

ESPECIACIÓN DE SELENIO EN MUESTRAS DE SANGRE Y PLASMA EN PACIENTES CON LEUCEMIA POR HPLC-ICP-MS

MSc. Jervis Nava¹, Dra. Marinela Colina^{1,2*}, MSc. Carolina Sthormes¹, Dra. Ana Cáceres¹, Lic. Brinolfo Montilla¹

¹Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias Departamento de Química, Maracaibo 4011, Zulia, Venezuela. ²Innovación Ambiental Quitosano CA, San Francisco No 29-25, Maracaibo, Zulia, Venezuela.

*Autor para la correspondencia. Email: colinamarinela@gmail.com

Recibido: 22-11-2017 / Aceptado: 21-2-2018

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método de análisis para la determinación de la concentración total de selenio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia mediante ICP-MS. Por otro lado, se desarrolló un método para la determinación de algunas especies de Se en muestras de sangre y plasma mediante HPLC-ICP-MS. Se emplearon diferentes fases móviles en modo isocrático. La separación más adecuada para las especies selenio DL cisteína y selenio DL metionina se obtuvieron con una fase móvil de: 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM de EDTA, a una velocidad de flujo de 1mL.min⁻¹. Para selenio total, los límites de detección y cuantificación fueron 0,03 µg.L⁻¹ y 0,04 µg.L⁻¹ respectivamente. Las desviaciones estándar relativas (DER) en la corrida y entre corridas fueron de 0,8 % 2,71 % respectivamente, indicando una adecuada precisión en el análisis, adicionalmente con los valores obtenidos en la recuperación (101,15% ± 1,4) cuya exactitud es aceptable. Las concentraciones medias de selenio en sangre completa y plasma fueron de 243,6 ± 112,3 y 141,7 ± 34,1 µg.L⁻¹ respectivamente para pacientes con leucemia y para la población control fueron de 198,0 ± 40,6 y 159,1 ± 30,1 µg.L⁻¹ respectivamente. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos para las especies fueron: 0,46 y 0,47 µg.L⁻¹ para la selenoDLcisteína y de 0,45 y 0,47 µg.L⁻¹ para la selenoDLmetionina respectivamente. La precisión como (DER) fue menor al 5% se encontraron valores adecuados en el proceso de extracción con recuperaciones entre 95 y 105%. Se encontraron concentraciones de selenoDLcisteína en sangre y plasma de pacientes con leucemia de 171,25 ± 56,5 y 106,74 ± 11,1 µg.L⁻¹ respectivamente y para la población control de 123,77 ± 16,2 y 84,96 ± 6,9 µg.L⁻¹.

Palabras clave: Selenio, sangre, plasma, leucemia, selenoproteínas, selenoaminoácidos, selenoDLcisteína, selenoDLmetionina.

SELENIUM SPECIATION IN BLOOD AND PLASMA SAMPLES IN PATIENTS WITH LEUKEMIA BY HPLC-ICP-MS"

ABSTRACT

The concentration of selenium in blood and plasma is the most appropriate magnitude for the valuation of the corporal content of selenium by means of analytic techniques for sin the for clinical practice. In this research, an analysis method to determine the total concentration of selenium in whole blood and plasma samples from patients with leukemia using ICP-MS was carried out. The limits of detection and quantification were 0.03 µg.L⁻¹ and 0.04 µg.L⁻¹ respectively. The relative standard deviations in and between runs were 0.8 % 2.71 %



respectively, indicating an appropriate accuracy in the analysis and also with the values obtained in the recovery ($101.15\% \pm 1.4$) whose accuracy is acceptable. The mean concentrations of selenium whole blood and plasma were 243.6 ± 112.3 and $141.7 \pm 34.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively for patients with leukemia and for the control population were 198.0 ± 40.6 and $159.1 \pm 30.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. Furthermore, it was developed a method for the determination of some species in the same samples, through HPLC-ICP-MS using different mobile phases with isocratic mode. The most appropriate separation was obtained with a mobile phase of: 0.1 % 2- mercaptoethanol, 3 % methanol, 0,06M ammonium acetate and 2mM of EDTA, with pump speed of 1mL.min^{-1} . The detection and quantification obtained were: 0.46 and $0.47 \mu\text{g.L}^{-1}$ for the seleno-DL-cysteine and 0.45 and $0.47 \mu\text{g.L}^{-1}$ for the seleno-DL-methionine respectively. The accuracy was 5% or even smaller than that. In the extraction process, recoveries between 95 and 105% were found. There were concentrations of seleno-DL-cysteine in whole blood and plasma from leukemia patients of 171.25 ± 56.5 and $106.74 \pm 11.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively and for the control population of 123.77 ± 16.2 and $84.96 \pm 6.9 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Key words: Selenium, blood, plasma, leukemia, selenoproteins, selenoaminoacids, selenoDLcysteine, selenoDLmetionine.

ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM AMOSTRAS DE SANGUE E PLASMA EM PACIENTES COM LEUCEMIA POR HPLC-ICP-MS

RESUMO

A concentração de selênio no sangue e no plasma é a magnitude mais apropriada para a avaliação do conteúdo corporal do selênio por meio de técnicas analíticas para a prática clínica. Nesta pesquisa, um método de análise para a determinação da concentração total de selênio no sangue total e nas amostras de plasma de pacientes com leucemia foram realizadas por meio de ICP-MS. Os limites de detecção e quantificação foram de $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,04 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Os desvios-padrão relativos e entre as replicas foram de 0,8% a 2,71%, respectivamente, indicando uma precisão adequada na análise e também com os valores obtidos na recuperação ($101,15\% \pm 1,4$) com uma acurácia aceitável. As concentrações médias de selênio no sangue total e no plasma foram de $243,6 \pm 112,3$ e $141,7 \pm 34,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, para pacientes com leucemia e para a população controle foram de $198,0 \pm 40,6$ e $159,1 \pm 30,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Além disso, foi desenvolvido um método para a determinação de algumas espécies nas mesmas amostras por meio de HPLC-ICP-MS usando diferentes fases móveis como o modo isocrático. A separação mais apropriada foi obtida com uma fase de: 0,1% de 2- mercaptoetanol, 3% de metanol, 0,06 M de acetato de e 2 mM de EDTA, com velocidade da bomba de 1 mL.min^{-1} . Os limites de detecção e quantificação obtidos foram: $0,46$ e $0,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a seleno-DL-cisteína e de $0,45$ e $0,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a seleno-DL-metionina, respectivamente. A precisão como foi de 5% ou menor. No processo de extração foram encontradas recuperações entre 95 e 105%. Foram concentrações de seleno-DL-cisteína no sangue total e plasma de pacientes com leucemia de $171,25 \pm 56,5$ e $106,74 \pm 11,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente e para a população controle de $123,77 \pm 16,2$ e $84,96 \pm 6,9 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavra chaves: Selênio, sangue, plasma, leucemia, selenoproteínas, selenoaminoácidos, selenoDLcysteine, selenoDLmetionine.

1. INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un elemento traza esencial en el cuerpo humano, forma parte importante de las enzimas antioxidantes que protegen las células contra los efectos de los radicales libres que se producen durante el metabolismo normal del oxígeno (Casals *et al.*, 2005). En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en el equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación

que conservan el estado normal fisiológico de los organismos (Avello & Suwalsky, 2006). Su papel protector en la prevención del cáncer es objeto de intensos debates y estudios epidemiológicos, existiendo indicios de que esa acción puede ser más farmacológica que esencial (Vadgama *et al.*, 2000). En el humano, el selenio ha sido reconocido como elemento esencial en el mantenimiento de las funciones fisiológicas en el organismo que, a su vez, debe ser ingerido en la dieta humana en concentraciones del orden de $70 \mu\text{g} \cdot \text{día}^{-1}$ en el caso de déficit de selenio. Su disminución o aumento de concentración puede provocar deficiencias o efectos tóxicos. Es por ello que, los efectos beneficiosos del selenio siempre están relacionados con el contenido de selenoproteínas o enzimas dependientes de selenio en el organismo (Hernández & Ríos, 2009).

Las fuentes principales del selenio es la ingesta de alimentos que proceden de la dieta diaria y los suplementos nutricionales enriquecidos con selenio, (Hernández & Ríos, 2009; Hurtado & Gardea, 2007; Werner, 1992) la forma en que se aportan el selenio en este tipo de alimento es unido a proteínas (selenoproteínas de baja masa molecular, $<10 \text{ KDa}$). En la estructura de la selenoproteína, tiene uno o varios átomos de selenio que reemplaza el azufre de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina, dando lugar a especies orgánicas de selenio como selenocistina (SeCys_2), selenocisteína (SeCys), selenometionina (SeMet), metil-selenocisteína (CH_3SeCys) y seleno-metil-selenocisteína (SCM) (Avissar, 1989). En la actualidad, tanto el selenio como sus especies son el objetivo de numerosas investigaciones en el campo de la salud humana, ya que presentan propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Hernández & Ríos, 2009). El selenio es un agente químico preventivo efectivo contra el cáncer en muchos animales de experimentación. Además, estudios epidemiológicos realizados en algunas ciudades han demostrado que el selenio posee posibles efectos en la prevención del cáncer (Rangel, 2005; Micke *et al.*, 2009). El selenio presenta varios estados de oxidación, formando gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos, siendo su química compleja en el medioambiente y en los sistemas vivos (Gómez *et al.*, 1999).

