



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**MASTER UNIVERSITARIO EN CIENCIAS, TECNOLOGÍAS Y GESTIÓN
AMBIENTAL**

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2014-2015

Orientación: Investigadora

**Desarrollo de un método de separación cromatográfica de
especies de selenio mediante HPLC-IPC-MS**

**Development of a chromatographic separation method for
selenium species by HPLC-ICP-MS**

**Desenvolvemento dun método de separación cromatográfica
de especies de selenio por HPLC-ICP-MS**

Alumno/a: Pérez Tadeo, María

Nombre del tutor académico y director/es:
Dr. Jorge Moreda Piñeiro y Dra. María Isabel Turnes Carou
Departamento de Química Analítica

Julio, 2015



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dr. D. Jorge Moreda Piñeiro y Dra. Dña. Isabel Turnes Carou, Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica de la Universidad de A Coruña,

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado: “**Desarrollo de un método de separación cromatográfica de especies de selenio mediante HPLC-IPC-MS**”, fue realizado bajo su dirección por Dña. María Pérez Tadeo y, una vez finalizado, autoriza su presentación como Trabajo de Fin de Máster encuadrado dentro del Máster Oficial de Ciencia, Tecnología y Gestión Ambiental de la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la presente certificación en A Coruña, a 20 de Julio de 2015.

Dr. D. Jorge Moreda Piñeiro

Dra. Dña. María Isabel Turnes Carou

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Introducción	8
2.1. Interés en el análisis del selenio	9
2.2. Técnicas utilizadas para la detección y cuantificación de especies de selenio.....	9
2.3. Química Verde: Métodos de extracción en Química Verde	14
2.3.1. Dispersión de la matriz en fase sólida	14
2.3.2. Métodos de hidrólisis enzimática	14
2.3.3. Extracción con líquidos presurizados	14
3. Objetivos	16
4. Materiales, métodos y procedimientos experimentales	18
4.1. Aparatos.....	19
4.2. Material.....	19
4.3. Reactivos	20
4.4. Procedimiento experimental	22
4.4.1. Preparación de patrones de las diferentes especies de selenio.....	22
4.4.2. Determinación de especies de selenio mediante HPLC-ICP-MS.....	22
5. Resultados y discusión	24
5.1. Optimización del método de separación para HPLC.....	25
5.2. Características del método analítico.....	38
5.2.1. Rectas de calibrado.....	38
5.2.2. Sensibilidad.....	41
5.2.3. Precisión	42
5.3. Aplicaciones	43
5.3.1. Extracción de especies de selenio mediante dispersión de la matriz en fase sólida	43
5.3.2. Extracción de especies de selenio mediante dispersión de la matriz en fase sólida e hidrólisis enzimática	44
5.3.3. Extracción de especies de selenio mediante líquidos presurizados.....	45
5.3.4. Extracción de especies de selenio mediante hidrólisis enzimática asistida por energía de ultrasonidos	46
6. Conclusiones	47
7. Bibliografía	49

LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

ICP: Plasma de Acoplamiento Inductivo

MS: Espectrometría de Masas

HPLC-ICP-MS: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Plasma de Acoplamiento Inductivo y Espectrometría de Masas

ASE: Extracción Acelerada con Disolventes

SeMet: Selenometeoina

SeCys: Selenocisteína

SeMeCys: Selenometilcisteína

Se(IV): Selenito

Se(VI): Selenato

CCT: Celda de reacción / colisión

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MSPD: Dispersión de la Matriz en Fase Sólida

DTT: DL-Dithiothreitol

PLE: Extracción con Líquidos Presurizados

EH: Hidrólisis Enzimática

EH-UAE: Hidrólisis Enzimática Asistida con Energía de Ultrasonidos

1. RESUMEN

Resumen

En este trabajo se optimiza un método de separación cromatográfica de especies de selenio (selenocisteína, selenometeonina, selenometilcisteína, selenito y selenato) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y detección mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

En primer lugar, se ajustaron las condiciones instrumentales de operación del ICP-MS. Posteriormente, utilizando una columna de intercambio aniónico Hamilton PRP X-100 (250 x 4 mm d.i.), se estudiaron diferentes parámetros para optimizar la separación cromatográfica: Temperatura de la columna, programa de elución, concentración, pH, porcentaje de metanol y flujo de la fase móvil. Tras la selección de las condiciones más adecuadas, se calcularon los límites de detección y cuantificación y la precisión del método propuesto.

Por último, tras la selección de las condiciones de separación más adecuadas, se ensayó la posibilidad de utilizar diferentes métodos de extracción que cumpliesen con los principios de la Química Verde. La aplicación de estos métodos tuvo como finalidad la extracción de especies de selenio en un alga verde (*Ulva rigida*).

Abstract

In this project, a chromatographic separation method for selenium species is optimized by High-performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma mass spectrometry.

First of all, instrumental conditions were adjusted for the ICP-MS operation. Then, using an anion exchange column Hamilton PRP X-100 (250 x 4 mm i.d.), some parameters were studied to optimize the chromatographic separation: column temperature, elution programme, and mobile phase concentration, pH, percentage of methanol and flow. After the selection of the most suitable conditions, the detection and quantification limits and precision of the proposed method were calculated.

Finally, after the selection of the most suitable conditions the possibility of using Green Chemistry extraction methods was tested. The application of these methods was aimed at extracting selenium species from green algae (*Ulva rigida*).

Resumo

Neste traballo optimízase un método de separación cromatográfica de especies de selenio (selenocisteína, selenometeonina, selenometilcisteína, selenito y selenato) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) e detección mediante espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

En primeiro lugar, as condicións instrumentais de operación do ICP-MS foron axustadas. Posteriormente, estudáronse varios parámetros para optimizar a

separación cromatográfica: A temperatura da columna, programa de elución, concentración, pH, porcentaje de metanol e o fluxo da fase móbil. Posteriormente calcúlanse os límites de detección e cuantificación e a exactitude do método proposto.

Por último, probase a posibilidade de utilizar diferentes métodos de extracción de Química Verde. A aplicación destes métodos pretendía a extracción das especies de selenio nunha alga verde (*Ulva rigida*).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Interés en el análisis del selenio

El selenio ha sido reconocido ampliamente como un oligoelemento esencial para la vida humana. Esto es debido a que principalmente la especie selenocisteína es un componente de ciertas enzimas conocidas como selenoenzimas las cuales juegan un papel importante en el metabolismo de los mamíferos [1]. Algunos estudios han mostrado que la ingesta de este elemento podría tener un efecto preventivo frente a algunos tipos de cáncer [4].

La ingestión de diversas sustancias tanto esenciales como tóxicas por los seres humanos, ocurre a través de la alimentación. Algunos alimentos como los champiñones, las nueces de Brasil y ciertos vegetales como el brócoli son ricos en selenio, principalmente en selenometeoina y otros alimentos como las algas son capaces de bioacumular este elemento [2]. Sin embargo, su contenido en alimentos está determinado por el contenido presente en el suelo y en diversas regiones del mundo dicho contenido es insuficiente para cubrir las necesidades del organismo, lo que justifica el creciente interés en la producción de complementos alimenticios enriquecidos [3]. Por otro lado, el conocimiento del contenido total de dicho elemento u otras sustancias en los alimentos no proporciona información suficiente para evaluar los efectos beneficiosos o los riesgos dietéticos tras su ingestión. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas analíticas sensibles y precisas dirigidas al análisis de especies de selenio en alimentos, complementos alimenticios y material biológico es necesario para una mayor comprensión del papel que juega en la salud humana [4].

2.2. Técnicas utilizadas para la detección y cuantificación de selenio

El método analítico utilizado para la separación, identificación y cuantificación de las diferentes especies de selenio fue el acoplamiento de una técnica de separación: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (**Figura 1**) a un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) como detector.

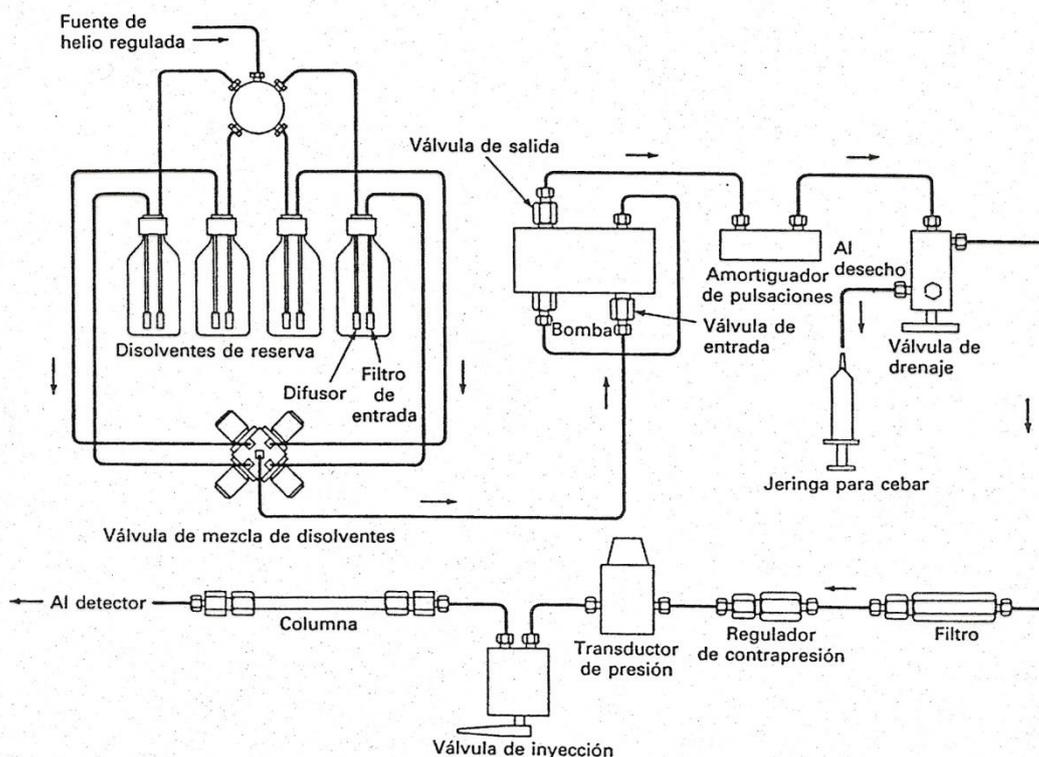


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un HPLC.

La detección de especies de selenio se llevó a cabo mediante ICP-MS, que se trata de una de las técnicas más importantes para el análisis elemental, debido a que presenta bajos límites de detección para la mayoría de los elementos, un elevado grado de selectividad y buena precisión y exactitud.

La mayoría de los métodos de separación cromatográficos de especies de selenio utilizan columnas de intercambio aniónico PRP-X-100 [6], [7], [8], aunque otros autores utilizan otro tipo de columnas, como columnas de intercambio catiónico [9], [10], [11] o columnas Xterra MS C18 [12], [13], [14]. Las fases móviles más utilizadas en la bibliografía son citrato amónico [6], acetato amónico [8], [15], [16], TEACI [12], [13], [14] o formiato de pirimidina [7], [10], [11]. Diferentes condiciones de separación de especies de selenio encontradas en la bibliografía se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Técnicas analíticas y condiciones de separación para especies de selenio [5].

