

ANALYSIC II



GRUPO
UCM

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

TRABAJO REALIZADO

ALIMENTOS FUNCIONALES EN SELENIO

- 1. Biofortificación con Se de cultivos de colza**
- 2. Bioacumulación de Se en Clarias Gariepinus**
- 3. Biotransformación de Se en coles fermentadas**
- 4. Biotransformación de Se en productos lácteos**

SEGURIDAD ALIMENTARIA: ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN

- 1. Bioacumulación de metales y sus especies**
- 2. Bioacumulación de compuestos orgánicos**

ALIMENTOS FUNCIONALES en Se

- 1. Biofortificación con Se de cultivos de colza**
- 2. Bioacumulación de Se en Clarias Gariepinus**
- 3. Biotransformación de Se en coles fermentadas**
- 4. Biotransformación de Se en productos lácteos**

BIOFORTIFICACIÓN CON SELENIO DE CULTIVOS DE COLZA

Bioacumulación y biotransformación de selenio en semillas y harina de colza desgrasada para uso animal

OBJETIVO PRINCIPAL: Estudiar la viabilidad del empleo de semillas de colza, enriquecidas en selenio, como suplemento para la alimentación animal.

- ➔ Desarrollar una **metodología analítica** enfocada a la extracción de los compuestos de Se y su posterior determinación mediante HPLC-ICP-MS
- ➔ Evaluar **la forma de suplementación con Se** más adecuada
- ➔ Identificar las **especies de Se** biotransformadas por las plantas

INTRODUCCIÓN:

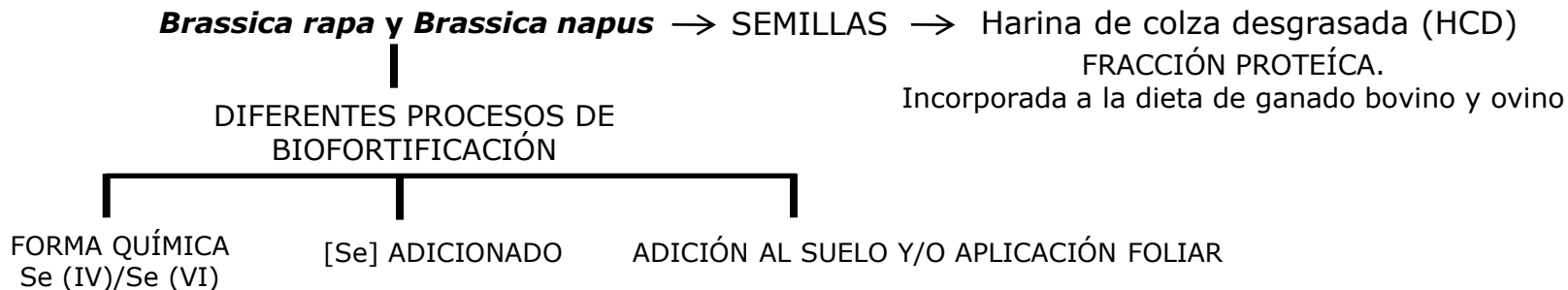
La **SUPLEMENTACIÓN CON Se** se realiza mediante el **ENRIQUECIMIENTO** de algunos alimentos (directamente) o por medio de la **FERTILIZACIÓN** previa de los suelos (indirectamente)

**COLABORACIÓN CON EL DPTO DE BIOLOGIA
APLICADA UNIVERSIDAD DE HELSINKI FINLANDIA**

La biofortificación de suelos ha conseguido incrementar la ingesta diaria de Se de $0.025 \text{ mg dia}^{-1}$ a 0.08 mg dia^{-1}

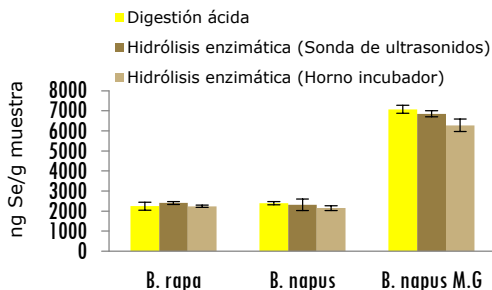
BIOFORTIFICACIÓN CON SELENIO DE CULTIVOS DE COLZA

Evaluación de la capacidad de las especies *B. rapa* y *B. napus* para bioacumular Se