Las propiedades tóxicas y esenciales del selenio dependen no sólo del nivel de concentración sino también de la forma química en que esté presente. Por lo tanto, la biodisponibilidad, actividad biológica, transporte, distribución y efectos tóxicos de este elemento traza en los organismos vivos dependerá en gran parte de su especie química (Gómez *et al.*, 1999). Actualmente está claramente establecida la necesidad de la determinación, no solo de la cantidad total de un elemento en una muestra, sino de las distintas especies químicas en que se encuentra distribuido ese elemento en dicha muestra (especiación). La especiación química permite establecer la distribución geoquímica del

elemento en el medioambiente, su biodisponibilidad y/o toxicidad en los distintos organismos vivos y seres humanos. El análisis de especies inorgánicas y orgánicas en suplementos alimenticios, así como de muestras biológicas, es de gran interés para definir rutas metabólicas y prevenir enfermedades muy extendidas. Estos procedimientos analíticos requieren la aplicación de técnicas analíticas de última generación para la identificación y cuantificación de especies elementales (Gómez *et al.*, 1999; Hernández, 2010; Kelly, Paramee, Patrick, & Zoltán, 2018).

Selenio en la leucemia

La disminución en la concentración sérica de selenio se considera un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, cirrosis hepática y distrofia muscular. La importancia de este mineral como micronutriente, radica en que se asocia con el sitio activo de la Glutación Peroxidasa (GSH-PX) y esta enzima protege al cuerpo de los peróxidos nocivos que son producto del metabolismo. La acumulación de peróxidos puede conducir a la generación de radicales libres, que a su vez destruyen membranas y son causa de cáncer y aterosclerosis.

En el presente trabajo se persigue la determinación de selenio total, así como algunas especies químicas presentes en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia mediante la técnica cromatografía líquida de alta resolución acoplado en línea con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos

Los reactivos químicos empleados fueron de grado certificado o analítico. La solución concentrada de selenio (ca. 1000 mg Se.L⁻¹) se preparó gravimétricamente a partir de selenito de sodio (Na₂SeO₃) (Merck). Las soluciones patrones de plomo se prepararon diariamente por dilución serial de la solución concentrada del analito. El rango de concentraciones empleado para la técnica de espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para la determinación analítica del selenio fue: 5, 10, 20 y 40 µg Se.L⁻¹. Estos patrones se prepararon a partir de soluciones intermedias (ca. 100, 10 y 1 mg Se.L⁻¹), cuyas concentraciones se evaluaron por ICP-MS. Todas las soluciones fueron preparadas con agua bidestilada y desionizada en ácido nítrico (HNO₃ al 2% v/v). Se emplearon matraces volumétricos de vidrio tipo A de 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mL (Pyrex o Kimax) para preparar las soluciones, y envases de polietileno lineal

(Nalgene) de 125, 250 y 500 mL para almacenar las soluciones concentradas, intermedias, patrones acuosos de las especies de selenio estudiadas y para las diluciones de las muestras requeridas para el análisis espectrométrico.

Para el tratamiento de muestras de sangre completa y plasma se emplearon: Hidróxido de amonio (NH_4OH) (Alba Aesor), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 30% v/v) (Riedel de Haën), 1-octanol (Riedel de Haën) y agua bidestilada y desionizada.

Para extraer el selenio para determinarlo por HPLC-ICP-MS se usaron, como agentes complejantes del selenio en forma de aminoácidos o proteínas: L-cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SNO}_2$ al 0,05% m/v) marca (Merck, 99%), en una solución de ácido clorhídrico (HCl al 0,1% v/v) (Riedel de Haën, 37% M), 2-mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ al 0,1% v/v). (Merck, 99%). La solución extractante fue preparada con agua grado HPLC (Ricca Chemical Company, ACS).

Para las separaciones cromatográficas de las especies de selenio se utilizaron como reactivos patrones: Seleno-DL-cisteína (Sigma, 79%) y seleno-DL-metionina (Fluka Biochemika, 99%). El rango de concentraciones empleado para la técnica de HPLC-ICP-MS para la especiación de selenio fue: 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g Se.L}^{-1}$. Estos patrones se prepararon a partir de soluciones intermedias (i.e. 100 y 1 mg Se.L^{-1}) en agua grado HPLC. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2 mmol.L^{-1}) (Riedel de Haën, 99%), 2-mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ al 0,1 % v/v), Acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0,06 M) (Merck, 98%) y metanol (CH_3OH al 3% v/v), Grado HPLC (Merck) como fase móvil. se Como fase móvil 0.1% de Ácido Fórmico (Merck, 99%), metanol al 1% y agua grado HPLC.

2.2. Equipos

Se utilizó un equipo ICP-MS Agilent Technologies Serie 7500. Las condiciones del equipo ICP-MS se representan en la **tabla 1**. La separación de las especies de selenio se realizó mediante un cromatógrafo HPLC marca Agilent Technologies serie 1200 equipado con una bomba de automuestreado de volumen variable modelo ASX-500 Series, una columna analítica Zorbax eclipse XDB-C18 de 150 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro interno.

2.3. Muestreo

La recolección de las muestras de sangre completa se realizó a través de un muestreo al azar de pacientes con leucemia (PL, n=35) y suministradas por el Instituto Hematológico de Occidente (IHO), Maracaibo, Venezuela. También se recolectaron muestras de individuos sanos (población control, PC, n=5), con jeringas desechables, las muestras se colocaron

en tubos de propileno tapados a presión que contenían 0,1 mL de sal disódica de EDTA al 10% como anticoagulante por cada 4,5 mL de sangre.

Tabla 1. Condiciones de trabajo optimizadas en HPLC-ICP-MS para la separación y cuantificación de algunas especies de selenio en sangre completa y plasma.

Parámetros de ICP-MS	Datos
Potencia (Rf)	1400W
Nebulizador	Concéntrico
Velocidad de la bomba del nebulizador (rpm)	0,4
Flujo del plasma (L.min ⁻¹)	14,5
Flujo de gas de arrastre (L.min ⁻¹)	0,9
Flujo de gas de enfriamiento (L.min ⁻¹)	0,17
Isótopo monitoreado	⁸² Se
Método de adquisición de la data	Spectrum
Parámetros de HPLC	
Columna	C ₁₈
Fase móvil	Ácido fórmico, metanol, agua
Composición de la fase móvil	0,1%, 1%, 98,9%
Caudal de flujo	1,3 mL.min ⁻¹
Modo de elución	Isocrático
Volumen de inyección	50 µL
Método de adquisición de la data	Análisis de tiempo de resolución
Columna	C ₁₈
Fase Móvil	2-Mercaptoetanol, acetato de amonio, EDTA, metanol
Composición de la fase móvil	0,1%, 0,06M, 2mM, 3%
Caudal de flujo	1 mL.min ⁻¹
Modo de elución	Isocrático
Volumen de inyección	50 µL
Método de adquisición de la data	Análisis de tiempo de resolución

2.4. Metodología analítica

La metodología desarrollada para la determinación de las concentraciones de algunas especies de Se utilizando HPLC-ICP-MS se optimizó evaluando los parámetros de mérito analítico. Los límites de detección (LD) fueron calculados a partir de las curvas de calibración correspondientes a cada especie en estudio (Miller & Miller, 2002). La precisión del método, expresada como la desviación estándar relativa (%DER) en la corrida y entre corrida, se obtuvo a partir de cinco determinaciones de una muestra real. Por su parte, la exactitud se evaluó preparando disoluciones de concentración conocida y adicionadas a una muestra de sangre completa y se inyectaron en el sistema cromatográfico para así obtener el porcentaje de recuperación.

La sensibilidad se estudió por medio de las curvas de calibración y de esta manera poder determinar qué tan sensible resultó el método para cada una de las especies consideradas

en estudio; para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$S = \frac{dy}{dC} \quad (1)$$

Donde de S es la sensibilidad; dy es el diferencial de las señales y dC el diferencial de las concentraciones (Cámara *et al.*, 2004).

2.5. Procedimientos

2.5.1. Tratamiento de las muestras de sangre completa y plasma para la determinación de selenio total

Las muestras de sangre completa se centrifugaron a aproximadamente 5500 rpm durante 15 min para obtener el plasma y las células sanguíneas por separado, luego se empleó digestión en medio básico para la mineralización de las muestras para sangre completa y plasma. Para esto se utilizó un volumen de 0,5 mL de sangre y plasma con volúmenes variables de (NH_4OH 1 M y 2 M), H_2O_2 al 30% v/v y 20 μL de 1-octanol (aprox. 2 gotas) como antiespumante. Esto se realizó en matraces abiertos en un ambiente de baja temperatura para evitar pérdidas del analito por volatilización. Las muestras se dejaron estabilizar por aproximadamente 24h hasta la mineralización total de las mismas, finalmente se transfirieron a matraces volumétricos que se aforaron a 10 mL con agua desionizada. Los blancos se prepararon con los mismos reactivos, pero en ausencia de la muestra bajo las mismas condiciones de mineralización.

2.5.2. Determinación de la concentración total de selenio en las muestras de sangre y plasma

La determinación de la concentración total de Se en las muestras de sangre y plasma una vez digeridas se llevó a cabo mediante la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), utilizando curvas de calibración elaboradas con patrones acuosos en ácido nítrico al 2% v/v. Estos patrones se prepararon cada vez que se realizaron las determinaciones analíticas y fueron preparados a partir de soluciones intermedias partiendo de una solución de 1000 mg Se.L^{-1} del isótopo de ^{82}Se (Peachey *et al.*, 2009).

2.5.3. Especiación química de selenio en muestras de sangre completa por HPLC-ICP-MS

Para la metodología de extracción de las especies de selenio por HPLC-ICP-MS, se tomaron 250 μL de sangre completa y se colocaron en tubos de polipropileno con 4,75 mL de una solución que contenía: HCl al 0,1% v/v; L-cisteína al 0,05% m/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v. La mezcla fue colocada en un baño de ultrasonidos (1400 A Maraca LR) por 15min. Las soluciones resultantes fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min y posteriormente filtradas antes de la inyección en el cromatógrafo HPLC. (Colina, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009).

La separación y cuantificación de las especies de selenio se realizó mediante HPLC-ICP-MS en las cuales se evaluaron dos fases móviles diferentes:

Método 1: Bajo la modalidad de fase reversa para especies orgánicas (SelenoDLcisteína y SelenoDLmetionina) utilizando como fase móvil: 0.1% de Ácido Fórmico, metanol al 1% y agua grado HPLC, utilizando un flujo de elución de $1.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en modo isocrático y una columna C18 en fase reversa (Hernández, 2010).

