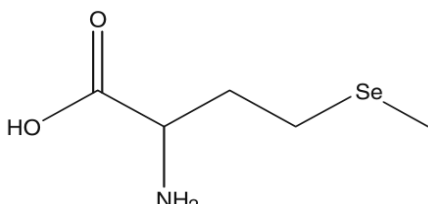
Esta levadura tiene un alto contenido de proteínas que le permiten captar selenio. En su mayoría, el selenio se añade como selenito de sodio (Na_2SeO_3) y éste se incorpora a las proteínas de la levadura, principalmente como SeMet. La levadura selenizada, además de como complemento nutricional, puede usarse como sustituta de la levadura convencional para hornear pan. Hay que tener en cuenta que ciertos factores afectan a la biodisponibilidad de selenio de los suplementos, como la presencia de otros micronutrientes, el uso de ciertos medicamentos, la dosis y la hora de la ingesta del suplemento (Dumont *et al.* (2006)).

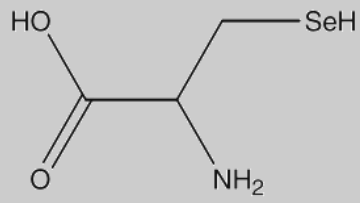
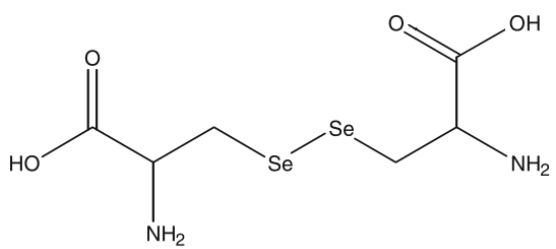
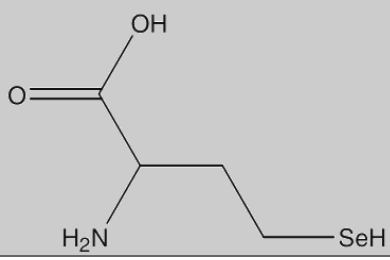
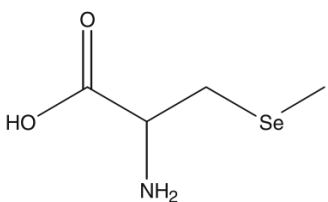
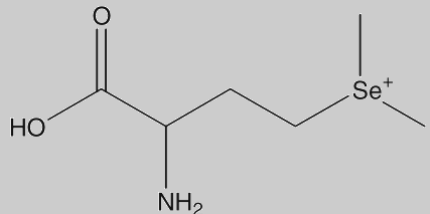
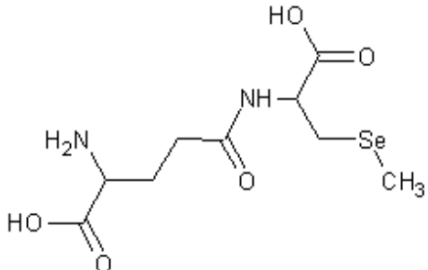
2.3. Formas de selenio en los alimentos

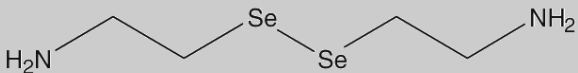
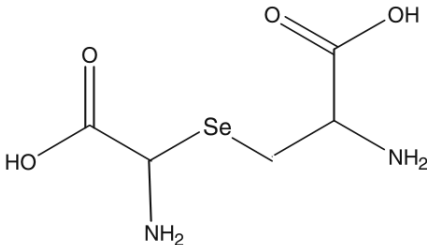
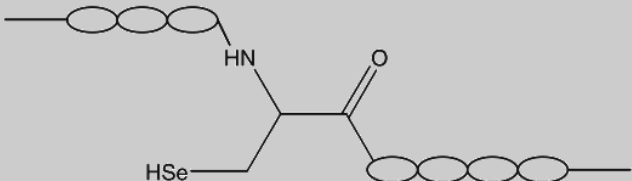
Los principales compuestos de selenio que son de interés en plantas incluyen especies inorgánicas, como el selenito y el selenato; especies orgánicas simples, como el metilselenol o la dimetilselenida; especies orgánicas más complejas, aminoácidos y especies de bajo peso molecular, como selenometionina,

selenocisteína, selenocistina (SeCys2), selenohomocisteína (SeHoCys2), Se-metilselenocisteína (MeSeCys), Se-metilselenometionina (MeSeMet), γ-glutamyl-Se-metilselenocisteína (γ-Glu-MeSeCys), Se-cistamina (Se-Cya), Se-cistationina; y otros compuestos tales como selenoproteínas o selenoenzimas (Dumont *et al.* (2006), Pyrzynska (2009)). Las fórmulas y estructuras se representan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Nombre, fórmula y estructura de las diferentes especies de Selenio

Nombre	Fórmula y estructura	
Selenito (Se (VI)) [ácido selenoso]	$SeO_3^{-2} \rightarrow [H_2SeO_3]$	
Selenato (Se (IV)) [ácido selénico]	$SeO_4^{-2} \rightarrow [H_2SeO_4]$	
Metilselenol	CH_3SeH	$CH_3 - SeH$
Dimetilselenida	$(CH_3)_2Se$	
Ion trimetilselenonio (catión)	$(CH_3)_3Se^+$	
Selenometionina (SeMet)	$HOOCH(NH_2)CH_2CH_2-Se-CH_3$ 	

Selenocisteína (Sec)	$HOOCCH(NH_2)CH_2-Se-H$ 
Selenocistina (SeCys2)	$HOOCCH(NH_2)CH_2-Se-Se-CH_2(NH_2)COOH$ 
Selenohomocisteína (SeHoCys2)	$HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2-Se-H$ 
Se-metilselenocisteína (MeSeCys)	$HOOCCH(NH_2)CH_2-Se-CH_3$ 
Se-metilselenometionina (MeSeMet)	$HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2-Se^+-(CH_3)_2$ 
γ-glutamil-Se-metilselenocisteína (γ-Glu-MeSeCys)	$H_2NCH_2CH_2-CO-NHCH(COOH)CH_2-Se-CH_3$ 