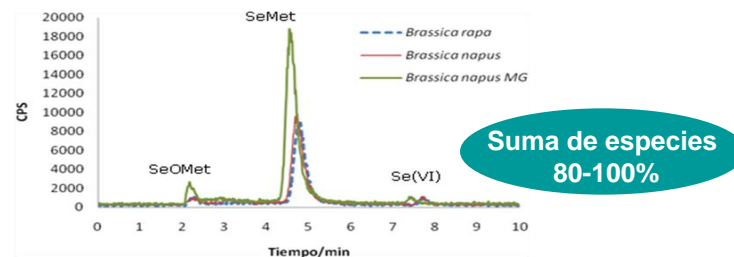
Las especies *B. rapa* y *B. napus* **SON CAPACES DE BIOACUMULAR SELENIO (BCF 14)** en la fracción proteica de las semillas. La **BIOACUMULACIÓN** es mayor cuando se **ADICIONA SELENIATO** independientemente de el tipo de adición

Desarrollo de una metodología analítica basada en LC-ICP-MS para la especiación de Se



ESTUDIO de la BIOTRANSFORMACIÓN de Se
Cromatografía de intercambio aniónico-ICP-MS

Se-especies presentes en HCD y SEMILLAS



EFICIENCIAS DE EXTRACCIÓN DEL 100%
en un tiempo reducido (2 min)

LA HARINA DE COLZA DESGRASADA SE CONVIERTE EN UNA ATRACTIVA OPCIÓN COMO SUPLEMENTO EN LA DIETA DE LOS RUMIANTES

ESPECIACIÓN DE SELENOCOMPUESTOS EN *CLARIAS GARIEPINUS*

OBJETIVO PRINCIPAL:

- ➔ Desarrollar una **metodología analítica** enfocada a la obtención de una extracción cuantitativa de los compuestos de selenio presentes en las muestras de músculo de pescado
 - * Evaluación de diferentes procedimientos basados en la hidrólisis enzimática
- ➔ **Detección y separación de las seleno especies** mediante HPLC-ICP-MS empleando la cromatografía multidimensional

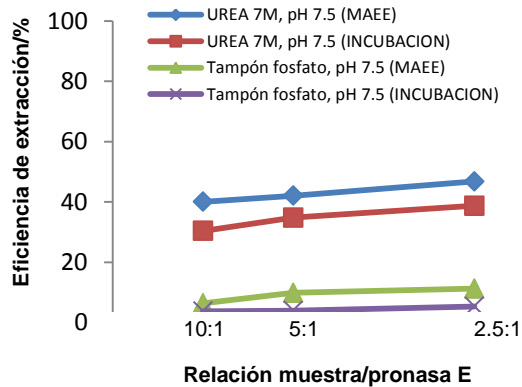
INTRODUCCIÓN:

El **Clarias gariepinus (pez gato)** constituye una de las principales fuentes de alimentación para los residentes de la ciudad Sagua la Grande (Cuba). Las **elevadas concentraciones de Se** encontradas en su músculo (**6.2-15.5 ug · g⁻¹**) convierten a este tipo de muestras en interesantes matrices para llevar a cabo estudio de especiación.

COLABORACIÓN: Lab. Análisis ambiental. Instituto Superior de Tecnologías y ciencias aplicadas. La Habana (Cuba)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

➔ OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA EMPLEANDO DIFERENTES METODOLOGÍAS MAEE vs. INCUBACIÓN



- ✓ El empleo de urea 7M mejora la eficiencia de extracción
- ✓ Aunque ambas metodologías (MAEE e incubación) proporcionan similares eficiencias de extracción, MAEE permite reducir el tiempo de tratamiento de muestra (50 min vs. 24 h)
- ✓ La enzima pronasa E (2.5:1) proporcionó la máxima recuperación.
- ✓ El hecho de que cantidades crecientes de lipasa no mejore la eficiencia de extracción indica que el Se no está unido a lípidos en este tipo de muestras

➔ EFFECTO DE LA [UREA]

PASO 1: desnaturalización de la estructura proteica

100 mg muestra en 1.5 mL de UREA 7M, pH 7.5
Sonda de ultrasonidos (2 min, 40%)

PASO 2: Hidrólisis proteolítica

Pronasa E (2.5:1) en 10 mL de UREA 1M, pH 7.5

←
a. MAEE (50 min, 37 °C) b. USP (2 min, 40%)