Método 2: Se utilizó EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1%, acetato de amonio 0,06 M y metanol al 3% en agua, y una columna C18 en fase reversa. La separación cromatográfica de Se-DL-Cys y Se-DL-Met se realizó en modo isocrático empleando un volumen de inyección de muestra de 50 μL y un flujo de elución de $1.00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Colina, 2001).

El acoplamiento HPLC-ICP-MS se realizó por conexión entre la salida de la columna analítica y el nebulizador a través de un tubo capilar de PTFE (politetrafluoretileno) de 30 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro interno.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de los parámetros analíticos para selenio total

La técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) goza de un amplio reconocimiento como técnica principal para el análisis de metales traza. Proporciona una sensibilidad muy por encima de la que proporciona la técnica ICP-OES y una velocidad de análisis de muestras muy superior a la de los instrumentos de absorción atómica con cámara de grafito. El ICP-MS cumple ambos requisitos en un rango de trabajo analítico más amplio, además de añadir capacidades de análisis isotópico, sin interferencias y en un único modo de adquisición. El procedimiento ICP-MS combina la eficiencia en la descomposición de las muestras para formar iones con la potencia de la espectrometría de masas para distinguir iones de masas diferentes, ofreciendo una gran detectabilidad en la determinación de selenio y otros elementos, pudiendo incluso realizar estudios de especiación. Otro avance importante es la posibilidad de cuantificar individualmente cada uno de los isótopos del selenio, por lo que se considera un método ideal para el estudio del metabolismo utilizando isótopos estables de este metaloide en el plasma, eritrocitos, y orina (Wilbur, 2007; Amy, Rosen & Hieftje, 2005; Umesh *et al.*, 2017).

3.1.1. Curva de calibración

La curva de calibración obtenida a partir de las soluciones patrones de Se cuyo intervalo de concentraciones estuvo entre 5,0 – 20,0 $\mu\text{g Se.L}^{-1}$. obteniéndose una buena linealidad y cumplimiento de la Ley de Beer, por lo tanto, la calidad de la determinación de la concentración de Se aceptable debido a la excelente capacidad de respuesta del ICP-MS para establecer la señal medida proporcional a la concentración de Se en términos de sensibilidad.

En la **tabla 2** se muestran los parámetros estadísticos asociados a la curva de calibración empleada en la determinación de la concentración total de Se. Estos valores evidencian la solidez de esta herramienta analítica basado en el manejo estadístico de la data, lo cual permite su uso en la cuantificación del analito en estudio.

También se muestran los límites de detección (L_D , calculado como la concentración correspondiente a tres veces la desviación estándar del blanco) y de cuantificación (L_Q , calculado como la concentración correspondiente a diez veces la desviación estándar del blanco) (Miller & Miller, 2002) y la sensibilidad instrumental (S , calculado como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio) la cual fue de 661,47. Estos resultados indican la alta sensibilidad de la técnica de ICP-MS y los bajos límites de detección para el análisis de muestras de sangre completa y plasma sanguíneo en pacientes diagnosticados con leucemia.

Tabla 2. Parámetros estadísticos asociados a la curva de calibración de Se.

<i>Metal</i>	<i>Ecuación de regresión</i>	<i>r^a</i>	<i>I.L.^b</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>L_D</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>L_Q</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>DE de la</i> <i>pendiente</i>	<i>DE del</i> <i>intercepto</i>
Se	$y = 661,47x - 4,177$	0,999	5,0-20,0	0,03	0,04	0,39	0,051

$n=3$, ^a Coeficiente de correlación, ^b Intervalo lineal, DE = Desviación estándar.

3.2. Estudio de interferencias no espectrales

El estudio de interferencias no espectrales fue realizado comparando las pendientes de la curva de calibración, en matriz de ácido nítrico al 2% v/v, con aquellas obtenidas por el método de adición estándar para las diferentes matrices evaluadas.

La **figura 1** muestra las curvas de adición estándar obtenidas para la determinación de selenio en muestras de sangre completa de pacientes con leucemia por ICP-MS con respecto a la curva de calibración, observándose el excelente paralelismo entre las gráficas allí expresadas y por consiguiente la inexistencia de interferencias no espectrales en este tipo de matriz, además se obtuvieron porcentajes de error entre pendientes menores a (5,0%) los cuales se expresan en la **tabla 3** cuya media de los porcentajes fue de 3.03%, en tal sentido, se encontraron ecuaciones para las curvas de adición estándar estadísticamente similares ($p \leq 0,05$) a las de las curvas de calibración. Este hecho refuerza

el uso de las curvas de calibración para la determinación de selenio en sangre completa de pacientes con leucemia.

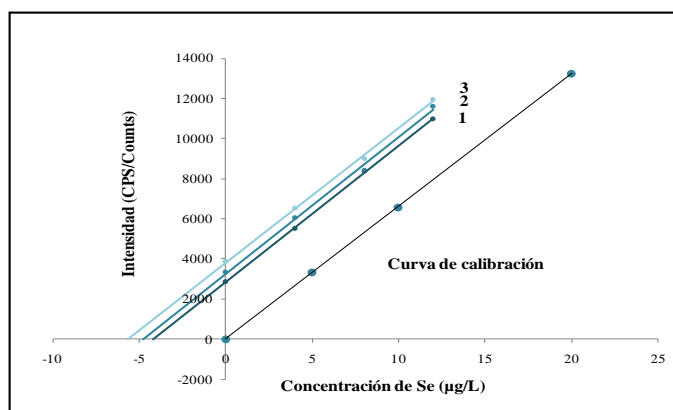


Figura 1. Curvas de adición estándar y calibración para la determinación de Se total en sangre completa.

Tabla 3. Parámetros de regresión obtenidos de las adiciones estándar para la determinación de Se total en muestras de sangre completa.

Adición estándar	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación (r)	% Error entre pendientes
1	$y = 630,64 x + 2845,4$	0,998	4,66
2	$y = 681,57 x + 3271,3$	0,998	3,04
3	$y = 670,59 x + 3818,7$	0,997	1,38

$n=3$

Estos resultados indican que no existen efectos de matriz, siendo el método libre de interferencias del tipo no espectral y puede ser aplicado para la determinación de la concentración total de selenio por ICP-MS en este tipo de muestra.

3.3. Precisión

El estudio de precisión del método desarrollado para la determinación de Se en sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia, se realizó en muestras reales diluidas (**Tabla 4**). Estos resultados de precisión en la corrida y entre corridas son expresados como media (\bar{X} , en $\mu\text{g Se.L}^{-1}$), desviación estándar (DE, en $\mu\text{g Se.L}^{-1}$) y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (DER o CV, en %), obtenidos para la determinación de Se por ICP-MS.

Los experimentos se realizaron en tres alícuotas de cada una de las muestras reales y las determinaciones de Se total en estas porciones de prueba se hicieron por pentaplicado. Los resultados obtenidos señalan que la DER promedio fue de 0,8 % y 2,71 %, para la precisión en la corrida y entre corridas respectivamente, y fueron menores al 5,0 % lo cual internacionalmente se considera adecuado para este tipo de análisis (Sierra *et al.*, 2009).

3.4. Exactitud

Los resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud para la determinación de Se total, se expresan en la **tabla 6**. La exactitud se evaluó mediante un estudio de recuperación (método de adición estándar), adicionando concentraciones conocidas de Se a muestras de sangre completa de pacientes con leucemia (mineralizadas). En la **tabla 5** se muestran los valores esperados y los valores encontrados en la evaluación de la exactitud mediante estudios de recuperación (método de adición estándar) expresados como la media de los porcentajes (%) de recuperación para una muestra mineralizada y determinada por ICP-MS. Se obtuvieron valores analíticamente aceptables a nivel internacional (Sierra *et al.*, 2009) encontrándose en un intervalo entre el 95 y 105%, que indican que el método desarrollado estuvo libre de interferencias fue confiable y reproducible, por lo tanto, es adecuado para la determinación de Se total en muestras de sangre.

Tabla 4. Estudios de precisión en la corrida y entre corridas para la determinación de Se total en muestras de sangre completa por ICP-MS.

Muestra	Media X ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	En la corrida		Entre corridas	
		DE ($\mu\text{g Se.L}^{-1}$)	DER (%)	DE ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	DER (%)
1	4,51	0,007	0,15	0,009	0,22
2	4,81	0,062	1,29	0,296	6,16
3	5,69	0,055	0,96	0,099	1,75

Tabla 5. Estudio de exactitud para la determinación de Se total en muestras de sangre completa mineralizadas por ICP-MS usando el método de adición estándar.

Adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g Se.L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g Se.L}^{-1}$)	Recuperado (%)
4	9,70	9,86	101,64
8	13,70	13,64	99,56
12	17,70	18,10	102,26
			101,15 \pm 1.4

3.5. Optimización del tratamiento de las muestras de sangre completa y plasma

Para la determinación de las concentraciones totales de Se en sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia por IPC-MS, es necesario tener el analito libre en solución, por lo que se debe tratar la muestra con métodos factibles que permitan obtener

al analito libre, es por ello, que se llevó a cabo una digestión en medio básico con hidróxido de amonio y peróxido de hidrógeno con un volumen constante de muestra (0,5 mL) y variando el volumen de agente oxidante (H_2O_2 conc.), volumen y concentración de base (NH_4OH , 1 M y 2M). Dado que dicho tratamiento genera un exceso de espuma debido a la degradación de la materia orgánica presente en las muestras de sangre que imposibilita la adecuada dilución de la misma, se utilizó 20 μL de 1-octanol como agente antiespumante. En la **tabla 6** se resumen los volúmenes de dichos reactivos ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4\text{OH}$), utilizados para la determinación de Se total en sangre completa. Se buscaba maximizar la concentración de Se total en sangre completa, para ello, se utilizaron diferentes combinaciones de volúmenes de ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4\text{OH}$) y modificando la concentración de base para el tratamiento. Se observó que los diferentes volúmenes utilizados no afectaba significativamente en la determinación de la concentración de Se total en la muestra de sangre ($p > 0,05$) para una misma concentración de base, pero si entre diferentes concentraciones de base (NH_4OH , 1M y 2M). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), para un límite de confianza del 95%. Se establecieron como volúmenes óptimos, 4 mL para H_2O_2 conc. y 2 mL para NH_4OH 1 M, los cuales mejoraron la detección de Se total, buscando un menor consumo de reactivo, minimizar costos y toxicidad. Las mismas condiciones se adaptaron para el tratamiento de plasma.