Técnica analítica	Condiciones de separación
HPLC-ICP-MS [6]	PRP-X-100 (150 * 4.6 mm d.i., 10 µm) Columna de intercambio aniónico Volumen de inyección: 100 µL Flujo de la fase móvil: 1.0 mL min ⁻¹ Composición de la fase móvil: 10 mM Citrato amónico (pH 5.0) Programa de elución: isocrático

LC-ESI-MS [12]	<p>Xterra MS C18 (250 * 2.1 mm d.i., 5 µm) Volumen de inyección: 10 µL Flujo de la fase móvil: 1.0 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 0.01% (v/v) TEACI, 2.0% (v/v) MeOH a pH 4.5 Programa de elución: isocrático</p>
HPLC-ICP-MS [7]	<p>Chrompack IonoSpher 5C (150 * 4.6 mm d.i., 5 µm) Volumen de inyección: 100 µL Flujo de la fase móvil: 0.8 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 2 mM pyridinium formate, pH 2.8 Programa de elución: isocrático</p> <p>Hamilton PRP X-100 (250 * 4.1 mm d.i., 10 µm) Volumen de inyección: 100 µL Flujo de la fase móvil: 1.5 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: Fase móvil A: 10 mM NH₄H₂PO₄, 1% (v/v) metanol, pH 5.0 Mobile phase B: 50 mM NH₄H₂PO₄, 1% (v/v) metanol, pH 5.0 Programa de gradiente: 100% (v/v) A, 7.0 min 50% A, 7.5 min 0% A, 20.5 min 100% A, 26 min</p>
HPLC-ICP-MS, HPLC-ES-MS-MS [40]	<p>Xterra MS C18 (250 * 2.1 mm d.i., 5 µm) Volumen de inyección: 10 µL Flujo de la fase móvil: 0.16 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 0.01% (v/v) TEACI, 2.0% (v/v) MeOH at pH 4.5 Programa de elución: isocrático</p>
HPLC-ICP-ES-MS [9]	<p>Polysphere IC AN-2 (120 * 4.6 mm d.i.) columna de intercambio catiónico Volumen de inyección: 50 µL Flujo de la fase móvil: 0.75 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 5.0 mM salicylate (pH 8.5) Programa de elución: isocrático</p>
HPLC-ICP-MS [10], [11]	<p>PRP-X-200 (550 * 4.1 mm d.i., 10 µm) columna de intercambio catiónico Volumen de inyección: 100 µL Flujo de la fase móvil: 1.0 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 4.0 mM pyridine formate, H₂O:MeOH (93:3) (pH 2.8–4.7) Programa de elución: isocrático</p>

<p>HPLC-ICP-MS, HPLC-ES-MS [14]</p>	<p>Xterra MS C18 (250 · 2.1 mm d.i., 5 lm) Volumen de inyección: 10 µL Flujo de la fase móvil: 0.16 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 0.01% (v/v) TEACI, 2.0% (v/v) MeOH at pH 4.5 Programa de elución: isocrático</p>
<p>SEC-ICP-MS, HPLCICP-MS, ESI-Q-TOF-MS, MALDI-TOF-MS [8]</p>	<p>Fractionation: Superdex 200 HR 10/30 SEC (300 * 10 mm d.i., 13 µm) with a exclusion limit of 1300 kDa for HMW (10 –600 kDa) Volumen de inyección: 6 * 200 µL Flujo de la fase móvil: 0.6 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 10 mM acetato de amonio (pH 8.5) Programa de elución: isocrático Separación: Shidex GS-220 HQ (300 * 7.6 mm d.i., 6 lm) with exclusion limit of 3 kDa LMW Volumen de inyección: 6 * 200 µL Flujo de la fase móvil: 0.5 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 20 mM o 50 mM ammonium acetate (pH 7.0) Programa de elución: isocrático Caracterización: Discovery BIO Wide Pore C8 microbore (150 * 2.1 mm d.i., 3 µm) Flujo de la fase móvil: 175 µL min⁻¹ Composición de la fase móvil: Fase A: 0.1% (v/v) HFBA in 5.0% (v/v) MeOH Fase B: 0.1% (v/v) HFBA in 95% (v/v) MeOH Programa de gradiente: 5% (v/v) MeOH, 10 min 5–75% MeOH, 45 min 75–90% MeOH, 50 min 90% MeOH, 60 min</p>
<p>HPLC-ICP-MS</p>	<p>Hamilton PRP X-100 (250 · 4.1 mm d.i., 10 lm) Volumen de inyección: 100 µL Flujo de la fase móvil: 0.9 mL/min Composición de la fase móvil: Fase A: 10 mM NH₄H₂PO₄, 2% (v/v) MeOH, pH 7.0 Fase B: 100 mM NH₄H₂PO₄, 2% (v/v) MeOH, pH 7.0 Programa de gradiente: 100% A, 3.0 min 0% A, 12 min 0% A, 15 min</p>
<p>HPLC-ICP-MS [15]</p>	<p>Superdex 75 (300 · 10 mm d.i., 10 µm) Volumen de inyección: 100 µL Flujo de la fase móvil: 0.7 mL min⁻¹ Composición de la fase móvil: 100 mM ammonium acetate, pH = 7.5</p>

HPLC-ICP-MS [16]

Programa de elución: isocrático
Superdex 75 (300 · 10 mm d.i., 10 µm)
Volumen de inyección: 100 µL
Flujo de la fase móvil: 0.7 mL min⁻¹
Composición de la fase móvil: 100 mM
acetato de amonio, pH = 7.5
Programa de elución: isocrático

En vista de todas las condiciones revisadas en la bibliografía, para realizar el presente estudio, se seleccionó una columna de intercambio aniónico Hamilton PRP X-100 y citrato amónico como fase móvil.

2.3 Química verde: Métodos de extracción en química verde

La química verde se basa en la utilización de un conjunto de principios que reduce o elimina el uso o generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y aplicación de productos químicos [17].

Algunos métodos de extracción orientados hacia la química verde y que serán estudiados en esta memoria se describen a continuación.

2.3.1. Dispersión de la matriz en fase sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida, desarrollada por Barker y Long en 1989 [18], es una técnica de extracción que puede utilizarse como alternativa rápida y eficaz a los métodos tradicionales de extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas, semisólidas o muestras biológicas [19]. Esta técnica permite la extracción en muestras dispersadas de forma homogénea en un soporte sólido que generalmente es un adsorbente. La matriz homogeneizada se introduce en una columna, se compacta y a continuación los analitos son aislados de la matriz por elución con disolventes orgánicos por gravedad, aplicación de vacío o presión. La principal ventaja de esta técnica es que permite llevar a cabo varios pasos en la preparación de la muestra de manera simultánea, reduciendo de esta manera el tiempo de análisis y disminuyendo el consumo de disolventes, ya que la extracción y purificación de la muestra se realizan en un único paso [20].

2.3.2. Métodos de hidrólisis enzimática

Estos métodos consisten en hidrolizar biomoléculas mediante la rotura de determinados enlaces, permitiendo así la liberación de los analitos de interés de la muestra. Las enzimas hidrolizan macromoléculas contenidas en muestras biológicas bajo condiciones suaves de pH y temperatura y en ausencia de contaminantes o reactivos tóxicos. Por lo tanto, estos procedimientos se consideran métodos respetuosos con el medio ambiente. Además, debido a las condiciones suaves de pH y temperatura, la degradación o interconversión del analito es mínima, lo que resulta muy adecuado en estudios de especiación. [21]

2.3.3. Extracción con líquidos presurizados

Este método consiste en la utilización de disolventes a elevada presión y/o temperatura sin llegar a alcanzar el punto crítico, es decir, utilizando el disolvente en fase líquida para la extracción de los analitos. Bajo estas condiciones, las propiedades del disolvente cambian drásticamente; se produce una disminución en la constante dieléctrica, densidad, viscosidad y tensión superficial del disolvente. Todo esto permite una mejor penetración del disolvente en la muestra, facilitando así el contacto entre muestra y disolvente. La elevada temperatura alcanzada en las celdas de extracción

facilita la rotura de los enlaces entre el analito y la matriz en la que está contenido, permitiendo así una rápida desorción del analito, un aumento en su solubilidad y, por tanto, una transferencia de masa eficiente de las partículas sólidas hacia el disolvente de extracción.

Las principales ventajas de este método se basan en el corto tiempo de extracción y bajos volúmenes de disolventes requeridos. Además, la técnica presenta un elevado nivel de automatización y la posibilidad de realizar en la celda las etapas de limpieza [21].

3. OBJETIVOS

El primer objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de un método de separación y determinación de diferentes especies de selenio: Selenocisteína, selenometeonina, selenometilcisteína, selenito y selenato. Para ello se utilizará la técnica analítica de detección ICP-MS previa separación cromatográfica mediante HPLC.

El segundo objetivo se centra en la evaluación de las características analíticas de dicho método: Sensibilidad y precisión.

Por último, se aplicará este método tras la realización de diferentes procesos de extracción de Química Verde, para la determinación de selenocisteína, selenometilcisteína, selenometeonina, selenito y selenato en un alga verde (*Ulva rigida*).

4. MATERIALES, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1. Aparatos

- Dionex HPLC UltiMateO 3000 LC de Dionex, (Sunnyvale, CA, USA) equipado con una bomba de gradiente GP50 (Dionex), un compartimento termal AS50 (Dionex) y un automuestreador AS50 (Dionex).
- Columna de intercambio aniónico (250 mm x 4.1 mm d.i.) (Hamilton PRP X-100) acoplada a una precolumna (25 mm, 2.3 mm d.i.) (Hamilton, Reno, NV, USA).
- El sistema cromatográfico fue acoplado con un ICP-MS cuadrupolar Thermo Finnigan X Series (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA).
- ASE-200, Accelerated Solvent Extractor. (Dionex). Equipado con celdas de extracción de 11 mL.
- Sistema de depuración de agua Mili-Q de 18 Ω cm⁻¹ de resistencia específica. Milipore (Bedford, USA).
- Rotavapor Büchi R-200 equipado con un baño calefactor Büchi B-490 y una bomba de vacío Büchi (Flawil, Switzerland).
- Molino de bolas, Fritsch Planetary-Micro Mill-Pulverisette 7, Fritsch Industriest (Indar-Oberstein, Germany) equipado con cilindros y bolas de zirconio.
- Baño de ultrasonidos SELECTA Modelo 513, J.P. Selecta S.A. (Barcelona, España).
- Medidor de pH GLP21 Crison (Barcelona, España).

4.2. Material

- Viales ámbar de vidrio con tapón de rosca y septos de teflón/silicona adheridos para el almacenamiento de las muestras y patrones de Waters (Milford, MA, USA).
- Mortero de Ágata con mano de 10 cm de diámetro exterior.
- Filtros de celulosa de 19.8 mm de diámetro (Dionex).
- Omnifix jeringas de plástico de 25 mL Braun (Melsungen, Germany).