Tabla 1. Eficiencias de extracción de Se

	a. USP + MAEE	b. USP + USP
Muestra	87±2 %	91±2 %

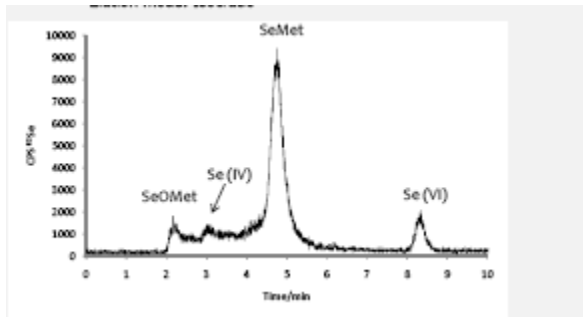
**Eficiencia de extracción
90%**

**El uso de la sonda de ultrasonidos
proporciona una extracción
cuantitativa en sólo 2 min!!**

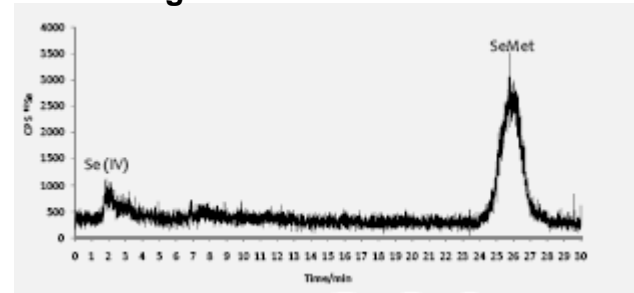
RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN de Se especies mediante HPLC-ICP-MS

Cromatografía de intercambio aniónico

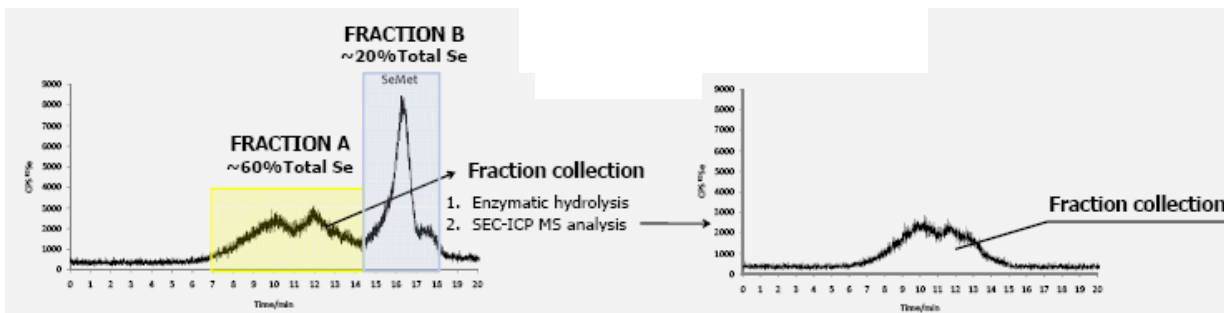


Cromatografía de fase inversa

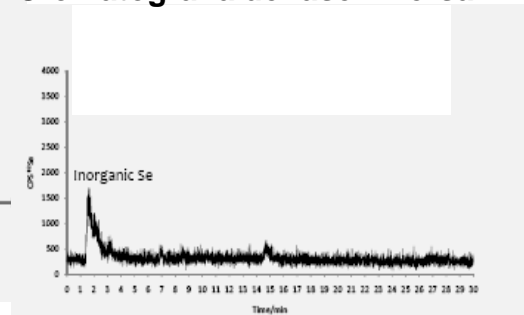


- ✓ **SeMet** es el selenoaminoácido mayoritario encontrado en los extractos enzimáticos
- ✓ **BALANCE de MASAS.** La suma de especies en los extractos enzimáticos tras los análisis AE-HPLC y RP-HPLC-ICP MS fueron **28 y 20%**, respectivamente.

Cromatografía de exclusión molecular



Cromatografía de fase inversa



- ✓ El **80%** del Se extraído se encuentra **unido a proteínas**
- ✓ El único compuesto identificado tras el análisis por RP-HPLC-ICP MS fue Se inorgánico.