Tabla 6. Volúmenes de NH_4OH y H_2O_2 en la digestión de las muestras de sangre completa ($n=3$) ($*p < 0,05$).

Concentración NH_4OH (mol.L ⁻¹)	Volumen (mL) de ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4\text{OH}$)	Concentración de Se ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
		$\bar{X} \pm \text{DE}$
1	4/2	270,6 \pm 3,6
	4/4	204,6 \pm 1,7*
	6/2	260,4 \pm 6,0
	6/4	207,8 \pm 8,3
2	4/2	239,6 \pm 3,3
	4/4	143,9 \pm 3,1*
	6/2	203,1 \pm 1,6
	6/4	193,5 \pm 2,6

3.6. Concentraciones totales de Se en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia

La metodología validada se empleó para establecer las concentraciones totales de Se para 35 pacientes con leucemia clasificados por edad y sexo, expresados en la **tabla 7**.

Tabla 7. Concentraciones totales de Se en sangre completa de pacientes con leucemia.

Grupo (años)	Sexo	n	Concentración de Se ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
			X \pm DE	Intervalo
1–19	M	10	284,7 \pm 151,0	59,2 - 588,5
	F	8	276,3 \pm 104,6	78,6 - 356,7
20–40	M	3	261,9 \pm 95,4	165,3 - 356,1
	F	3	164,4 \pm 57,5	103,6 - 217,8
41–60	M	4	294,0 \pm 117,7	208,3 - 458,9
	F	2	237,9 \pm 45,6	205,7 - 270,1
61–80	M	3	226,1 \pm 68,5	147,2 - 270,6
	F	2	155,1 \pm 36,4	129,4 - 180,8

Las concentraciones de Se en sangre completa de los pacientes en estudio variaron de acuerdo a la edad, encontrándose mayor contenido de Se total en pacientes con edades comprendidas de (1–19) y de (41–60) que para el resto de la población, sin embargo, no existieron diferencias significativas para estos grupos de edades ($p \leq 0,05$) ni para el resto de la población. De forma general, se encontraron mayores concentraciones de Se total en la población masculina que en la femenina tanto para sangre como para plasma y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de que la concentración de Se total varíe con el sexo de la población en estudio, debido a la forma en la que el Se ingresa al organismo a través de los alimentos, por lo que va depender en gran parte de una adecuada alimentación, ya que los niveles de Se en el organismo varían con la alimentación (Navarro & Cabrera, 2008).

La concentración de selenio en el plasma (o suero) está relacionada con la ingesta y responde de forma relativamente rápida. Dentro de una misma población, los niños tienen concentraciones más bajas que los adultos. Al nacer, el selenio plasmático es de un 40 a un 70% del valor materno decreciendo su concentración durante los 4 primeros meses de vida, y elevándose gradualmente, hasta alcanzar los valores de un adulto en los últimos años de la adolescencia. La concentración en sangre y en eritrocitos es aproximadamente un 15% y un 37%, respectivamente, más elevada que en el plasma (Casals *et al.*, 2005).

Cabe destacar que los productos derivados de cereales, carne, huevos y pescado son las fuentes de selenio principales de la dieta. Los niveles dependen de la clase de alimento y de la concentración y accesibilidad del selenio del suelo en el que se cultivan las plantas, por lo que los valores de selenio varían considerablemente (Navarro & Cabrera, 2008).

3.7. Concentraciones totales de selenio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia (PL) e individuos controles (PC)

En la **tabla 8** se muestran las concentraciones de Se de pacientes con leucemia para sangre completa (PL, $n = 35$) y plasma (PL, $n = 5$) y de 5 individuos sanos que conformaron la población control (PC, $n = 5$). Para las concentraciones de Se en sangre completa y plasma de pacientes con leucemia y la población control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las concentraciones de Se total. Se encontraron concentraciones de Se mayores en sangre completa y plasma de los pacientes que en la población control. Estadísticamente hasta ahora tanto las concentraciones de Se en sangre y plasma de PL y PC resultaron ser idénticas y este elemento no guarda relación con la enfermedad de la leucemia.

Sin embargo, un análisis total del elemento es insuficiente para conocer su papel biológico en esta patología por lo que se necesitarán llevar a cabo estudios de especiación y evaluar algunas de las especies de Se presentes en las muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y conocer la biodisponibilidad de las mismas y su relación con la patología.

Tabla 8. Concentraciones de Se total encontradas en pacientes con leucemia (PL, $n = 35$) para sangre completa, (PL, $n = 5$) para plasma y población control (PC, $n = 5$). ($P > 0,05$).

Población	Muestra	Concentración de Se ($\mu\text{g.L}^{-1}$) $\bar{X} \pm \text{DE}$
PL	SC	$243,6 \pm 112,3$
	P	$141,7 \pm 34,1$
PC	SC	$198,0 \pm 40,6$
	P	$159,1 \pm 30,1$

SC = Sangre completa, P = Plasma.

Granadillo (2009) encontró valores de concentración media de Se total ($\mu\text{g.L}^{-1}$) en muestras de sangre completa de pacientes con leucemia del Instituto Hematológico de Occidente ($n = 32$): $218,4 \pm 45,6$ los cuales se compararon con las concentraciones encontradas en la población en estudio, resultando ser más bajas, para una media ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de la población en estudio ($n = 35$): $243,6 \pm 112,3$. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), tomando en cuenta que la población estudiada por Granadillo fueron pacientes con leucemia de la ciudad Maracaibo Edo. Zulia y los pacientes bajo estudio pertenecen a la ciudad de Barquisimeto Edo. Lara, los cuales pueden estar sometidos a una dieta especial a base de Se para cubrir las funciones metabólicas normales de este elemento traza en el organismo, a través de la dieta diaria y/o como posible suplemento para tratar la enfermedad.

Van *et al.*, 2007 establecieron los niveles de Se en plasma de donadores sanos del banco de sangre de la parte central-este de Bélgica ($79,7 \pm 4,4 \text{ ng.L}^{-1}$) y otros países de Europa

tales como: Francia ($75,8 \pm 2,4 \text{ ng.L}^{-1}$), Alemania ($106,5 \pm 16,5 \text{ ng.L}^{-1}$), Portugal ($98 \pm 16 \text{ ng.L}^{-1}$), España ($74,7 \pm 25,2 \text{ ng.L}^{-1}$) y Eslovenia ($66 \pm 15 \text{ ng.L}^{-1}$).

Las medidas más habituales de la exposición humana a selenio son el contenido de selenio de la sangre completa, suero o plasma. La fracción de sangre que se elige para el análisis depende de las circunstancias. El plasma y el suero reflejan los cambios en la ingesta de selenio de manera más rápida que los eritrocitos. Puede ser posible utilizar los niveles de selenio en plasma para valorar la concentración a corto plazo y el selenio de los eritrocitos y la sangre completa para reflejar la concentración a largo plazo. Esta atribución puede explicarse por el hecho de que el selenio está enlazado en los eritrocitos de manera estable y la vida media de los eritrocitos es de unos 120 días. Las concentraciones en los eritrocitos se mantienen proporcionales a la ingesta diaria de selenio. A concentraciones más altas, la capacidad de transporte del plasma llega a saturarse y los eritrocitos soportan todo el incremento de este elemento (Schaller & Schiele, 2006).

La variación de la concentración de Se total en sangre y plasma se debe a la alimentación. El contenido de Se en el alimento depende de la zona geográfica y de la relación suelo planta, por lo tanto, en zonas donde la dieta sea baja en Se los niveles en sangre y plasma disminuirán y viceversa. Entre otras fuentes de variación de Se, se encuentra la edad, la raza y la época del año. Actualmente en la práctica clínica, es importante el seguimiento de las concentraciones de selenio en el plasma en pacientes a los que se les considera proclives padecer una deficiencia de este elemento como consecuencia de una enfermedad, una terapia, o una ingesta deficiente y/o crónica, por lo que la concentración de selenio en el plasma valora de una forma adecuada el contenido corporal de selenio en el organismo (Schaller & Schiele, 2006)

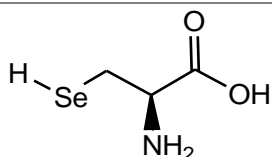
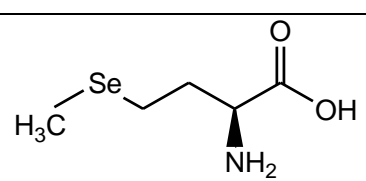
3.8. Especiación química de selenio por HPLC-ICP-MS

En relación a los sistemas de detección utilizados para realizar estudio de especiación se encuentran: las técnicas de espectrometría atómica (AAS, ICP-OES) y la de masa ICP-MS. La técnica ICP-MS se utiliza para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas, además ofrece mejores límites de detección (Cáceres, 2002; Cabañero *et al.*, 2005).

