



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE
SELENIO EN UNA LEVADURA ENRIQUECIDA MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ADRIANA OLIVERA CABRERA

ASESOR: DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUÉZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Caracterización y cuantificación de compuestos de Selenio en una levadura enriquecida mediante Electroforesis Capilar

que presenta la pasante: Adriana Olivera Cabrera
 con número de cuenta: 09606440-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Mayo de 2004

PRESIDENTE	<u>Dra. Luisa Martínez Aguilar</u>	<u>L. G. A.</u>
VOCAL	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Marina L. Morales Galicia</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Olimpia R. Ponce Crippa</u>	<u>[Firma]</u>

AGRADECIMENTOS

Gracias a todas las personas que han pasado por mi vida y hacerme quien soy hoy.

A mi madre por el ejemplo, la libertad y la confianza.

A mi padre por el pensamiento positivo, la alegría y la paciencia.

A mi hermano por el cariño y la complacencia.

A mis hermanas por las risas, las lágrimas y la sangre.

A mi asesora por el apoyo y el conocimiento.

A mis maestros por la reflexión.

A mis amigos por la tolerancia y el tiempo.

A los hombres por la diversión.

A Piolín por la simplicidad.

A mi súper yo por la cordura.

A mi ello por la locura.

*Canta conmigo, canta por los años, canta por las risas, canta por el
llanto.*

*Canta conmigo, canta conmigo sólo por hoy, tal vez mañana el buen
Señor nos lleve lejos.*

Sueña, sigue soñando hasta que tus sueños se hagan realidad.

ÍNDICE

Índice de tablas	1
Índice de figuras	2
I. Introducción	4
II. Objetivos	6
III. Antecedentes	7
1. Características del Selenio	7
1.1 Actividad biológica	7
1.2 Fuentes de Selenio	10
1.3 Metabolismo de las formas orgánicas e inorgánicas del Selenio	11
2. Características de la levadura	12
2.1. Composición y algunas propiedades biofuncionales	12
3. Generalidades de EC	15
3.1. Fundamentos de la separación	16
3.2. Conceptos importantes de Electroforesis Capilar	18
3.3. Modos de separación	21
4. Características de la muestra	23
5. Aplicaciones de Electroforesis Capilar al análisis del Selenio	24
IV. Hipótesis de trabajo	25
V. Materiales y métodos	26
VI. Metodología	28
VII. Resultados Y Análisis de resultados	32

A. Determinación de comportamiento experimental de los analitos	32
B. Determinación de las condiciones óptimas de separación	38
B.1. Optimización del tiempo de introducción de la muestra	38
B.2. Optimización del pH del buffer	45
B.3. Optimización del voltaje aplicado	46
B.4. Optimización de la concentración del buffer	47
B.5. Optimización de la concentración del surfactante	50
C. Pruebas con diferentes tipos de buffer	52
D. Determinación de otros factores que afectan el análisis	54
E. Preparación de la muestra	57
F. Método óptimo	61
G. Curvas de calibración	62
G. Análisis de la muestra de levadura	66
VIII. Conclusiones	68
XI. Referencias	69

LISTA DE ABREVIATURAS

CCEM	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
CMC	Concentración micelar crítica
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio, en inglés
D.E.	Desviación estándar
EC	Electroforesis Capilar
ECC	Electrocromatografía Capilar
ECG	Electroforesis Capilar en Gel
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
EIC	Enfoque Isoeléctrico Capilar
FEO	Flujo electroosmótico
GSH-Px	Glutación Peroxidasa
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, en inglés
ITPC	Isotacoforesis Capilar, en inglés
LDL	Lipoproteína de baja densidad, en inglés
µm	microgramos
mg	miligramos
mL	mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	partes por millón
s	segundos
Se-cys	Selenocisteína
Se-met	Selenometionina
TTAB	Bromuro de tetradeciltrimetilamonio, en inglés

Este trabajo fue presentado en el XXXV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y el 9º Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y la Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria con el nombre de "Caracterización de una levadura enriquecida con Selenio mediante Electroforesis Capilar "

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función de algunas selenoproteínas.