4.3. Reactivos

- Metanol, Merck (Poole, UK).
- AnalaR ácido nítrico 69%, Panreac (Barcelona, Spain).
- Amoníaco 25% (m/v) Panreac.
- Ácido cítrico 99% (m/m), Panreac.
- Arena de mar (lavada), Panreac.
- Tierra de diatomeas 95% SiO₂, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Superclean LC-8 (SUPELCO), Sigma Aldrich.
- Superclean ENVI-18 (SUPELCO), Sigma Aldrich.
- Silicato de magnesio activo (Florisil), Sigma Aldrich.
- Carbón activo, Sigma Aldrich.
- Disolución estándar de selenito (Se(IV)) (1000 mg L⁻¹), Panreac.
- Disolución estándar de selenato (Se(VI)) (1000 g L⁻¹) preparadas disolviendo la cantidad apropiada de selenato de sodio (Na₂SeO₄), Sigma Aldrich.
- Disolución estándar de SeCys₂ (1000 g L⁻¹) preparadas disolviendo la cantidad apropiada de SeCys₂ (seleno-L-cystine 95%), Sigma Aldrich.
- Disolución estándar de SeMe-Cys (1000 g L⁻¹) preparadas disolviendo la cantidad apropiada de SeMeCys (Se-(Methyl)selenocysteine hydrochloride 95%), Sigma Aldrich.
- Disolución estándar de SeMet (1000 g L⁻¹) preparadas disolviendo la cantidad apropiada de SeMet (seleno-D,L-methionine 99%), Sigma Aldrich.
- DL-Dithiothreitol 95.5%, Sigma Aldrich.
- Enzimas digestivas (pepsina porcina, p-7000, pancreatina porcina, P-1750), Sigma Aldrich.
- Proteasa de *Streptomyces griseus*, Sigma Aldrich.
- Enzimas celulasa y lipasa de *Candida rugosa*, Sigma Aldrich.
- Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris), Sigma Aldrich.

➤ Ácido clorhídrico 37%, Panreac.

4.4. Procedimiento experimental

4.4.1. Preparación de patrones de las diferentes especies de selenio

Las disoluciones madres de las diferentes especies de selenio: selenometeoina (SeMet), selenocisteína (SeCys), selenometilcisteína (SeMeCys), selenito (Se(IV)) y selenato (Se(VI)) con concentraciones de 1000 mg L⁻¹ fueron preparadas a partir de los compuestos sólidos y posteriormente almacenadas en el congelador hasta la preparación de los diferentes patrones de trabajo.

En primer lugar, fue necesario preparar disoluciones intermedias de 1.0 mg L⁻¹ para cada una de las especies.

Para preparar los diferentes patrones de trabajo se añadió el correspondiente volumen de disoluciones madres para obtener la concentración deseada (entre 0 y 50 µg L⁻¹) en matraces de 5 mL y se enrasó con agua Mili-Q.

4.4.2. Determinación de especies de selenio mediante HPLC-ICP-MS

La determinación de las especies de selenio se realizó mediante ICP-MS cuadrupolar previa separación por HPLC. Para minimizar la interferencia debida al Argón se utiliza una celda de reacción / colisión (CCT). Como gas de reacción / colisión se utiliza una mezcla de hidrógeno y helio. Las condiciones experimentales de medida se indican en las **Tablas 2 y 3**.

Tabla 2. Condiciones de operación del ICP-MS

ICP-MS	Potencia de radiofrecuencia / W	1400
Flujo de Gas / L min	Velocidad de la bomba peristáltica / rpm	2.5
	Tipo de nebulizador	Bola de impacto
Alineación de la antorcha / mm	Plasma	14,0
	Auxiliar	0.8
Óptica / V	Nebulizador	0.85
	Horizontal	117
CCT-KED / mL min ⁻¹ Relación masa/carga	Vertical	317
	Profundidad de muestreo	210
	Extracción	-102
	Lente 1	-1150
	Lente 2	-62
	Focus	-7,8
	D1	-55.7
	D2	-140
	Pole bias	-15
	Hexapole bias	-18
Relación masa/carga	H ₂ /He	4.5
	Se	78
	Ge (patron interno). Post column addition at 5.0 µg L ⁻¹	72

Tabla 3. Condiciones de operación del HPLC seleccionadas tras el estudio de los diferentes parámetros.

HPLC	Hamilton PRP X-100 (250 x 4 mm d.i.) columna de intercambio aniónico	
Programa de elución	Volumen de inyección	25 µL
	Temperatura de la columna / °C	25
	t=0 min; 100%A, 0%B	
	t=4 min; 0%A, 100%B	
	t=9 min; 100%A, 0%B	
Composición de la Fase Móvil	t=13 min; 100%A, 0%B	
	Fase A (agua Milli-Q) Fase B (citrato amónico): 25 mM Ácido cítrico (pH 5.0 ajustado con amoníaco), 2.0%(v/v) MeOH	
Flujo de la Fase Móvil	0.9 mL min ⁻¹	

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Optimización del método de separación para HPLC

Para llevar a cabo la optimización de la separación de las diferentes especies de Selenio: SeCys, SeMet, SeMeCys, Se(IV) y Se(VI) mediante un método de separación cromatográfica, se utilizó una muestra patrón con una concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada una de las especies y un volumen de inyección de $25\mu\text{L}$.

Se realizaron experimentos en los que diferentes parámetros fueron variándose con el fin de encontrar las condiciones más adecuadas para la separación y determinación de las diferentes especies de selenio.

Los diferentes parámetros estudiados fueron los siguientes:

➤ pH

Se estudió el efecto del pH variando entre 3 y 7. Las demás condiciones de medida fueron las siguientes: 20 mM de ácido cítrico, 2% (v/v) MeOH, caudal de la fase móvil: 1 mL min^{-1} , gradiente 5 ($t=0 \text{ min } 100\%A, 0\%B$; $t=5 \text{ min } 0\%A, 100\%B$; $t=9 \text{ min } 100\%A, 0\%B$; $t=13 \text{ min } 100\%A, 0\%B$) y T° : 25°C . Tras la medida de la muestra patrón se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 2**.

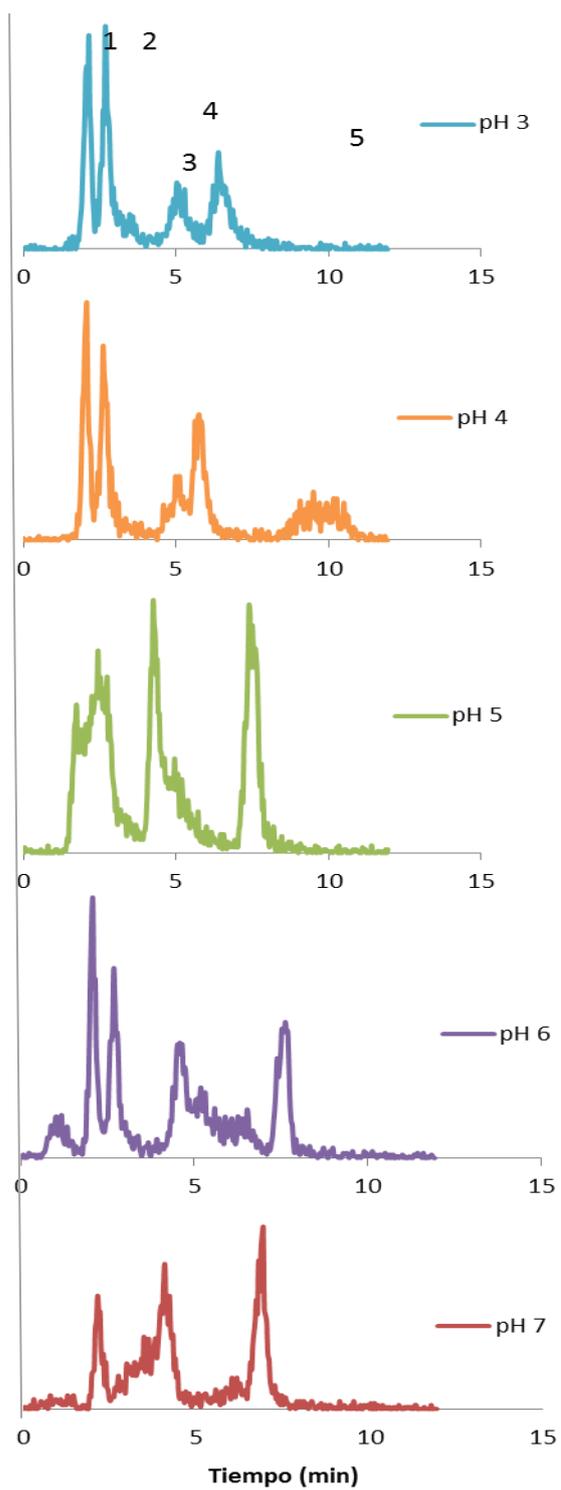


Gráfico 2. Efecto del pH de la fase móvil en la separación de las diferentes especies de selenio: SeCys (1), SeMeCys (2), Se(IV) (3), SeMet (4), Se(VI) (5).

Observamos que para ciertos valores de pH bajos (pH=3; o altos (pH>6) no tiene lugar una buena separación de los compuestos; los picos se solapan y la resolución es mala. La elución de la SeCys y la SeMecys es independiente del pH de la fase móvil. Finalmente a pH bajos se retrasa la elución de la SeMet y las formas inorgánicas de selenio incrementándose el tiempo de separación. El pH más adecuado para la separación de las especies es pH 5.

➤ Gradiente

Se utilizaron diferentes programas de gradiente de la fase móvil como se muestra en la **Tabla 4**. Para ello se utilizaron dos fases, la fase A, que corresponde a agua Mili-Q y la fase B, que corresponde a 20 mM de ácido cítrico (pH 5) y 2% (v/v) MeOH.

Tabla 4. Diferentes programas de gradiente utilizados.

Gradiente	Tiempo (min)	Fase A	Fase B
2	0	100%	0%
	2	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%
3	0	100%	0%
	3	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%
4	0	100%	0%
	4	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%
5	0	100%	0%
	5	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%

	0	100%	0%
6	6	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%
	0	100%	0%
7	7	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%
	0	100%	0%
8	8	0%	100%
	9	100%	0%
	13	100%	0%

Las demás condiciones de medida fueron las siguientes: pH=5, 2% (v/v) MeOH, 20 mM de ácido cítrico, caudal de la fase móvil: 1 mL min⁻¹ y T^a: 25°C. Tras la medida de la muestra patrón se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 3**.