Se-cistamina (Se-Cya)	$NH_2CH_2CH_2 - Se - Se - CH_2CH_2NH_2$ 
Se-cistationina	$HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2 - Se - CH_2CH(NH_3)COOH$ 
Se-proteínas	

3. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

Hay numerosos estudios sobre el Se en alimentos, tanto referidos a contenido total como a la especiación de las diferentes formas químicas. Se ha realizado una búsqueda bibliográfica a fin de conocer las diferentes especies, los tratamientos de muestra y las metodologías de análisis que se describen en los diferentes estudios. En esta búsqueda bibliográfica se han empleado las bases de datos: ScienceDirect/Scopus y Google Scholar.

En primer lugar, para que la búsqueda sea efectiva, es importante tener conocimiento sobre lo que se va a investigar para eliminar todo aquello que no guarde interés en este estudio. Para ello, se definen los criterios que van a permitir realizar una búsqueda más específica de las referencias. Algunos de éstos son: palabras clave, principalmente en inglés (dado que gran parte de los artículos están en este idioma), tipos de publicaciones (revistas, artículos científicos, tesis, libros, etc.), fecha de publicación...

Una vez seleccionados, se introdujeron estos parámetros en las diferentes bases de datos. Inicialmente las palabras clave para la búsqueda fueron: selenium, food, vegetables y speciation. Se usaron los operadores booleanos “AND”, para hacer búsquedas simultáneas de las diferentes palabras clave, haciendo que aparezcan esos términos en el mismo artículo y “OR” con términos similares. Además, también se fijaron los años de publicación, entre 1990 y la actualidad. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Referencias obtenidas en los buscadores de literatura científica

Base de datos	Referencias
ScienceDirect/Scopus	1022
Google Scholar	8900

Si se amplía el rango de años a un periodo que abarque todos los estudios, en ScienceDirect la búsqueda asciende a 1099 mientras que en GoogleScholar a 9170. Si, por el contrario, reducimos el intervalo a las dos últimas décadas, desde el año 2000 a la actualidad, en el primero tenemos 804 resultados y en el segundo 8340. Por

tanto, se puede apreciar que en este periodo de tiempo el número de publicaciones ha sido mucho mayor, lo cual ha sido posible gracias a la aparición de nuevas técnicas analíticas y a la mejora de las ya existentes, además de la ascendente preocupación por la calidad de la alimentación y la aparición de normativas más exigentes sobre la composición de los alimentos.

A continuación, se redujo la búsqueda seleccionando solo artículos, quedando unos 480 en ScienceDirect. Como GoogleScholar no permite hacer esta selección, se ordenaron los artículos por relevancia. Se seleccionaron primero artículos referentes a la importancia del Se en la dieta. También se ha utilizado la propia bibliografía que contenían los artículos seleccionados, para acceder a información más relevante.

En la Figura 9 se observa un diagrama de los pasos a seguir en la realización de la revisión bibliográfica.

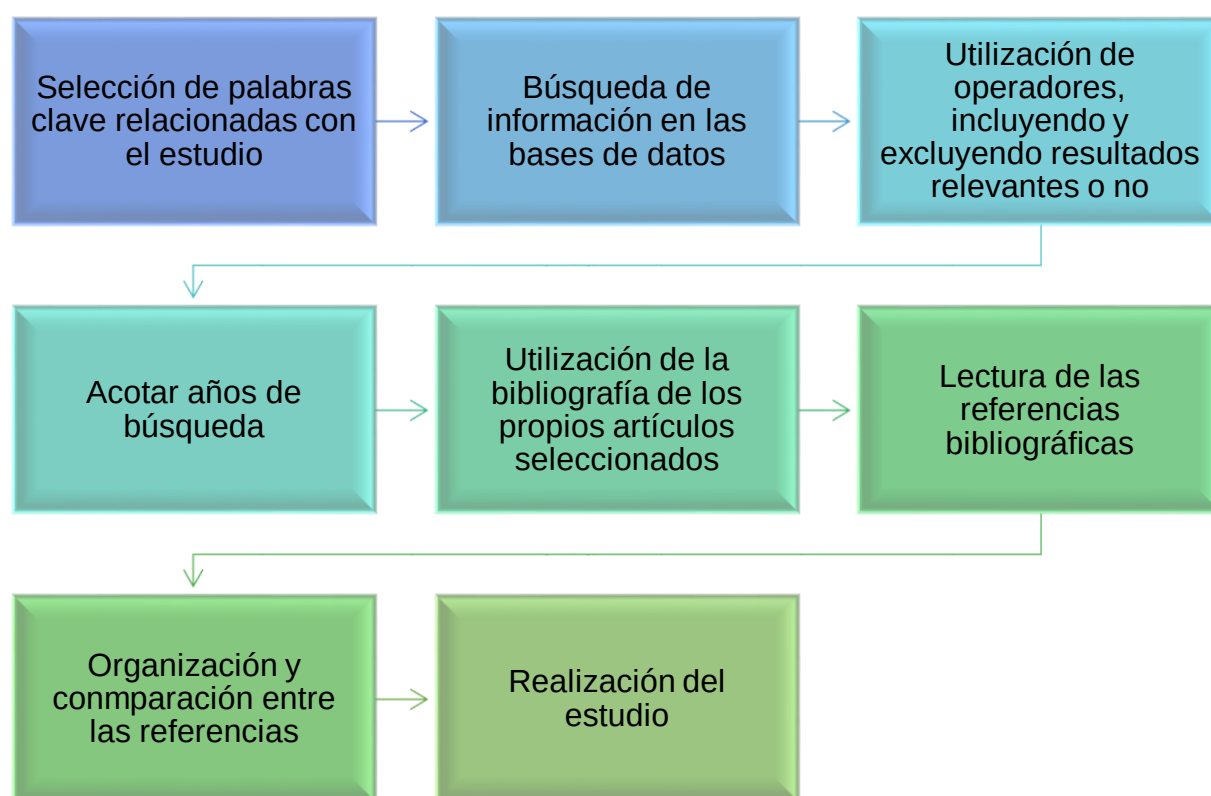


Figura 9. Diagrama de flujo de la revisión de la bibliografía

4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ESPECIES DE SELENIO EN ALIMENTOS Y SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