Tabla 2. Fuentes naturales de Selenio.

Tabla 3. Datos obtenidos de la repetición del análisis con las condiciones iniciales.

Tabla 4. Comparación de las áreas bajo la curva de los analitos con el tipo de introducción de la muestra.

Tabla 5. Relación del ancho del pico de la Selenometionina con la concentración.

Tabla 6. Datos obtenidos con el uso de TTAB como surfactante.

Tabla 7. Datos obtenidos con K_2CO_3 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5.

Tabla 8. Comparación de las áreas bajo la curva de los analitos en la preparación de la muestra con diferentes disolventes.

Tabla 9. Comparación de las áreas bajo la curva de los analitos en la preparación de la muestra con disolventes orgánicos y CTAB.

Tabla 10. Curva de calibración de Selenometionina.

Tabla 11. Resultados de la corrección del área bajo la curva de los analitos en base al área bajo la curva del cloro.

Tabla 12. Datos obtenidos de la muestra de Selplex de 2000 ppm de Selenio.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar.
- Figura 2. Ejemplo de electroferograma
- Figura 3. Doble capa eléctrica.
- Figura 4. Efecto del CTAB sobre el FEO.
- Figura 5. Escalas de zonas de predominio de los compuestos de Selenio.
- Figura 6. Movilidad efectiva de selenoaminoácidos en función del pH.
- Figura 7. Separación de los compuestos en forma aniónica usando Boratos
20 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5.
- Figura 8. Condiciones dentro del capilar al invertir el flujo electrosmótico y la carga de los electrodos.
- Figura 9. Movilidades en función del pH.
- Figura 10. Platos teóricos en función del tiempo de introducción hidrodinámica (0.5 psi).
- Figura 11. Platos teóricos en función del tiempo de introducción electrocinética (-5 kV).
- Figura 12. Comparación de la introducción hidrodinámica con la introducción electrocinética de la muestra de Selplex.
- Figura 13. Platos teóricos en función del tiempo de introducción hidrodinámica (0.5 psi).
- Figura 14. Platos teóricos en función del tiempo de introducción electrocinética (-5 kV).
- Figura 15. Platos teóricos en función de la introducción hidrodinámica a 0.5 psi, 25 s.
- Figura 16. Platos teóricos en función del pH.
- Figura 17. Platos teóricos en función del voltaje.
- Figura 18. Platos teóricos en función de la concentración del buffer.

- Figura 19. Separación de la mezcla de estándares usando Boratos - Fosfatos CTAB 0.5 mM pH 10.5.
- Figura 20. Separación de la mezcla de estándares usando Boratos 10 mM TTAB 0.5 mM pH 10.0.
- Figura 21. Platos teóricos en función de la concentración de CTAB.
- Figura 22. Separación de la mezcla de estándares usando K_2CO_3 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5.
- Figura 23. Espectro de absorción Selenometionina 200 ppm. Blanco: agua.
- Figura 24. Espectro de absorción Selenocisteína 200 ppm. Blanco: agua.
- Figura 25. Espectro de absorción Selenito 200 ppm. Blanco: agua.
- Figura 26. Espectro de absorción Selenato 200 ppm. Blanco: agua.
- Figura 27. Espectro de absorción Selenometionina 200 ppm. Blanco: Selenato 200 ppm.
- Figura 28. Separación de la muestra de Selplex. Boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.0. Introducción hidrodinámica 0.5 psi, 25 segundos.
- Figura 29. Separación de la muestra de Selplex. Boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.0. Introducción hidrodinámica 0.5 psi, 25 segundos.
- Figura 30. Curva de calibración de Selenometionina.
- Figura 31. Curva de calibración de Selenocisteína
- Figura 32. Curva de calibración de Selenito
- Figura 33. Curva de calibración de Selenometionina
- Figura 34. Curva de calibración de Selenato
- Figura 35. Separación de la muestra de Selplex preparado en CTAB 1.0 mM usando Boratos 5 mM Fosfatos 5 mM CTAB 1.0 mM pH 10.5