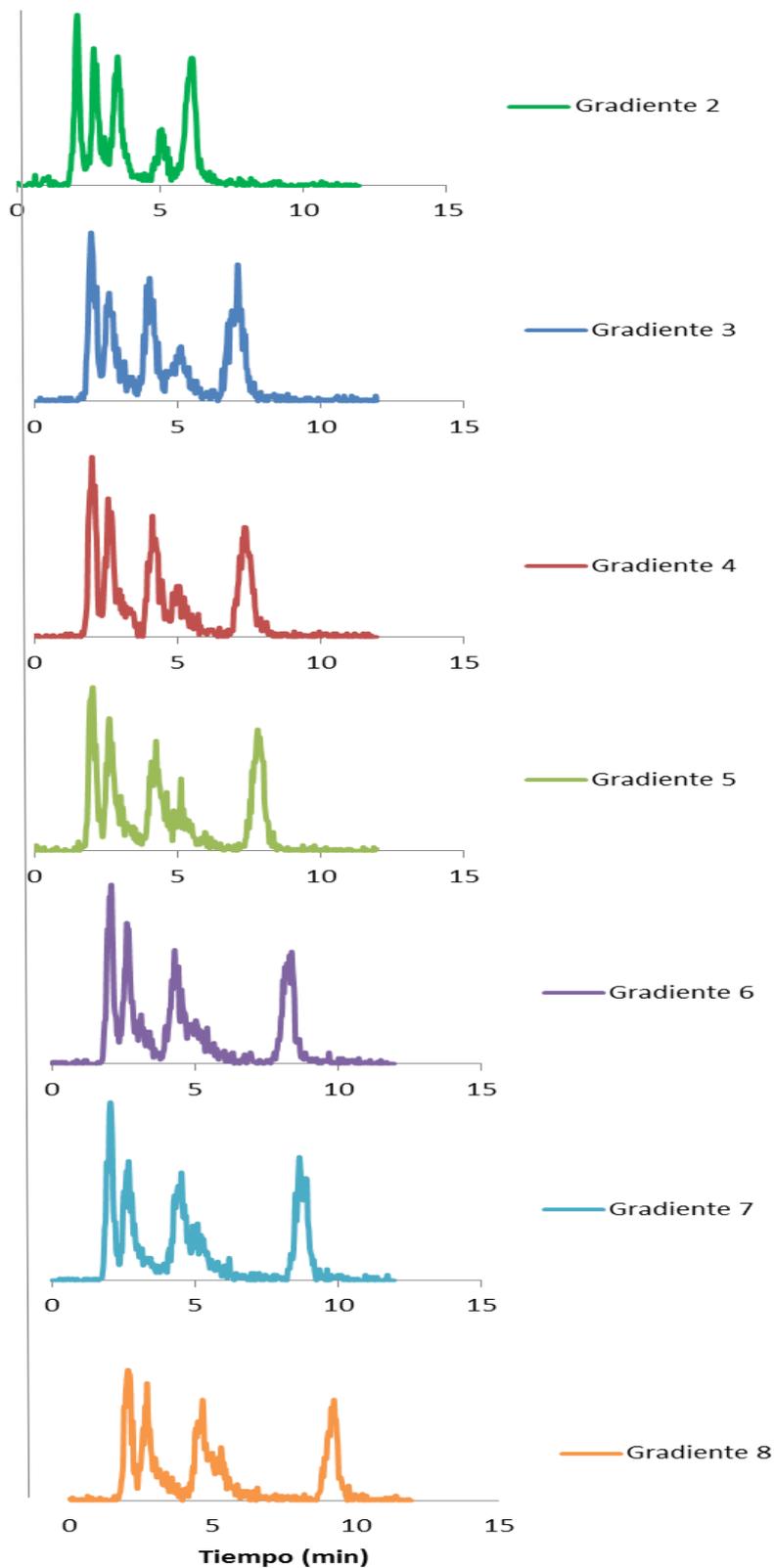


Gráfico 3. Diferentes gradientes utilizados para la separación de las diferentes especies de selenio: SeCys (1), SeMeCys (2), Se(IV) (3), SeMet (4), Se(VI) (5).

Al incrementar más lentamente la proporción de fase B (del Grad 2 a Grad 8) se produce una mejor separación de las especies SeMet, Se(IV) y Se(VI), a la vez que se incrementa el tiempo de elución. Para los gradientes 2 y 3 empeora considerablemente la resolución de las especies SeMet y Se(IV). Al igual que con los parámetros anteriormente comentados, los tiempos de retención de la SeCys y la SeMeCys son independientes de los cambios de gradiente de la fase móvil. Por todo lo comentado anteriormente, seleccionamos el 4 como el más adecuado.

➤ **Caudal de la fase móvil**

El flujo de la fase móvil se varió desde 0.7 a 1.2 mL min⁻¹. Las demás condiciones de medida fueron las siguientes: 20 mM de ácido cítrico, 2% (v/v) MeOH, gradiente 5 (t=0 min 100%A, 0%B; t=5 min 0%A, 100%B; t=9 min 100%A, 0%B; t=13 min 100%A, 0%B) y T^a: 25°C. Tras la medida de la muestra patrón se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 4**.

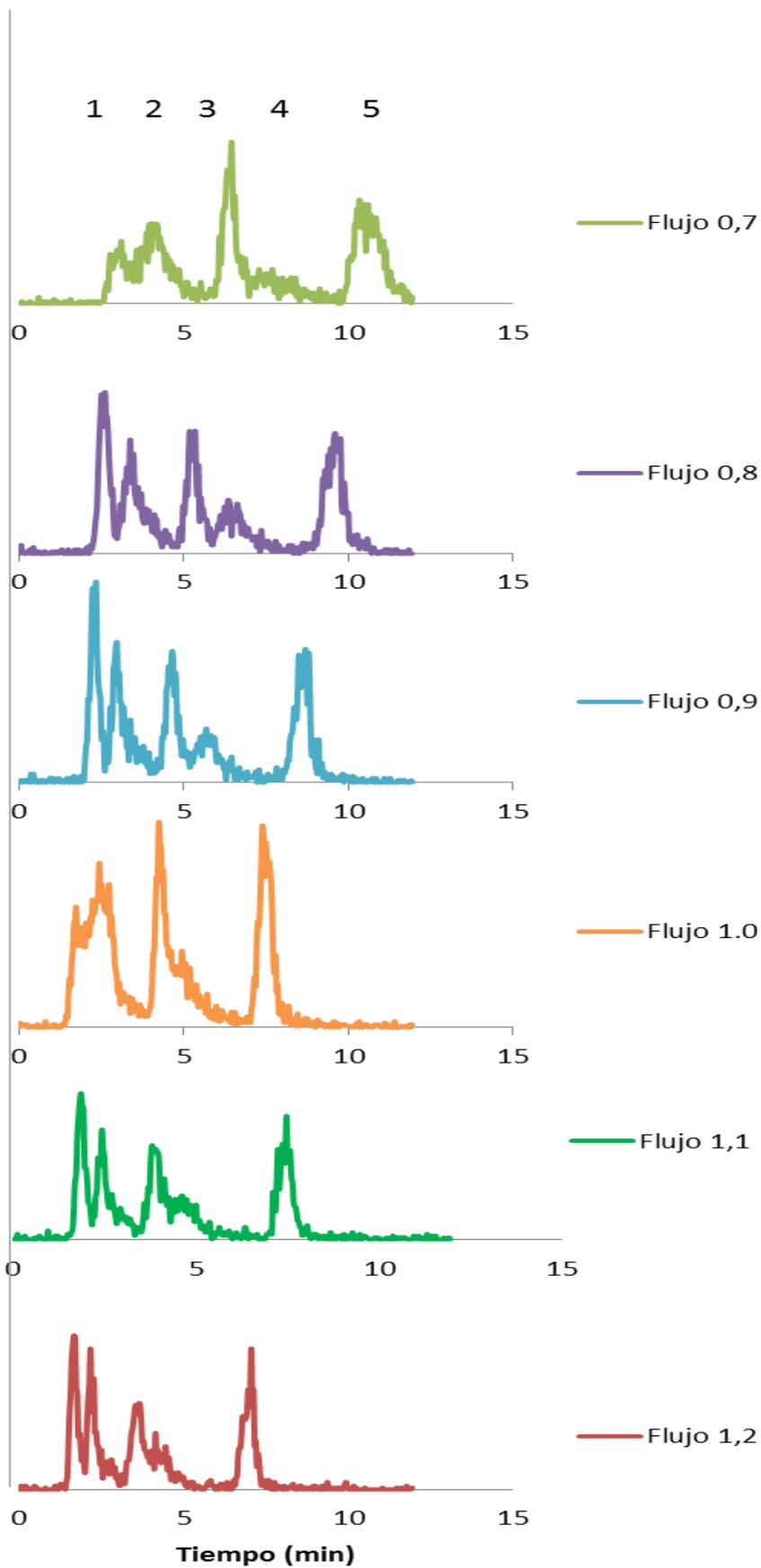


Gráfico 4. Diferentes caudales expresados en mL min⁻¹ utilizados para la fase móvil en la separación de las diferentes especies de selenio: SeCys (1), SeMeCys (2), Se(IV) (3), SeMet (4), Se(VI) (5).

Podemos observar que para flujos bajos ($< 0.7 \text{ mL min}^{-1}$) no se produce una separación de las especies SeMet y Se(IV) y se incrementa considerablemente el tiempo de separación. Flujos altos ($>1.0 \text{ mL min}^{-1}$) tampoco son adecuados para la separación de las especies SeMet y Se(IV), puesto que estos picos se solapan. Seleccionamos por tanto el flujo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ debido a la buena resolución proporcionada para todas las especies y debido a que el tiempo de elución total no es demasiado elevado.

➤ **Concentración de metanol en la fase móvil.**

La concentración de metanol en la fase móvil se varió desde 0 a 3 % (v/v). Las demás condiciones de medida fueron las siguientes: 20 mM de ácido cítrico, pH 5, gradiente 5 (t=0 min 100%A, 0%B; t=5 min 0%A, 100%B; t=9 min 100%A, 0%B; t=13 min 100%A, 0%B), caudal de la fase móvil: 1 mL min^{-1} y T^a : 25°C . Tras la medida de la muestra patrón se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 5**.