La importancia, cada vez más patente, del Se en la alimentación ha dado lugar a la necesidad de contar con procedimientos analíticos fiables y sensibles, para la identificación y cuantificación de las distintas especies de Se a nivel de trazas.

La técnica más utilizada actualmente para el análisis y la especiación del Se en alimentos es la cromatografía de líquidos para separar los diferentes analitos, seguida de la etapa de determinación con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). En menor medida, se han usado otros métodos de análisis conductimétricos, detección ultravioleta, fluorescencia o incluso espectrometría de masas orgánica con ionización por electropulverización (ESI-MS), que además de la posibilidad de cuantificar, permite la elucidación estructural de especies desconocidas de Se. Para la determinación de selenio inorgánico en sus diferentes estados de oxidación, también se utiliza la técnica de generación de hidruros (HG) asociada con espectroscopia de absorción atómica (AAS) (HPLC-HG-AAS).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tiene la ventaja de realizar separaciones de especies de Se no volátiles y, en general, tiene mayor versatilidad que la cromatografía de gases, que puede requerir una etapa de derivación antes del análisis. Solo para algunos casos de compuestos volátiles de selenio que se han estudiado en la emisión de especies volátiles de plantas es más apropiado el empleo de cromatografía de gases.

La determinación de especies volátiles de Se suele incorporar un paso de preconcentración, seguido de desorción térmica o de extracción con un disolvente orgánico, antes de la separación por cromatografía de gases. Recientemente, se ha planteado la microextracción en fase sólida como un método interesante para la preparación de muestras, compatible con la cromatografía de gases y la detección por ICP-MS (Kozak (2012), Pyrzynska (2009))

4.1. Métodos de extracción de compuestos de selenio

Para el análisis de compuestos no volátiles, antes de la separación, ya sea cromatográfica o por otros métodos como la electroforesis capilar, hay que extraer los analitos de las muestras sólidas de las que se quiere identificar y determinar las especies de Se. Este procedimiento de extracción sólido-líquido es un paso muy importante con respecto a la especiación del selenio. Se han estudiado varias metodologías de extracción para recuperar la mayor cantidad de especies de Se, sobre todo, a partir de material vegetal y suplementos alimenticios (Montes *et al.* (2006)).

También es necesario mencionar la etapa de tratamiento de muestra previa a la determinación. A la hora de realizar el análisis de especies de Se, también es importante la toma de muestra y el almacenamiento de la misma, ya que pueden producirse pérdidas por volatilización, transformación de una especie a otra, por lo que la concentración y la forma original del analito, se puede ver alterada. Estos problemas pueden solucionarse, por ejemplo, almacenando la muestra a baja temperatura, utilizando recipientes adecuados que no interactúen con la muestra, también, para el Se total, pero no para las especies orgánicas, puede acidificarse la muestra (Quijano Nieto (2003)).

La naturaleza de la matriz de la muestra vegetal, que es objeto de estudio, y las especies de Se que se analizan, son las que van a dictar el tipo de extracción. En la preparación de muestras sólidas, generalmente se incluyen procesos como moler, triturar, liofilizar o tamizar y a posteriori, alguna forma de extracción. Los procedimientos más utilizados de concentración y/o extracción, son la extracción sólido-líquido o líquido-líquido.

En la actualidad, siguiendo los postulados de la Química Verde, se intenta establecer como prioridad la eliminación de reactivos, principalmente disolventes orgánicos, disminuir la cantidad de emisiones de gases y residuos tanto sólidos como líquidos, que se generan diariamente en el laboratorio. Hay otras técnicas de extracción, aparte de la extracción sólido-líquido (SLE), que son más afines a esas propuestas de la química verde y son:

- La hidrólisis enzimática

- Las extracciones asistidas por microondas (MAE) o bien asistida por ultrasonidos (SAE)
- La extracción asistida por fluidos presurizados.

4.1.1. Extracción sólido-líquido

La SLE se utiliza para aislar analitos de una matriz sólida o semisólida con disolventes. El analito difunde del sólido al disolvente, en función de la afinidad que tenga con este. Se puede realizar simplemente agitando una muestra sólida en un disolvente frío o bien caliente (Chen *et al.* (2008)).

La extracción de Se^{4+} y Se^{6+} debe realizarse sin que sufran transformación en otras especies, a través de procesos de lixiviación con NaOH 1M. También pueden extraerse especies tanto orgánicas como inorgánicas con mezclas de distintos disolventes orgánicos que no destruyan las especies de Se (Quijano Nieto (2003)).

4.1.2. Extracción mediante hidrólisis enzimática (HE)

La hidrólisis enzimática, es un proceso de rotura de macromoléculas, concretamente de enlaces peptídicos, que unen los aminoácidos que forman las proteínas, mediante la adición de una enzima, una proteasa (Figura 10). Generalmente se realiza una incubación, con una temperatura de 37 °C durante 24 horas, en un medio tamponado (fosfato-ácido cítrico a pH $\approx$ 7,5). (Quijano Nieto (2003)).