I. INTRODUCCIÓN

El Selenio es un metaloide de importancia ambiental, industrial, biológica y toxicológica; bioquímicamente, es uno de los micronutrientes esenciales para los animales y para los humanos, ya que está relacionado con actividad anti-carcinogénica y preventiva de los efectos tóxicos de los metales pesados. Es un elemento indispensable para el funcionamiento normal de músculos, corazón, hígado, riñones, páncreas y quizás otros órganos ⁽¹⁾.

La deficiencia dietaria de selenio en animales se ha asociado a un amplio rango de problemas prácticos y de costos debido a que afecta la fertilidad, la resistencia a las enfermedades y el metabolismo relacionado a la hormona tiroidea. Los problemas más importantes producido por la deficiencia de Selenio en el ganado son las enfermedades degenerativas, que provocan pérdidas en la producción ⁽²⁾.

Se ha investigado la relación entre el selenio y el cáncer en humanos, algunos estudios mencionan una reducción significativa del riesgo de cáncer en personas con un consumo de 200 µg de Selenio en forma de levadura enriquecida ⁽⁴⁾.

Dada la importancia que tiene el consumo moderado de Selenio (Se) tanto para los hombres como para los animales, existen en el mercado productos que tiene como propósito suministrar este tipo de elemento esencial, sin que afecten la salud del organismo que los consume. La levadura enriquecida con Selenio es un ejemplo de estos productos, pero

requiere la caracterización de todos sus componentes y la determinación de la cantidad de los selenoaminoácidos presentes, mediante un método confiable que garantice que su proceso de producción es eficiente ⁽²⁾.

La Electroforesis Capilar se ha aplicado en la especiación y cuantificación de compuestos orgánicos e inorgánicos de varios elementos como Arsénico, Estaño, Cromo, entre otros, además del Selenio, tanto en agua, tierra y suplementos alimenticios ⁽²⁾.

Las ventajas de esta técnica con respecto a otras, como HPLC, residen en el corto tiempo de análisis, la pequeña cantidad de muestra que se consume, la alta eficiencia de separación y los bajos costos de operación ⁽¹⁾, además de la disponibilidad de equipos automatizados comerciales.

Se han reportado diferentes métodos para la separación de compuestos de Selenio mediante Electroforesis Capilar por diferentes autores como Gilon ⁽⁵⁾, Zheng ⁽⁶⁾, Casiot ⁽⁷⁾ y Hagege ⁽⁸⁾, pero con límites de detección muy altos o tiempos de análisis largos.

En este trabajo se pudo desarrollar un método que permite el análisis de cuatro compuestos de Selenio: Selenato (Se VI) y Selenito (Se IV), Selenocisteína y Selenometionina, obteniendo un tiempo de análisis corto y límites de detección más bajos que los reportados anteriormente.

II. OBJETIVOS

- **Desarrollar un método para caracterizar y cuantificar compuestos orgánicos e inorgánicos de Selenio (Selenito, Selenato, Selenometionina y Selenocisteína) mediante electroforesis capilar.**
- **Encontrar un pretratamiento adecuado para una muestra comercial (levadura enriquecida con selenio) para asegurar la extracción total de los cuatro compuestos de selenio.**
- **Caracterizar una levadura enriquecida con selenio, utilizando el método de Electroforesis Capilar, con el fin de controlar la calidad de la levadura que será utilizada en la elaboración de bolos de usos veterinario.**

III. ANTECEDENTES

1. Características del Selenio

El Selenio (Se) fue descubierto por Berzelius y Ganh en 1817. El Selenio está reconocido como un metaloide importante para la industria, el ambiente, la toxicología y la biología⁽⁸⁾. El elemento existe en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos en diferentes estados de oxidación, entre las formas inorgánicas esta el Selenio elemental (Se), el Selenato (SeO_4^{2-}) y el Selenito (SeO_3^{2-}); las especies orgánicas son aminoácidos (Selenometionina y Selenocisteína) y sus derivados⁽⁵⁾.