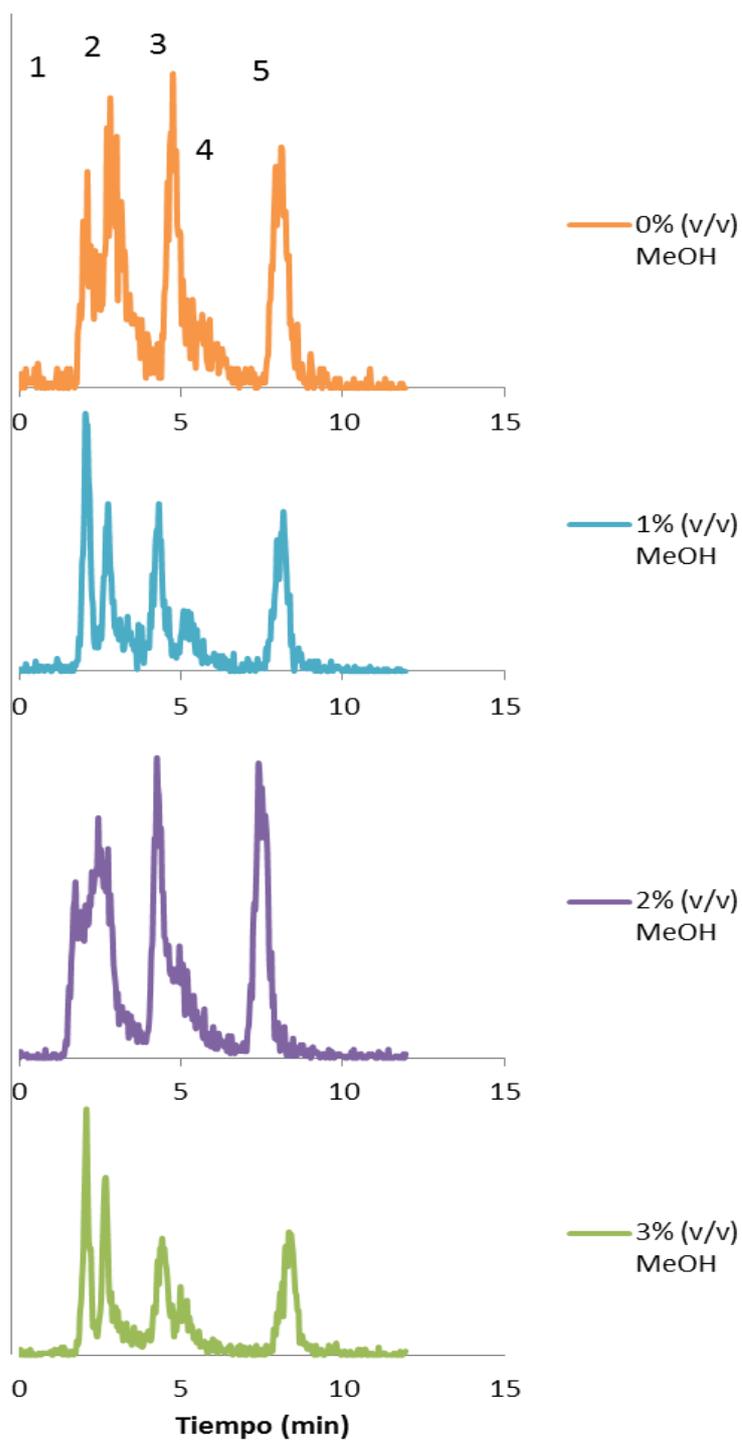


Gráfico 5. Diferentes concentraciones de metanol presentes en la fase móvil para la separación de las diferentes especies de selenio: SeCys (1), SeMeCys (2), Se(IV) (3), SeMet (4), Se(VI) (5).

Podemos observar que, al aumentar el porcentaje de metanol en la fase móvil, no mejora apreciablemente la resolución de los compuestos. Sin embargo, la adición de metanol es necesaria para mejorar la dispersión de las bandas. Por ello, seleccionamos un 2% (v/v) de metanol.

➤ **Composición de la fase móvil**

Como fase móvil se utilizó una disolución de ácido cítrico y metanol. El pH fue ajustado con una disolución de amoníaco. Para un porcentaje de metanol del 2%, se varió la concentración de ácido cítrico de 10 a 30 mM. Las demás condiciones de medida fueron las siguientes: pH=5, 2% (v/v) MeOH, caudal de la fase móvil: 1 mL min⁻¹, gradiente 5 (t=0 min 100%A, 0%B; t=5 min 0%A, 100%B; t=9 min 100%A, 0%B; t=13 min 100%A, 0%B) y T^a: 25°C. Tras la medida de la muestra patrón se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 1**.

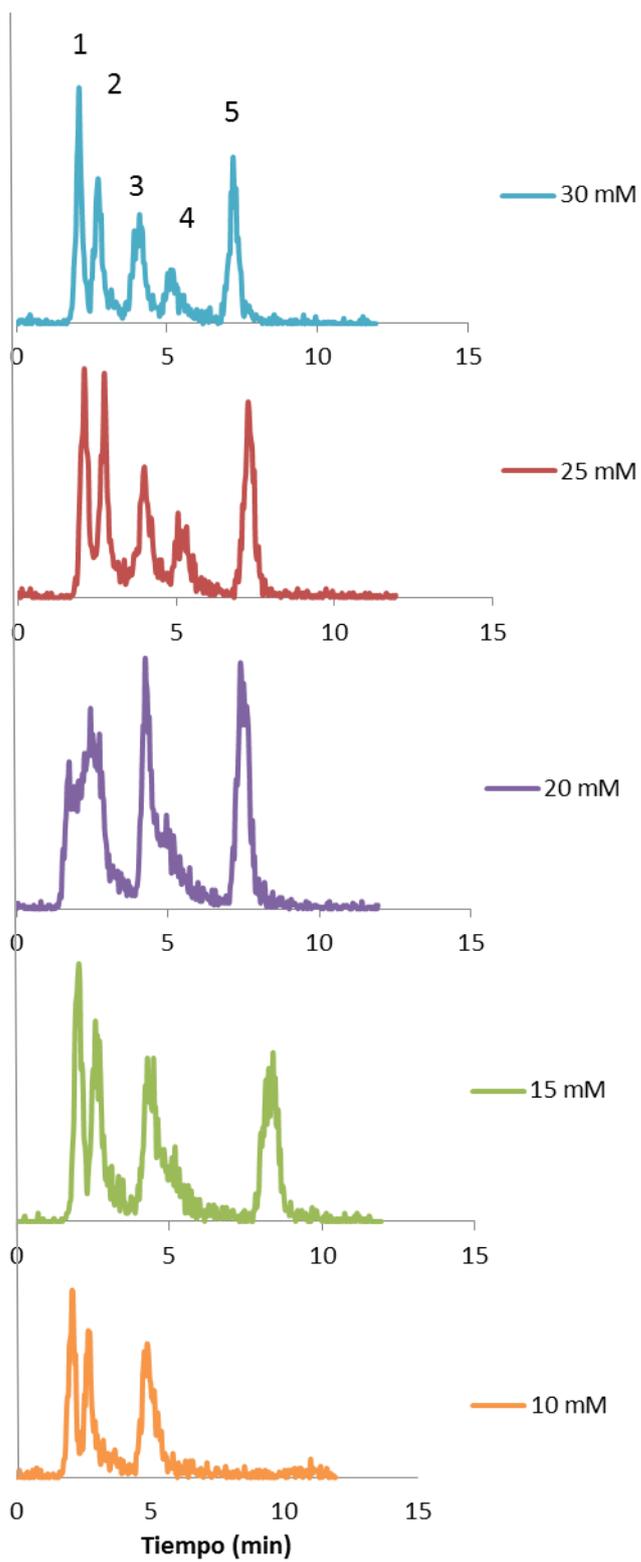


Gráfico 1. Diferentes concentraciones de ácido cítrico en la fase móvil utilizadas para la separación de las diferentes especies de selenio: SeCys (1), SeMeCys (2), Se(IV) (3), SeMet (4), Se(VI) (5).

Podemos observar que, al aumentar la concentración de ácido cítrico en la fase móvil, mejora la separación de las especies SeMet y Se(IV). Sin embargo los tiempos de retención para la SeCys y la SeMecys permanecen inalterados. Por último, el incremento de la concentración de ácido cítrico reduce el tiempo de retención del Se(VI), acortándose así el tiempo total de separación. La concentración más adecuada sería 25 mM de ácido cítrico ya que presenta una mejor resolución y una mejor separación de las diferentes especies de selenio.

➤ **Temperatura de la columna.**

Se realizó una variación en la temperatura de la columna de 10 a 30 °C. Las demás condiciones de medida fueron las siguientes: 25 mM de ácido cítrico, 2% (v/v) MeOH, pH 5, gradiente 4 (t=0 min 100%A, 0%B; t=4 min 0%A, 100%B; t=9 min 100%A, 0%B; t=13 min 100%A, 0%B) y caudal de la fase móvil: 0,9 mL min⁻¹. Tras la medida de la muestra patrón se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 6**.

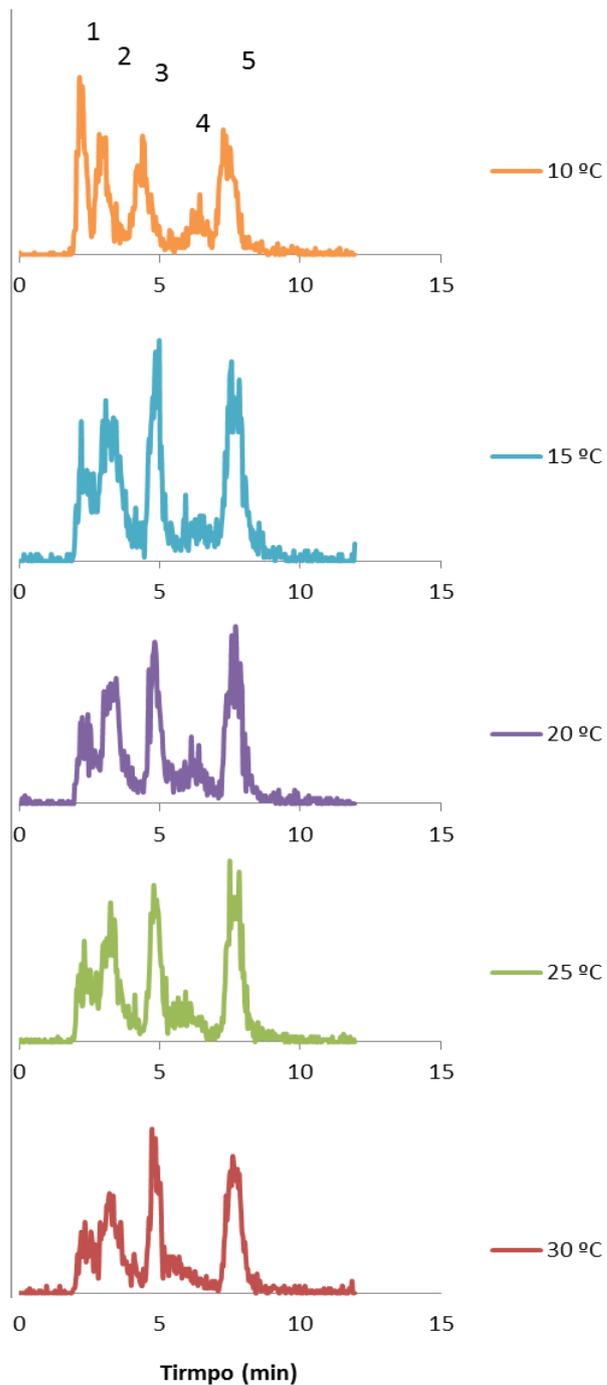


Gráfico 6. Efecto de la temperatura de la columna en la separación de las diferentes especies de selenio: SeCys (1), SeMeCys (2), Se(IV) (3), SeMet (4), Se(VI) (5).

Observando los cromatogramas, podemos concluir que la temperatura no afecta en la separación de los compuestos. Por ello, seleccionamos una temperatura de 25°C.