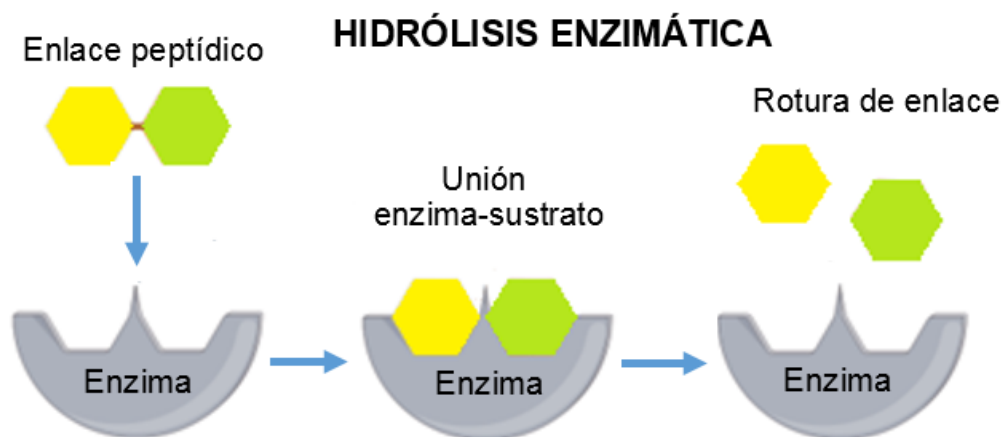


Figura 10. Esquema de la secuencia de la ruptura de un enlace peptídico por acción de una enzima

Como en toda extracción, la eficiencia de esta depende de factores como: el pH, la temperatura, la fuerza iónica o la relación enzima/muestra. Dado que las enzimas actúan en lugares específicos, estas deben seleccionarse atendiendo al tipo de muestra que se tiene.

La ventaja de esta hidrólisis, es que las enzimas actúan solo sobre enlaces químicos concretos, lo que va a provocar que los compuestos de interés, presentes en la muestra, queden libres. Otra ventaja es que no hay contaminantes ni reactivos. Su desventaja más destacada, es el tiempo que se requiere para una extracción cuantitativa, en torno a 15-24 horas. Ahora bien, si esta técnica se combina con MAE, SAE o PLE, el proceso se puede acelerar, logrando extracciones cuantitativas en cuestión de minutos, al romperse las paredes celulares y las membranas, permitiendo así un ataque enzimático más rápido. (Mañana López (2016), Pérez Tadeo (2015)).

Mediante hidrólisis enzimática de levaduras enriquecidas con selenio se han identificado SeMet o SeCys₂, llegando a recuperar alrededor del 90% con la enzima pronasa E. La acción conjunta de proteasas y lipasas, el análisis de Se total en plantas y pescados, dio extracciones cerca del 100%, solo en muestras sólidas, no en los extractos (Quijano Nieto (2003)).

4.1.3. Extracción asistida por microondas (MAE)

Esta técnica, permite la extracción rápida de analitos a partir de matrices sólidas, con una alta eficacia de extracción, comparable a la de las técnicas clásicas, aunque con las ventajas de trabajar sin disolventes orgánicos tóxicos, por lo que disminuye la cantidad utilizada y sus residuos, la exposición humana a ellos y su liberación al medio ambiente.

La radiación de microondas es una radiación no ionizante, puede utilizarse como portadora de energía. Al incidir las ondas sobre un material, capaz de absorber en la región del microondas, esa parte de energía absorbida va a transformarla en calor. La transformación de la energía electromagnética en energía calorífica se produce por dos hechos:

- La conducción iónica, que es la migración de los iones

- La rotación dipolar, los momentos dipolares se intentan alinear con el campo eléctrico aplicado

Tanto en el disolvente como en la muestra, estos dos hechos tienen lugar simultáneamente, lo que se produce es un cambio de la energía de microondas a energía térmica.

Hay que tener ciertos factores en cuenta como: el disolvente, la presión, la temperatura, el tipo de matriz o la energía suministrada. La MAE se puede realizar con un sistema de microondas abierto, cerrado o incluso con un microondas de cocina. La instrumentación utilizada puede verse en la Figura 11.

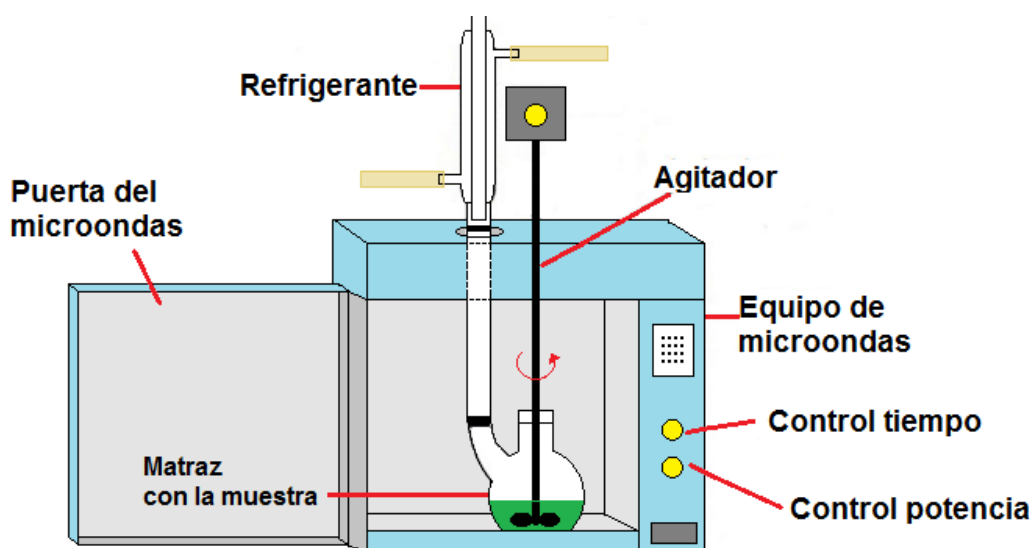


Figura 11 Extractor asistido por microondas

Algunas de las ventajas de MAE son:

- Su amplia aplicabilidad para extracciones rápidas de analitos, incluidas algunas sustancias térmicamente inestables.
- También que a diferencia de un calentamiento normal, el de microondas, calienta toda la muestra al mismo tiempo, lo hace desde el centro hacia afuera en un corto período de tiempo, dando un calentamiento rápido y uniforme, al contrario del calentamiento convencional, ver esquema en la Figura 12.