El selenio forma parte de enzimas que cumplen funciones importantes en el organismo, y es por ello que hoy en día es de interés determinar además del selenio total, también son importantes algunas especies orgánicas de este elemento como los selenoaminoácidos que constituyen parte de las selenoproteínas. En tal sentido, en el presente trabajo se enfocó en las dos especies orgánicas de selenio (SeDLCys y SeDLMet) más importantes,

las cuales participan en procesos biológicos esenciales y las de mayor biodisponibilidad en el organismo (**Tabla 9**). Para este fin, se requiere de una técnica de separación como la cromatografía líquida en combinación con una técnica de espectrometría de masas. En esta investigación se realizó el acoplamiento HPLC con detección por ICP-MS

Tabla 9. Estructuras de las especies orgánicas de selenio en estudio (Rayman, 2009).

NOMBRE	ESTRUCTURA
SELENODLCISTEÍNA	
SELENODLMETIONINA	

3.8.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

Una vez realizado el acoplamiento HPLC-ICP-MS y establecidas las condiciones para la detección de los selenocompuestos en estudio, se inició la optimización de la separación de los selenoaminoácidos, para ello se emplearon diferentes fases móviles. Con la finalidad de identificar las especies en estudio, estándares en un intervalo de 5-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ se inyectaron individualmente para conocer el tiempo de retención de cada especie. Posteriormente se preparó una mezcla compuesta por selenoDLcisteína y selenoDLmetionina a una concentración de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cada especie y se inyectaron en el sistema cromatográfico para observar la separación de estos compuestos. En este caso, se lograron obtener señales de poca intensidad, por esta razón, se incrementó la concentración a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sin embargo, la señal observada resultó ser poco intensa. En la **figura 2** se muestra el cromatograma para una mezcla de patrones de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por especie, utilizando inicialmente como fase móvil: 0,1% ácido fórmico, 1% de metanol y 98,9% de agua grado HPLC, con una velocidad de flujo de 1,3 mL.min^{-1} y con un volumen de inyección de 50 μL , la cual fue seleccionada de la literatura (Hernández, 2010). En el cromatograma se puede observar que existe una buena resolución en el sistema cromatográfico, por lo tanto, una buena separación de las especies de selenio. Así se tiene, que para la especie de SelenoDLcisteína (SeDLCys) se obtuvo un tiempo de retención de 1,96 min y para la selenoDLmetionina (SeDLMet) un tiempo de 3,08 min.

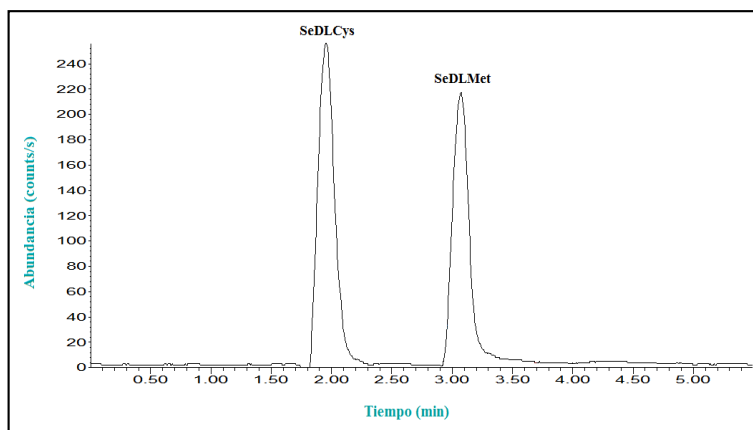


Figura 2. Cromatograma de la SeDLCys y SeDLMet a una concentración de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, condiciones: Volumen de inyección: $50 \mu\text{L}$. Velocidad de flujo: $1,3 \text{ mL.min}^{-1}$. Columna C_{18} . Fase móvil: 0,1% de ácido fórmico, 1% metanol.

El pH de la fase móvil influye en esta modalidad cromatográfica sobre el grado de ionización del analito. Un aumento o disminución del mismo favorece o desfavorece la ionización del analito y por lo tanto su retención en la fase estacionaria.

Con la finalidad de reducir los tiempos de retención y aumentar la intensidad de las señales cromatográficas para las especies de selenio en estudio, se procedió a preparar una mezcla compuesta por SeDLCys y SeDLMet a una concentración de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ para cada especie en agua grado HPLC y se inyectaron en el sistema cromatográfico, empleando una segunda fase móvil, la cual estuvo compuesta por 0,06 mM de acetato de amonio, 3% de metanol, 0,1% de 2-mercaptoetanol y 2 mM de EDTA, utilizando un volumen de inyección de $50 \mu\text{L}$, con una velocidad de flujo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ y una columna C18. La cual fue seleccionada de la literatura (Colina, 2001).

En la **figura 3** se representa el cromatograma de una mezcla de SeDLCys y SeDLMet con una concentración de $20 \mu\text{g/L}$ por especie. Se puede observar que en este caso también existe una buena resolución en el sistema cromatográfico. Con el empleo de esta fase (Fase móvil: 0,1% 2-mercaptoetanol, 0,06M de acetato de amonio, 2mM de EDTA y 3% de metanol), se obtiene una mayor intensidad de las señales cromatográficas para las especies de selenio en estudio, así como una disminución en los tiempos de retención de las especies en comparación con la fase móvil empleada inicialmente, obteniéndose tiempos de retención para la SeDLCys y SeDLMet de 1,52 y 2,11 min respectivamente.

Entre los modificadores más comunes utilizados se encuentran el metanol (MeOH), etanol (EtOH) y el acetonitrilo (ACN). De igual forma se reporta el uso de agentes que pueden controlar la ionización del analito tales como ácidos orgánicos, entre los cuales se encuentran el ácido acético (HAc), el ácido fórmico (HCO_2H) y el ácido

etilendiaminotetracético (EDTA). En general, estos últimos se emplean a bajas concentraciones para disminuir el poder ionizante del analito y reducir la retención en la fase estacionaria, además, actúan como fuente de protones y mejoran la forma de la señal cromatografica (Quattrocchi, Abelaira, Laba, 1992). El aumento del porcentaje de metanol por encima de 3%, no afecta a los tiempos de retención de las especies estudiadas; sin embargo, provoca un leve ensanchamiento de los picos correspondientes a las especies orgánicas, empeorando la resolución cromatográfica. Por otro lado, el aumento en la cantidad de disolvente orgánico ejerce un efecto reductor en la señal de selenio por ICP-MS. En vista de los resultados, se decidió seguir trabajando con un porcentaje de un 3% de metanol para el resto de los experimentos como lo reporta la literatura. Por su parte, el pH de la fase móvil se encontraba entre 6–7,5 a temperatura ambiente.

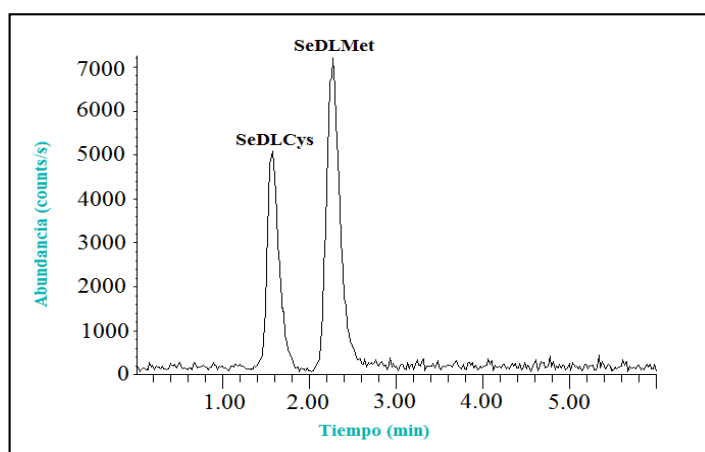


Figura 3. Cromatograma de la SeDLCys y SeDLMet a una concentración de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$, condiciones: Volumen de inyección: $50 \mu\text{L}$. Velocidad de flujo: $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Columna C_{18} .

Al aumentar el pH de la fase móvil se produce una reducción en los tiempos de retención de las especies de selenio, hecho que es mucho más marcado para la especie SelenoDLmetionina. A pH ácidos próximos a 2, los grupos carboxílicos de los aminoácidos se encuentran protonados, confiriendo a las moléculas una carga neta positiva (debido al grupo $-\text{NH}_3^+$), mientras que a pH superiores adquieren la forma de zwitterión. Esto podría explicar la reducción de la retención de las especies a pHs superiores, donde la carga negativa del grupo carboxilato interactúa con la fase estacionaria por repulsiones electrostáticas, y de esta manera acortando los tiempos de retención de las especies de selenio en estudio, junto con una reducción en la anchura de sus picos.

En las **tablas 10 y 11** se observan los valores de los parámetros cromatográficos tales como: tiempo de retención, factor de retención, número de platos teóricos, factor de selectividad y resolución de la columna para cada fase móvil empleada.

Los resultados de la resolución (R_s) muestran también un grado de separación correcta de las especies ya que presentan valores por encima de 1,5, del mismo modo los resultados en cuanto al factor de selectividad (α) demuestran que esta resultó efectiva para la separación de los selenocompuestos corroborando la eficiencia de la separación cromatográfica.