Tras la realización de los experimentos, se seleccionaron las condiciones más adecuadas para la separación y determinación de las diferentes especies de selenio. Las condiciones seleccionadas se muestran en la **Tabla 5**. En el **Gráfico 7** se muestra un cromatograma de la separación de las cinco especies de selenio utilizando las condiciones óptimas mostradas en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Valores óptimos de los parámetros estudiados.

Parámetros	Valores
Concentración de ácido cítrico en la fase móvil	25 mM
Gradiente	4
pH	5
Caudal de la fase móvil	0.9 mL/min
% Metanol	2% (v/v)
Temperatura	25°C (No influye)

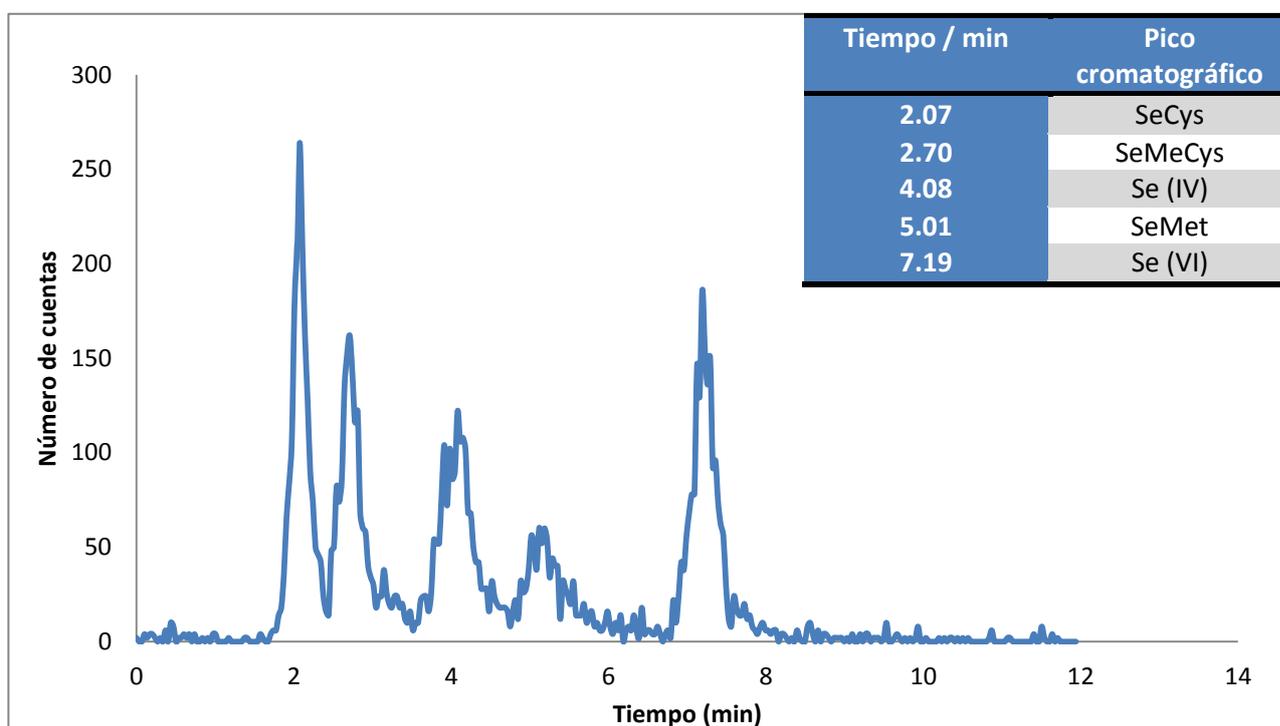


Gráfico 7. Cromatograma de un patrón de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de SeCys, SeMeCys, SeMet, Se (IV) y Se (VI) utilizando las condiciones de separación indicadas en la Tabla 4.

5.2.1. Rectas de calibrado.

Para poder obtener un valor de concentración de las diferentes especies de selenio a partir de una señal analítica, es necesario disponer de una recta de calibrado que permita convertir los valores de la señal analítica en concentración. Con este objetivo se realizan rectas de calibrado (**Gráficos 8-12**) preparando seis patrones acuosos que contienen una cantidad variable de las distintas especies de selenio entre 0 y 40 $\mu\text{g/L}$.

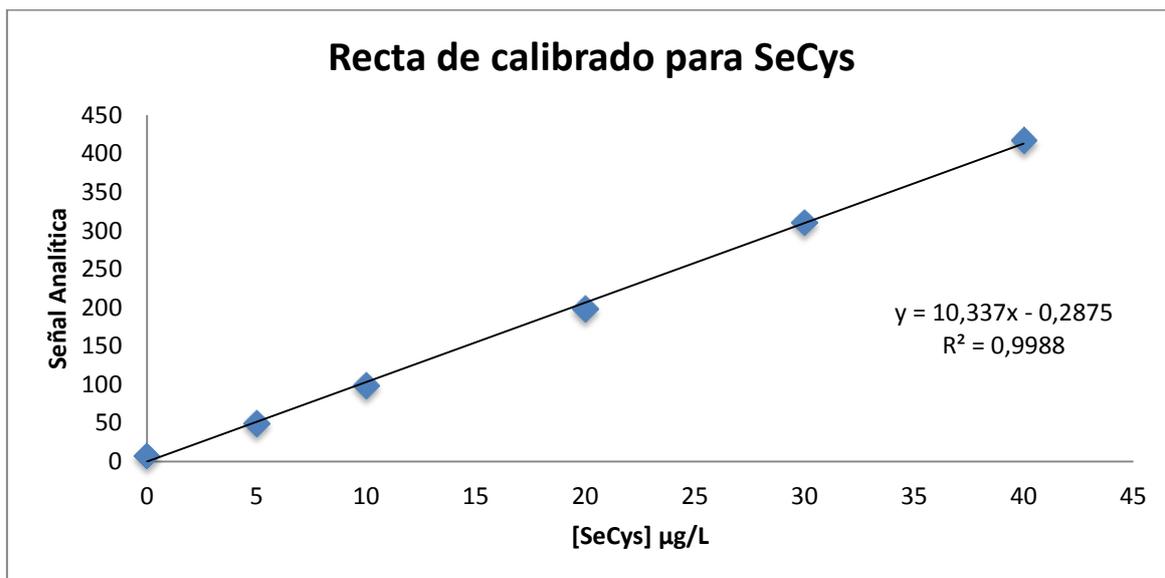


Gráfico 8. Recta de calibrado para SeCys: Señal analítica = $(10.337 \pm 1.16)[\text{SeCys}] - 0.2875 \pm 13.31$.

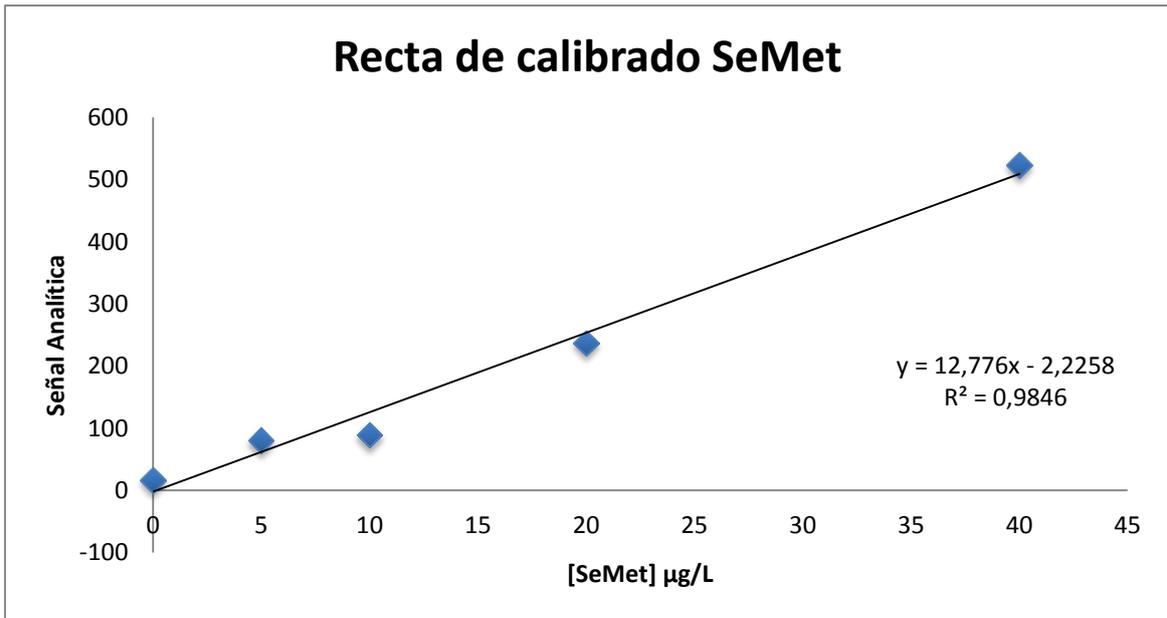


Gráfico 9. Recta de calibrado para SeMet: Señal analítica = $(12.776 \pm 2.32)[\text{SeMet}] - 2.2258 \pm 17.95$.

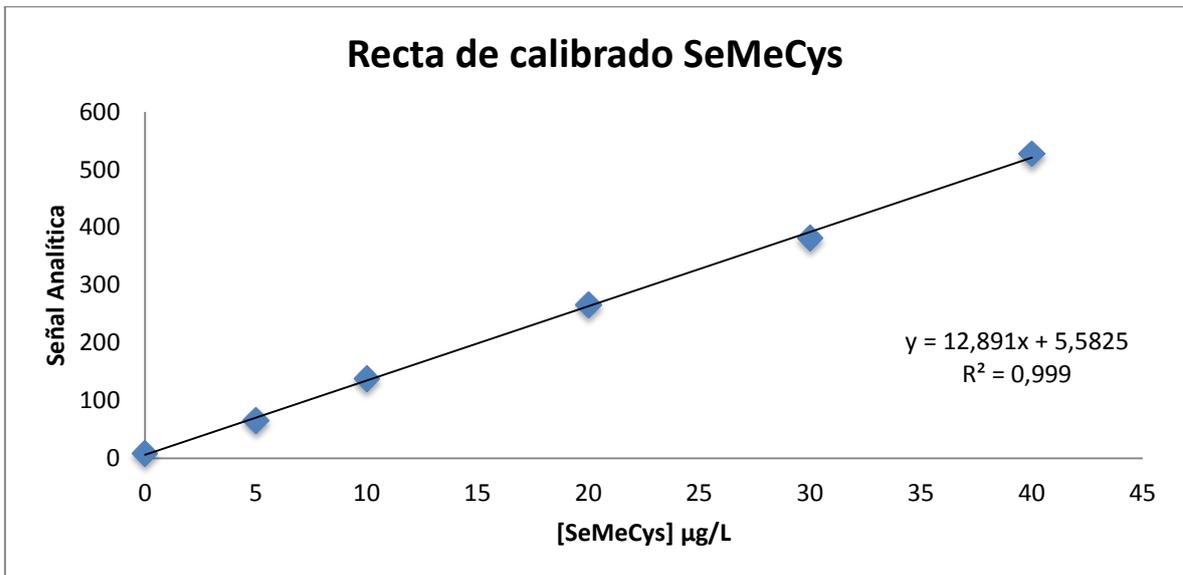


Gráfico 10. Recta de calibrado para SeMeCys: Señal analítica = $(12.891 \pm 0.87)[\text{SeMeCys}] + 5.5825 \pm 5.43$.