Sus desventajas incluyen:

- Que no puede incluirse en un sistema de flujo.
- Que solo pueden calentarse moléculas polares.

(Chen *et al.* (2008), Destandau *et al.* 2013))

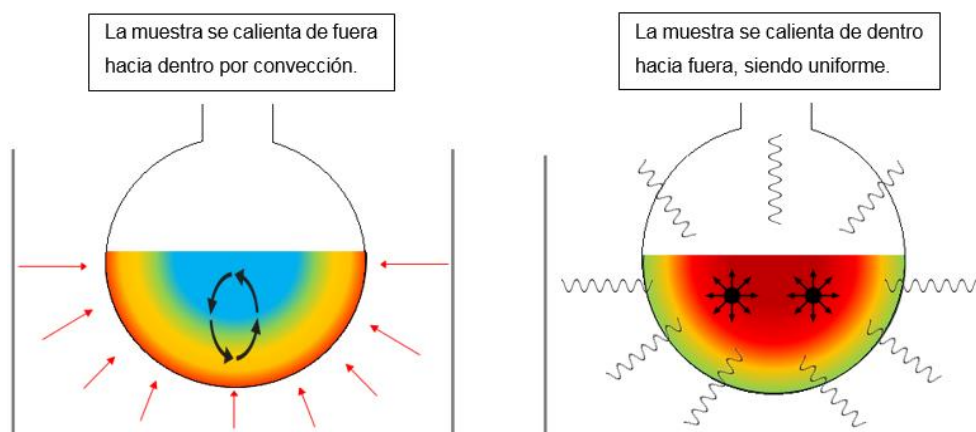


Figura 12. Esquema de calentamiento por convección y por microondas

Para llevarla a cabo, se agregaran 2,5 mL de agua Milli-Q a 0.2 g de la muestra y 0,05 g de proteasa en tubo de centrífuga de 10 mL. Se homogeneiza mediante agitación mecánica, a 37°C durante 20 h. Posteriormente, se centrifuga durante 20 min y el sobrenadante se retira. Los extractos provenientes de la hidrólisis enzimática se pasan por una membrana de para eliminar el exceso de proteasa que pudiera interferir en la separación cromatográfica (Montes *et al.* (2006)).

4.1.4. Extracción asistida por ultrasonidos (SAE)

La extracción asistida por ultrasonidos es otra técnica alternativa que mejora la extracción. Lo hace mediante cavitaciones inducidas que crean microambientes con altas temperaturas y altas presiones, que a su vez, aumentan la penetración del extractante en la muestra. La SAE es una forma de extracción rápida, económica y eficiente, que permite un menor uso del disolvente necesario para la extracción y favorece la extracción de compuestos termolábiles.

Los ultrasonidos sustituyen la agitación normal, como se muestra en la Figura 13. La radiación está en torno a los 30 Hz y lo que hace es excitar las moléculas para que vibren, con lo que los choques son mayores y el disolvente penetra con mayor facilidad en la muestra, haciendo más fácil que ambas fases permanezcan en contacto (Chen *et al.* (2008), Mañana López (2016)).

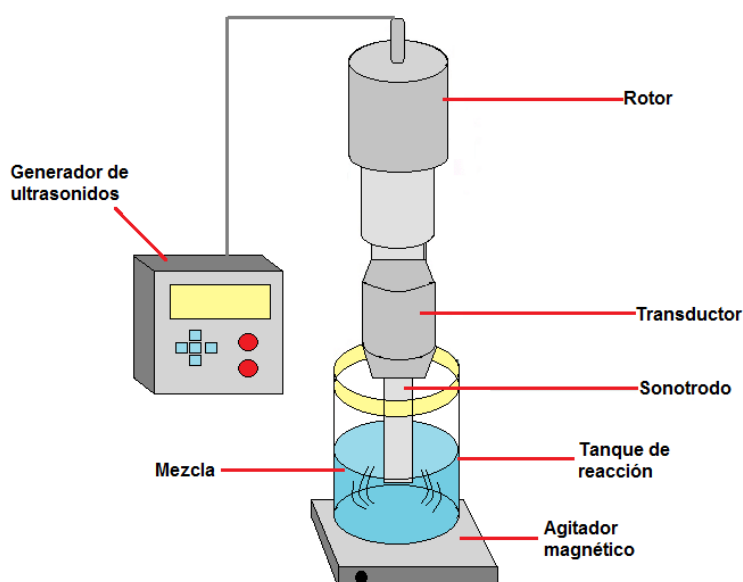


Figura 13. Equipo de extracción por Ultrasonidos

4.1.5. Extracción con líquidos presurizados (PLE)

La extracción con líquidos presurizados se basa en el uso de la presión y la temperatura para extraer componentes orgánicos de matrices tanto sólidas, como semisólidas. Utilizar presiones elevadas, en torno a 100 atm, permite elevar el punto de ebullición de los disolventes favoreciendo el estado líquido de estos a mayores temperaturas y aumentando así el poder de solvatación y la cinética de extracción. Las altas temperaturas (entre 30-120°C), van a alterar las interacciones analito-matriz, rompiéndose los enlaces entre ellos, aumentando la eficacia y la velocidad de extracción. Igualmente, se reduce la cantidad de disolvente orgánico y el tiempo de extracción. Uno ejemplo de este tipo de instrumentación se recoge en la Figura 14.