1.1 Actividad Biológica

El Se tiene actividad biológica a través de la enzima Glutación peroxidasa (GSH-Px) la cual en cooperación con la vitamina E y algunos otros agentes antioxidantes son capaces de reducir los efectos destructivos sobre las células vivas de reacciones peroxidativas⁽³⁾.

Los efectos antioxidantes del Selenio y la vitamina E son diferentes, pero complementarios. La vitamina E previene la formación de peróxidos grasos por secuestro de radicales libres antes de que ellos inicien la peroxidación de las grasas. El Selenio como parte esencial de la GSH-Px, reduce peróxidos ya formados a alcoholes menos reactivos. Hay, sin embargo, diferentes formas de esta enzima, las cuales funcionan en diferentes sitios (Citosólica, Plasmática, Hidroperóxido fosfolípido, intestinal y pulmonar), cada una quizá con especificidad al sistema antioxidante

necesitado por este tejido. El hidroperóxido fosfolípido GSH-Px parece estar envuelto con la actividad antioxidante a nivel de la membrana celular; mientras la GSH-Px citoplasmática se asocia con actividad antioxidante dentro del citoplasma celular. La distribución de los tipos de GSH-Px difiere por tejido y por especie, consecuentemente los síntomas clínicos de deficiencia de las especies animales podrían reflejar diferentes distribuciones de los sistemas antioxidantes GSH-Px en estas especies ⁽⁹⁾.

A continuación se muestra en la tabla 1 (pág. 9) información de las selenoproteínas conocidas hasta el momento:

Tabla 1. Función de algunas selenoproteínas ⁽⁹⁾

SELENOPROTEÍNA	FUNCIÓN
Glutación peroxidasa (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)	Enzimas antioxidantes, remueven el peróxido de hidrógeno e hiperóxidos de lípidos y fosfolípidos. Mantiene la integridad de la membrana celular.
Selenoproteína de la cápsulas mitocondrial (espermatozoide)	Forma de la glutación peroxidasa (GPx4), protege a los espermatozoides en desarrollo del daño oxidativo y de las polimerasas tardías, forma parte de una proteína estructural requerida para la estabilidad de los espermatozoides maduros.
Iodotironina deiodinasa	Producción y regulación del nivel de hormona tiroidea activa T3, a partir de T4.
Tioredoxina reductasa	Reducción de nucleótidos en la síntesis de DNA, regeneración de sistemas oxidativos, mantenimiento del potencial redox intracelular, crítico en la viabilidad y proliferación celular, regulación de la expresión génica por control redox en la unión de los factores de transcripción.
Selenofosfato sintetasa, SPS2	Requerida en la síntesis de selenofosfato que es precursor de la selenocisteína que se incorpora a las selenoproteínas.
Selenoproteína P	Se encuentra en plasma y asociada a células endoteliales, Parece que protege a las células endoteliales del daño por peroxinitrito.
Selenoproteína W	Requerida en el funcionamiento muscular.
Selenoproteína prostática epitelial	Parece tener función redox, tal vez protegiendo a las células secretorias contra el desarrollo de carcinoma.
Selenoproteína espermática unida a DNA	Se encuentra en estómago y en el núcleo de los espermatozoides, puede tener función protectora.
Selenoproteína de 18 KDa	Se encuentra en el hígado y en otros tejidos, se preserva en deficiencia de selenio.

1.2 Fuentes de Selenio

En la naturaleza, el Selenio se encuentra en forma de seleniuros de cobre, hierro, plomo, mercurio y plata, mezclados con los correspondientes sulfuros. Es recuperado comercialmente durante la fundición de esos minerales en bruto y de los residuos de la refinación electrolítica del cobre⁽⁹⁾.