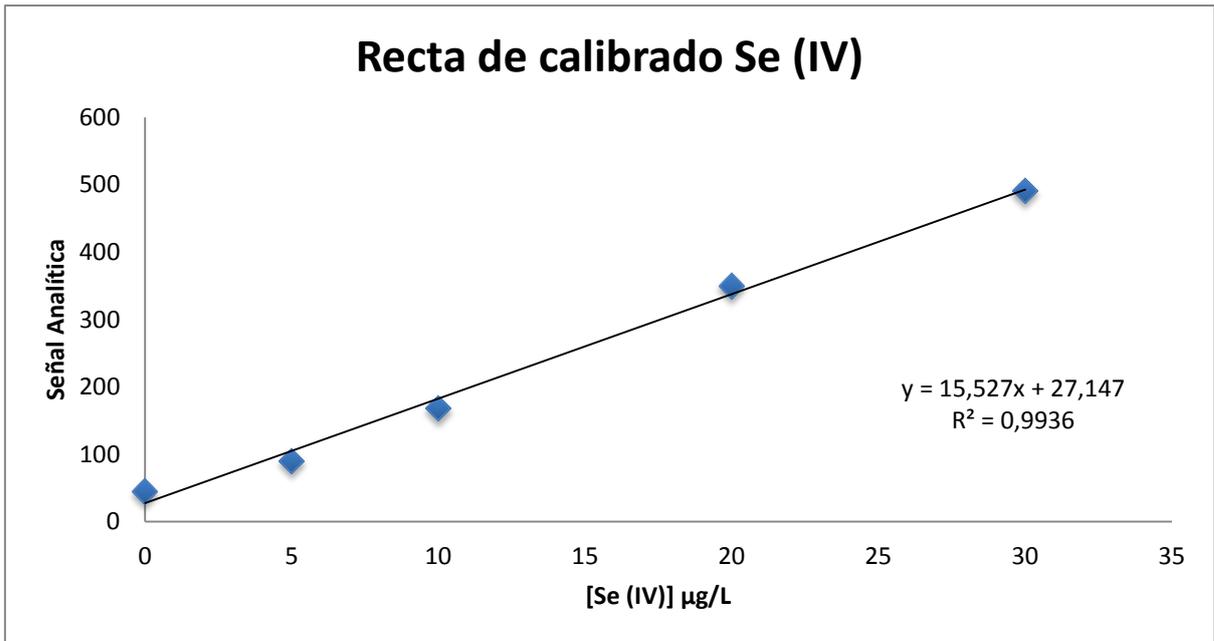


Gráfico 11. Recta de calibrado para Se(IV): Señal analítica = $(15.527 \pm 3.03)[\text{Se(IV)}] + 27.147 \pm 32.09$.

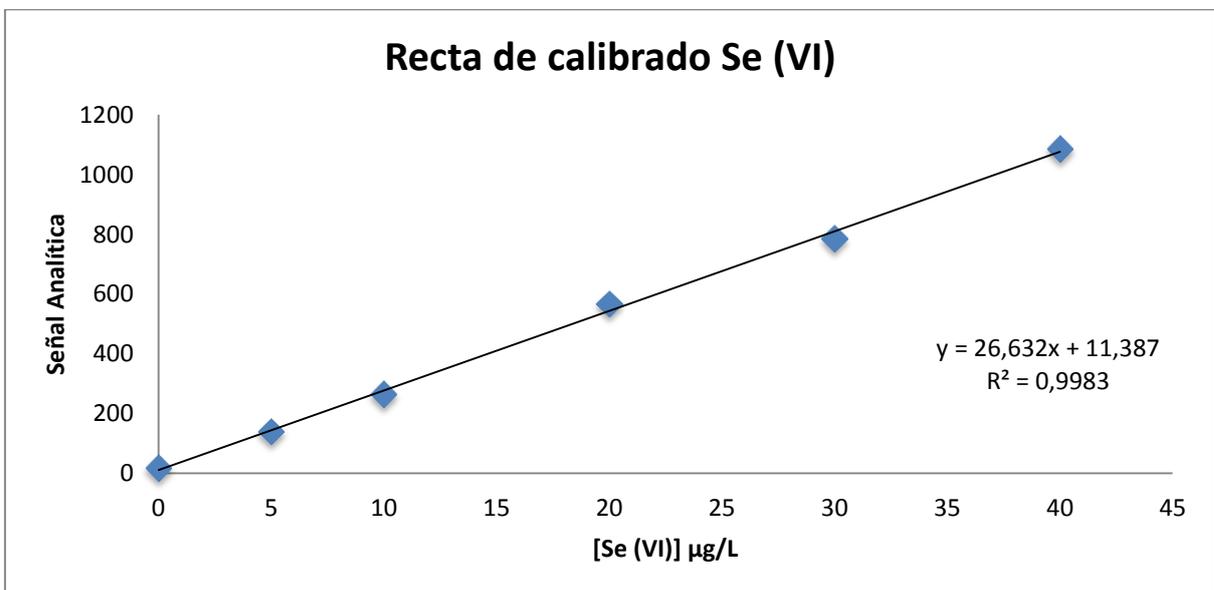


Gráfico 12. Recta de calibrado para Se(VI): Señal analítica = $(26.632 \pm 2.18)[\text{Se(VI)}] + 11.387 \pm 16.15$.

5.2.2. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico se define como la capacidad de diferenciar pequeñas variaciones de concentración de un analito [22].

Para expresar la sensibilidad de un método analítico, se emplean los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

El límite de detección se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada y diferenciada de un blanco para un determinado nivel de confianza. El límite de detección puede calcularse a partir de **la Ecuación 1**.

$$\bullet \quad LOD = \frac{x+kSD}{S} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde SD es la desviación estándar de las medidas del blanco, S es la pendiente de la recta de calibrado, x es el valor medio de la señal del blanco y k es un factor estadístico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado. Para un 99.7 % de confianza, k toma un valor de 3.

El límite de cuantificación se define como la concentración mínima de analito que puede ser determinada de forma cuantitativa. Puede obtenerse a partir de la Ecuación 1 teniendo en cuenta que, en este caso, k toma un valor de 10 para un 99.7% de confianza.

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación, se midió 6 veces el blanco preparado en las mismas condiciones que los patrones. Los límites de detección y cuantificación obtenidos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 6. Límites de detección y cuantificación calculados para cada una de las especies de selenio.

	SeCys	SeMeCys	Se (IV)	SeMet	Se (VI)
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,39	2,47	7,99	3,30	1,64
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,97	6,70	19,19	7,62	3,91

Los límites de detección y cuantificación son adecuados, ya que son lo suficientemente bajos como para que los resultados y conclusiones de las pruebas posteriores de precisión y aplicación a muestras reales sean válidos.

5.2.3. Precisión

La IUPAC define la precisión de un método analítico como el grado de concordancia de una serie de medidas entre sí con un determinado nivel de confianza. La evaluación de la precisión se mide mediante la desviación estándar relativa, que se indica en la **Ecuación 2**.

$$\bullet \quad RSD = \frac{SD}{X} 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde RSD es la desviación estándar relativa, SD es la desviación estándar de las medidas de los patrones de las diferentes especies de selenio y X es el valor medio de las mismas.

Los resultados obtenidos expresados como RSD (N=5) se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 7. Precisión del método expresado como RSD.

RSD / %					
Patrón	SeCys	SeMeCys	Se(IV)	SeMet	Se(VI)
0	24,99	8	16,21	22,88	6,93
5	5,09	9,03	17,57	19,93	20,06
10	14,70	16,23	14,20	13,26	11,95
20	14,48	10,64	23,92	21,26	8,81
30	6,77	12,37	7,47	16,00	6,55
40	14,19	14,17	25,82	12,58	10,97

Como podemos observar, los RSD son inferiores al 25% para todos los niveles de concentración estudiados lo que indica que la precisión del método es adecuada.

5.3. Aplicaciones

En este apartado aplicaremos el método, anteriormente desarrollado, a la determinación de especies de selenio presentes en algas comestibles atlánticas (lechuga de mar, *Ulva rigida*). Previamente se estudiará la posibilidad de emplear diferentes métodos de extracción de Química Verde (dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) con o sin hidrólisis enzimática (EH); extracción enzimática asistida por energía de ultrasonidos (EH-UAE) y extracción con fluidos presurizados (PLE)) para la extracción de las especies de selenio presente en la muestra de lechuga de mar.

5.3.1. Extracción de especies de selenio en alga verde (*Ulva rigida*) mediante dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

Las muestras de alga que se emplearon para las diferentes aplicaciones fueron adquiridas en un supermercado. El único tratamiento previo que se les realizó fue triturarlas mediante la utilización de un molino de bolas.

La muestra de alga triturada (0.25 g) se colocó en un mortero de ágata junto con el adsorbente (1.75 g) sólido en una proporción 1:7 y se molturó durante un tiempo de 5 minutos hasta conseguir la completa dispersión / abrasión de la muestra en el adsorbente. Este sistema actúa como un disolvente abrasivo y lipofílico que ayuda a la destrucción y ruptura de las membranas celulares de forma que la muestra se rompe en partes más pequeñas y sus componentes se distribuyen en el adsorbente quedando dispersados en la superficie de dicha fase, de acuerdo con sus polaridades relativas. Posteriormente, la muestra y el adsorbente se humectaron con agua ultrapura (1.5 mL) para evitar la formación de canales preferentes. La mezcla de muestra y adsorbente fue transferida a una columna (jeringuilla de plástico) que contenía un filtro de celulosa en la parte inferior. Una vez compactada la mezcla (con ayuda del émbolo de la jeringuilla), se añadió el eluyente y se dejó percolar por gravedad.

Para extraer los compuestos de selenio se realizaron 3 eluciones sucesivas utilizando 5 mL de metanol y agua ultrapura en una proporción 1:1.

El procedimiento se repitió utilizando diferentes agentes dispersantes con diferentes polaridades: tierra de diatomeas, C18, C8, florisil y arena.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que se encontraron por debajo de los límites de detección. Esto puede ser debido a dos motivos: en primer lugar la utilización de condiciones de extracción no optimizadas y en segundo lugar a la elección de adsorbentes y / o eluyentes no adecuados.

5.3.2. Extracción de especies de selenio en alga verde (*Ulva rigida*) mediante dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) e hidrólisis enzimática.