Los disolventes que pueden emplearse son agua, metanol, etanol y hexano. El amplio rango de polaridades de los disolventes permite extraer multitud de compuestos (Chen *et al.* (2008), Mañana López (2016), Pérez Tadeo (2015)).

Concretamente para el Se y sus especies en un estudio sobre levaduras enriquecidas con Se, este método se realizó con estas condiciones: la mezcla extractante era (1:1, v:v) de agua y metanol, a una presión de 109 atm, una temperatura de 160°C y un tiempo de extracción de 10 minutos (Mañana López (2016)).



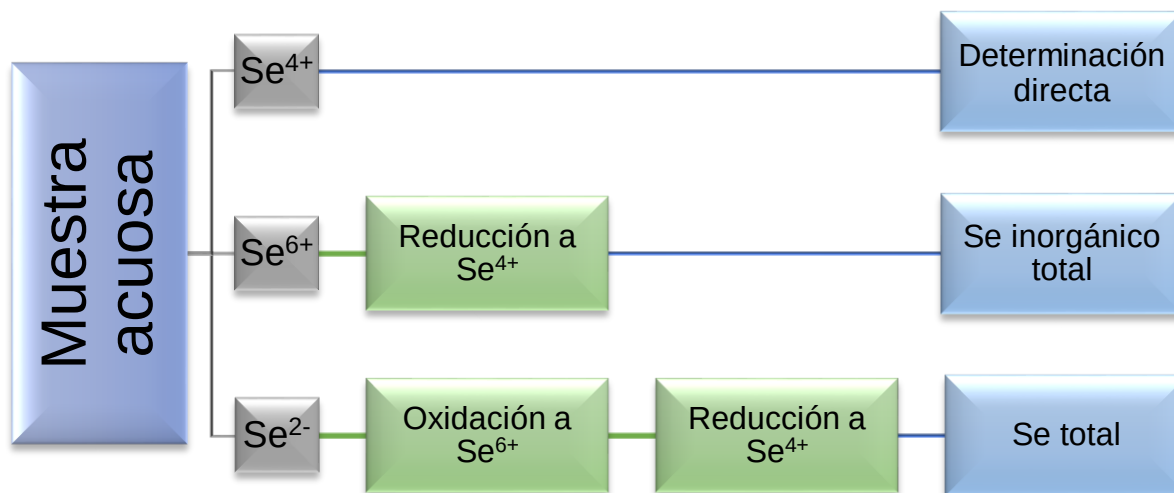
Figura 14. PF07-Sistema de extracción con líquidos presurizados (UJA, (s.f.))

4.2. Determinación del contenido total de selenio

Se utilizan tanto métodos no cromatográficos como cromatográficos para determinar el Se total. Los primeros se usan normalmente para la especie Se^{4+} . Para el resto de especies, es necesario un pretratamiento para su transformación en una estructura química detectable.

En la Figura 15 se puede observar las diferentes vías tomadas para la determinación de las diferentes especies de selenio. El Se^{6+} tiene que reducirse siempre a Se^{4+} para poder determinar el Se inorgánico total. La reducción puede hacerse de diferentes maneras, uno de los métodos más usados es calentar hasta 90-100 °C durante 10-20 min con una disolución de HCl entre 4N y 6N, si se calentase mucho más tiempo se pueden sufrir pérdidas de Se.

Para el Se total, hay que oxidar el Se^{2-} , normalmente con peroxidisulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) en medio ácido. Esto hace que el selenio se oxide por completo, por lo que luego es precisa una reducción a Se^{4+} .



$$\text{Se}^{6+} = \text{Se}_{\text{inorgánico total}} - \text{Se}^{4+}$$

$$\text{Se}^{2-} = \text{Se}_{\text{total}} - \text{Se}_{\text{inorgánico total}}$$

Figura 15. Determinación de especies de selenio

El inconveniente de los métodos no cromatográficos (detección fluorimétrica, detección electroquímica...), es que la manipulación de la muestra es compleja y no permite diferenciar las especies de Se orgánico y sufren interferencias por diversos iones. (Quijano Nieto (2003)).

En los métodos cromatográficos se va a precisar una separación de las especies antes de determinarlas, acoplando así dos técnicas, una que separa las especies y otra que las cuantifica.

4.2.1. Análisis mediante ICP-MS

El plasma de acoplamiento inductivo junto con la espectrometría de masas, es una técnica para el análisis multielemental. El ICP es una fuente de ionización de alta energía; el plasma normalmente opera a temperaturas entre 5000 y 10 000 K, a

presión atmosférica. El plasma de argón se genera en una antorcha de cuarzo en las condiciones de un campo electromagnético de radiofrecuencia potente (27–40 MHz).

Presenta muchas ventajas:

- Bajos límites de detección (1-100 ng/L)
- Da información cuasi cuantitativa tanto de elementos mayoritarios, minoritarios y traza.
- Los espectros de masas son sencillos de analizar.
- Escaso nivel de interferencias
- Gran versatilidad, por que como puede acoplarse a diferentes sistemas de introducción de muestra, esta puede analizarse en sus tres estados (sólido, líquido y gaseoso).