Tabla 10. Parámetros cromatográficos para la separación de selenoaminoácidos estudiados a una concentración de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ utilizando una columna C_{18} , fase móvil: 0,1% ácido fórmico, 1% metanol y 98,9% agua a un flujo de $1,3 \text{ mL.min}^{-1}$ ($n=3$)

Especie	Tiempo de retención (min)	Factor de retención (k')	Número de platos teóricos (N)	Factor de selectividad (α)	Resolución (R_s)
SeDLCys	1,96	2,32	784	1,82	3,85
SeDLMet	3,08	4,22	1936		

En la **tabla 11**, empleando una fase móvil de 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM EDTA a un flujo de $1,0 \text{ mL/min}$, se observan que los valores del factor de retención (k') y los cortos tiempos de retención demuestran una elución eficiente en términos de tiempo de análisis, indicando un menor tiempo de permanencia de los analitos en la fase estacionaria y en la fase móvil, los cuales son adecuados para la separación ya que se encuentran entre un intervalo ideal entre 2 y 10. El valor de la resolución (R_s) muestra también un grado de separación correcta de las especies ya que presentan valores por encima de 1,5 lo cual indica los cortos tiempos de elución de las especies en el análisis, de igual forma los resultados en cuanto al factor de selectividad (α) demuestran que también resultó ser efectiva para la separación de los selenocompuestos, indicando la buena eficiencia de la separación cromatográfica.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el empleo de ambas fases móviles resultaron por lo general ser adecuadas para la separación de las especies de selenio exhibiendo factores de retención adecuados, cortos tiempos de análisis, y buena resolución en las separaciones. No se encontraron diferencias significativas en términos de selectividad cromatográfica para las fases empleadas. En tal sentido, la mezcla de 0,1% de 2-mercaptoetanol, 3% de metanol, 0,06M de acetato de amonio y 2mM de EDTA utilizada como fase móvil, permitió la separación adecuada de las dos especies de selenio, con una buena resolución en la separación, tiempos de retención más cortos, picos más definidos y señales cromatográficas más intensas, por lo que se tomo como las condiciones óptima de trabajo para el análisis de especiación de selenio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia.

Tabla 11. Parámetros cromatográficos para la separación de selenoaminoácidos estudiados a una concentración de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ utilizando una columna C₁₈, fase móvil: 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM EDTA a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹ (n=3)

Especie	Tiempo de retención (min)	Factor de retención (k')	Número de platos teóricos (N)	Factor de selectividad (α)	Resolución (Rs)
SeDLCys	1,52	2,04	591	1,57	2,11
SeDLMet	2,11	3,22	741		

3.9. Evaluación de los parámetros analíticos

3.9.1. Curvas de calibración

Una vez optimizadas las condiciones para la separación de los selenocompuestos estudiados se prepararon las respectivas curvas de calibración. En la **tabla 12** se muestran las ecuaciones de regresión, los intervalos lineales, coeficientes de correlación lineal, límites de detección y cuantificación para cada especie.

Cabe mencionar que los límites de detección (L_D) y cuantificación (L_Q) fueron calculados a partir de cinco determinaciones de una disolución patrón de menor concentración, ya que la señal procedente del blanco no era discernible de la línea base del cromatograma. La concentración de esta disolución fue de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Se por especie. Para ambas especies la linealidad fue buena obteniéndose bajos límites de detección, sin embargo, la especie selenoDLcisteína resultó ser menos sensible que la especie selenoDLmetionina reflejada en una menor pendiente de curva

Tabla 12. Parámetros estadísticos asociados a la curva de calibración de los selenocompuestos.

Especie	Ecuación de regresión	r^a	I.L. ^b ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	L_D ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	L_Q ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DE de la pendiente	DE del intercepto
SeDLCys	$y = 213,47x + 19,496$	0,995	5,0-20,0	0,46	0,47	3,15	0,53
SeDLMet	$y = 312,77x + 35,048$	0,991	5,0-20,0	0,45	0,47	2,57	0,46

$n=3$, ^a Coeficiente de correlación, ^b Intervalo lineal, DE = Desviación estándar.

La sensibilidad instrumental (S , calculado como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio para la selenoDLcisteína fue de 213,47 mientras que para la selenoDLmetionina fue de 312,77. Estos resultados indican la buena sensibilidad de la técnica de HPLC-ICP-MS, siendo más sensible en la detección la especie selenoDLmetionina.

3.9.2. Precisión

Para el estudio de precisión del método desarrollado para la determinación de las especies de Se en muestras de sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia, se evaluó mediante una muestra de sangre preparada por triplicado la cual se inyectó en el sistema cromatográfico y leída por pentuplicado.

En la **tabla 13** se representan los resultados de precisión en la corrida y entre corridas los cuales son expresados como (desviación estándar, DE) y (desviación estándar relativa, DER) para una muestra cuya especie contenía selenoDLcisteína. Los resultados obtenidos señalan que la DER promedio fue de 1,58 % y 2,46 %, para la precisión en la corrida y entre corridas respectivamente, las cuales fueron menores al 5,0% indicando que el método por HPLC-ICP-MS es reproducible, lo que internacionalmente se considera adecuado para este tipo de análisis. Cabe señalar que las inyecciones de muestras en el cromatógrafo HPLC se hacen de forma automatizada, evitando así errores aleatorios o sistemáticos por parte del analista.

Tabla 13. Estudios de precisión en la corrida y entre corridas para la determinación de selenoDLcisteína en una muestra de sangre completa por HPLC-ICP-MS.

Muestra	Concentración de selenoDLcisteína ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	En la corrida		Entre corridas	
		DE	DER (%)	DE	DER (%)
1	4,09	0,058	1,42	0,073	1,78
2	4,13	0,045	1,09	0,121	2,92
3	4,40	0,098	2,23	0,118	2,68

$n=3$

3.9.3. Exactitud

La exactitud se evaluó mediante un estudio de recuperación, adicionando 3 niveles de concentraciones conocidas de la especie selenoDLcisteína a una muestra de sangre completa mineralizada. Los resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud para la determinación de la especie de selenio por HPLC-ICP-MS, se expresan en la **tabla14**.

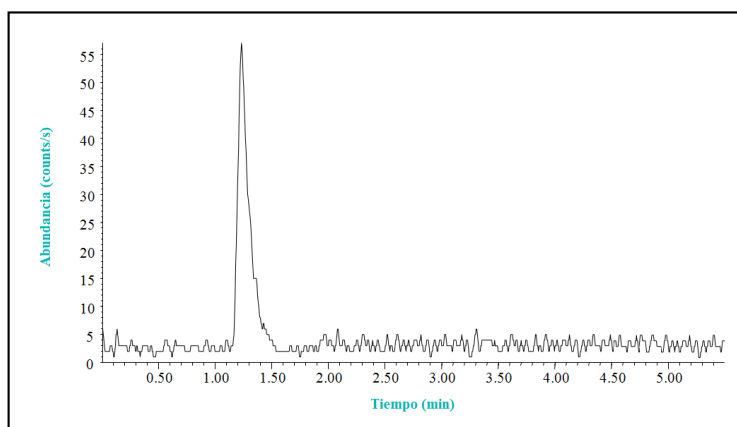
En la **tabla 14** se muestran los valores esperados y los valores encontrados en la evaluación de la exactitud mediante estudios de recuperación expresados como la media de los porcentajes (%) de recuperación para una muestra de sangre conteniendo la especie selenoDLcisteína. Se obtuvieron valores aceptables a nivel internacional, encontrándose en un intervalo entre el 95 y 105%, que indican que el método desarrollado fue confiable, reproducible y adecuado para la determinación de selenocompuestos en muestras de sangre y plasma utilizando HPLC-ICP-MS.

Tabla 14. Estudio de exactitud para la determinación de SelenoDLcisteína en una sangre completa mineralizada determinado por HPLC-ICP-MS.

Muestra	Concentración de selenoDLcisteína ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	(%) Recuperación
Sangre	4,09	10	14,09	13,91	98,72
		20	24,09	23,69	98,34
		40	44,09	43,84	99,43
		98,83 \pm 0,6			

3.9.4. Evaluación del Proceso de Extracción

Como inicialmente se hicieron inyecciones directas de muestras de sangre mineralizadas las cuales presentaron poca intensidad en las señales cromatográfica como se muestra en la **figura 4**, lo que demuestra la bajas concentraciones en las que se encuentran los selenocompuestos en la muestra, que este caso solo se evidenció la presencia de la especie selenoDLcisteína, por lo que se procedió a realizar una extracción de las muestras de sangre completa con una solución que contenía L-cisteína al 0,05% m/v, ácido clorhídrico al 0,1% v/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v. La solución extractante fue preparada con agua grado HPLC, como así lo reporta la literatura (Colina, 2001).

**Figura 4.** Cromatograma de una muestra de sangre completa mineralizada.

Es importante resaltar que la extracción empleada para la especiación de selenio en muestras de sangre completa y plasma en una técnica de pretratamiento de la muestra, lo cual resulta muy importante para la obtención de las especies en estudio, a partir de una matriz compleja como lo es la sangre. Las especies deben formar una molécula neutra y estable con un agente acomplejante específico para que pueda lograrse la extracción cuantitativa de los analitos bajo estudio (Granadillo, 2009). En consecuencia, solo la especie química selenoDLcisteína pudo ser evaluada y detectada mediante el uso de esta extracción en fase líquida, por lo que luego de la extracción de las muestras de sangre

completa en forma de la especie selenoDLcisteína, la solución resultante fue inyectada en el sistema cromatográfico y de este modo evaluar la eficiencia de la extracción.

En la **tabla 15** se muestran los resultados de la recuperación de la especie selenoDLcisteína utilizando una solución de L-cisteína al 0,05% m/v, ácido clorhídrico al 0,1% v/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v a pH= 6–7, para evaluar el proceso de extracción en la determinación de selenocompuestos por HPLC-ICP-MS. Para ello, se adicionaron concentraciones conocidas del estándar de selenoDLcisteína a la muestra de sangre antes del proceso de extracción con la solución antes mencionada hasta un volumen final de 5 mL, obteniéndose recuperaciones analíticamente aceptables dentro del intervalo permitido de 95–105 %, resultando el proceso de extracción confiable, reproducible y adecuado para la determinación de selenoDLcisteína en muestras de sangre completa.

Tabla 15. Estudio de recuperación del proceso de extracción de la especie SelenoDLcisteína en una sangre completa.