En este estudio, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente: La muestra de alga triturada (0.5 g) se colocó en un mortero de ágata junto con el adsorbente sólido (3 g) en una proporción 1:6 y se molturó durante 5 minutos hasta conseguir la completa dispersión de la muestra en el adsorbente. Posteriormente, la muestra y el adsorbente se humectaron con 1.5 mL de agua ultrapura para evitar la formación de canales preferentes en la columna. La mezcla de muestra y adsorbente fue transferida a una jeringuilla de plástico que contenía un filtro de celulosa en la parte inferior. Una vez compactada la mezcla, se añadieron 10 mL del eluyente (tampón conteniendo diferentes enzimas hidrolíticas: pepsina, pancreasa, lipasa, proteasa y celulasa) y se dejó percolar por gravedad.

Los tampones y las concentraciones de las enzimas fueron: 200 mg de pepsina en 10 mL de agua ultrapura a pH=3, 200 mg de pancreatina en 10 mL de NaDHP/DNaHP (0.30M/0.30M) a pH=7.5, 200 mg de proteasa en 10 mL de Tris/CIH a pH=7.5, 200 mg de lipasa en Tris/CIH a un pH=7.5 y 200 mg de celulasa en NaDHP/DNaHP (0.30M/0.30M) a un pH=5.

El procedimiento se repitió una vez más utilizando 10 mL de Tris/CIH a pH=7.5 conteniendo proteasa (200 mg) y 100 mg de DL-Dithiothreitol (DTT).

Al igual que en el caso anterior no se obtuvieron resultados satisfactorios ya que se encontraron por debajo de los límites de detección. Esto puede ser debido a dos motivos: en primer lugar la utilización de condiciones de extracción no optimizadas y en segundo lugar a la elección de adsorbentes y / o eluyentes no adecuados.

5.3.3. Extracción de especies de selenio mediante líquidos presurizados (PLE).

La muestra de alga triturada (0.5 g) se colocó en un mortero de ágata junto con el adsorbente sólido (3 g) C18 en una proporción 1:6 y se dispersó hasta conseguir una mezcla homogénea. Posteriormente, la mezcla de muestra y adsorbente fue transferida a una de las celdas de extracción cubriendo las fritas con filtros de celulosa. A continuación, la celda se carga en el equipo.

El proceso de extracción se realizó utilizando un ciclo de extracción de 10 minutos con metanol como disolvente a 150°C y 1500 psi. Tras la extracción, el extracto se transfiere automáticamente a un vial colector. Finalmente, todo el sistema se purga con nitrógeno.

Los extractos obtenidos fueron llevados a un rotavapor hasta sequedad y se redisolvieron con 5 mL de agua ultrapura.

Al igual que en los casos anteriores, no se obtuvieron resultados adecuados por los motivos comentados anteriormente.

5.3.4. Extracción de especies de selenio en alga verde (*Ulva rigida*) mediante hidrólisis enzimática asistida por energía de ultrasonidos.

En este estudio, a la muestra de alga triturada (0.5 g) se le añadieron 0,1 gramos de proteasa y 10 mL de Tris/HCl a un pH de 7.5. Finalmente, la mezcla se introdujo en un baño termostatzado a 37°C y 35 khz durante 30 minutos. El extracto obtenido se filtra y se enrrasa a 25 mL con agua Milli-Q.

En estas condiciones se consigue la extracción de SeMet (**Gráfico 13**). La concentración de SeMet obtenida fue de $0.51\mu\text{g g}^{-1}$. De este puede deducirse que la extracción de especies de selenio en alga requiere tratamientos relativamente agresivos (como la utilización de energía de ultrasonidos) para conseguir extracciones adecuadas.

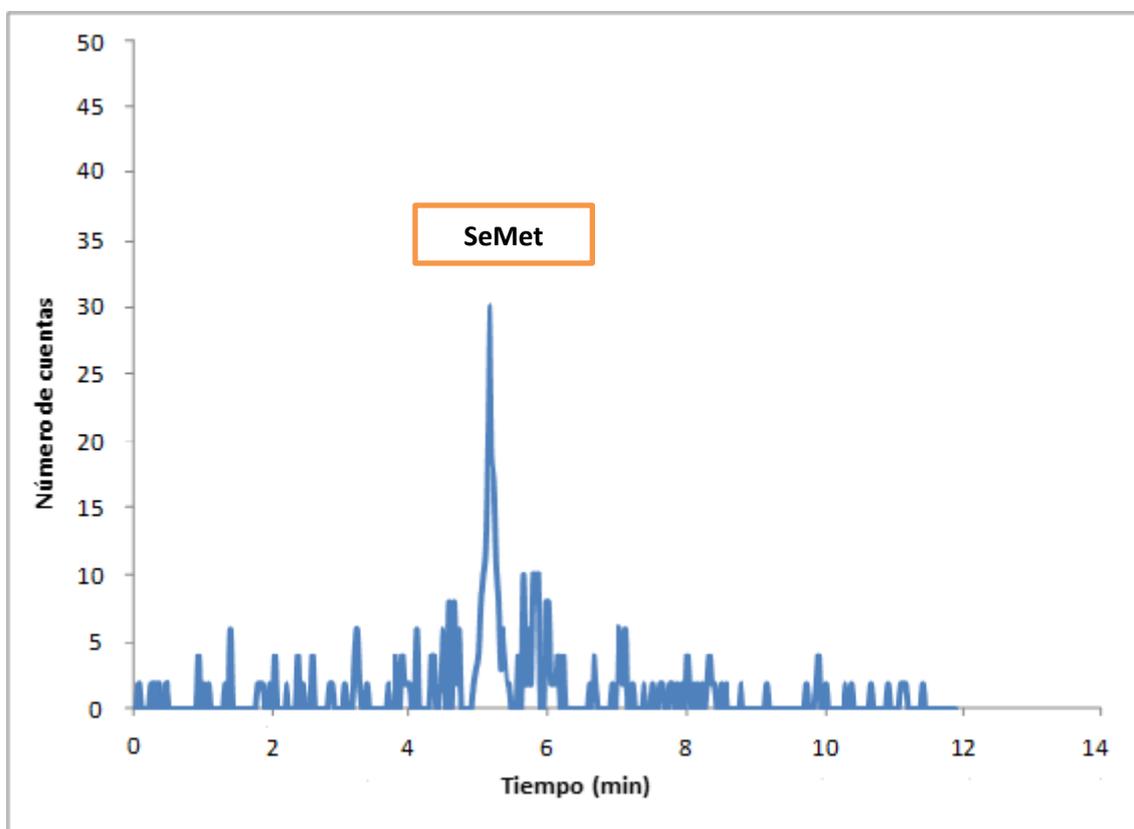


Gráfico 13. Cromatograma obtenido tras el análisis de muestras de alga verde sometidas a hidrólisis enzimática acelerada con ultrasonidos.

6. CONCLUSIONES

- A lo largo de este trabajo se ha desarrollado un método de separación cromatográfica de especies de selenio mediante HPLC-ICP-MS.
- Se ajustaron las condiciones instrumentales de operación para obtener la máxima resolución y sensibilidad.
- Se estudiaron diferentes parámetros para optimizar la separación cromatográfica obteniendo las siguientes condiciones:
 - Temperatura de la columna: 25°C
 - Características de la fase móvil: programa de elución: gradiente 4; concentración de ácido cítrico: 25 mM; pH=5.0; porcentaje de metanol: 2% (v/v) y flujo: 0.9 mL min⁻¹.
- Se evaluaron las características analíticas del método propuesto, calculando los límites de detección y cuantificación y la precisión.
- El método desarrollado se aplicó a la determinación de especies de selenio presentes en algas comestible atlánticas (lechuga de mar, *Ulva rigida*) tras haber realizado diferentes procedimientos de extracción de Química Verde.
- A pesar de no haber obtenido resultados satisfactorios en estos estudios preliminares de los procedimientos de extracción de Química Verde, sería conveniente continuar con su estudio, debido a las ventajas que presentan sobre los procedimientos de extracción convencionales, como un menor volumen de disolvente requerido, rapidez, selectividad y la posibilidad de realizar la extracción y etapa de limpieza en un único paso.
- Se puede concluir que la extracción de selenio en algas requiere tratamientos agresivos, dado que las únicas condiciones que permitieron la extracción de las especies fue el uso de hidrólisis enzimática asistida por energía de ultrasonidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., (1999). Selenocysteine-containing proteins in mammals. *Journal of Biomedical Science*. 6: 151–160.
- [2] Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., D., Romarís-Hortas, V., Dominguez-Gonzalez, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D., Bermejo-Barrera, P. (2013). *In vitro* bioavailability of total selenium and selenium species from seafood. *Food Chemistry*. 139: 872-877.
- [3] Finley, J. W. (2005). Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Annals of Botany*. 95: 1075–1096.
- [4] Larsen, E.H., Hansen, M., Fan T., Vahl, M. (2001). Speciation of selenoamino acids, selenonium ions and inorganic selenium by ion Exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 16:1403-1408.
- [5] Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D., Bermejo-Barrera, P. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 30 (2): 324-345.
- [6] Pedrero, Z., Madrid, Y., Cámara, C., Agric, J. (2006). *Food Chemistry*. 54: 2412.
- [7] Kápolna, E., Fodor, P. (2007). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 58: 282.
- [8] Hinojosa-Reyes, L., Ruiz-Encinar, J., Marchante-Gayón, J.M., García-Alonso, J.I., Sanz-Medel, A. (2006). *Journal of Chromatography A*. 1110: 108.
- [9] Crews, H.M., Clarke, P.A., Lewis, D.J., Owen, L.M., Strutt, P.R., Izquierdo, A. (1996). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 11: 1177.
- [10] Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C. (2004). *Analytical Chemistry*. 526: 51.
- [11] Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C. (2007). *Biological Trace Element Research*. 119: 195.
- [12] Dumont, E., Ogra, Y., Vanhaecke, F., Suzuki, K.T., Cornelis, R. (2006). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384: 1196.
- [13] Dumont, E., De Pauw, L., Vanhaecke, F., Cornelis, R. (2006). *Food Chemistry*. 95: 684.
- [14] Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. (2004). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379: 504.
- [15] Govasmark, E., Brandt-Kjelsen, A., Szpunar, J., Bierla, K. Vegarud, G., Salbu, B. (2010). *Pure and Applied Chemistry*. 82: 461.

- [16] Lipiec, E., Siara, G., Bierla, K., Ouerdane, L., Szpunar, J. (2010). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397: 731.
- [17] Anastas, P.T., Warner, J. C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- [18] Barker, S.A., Long, A.R., Short, C.R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 475: 353–361.
- [19] Moreda-Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Romarís-Hortas, V., Míguez-Framil, M., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P. (2009). Matrix solid-phase dispersion of organic compounds and its feasibility for extracting inorganic and organometallic compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. 28 (1): 110-116.
- [20] Ahmed, F. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends in Analytical Chemistry*. 20 (11): 649-661.
- [21] Moreda-Piñeiro, A., Moreda-Piñeiro, J., Bermejo-Barrera, P. (2013) Sample Pre-treatment Methods for Organometallic Species Determination. *Speciation Studies in Soil, Sediment and Environmental Samples*. 19-202. Sezgin Bakirdere.
- [22] Miller, J.N., Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Pearson Educación. Madrid 4ª Edición.