No obstante, también presenta ciertas desventajas:

- Aquellas debidas a posibles interferencias, ya sean espectrales o no espectrales. Las primeras son a causa de que el equipo no puede distinguir entre dos iones con relación masa/carga similar, perdiendo capacidad de resolución, aunque este tipo de interferencias han sido documentadas. Las segundas, se observan en un aumento o una disminución de la señal a causa de factores externos, principalmente causados por la matriz.
- Por el potencial de ionización del Se, que es elevado (9,75 eV), al contrario que la mayoría de los elementos que pueden ionizarse hasta un 90%, el Se solo lo hace en un 30%.
- Su isótopo más abundante es el ^{80}Se , al usar plasma de argón, forma dímeros con este que crean interferencias espectrales, superponiendo su señal a la del Se, con lo cual se utiliza un isótopo con menor abundancia, como ^{82}Se (9.2%), ^{78}Se (23.5%) o ^{77}Se (7,6%), que tienen menos interferencias, per se pierde sensibilidad (Quijano Nieto (2003)).

4.3. Identificación de especies de selenio mediante cromatografía líquida (HPLC)

Para el análisis de especies de Se, se debe utilizar una técnica de separación junto con un sistema de detección altamente sensible y específico. Las técnicas más usadas en la especiación del Se son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), muy por encima de otras técnicas separativas como la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de gases (GC).

Muchos de los compuestos a analizar de Se, no son volátiles. La HPLC, entre las mencionadas anteriormente, es la técnica más utilizada reportada en la literatura, por que no requiere derivatizar la muestra, y es apta para el análisis de compuestos termolábiles.

Los límites de detección de HPLC acoplada a ICP-MS han sido buenos para el Se. Se han reportado límites de detección por debajo de $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para muestras de suero humano y de 0,5 a 2 ppb para Se inorgánico, SeCys, SeMet (con HPLC de fase inversa) (B'Hymer & Caruso (2006)).

Analizadores:

Existen distintas relaciones masa/carga, por lo que un analizador debería ser capaz de distinguir diferencias ínfimas de masa. Existen diferentes tipos de analizadores, entre ellos:

- Cuadrupolo (Q),
- Trampa de iones (IT-MS, ion-trap MS o ITD, ion trap detector)
- Orbitrap por transformada de Fourier (FT-OT),
- Tiempo de vuelo (TOF).

4.3.1. Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), es un método en el que las moléculas o analitos, se separan por su tamaño y, en algunos casos, por su peso molecular. La fase estacionaria es no absorbente, inerte y con poros uniformes, de

aproximadamente el mismo tamaño del analito, los más grandes eluirán primero, es decir, se extraerán en primer lugar, mientras que las moléculas más pequeñas interactúan más con la fase estacionaria y eluirán después (Figura 16)

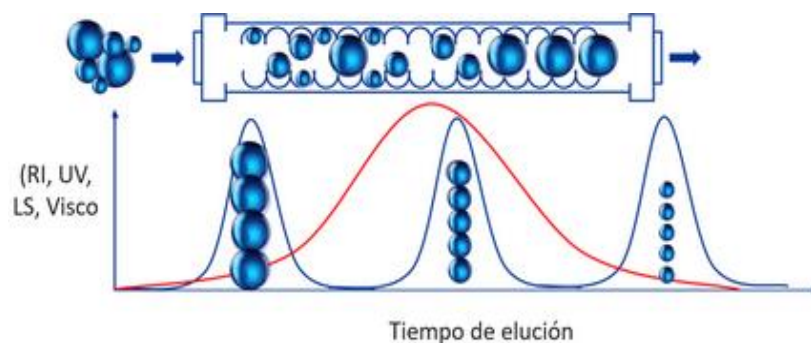


Figura 16. Gráfica de una separación utilizando una columna tipo SEC (Mexpolímeros (s.f.))

A diferencia de otros tipos de técnicas cromatográficas, el contacto entre la fase estacionaria y el analito se minimiza, no hay interacción física ni química entre ambos, lo que permite una separación eficaz.

En función de los analitos y de las fases móviles utilizadas, la SEC puede dividirse en dos categorías

- *Cromatografía de exclusión por tamaño/filtración en gel (GFC)*: utiliza una fase móvil acuosa y una fase estacionaria hidrofílica. Analiza y/o caracteriza proteínas, péptidos y otras biomoléculas como anticuerpos, inmunoglobulinas, complejos proteicos...
- *Cromatografía de exclusión por tamaño/permeación en gel (GPC) no acuosa*: utiliza una fase móvil orgánica y una fase estacionaria hidrofóbica. Analiza polímeros como adhesivos, aceites, plastificantes, plásticos, resinas y cauchos/elastómeros.

La SEC presenta una serie de ventajas:

- Los tiempos de extracción separación cortos y definidos.
- Las bandas estrechas que se obtienen, dan una buena sensibilidad.
- Los solutos no interaccionan con la fase estacionaria, con lo que se evita la pérdida de muestra.
- No se desactiva la columna al interactuar el soluto con el relleno

Y una principal desventaja, es la que no puede utilizarse con muestras de tamaños similares o con isómeros (Castaño (2015)).

La HPLC de exclusión por tamaño se utiliza en la especiación de Se para caracterizar las diversas selenoproteínas. En general, SEC es una técnica adecuada para la separación de macromoléculas bioquímicas como las que se encuentran con varias selenoproteínas.

5. CONCLUSIONES

En esta revisión se han descrito algunos ejemplos de la especiación de selenio y su análisis en alimentos de origen vegetal o animal, también a muestras biológicas, ambientales, tejidos animales y muestras clínicas humanas. La relevancia de la concentración de selenio, sus implicaciones ambientales y la relevancia sobre nuestra dieta hace que su análisis en aguas y suelo resulten fundamentales. La variedad de matrices en las muestras que contienen selenio hace necesario un tratamiento previo y estos han sido evaluados en la presente memoria. La revisión ha revelado la trascendencia del control de la concentración del selenio en los alimentos y su importancia en la dieta humana; pequeñas variaciones en la concentración de este elemento pueden resultar en graves problemas de salud.