Biotransformación de selenio en coles fermentadas

Objetivo principal: Evaluación de la metodología analítica necesaria para el estudio de la incorporación y biotransformación de selenio en coles fermentadas.

Col blanca (*Brassica oleracea*) $\xrightarrow[7 \text{ días, } 22^{\circ}\text{C}]{\text{Fermentación láctica}}$ Sauerkraut

Se(IV) $\xrightarrow[\text{Bacterias lácticas}]{\text{Biotransformación}}$ SeMeSeCys

Elaboración de **sauerkraut enriquecido** con 0.14 mg Se/kg de col fresca (1.63 mg Se/Kg col seca) para estudiar la incorporación y biotransformación del mismo.



SELENIO TOTAL

Digestión ácida

100mg muestra * + 1mL HNO₃ + 0.25mL H₂O₂ → llevar a 10mL H₂O MilliQ

*50mg en col cruda.

Muestra	[Se] / $\mu\text{g g}^{-1}$
Col Cruda	0.04 \pm 0.01
Col fermentada	0.07 \pm 0.01
Col fermentada + Se	1.29 \pm 0.02

Tabla 1. Contenido de selenio en muestras de col seca utilizando calibrado acuoso

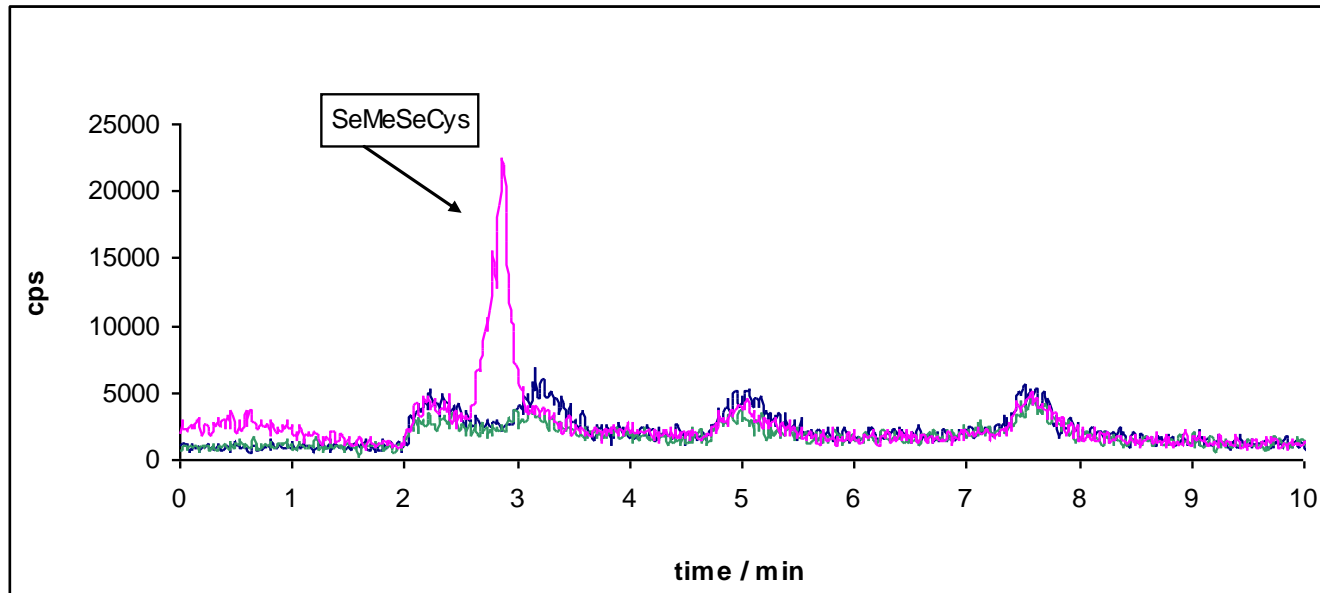
Incorporación del **81%** del Se añadido