Muestra	Concentración de selenoDLcisteína ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	(%) Recuperación
Sangre	6,22	20	26,22	26,06	99,39
		40	46,22	47,31	102,35
		50	56,22	58,49	104,03
					101,92 \pm 2,3

En general, el proceso de extracción como pretratamiento de las muestras de sangre completa para el análisis de especiación de selenio, resulta satisfactorio en comparación con muestras de sangre mineralizadas previamente, sin embargo, en ambos casos la muestra necesita un tratamiento previo que permita sacarle el mayor provecho en el análisis cuantitativo de las especies de selenio bajo estudio. Cabe mencionar que el proceso de extracción utilizando la solución de L-cisteína al 0,05% m/v, ácido clorhídrico al 0,1% v/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v resulta ser selectivo para la especie selenoDLcisteína debido a que químicamente intervienen una serie de reacciones que permitió analíticamente cuantificarla exitosamente, en dicho proceso de extracción ocurre lo siguiente:

La cisteína [$\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$] es un α -aminoácido no esencial, lo que significa que puede ser sintetizado por los humanos. La parte de la cadena donde se encuentra la cisteína es el tiol que es no polar y por esto la cisteína es un aminoácido hidrofóbico, de allí su disolución en medio ácido. La parte tiol de la cadena suele participar en reacciones enzimáticas, actuando como nucleófilo. El tiol es susceptible a la oxidación para dar lugar a puentes disulfuros derivados de la cisteína que tienen un importante papel estructural en muchas proteínas. La cisteína también llamada cistina, se trata de un dímero de dos

cisteínas a través de un puente disulfuro (S-S) (Johannson, Gafvelin & Arnér, 2005; Rodriguez *et al.*, 2009).

Ahora bien, al entrar en contacto la solución que contiene L-cisteína de alguna manera interactúa con el selenio presente en la sangre completa desplazando los átomos de azufre para convertirse en selenocisteína, y todas aquellas proteínas presentes en la sangre que no interactúan con la cisteína, ahora reaccionan con el 2-mercaptoetanol presente en la solución, por medio de la ruptura de los puentes disulfuro (S-S), la estructura terciaria así como la estructura cuaternaria de algunas proteínas presentes en la sangre (como la cisteína o cistina). Si una proteína consta de varias cadenas polipeptídicas distintas o iguales unidas mediante puentes disulfuro (S-S), como es el caso de la cistina, la acción del 2-mercaptoetanol separa las cadenas polipeptídicas en un proceso de desnaturalización de las proteínas, convirtiéndolas en moléculas de cisteína que pueden seguir interactuando con el selenio presente en la sangre hasta agotarse las reservas del mismo, y finalmente se extrae como la especie de selenocisteína o selenoDLcisteína para su análisis cuantitativo (Rodriguez *et al.*, 2009; Knight, Wiley & Sons, 2004).

3.9.5. Análisis de muestras reales

El método se aplicó a muestras de sangre completa (n= 5) y plasma (n= 5) de de pacientes con leucemia (PL) y de igual número de muestras de sangre y plasma a personas voluntarias consideradas como la población control (PC). En todos los casos o matrices analizadas, solo se evidenció la presencia de una especie con un tiempo de retención ($1,44 \pm 0,02$ min), que según los datos obtenidos para los selenocompuestos corresponde a la especie selenoDLcisteína. En la (**Figura 5, a y b**) se presentan los cromatogramas correspondientes a una muestra de sangre completa y de plasma de pacientes con leucemia respectivamente.

La presencia de selenoDLcisteína está influenciada por la ingesta o el consumo de alimentos ricos en selenio como el pescado, granos, mariscos, entre otros. Esta especie es muy importante para el humano, ya que este aminoácido forma parte de algunas proteínas esenciales como la glutatión peroxidasa. Además, la identificación y cuantificación de la SelenoDLcisteína proporciona información sobre la concentración de esta especie en el organismo, que se puede utilizar como herramienta útil en la prevención y diagnóstico de enfermedades (Johannson *et al.*, 2005).

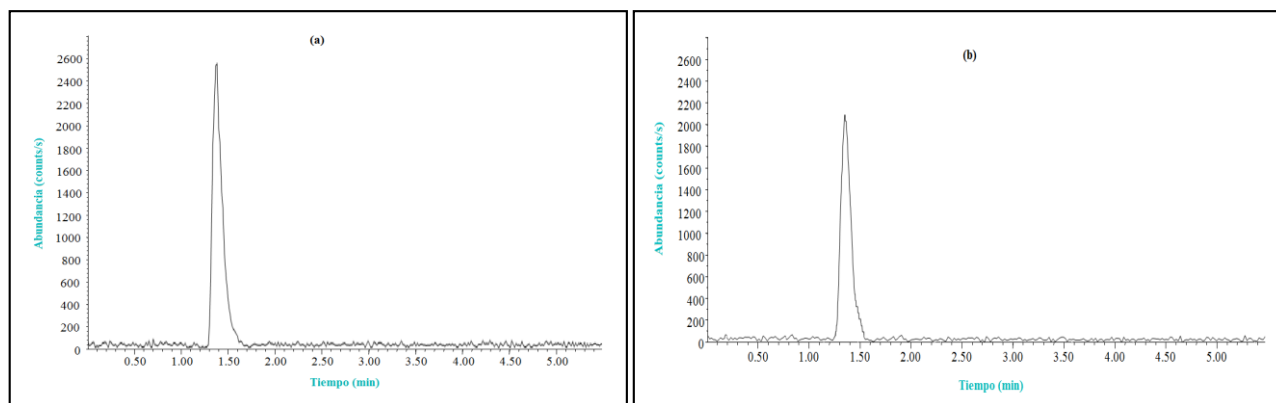


Figura 5. Cromatogramas de muestras de sangre completa (a) y plasma (b) de pacientes con leucemia para la especie SelenoDLcisteína, obtenidos por HPLC-ICP-MS. Columna C₁₈. Fase móvil: 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM EDTA a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹.

3.9.6. Relación entre las concentraciones de selenio total y las concentraciones de la especie selenodlcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y población control obtenidas mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

En la **tabla 16** se expresan las concentraciones individuales de selenio total y las encontradas para la especie selenoDLcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y los individuos control.

Tabla 16. Concentraciones individuales de selenio total y concentraciones de selenoDLcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y población control.

Población	Muestra	Concentración de Se total (µg.L ⁻¹)	Concentración de SeDLCys (µg.L ⁻¹)
PL	Sangre	320,3	242,6
		286,5	175,4
		210,1	106,7
		264,6	207,3
		217,8	124,3
	Plasma	171,6	123,1
		168,4	112,7
		116,7	103,6
		124,4	97,6
		102,1	96,8
PC	Sangre	222,1	123,1
		242,4	140,9
		134,7	127,0
		199,5	130,5
		191,5	97,4
	Plasma	155,2	91,8
		202,2	91,9
		125,1	80,1
		173,5	84,7
		139,6	76,2

Se observa que las concentraciones de selenio total tanto para los pacientes con leucemia como para los individuos controles resultaron ser mayores a las concentraciones de la especie selenoDLcisteína tanto en sangre como en plasma. Estos resultados tienen lógica si consideramos que en sangre completa y el plasma la especie selenoDLcisteína no es la única especie presente sino que existen otras especies que cumplen papeles esenciales y enzimáticos en el organismos, sin embargo, la especie selenoDLcisteína es una de las especies de selenio con mayor biodisponibilidad en el organismo proporcionada por la ingesta de alimentos con alto grado de proteínas como lo son los alimentos de origen animal (e.g., pollo, reses, huevos) (Casals *et al.*, 2005).

3.9.7. Concentraciones de la especie selenoDLcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y población control obtenidas mediante HPLC-ICP-MS.

En la **tabla 17** se muestran las concentraciones de la especie selenoDLcisteína (media \pm 1DE) de pacientes con leucemia para sangre completa (PL, $n = 5$) y plasma (PL, $n = 5$) y de 5 individuos sanos que conformaron la población control (PC, $n = 5$). Para las concentraciones de de la especie selenoDLcisteína en sangre completa de pacientes con leucemia y la población control, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones de esta especie. La media en sangre completa de (PL) resultó superior a la media en sangre de la (PC). Por lado se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de selenoDLcisteína para plasma de (PL) y (PC). En general, se encontraron concentraciones de selenoDLcisteína mayores en sangre completa y plasma de los pacientes con leucemia que en la población control.

Es importante resaltar que la concentración de la especie selenoDLcisteína tanto en plasma de pacientes como en la población control son diferentes, esto justifica el hecho de que los pacientes en estudio se encuentran bajo una dieta específica o tratamiento con selenio para tratar la enfermedad de la leucemia, por otra parte la presencia de esta especie en plasma de los pacientes resulta favorable en el tratamiento de la patología, ya que la especie selenoDLcisteína cumple importantes papeles enzimáticos y antioxidantes junto a la selenoproteína glutatión peroxidasa (GPx) para reducir los peróxidos, protegiendo así las membranas y otras estructuras celulares de la acción de los mismos y evitar así la oxidación de las células que puedan conllevar a la aparición de este tipo de cáncer, ya que se ha comprobado que a una concentración mayor de selenio (ca. $40 \mu\text{g} \cdot \text{día}^{-1}$) en sangre y plasma aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa en el plasma, aumentando la eficacia de

esta selenoproteína para combatir este tipo de cáncer en la sangre. Además, el selenio contribuye a la respuesta inmune, garantiza una función correcta del sistema endocrinológico e inmunológico (Casals *et al.*, 2005; Hernández, 2007).

Tabla 17. Concentraciones de la especie selenoDLcisteína encontradas en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia, (PL) y población control (PC).

Población	Muestra	Concentración de selenoDLcisteína (µg/L)		P valor
		$X \pm DE$	Intervalo	
PL	SC	171,25 \pm 56,5	106,7 – 242,5	< 0,05
	P	106,74 \pm 11,1	96,8 – 123,1	< 0,05
PC	SC	123,77 \pm 16,2	97,4 – 140,9	< 0,05
	P	84,96 \pm 6,9	76,2 – 91,9	< 0,05

$n=5$, SC= Sangre completa, P= Plasma.