Se han estudiado diferentes metodologías de extracción para Se-aminoácidos no proteicos como MeSeCys y SeMet en tejidos vegetales enriquecidos con selenio, no se encontraron diferencias significativas en el caso de aplicar hidrólisis enzimática en lugar de extracciones ácidas o tampón. De todos los métodos de extracción evaluados en esta búsqueda bibliográfica, los ultrasonidos permiten un tiempo de extracción mucho más rápido con recuperaciones de extracción muy similares a los métodos clásicos. Por lo tanto, el uso de la sonicación, es muy interesante para la extracción cuantitativa de Se-aminoácidos no proteicos en tejidos vegetales, ya que proporciona una extracción más rápida de las especies, es decir, tiempos de extracción muy cortos y además una degradación de especies insignificante.

6. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

B'hymer, C., & Caruso, J. A. (2006). Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1114(1), 1-20.

Castaño, E., 2015. *Cromatografía de exclusión por tamaño*. Cienciadelux. Recuperado 19 de Mayo de 2021 de: <https://cienciadelux.com/2015/08/15/>

Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., & Qiu, C. (2008). Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 191-219.

Destandau, E., Michel, T., & Elfakir, C. (2013). Microwave-assisted Extraction. In *Natural Product Extraction* (pp. 113-156).

Díaz-Alarcón, J. P., Navarro-Alarcón, M., López-García de la Serrana, H., & López-Martínez, M. C. (1996a). Determination of selenium in meat products by hydride generation atomic absorption spectrometry selenium levels in meat, organ meats, and sausages in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(6), 1494-1497.

Diaz-Alarcon, J. P., Navarro-Alarcón, M., de la Serrana, H. L. G., & Lopez-Martinez, M. C. (1996b). Determination of selenium in cereals, legumes and dry fruits from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake. *Science of the total environment*, 184(3), 183-189.

Dumont, E., Vanhaecke, F., & Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(7), 1304-1323.

Fairweather-Tait, S. J., Bao, Y., Broadley, M. R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J. E., & Hurst, R. (2011). Selenium in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 14(7), 1337-1383.

Goyer, R. A., & Clarkson, T. W. (1996). Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, Fifth Edition, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, 23, 813-858.

Kozak, L., Rudnicka, M., & Niedzielski, P. (2012). Determination of inorganic selenium species in dietary supplements by hyphenated analytical system HPLC-HG-AAS. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1237-1243.

López-Bellido Garrido, Francisco Javier, & López-Bellido, Luis. (2013). Selenio y salud: valores de referencia y situación actual de la población española. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5), 1396-1406. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.5.6634>

Manjusha, R., Dash, K., & Karunasagar, D. (2007). UV-photolysis assisted digestion of food samples for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). *Food Chemistry*, 105(1), 260-265.

Mañana López, A. (2016). Extracción y determinación de selenio y sus especies en nueces de Brasil.

Mexpolímeros. *GPC (cromatografía de permeación en gel)*. (s.f.). Polímeros termoplásticos, elastómeros y aditivos. Recuperado 19 de mayo de 2021, de <https://www.mexpolimeros.com/gpc.html>

Montes-Bayón, M., Molet, M. J. D., González, E. B., & Sanz-Medel, A. (2006). Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 68(4), 1287-1293.

National Institutes of Health (NIH): Office of Dietary Supplements (2019). *Selenio, Datos en español* <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-DatosEnEspanol/>

Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Science of the total environment*, 400(1-3), 115-141.

Núñez, S. C. (2016). Biocumulación, toxicidad e interacción de metilmercurio y especies de selenio. Universidad Complutense de Madrid.

Pappa, E. C., Pappas, A. C., & Surai, P. F. (2006). Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. *Science of the Total Environment*, 372(1), 100-108.

Pérez Tadeo, M. (2015). Desarrollo de un método de separación cromatográfica de especies de selenio mediante HPLC-IPC-MS.

Pyrzynska, K. (2009). Selenium speciation in enriched vegetables. *Food chemistry*, 114(4), 1183-1191.

Quijano Nieto, M. Á. (2003). Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de selenio y sus especies en muestras de alimentos, aguas y fluidos biológicos por ICP-MS.

Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The lancet*, 356(9225), 233-241.

Rayman, M. P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the nutrition Society*, 61(2), 203-215.

Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. *The Lancet*, 379(9822), 1256-1268.

Reglamento (CE) nº 1925/2006 de la Comisión Europea del Parlamento Europeo y del consejo de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. *Diario Oficial L 404 de 30/12/2006 p. 0026 0038*. <https://www.boe.es/doue/2006/404/L00026-00038.pdf> [consultado el 5 de junio de 2021].

Universidad de Jaén, Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI). (s.f.). *PF07-Sistema de extracción con líquidos presurizados*. <https://www.ujaen.es/servicios/scai/recursos/pf07-sistema-de-extraccion-con-liquidos-presurizados>

Zhang, X., Shi, B., & Spallholz, J. E. (1993). The selenium content of selected meats, seafoods, and vegetables from Lubbock, Texas. *Biological trace element research*, 39(2), 161-169.

ANEXO I: ABREVIATURAS

AAS → Espectrometría de absorción atómica

ESI-MS → Espectrometrías de masas de ionización por electro-pulverización

HE → Hidrólisis enzimática

HPLC → Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-HG-AAS → Cromatografía líquida de alta resolución con generación de hidruros y espectrometría de absorción atómica

ICP-MS → Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivamente

MAE → Extracción asistida por microondas

MeSeCys → Se-metilselenocisteína

MeSeMet → Se-metilselenometionina

NIH → National Institutes of Health

PLE → Extracción con líquido presurizados

SAE → Extracción asistida por ultrasonidos

Se → Selenio

Se-Cya → Se-cistamina

SeCys → Selenocisteína

SeCys2 → Selenocistina

SeHoCys2 → Selenohomocisteína

SeMet → Selenometionina

SLE → Extracción sólido-líquido

γ -Glu-MeSeCys → γ -glutamil-Se-metilselenocisteína