ESPECIACIÓN DE Se

Hidrólisis enzimática

100 mg muestra* + 3 mL agua + 20 mg proteasa → sonda 2 min, 40W

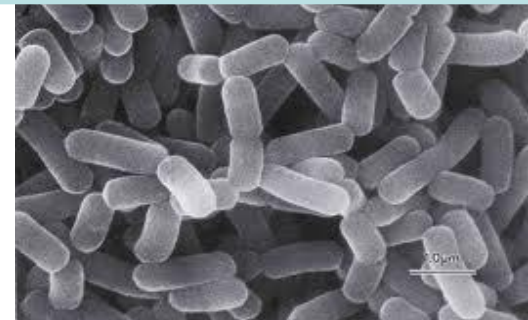
*50mg en col cruda y fermentada



Principal especie formada **SeMeSeCys**

Biotransformación de selenio en productos lácteos(*Lactobacillus Lactis*)

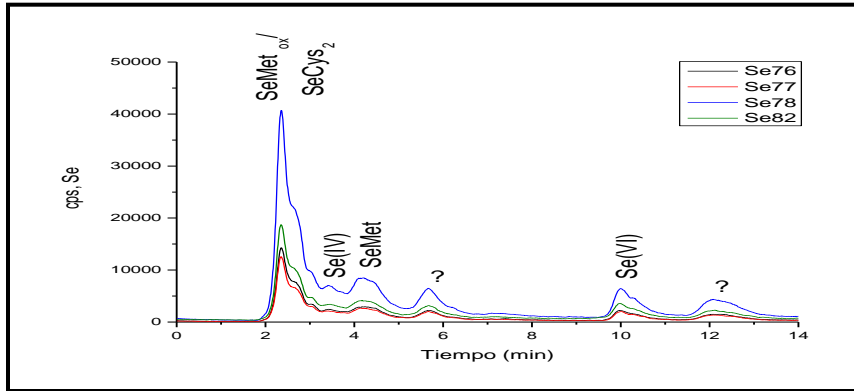
Objetivo principal: Evaluación y desarrollo de la metodología analítica necesaria para el estudio de la incorporación y biotransformación de selenio en productos lácteos por la acción de *Lactobacillus Lactis*.



Procedimiento experimental: A través del enriquecimiento de yogur con Se(IV), se ha procedido a la realización de etapas de desgrasado y precipitación de proteínas, con la consiguiente determinación de selenio y/o selenoproteínas mediante su cuantificación y especiación por ICP-MS.

Cromatografía de intercambio iónico

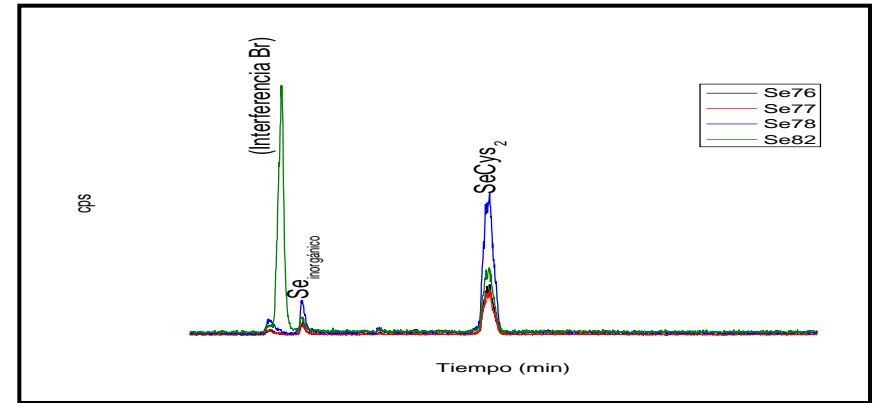
Desgrasado + precipitación proteínas



Columna: PRP-X100 (150 x 4.6mm, 5 μ m)
F. móvil: citrato amónico 10mM, 2% MeOH (pH 5.0)
Flujo: 1ml/min
Vol. Inyección: 100 μ l
Modo: isocrático

Cromatografía de fase inversa

Desgrasado + precipitación proteínas



Columna: Gemini C18 (250 x 4.6mm, 5 μ m)
F. móvil: 0.1% ác. Fórmico, 0.1% HFBA, 2% MeOH
Flujo: 1ml/min
Vol. Inyección: 100 μ l
Modo: isocrático

Conclusiones: Se ha demostrado la capacidad de biotransformación y, la incorporación de selenio a proteínas mediante la acción de *L. Lactis*. Mayoritariamente, se produce la biotransformación de Se(IV) a selenocistina (SeCys₂).

La optimización de la metodología analítica, ha permitido la eliminación del efecto interferente de Br⁻ y de otras impurezas de la matriz.