Como se ha dicho, las formas de selenio más biodisponibles en la dieta son los selenoaminoácidos: la selenometionina y la selenocisteína. La selenometionina procede de fuentes vegetales y animales, mientras que la selenocisteína proviene principalmente de fuentes animales. Las formas inorgánicas (selenatos y selenitos) los cuales no se determinaron en este trabajo, contribuyen poco al aporte diario de este elemento en condiciones normales y sólo adquieren importancia cuando son utilizadas como suplementos en dietas experimentales o en determinadas situaciones como en los pacientes sometidos a nutrición parenteral durante un periodo largo de tiempo (Casals *et al.*, 2005).

Aunque la selenometionina no puede ser sintetizada en el organismo, es posible obtenerla de la dieta. Sin embargo, es considerada como un reservorio poco regulado de selenio. El organismo hace uso de este almacén cuando se interrumpe la ingesta de selenio. Aunque se han sugerido otras funciones de este complejo, actualmente no se conoce que la selenometionina tenga una función fisiológica importante en el organismo. Por otra parte, el selenio se absorbe bien por el tracto gastrointestinal, se sabe que más del 90% de la selenometionina, forma principal de la dieta, se absorbe por el mismo mecanismo. La selenometionina puede almacenarse en un almacén proteico (se incorpora en las proteínas aleatoriamente en lugar de metionina) es por ello que en el presente estudio no se obtuvo indicios de que esta especie esté presente en sangre o plasma de las poblaciones bajo estudio (Casals *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2005).

En contraste, la selenocisteína constituye la forma biológicamente más activa y está estrechamente regulada. Es la forma en la que se encuentra el selenio formando parte de las selenoproteínas y, al contrario que la selenometionina, no hay evidencia que la selenocisteína sustituya a la cisteína. De hecho, el 80% del selenio se incorpora a las selenoproteínas en forma de selenocisteína. Sin embargo, se conoce poco sobre el

mecanismo de absorción de la selenocisteína. Tras la absorción, el selenio circula en el plasma unido principalmente a la selenoproteína P (contiene una tercera parte del selenio plasmático) y la selenoproteína W (contiene una sexta parte del selenio plasmático), hallándose el resto unido principalmente a la albúmina de forma no específica, como otros muchos micronutrientes. La biodisponibilidad de selenio depende de la absorción intestinal y de su conversión en una forma biológicamente activa. Las evaluaciones de la biodisponibilidad de selenio se basan en que, tras la absorción, la conversión a formas biológicamente activas difiere en las distintas formas químicas de selenio. Las diferentes formas de selenio siguen rutas metabólicas distintas (Casals *et al.*, 2005).

La selenometionina puede almacenarse en un almacén proteico. El catabolismo de este almacén liberará selenio en forma de selenuro. La selenocisteína no se almacena, sino que es catabolizada directamente a partir de la cisteína y el selenio resultante forma otra reserva de selenio. Las formas inorgánicas (selenito y selenato) se almacenan directamente en forma de selenuro, el cual, independientemente de su origen, se utiliza para la formación de selenofosfato, precursor de la selenocisteína, que formará parte de las selenoproteínas. El exceso de selenio es excretado. Si las células precisaran de los depósitos de selenometionina, ésta sería liberada por proteólisis, aunque, según algunos autores, la cantidad de selenio disponible en el organismo desde el almacén de selenometionina está en función del metabolismo de la metionina independientemente de la necesidad de selenio del organismo (Casals *et al.*, 2005; Rayman, 2009).

4. CONCLUSIONES

La metodología empleada basada en la técnica de ICP-MS, para la determinación de las concentraciones totales de Se en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia presentaron valores adecuados de precisión, exactitud y detectabilidad, constituyéndose una herramienta analítica poderosa para la interpretación clínica de los valores de Se exhibidos por la población experimental estudiada.

La concentración de selenio total en sangre completa o plasma proporciona la indicación más completa de ingesta alta o baja de selenio.

Las concentraciones de selenio en plasma o suero varían según la localización geográfica de la población.

Los estudios de recuperación demostraron una alta eficiencia en la extracción de la especie SelenoDLcisteína con un porcentaje de recuperación dentro del intervalo permisible analíticamente.

Los métodos desarrollados basados en la cromatografía líquida de alta resolución acoplado en línea con la espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS) para la determinación cualitativa y cuantitativamente en la especiación química de selenio (i.e., selenoDLcisteína y selenoDLmetionina) en matrices acuosas sencillas y muestras reales fueron precisos y exactos, libres de interferencias y permitieron la determinación rápida de las especies estudiadas.

5. REFERENCIAS

- Amy, L., Rosen, G. & Hieftje, M. (2005). "Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation". *Spectrochimica, Acta Part B*, 59, 135–146.
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección", *Atenea*, 494, 161–172.
- Avissar, N., Whitin, J., Allen, P., Palmer, I. & Cohen, H. (1989). "Antihuman plasma glutathione peroxidase antibodies: Immunologic investigations to determinane plasma glutathione peroxidase protein and selenium content in plasma". *Blood*, 73, 1, 318–323.
- Cabañero, A., Madrid, Y. & Cámara, C. (2005). "Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: A new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis". *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 38, 373–379.
- Cáceres, A. (2002). "The Development of Methods for determination selenium using spectrofluorimetric and ICP-MS techniques". PhD Thesis, Sheffield Hallam University, Sheffield, UK, 200.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín, A., Pérez, C. & Vidal, M. (2004). "Toma y Tratamiento de Muestras". Editorial Síntesis. S. A., Madrid, España, 49, 273 – 283.
- Casals, G., Torra, M., Deulofeu, R. & Ballesta, A. (2005). "Importancia del selenio en la práctica clínica". *Química Clínica*, 24, 3, 141–148.
- Colina, M. (2001). "Determination of nutrients and heavy metal species in samples from Lake Maracaibo, Venezuela". PhD Thesis, Sheffield Hallam University, Sheffield, UK, 167–164.
- Gómez, J., Pozas, J., Giráldez, I. & Morales, E. (1999). "Use of solid phase extraction for speciation of selenium compounds in aqueous environmental samples". *Analyst*, 124, 75–78.
- Granadillo, V. (2009). "Desarrollo metodológico para la especiación de metales en muestras de sangre de pacientes con Leucemia o Linfoma", Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumentación Analítica y Química Ambiental, Maracaibo, Venezuela. Tesis Doctoral. pp 149–181.
- Hernández, H. & Ríos, M. (2009). "Rol biológico del selenio en el humano". *Química Viva*, 2, 64–80.
- Hernández, M. (2010). "Desarrollos de nuevos métodos analíticos basados en el acople de las técnicas de análisis de inyección en flujo, espectrometría atómica y cromatografía para determinar algunas

especies de selenio en muestras de sangre, cabello y suplementos vitamínicos”, Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, División de Estudios de Graduados, Maracaibo, Venezuela, Tesis de Doctorado en Química. pp 85–101.

- Hurtado, R. & Gardea, J. (2007). “Evaluación de la exposición de selenio en Los Altos de Jalisco, México”, *Salud Pública de México*, 49, 312–315.
- Johannson, L., Gafvelin, G. & Arnér, E. (2005). “Selenocysteine in proteins properties and biotechnological use”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1726, 1–13.
- Kelly, L., Paramee, K., Patrick, H., Zoltán, M. (2018). Review. Selenium analysis in waters. Part 2: Speciation methods. *Science of The Total Environment*, 640-641, 1635-1651.
- Knight, J., Wiley & Sons. (2004). “2-Mercaptoethanol”, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Ed. L. Paquette, New York. pp 1002.
- Micke, O., Schomburg, L., Buentzel, J. & Kisters, K. (2009). “Selenium in oncology: From chemistry to clinics”. *Molecules*, 14, 3975–3988.
- Miller, N. & Miller, J. (2002). “Estadísticas y Estequiometría Para Química Analítica”, 4a Edición, Editorial Prentice Hall, 125-127.
- Navarro, M. & Cabrera, C. (2008). “Selenium in food and the human body: A review”. *Science of the total environment*, 400, 115–141.
- Peacheya, E., Cook, K., Castles, A., Hopleya, C. & Goenaga-Infantea, H. (2009). “Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium”. *Journal of Chromatography A.*, 1216, 7001–7006.
- Quattrocchi, O. Abelaira, As. & Laba, R. (1992). “Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica Artes Gráficas Farro”. Argentina. pp 66–79.
- Rangel, P. (2005). “Dieta y cáncer”. *Radiología*, 5, 114–119.
- Rayman, M. (2009). “Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 45–50.
- Rodriguez, J., De Souza, S., De Oliveira, V. & Barboza, F. (2009). “Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure”. *Talanta*, 1–6.
- Sierra, I., Pérez, D., Gómez, S. & Morante, S. (2009). “Análisis Instrumental: Algunas Herramientas de Enseñanza-Aprendizaje Adaptadas al Espacio Europeo de Educación Superior”. Editorial Netbiblo, La Coruña, España, 9.
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T. (2001). “Principios de Análisis Instrumental”. 5ta edición, Madrid, España, McGraw-Hill, pp 736, 785–795.
- Silencio, J. (2009). “Investigación clínica con respecto a nutrición y cáncer”. *Revista Mexicana de Pediatría*, 76, 4, 181–186.
- Schaller, K. & Schiele, R. (2006). “Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial Chemicals”. ECSC-EEC-EAEC, Bruselas-Luxemburgo. 49–76 pp.
- Vadgama, J., Wu, Y., Shen, D., Hsia, S. & Block J. (2000). “Effect of selenium in combination with adriamycin or taxol on several different cancer cells”. *Anticancer Research*, 20, 1391–1414.
- Umesh, B., Abdul, B., Tukaram, N., Mansing, A., Ganesh, S., Vashishtha, M., Shashikant, H. (2017). Acid switched efficient, cost effective, selective separation and determination of selenium(IV). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5 (5), 4828-4840.
- Werner, J. (1992). “Selenio, un elemento esencial y tóxico. Datos de Latinoamérica”. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 42, (2), 90–93.