Dentro de las fuentes de Selenio utilizadas para la alimentación de animales se encuentran:

- Fuentes naturales:

Tabla 2. Fuentes naturales de Selenio ⁽⁹⁾.

Alimento	Contenido de Se (mg/kg)
Alfalfa	0.32 - 0.37
Avena	0.17-0.26
Gluten	1.11
Soya	0.11
Maíz	0.08
Pescado	1.4-2.4
Sorgo	0.21

- **Selenito de sodio (Na_2SeO_3).** El Selenito de Sodio es uno de los componentes principales con un gran aporte de Selenio, y su uso esta relacionado como mineral esencial en cantidades reducidas para todas las especies animales, principalmente en: aves, cerdos, rumiantes y cerdos en una dosis de 450 a 1300mg./ton. de alimento⁽¹⁰⁾.
- **Levadura suplementada con Selenio (*Saccharomyces cerevisiae* con Se).** Las formas orgánicas de Se halladas en la selenio - levadura son, la Selenometionina (42 ± 4 %) y la Selenocisteína (35 ± 9 %), estos compuestos son más disponibles biológicamente y tiene niveles más altos de bioactividad que los componentes inorgánicos de Selenio⁽¹⁰⁾.

1.3 Metabolismo de las formas orgánicas e inorgánicas del selenio.

La absorción del selenio se realiza en el intestino delgado. El selenio inorgánico es absorbido de forma pasiva, mientras que las selenoproteínas se absorben por mecanismos de transporte específicos de aminoácidos. Una vez absorbido, el Selenio inorgánico es reducida a la forma de Selénido (Se^{-2}), útil para el organismo, la cual se une a proteínas plasmáticas y es transportado al hígado para formar parte de las proteínas que ahí se sintetizan¹⁰. La Selenometionina viaja en la sangre y puede ser transportada al hígado para incorporarse directamente a las proteínas o ir a otros tejidos e incorporarse a proteínas tisulares⁽¹⁰⁾.

2. Características de la levadura

Es un microorganismo unicelular Gram positivo, se ubica dentro de la clasificación de los hongos y cuyo nombre científico es *Saccharomyces cerevisiae*; para visualizarla debe aumentarse su tamaño unas 600 veces a través del microscopio óptico ⁽¹¹⁾.

2.1 Composición y Algunas Propiedades Biofuncionales

- **Proteínas:** El contenido de proteínas en la levadura es el elemento nutricional más importante y se les han llamado proteínas unicelulares. Al ingerirse las proteínas de la levadura se liberan a nivel intestinal las envolturas celulares por acción de las enzimas digestivas, siendo hidrolizadas a aminoácidos, que luego son reconstituídos para formar enzimas y otros compuestos nitrogenados necesarios para la vida ⁽¹¹⁾.

Se observa que las levaduras contienen todos los aminoácidos considerados esenciales por la OMS y la FAO (Informe 522 de 1973).

- **Vitaminas :** Las levaduras contienen importante cantidad de vitaminas hidrosolubles del complejo B, fuente indispensable para el hombre pues muchas veces deben ser incorporadas para lograr el normal desarrollo de las funciones celulares durante el crecimiento y la reproducción. Pero no aportan suficiente cantidad de vitaminas C, A, E, D y K ⁽¹¹⁾.

- **Minerales y Oligoelementos:** Predominan en la levadura de cerveza los Fosfatos y el Potasio, que cubren una importante parte de los requerimientos en el hombre, 34% y 21% respectivamente con la ingesta de 20g. de levadura. El contenido en elementos bioquímicamente importantes como azufre, magnesio y calcio es relativamente alto. Por su bajo contenido en sodio, el extracto de levadura de cerveza, puede ser utilizado en hipertensos ⁽¹¹⁾.
- **Lípidos:** El contenido en lípidos de las levaduras puede variar entre 4% y 7 % en base seca según las condiciones de propagación impuestas y las especies o cepas utilizadas. La especie *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la producción de levadura alimenticia contiene una cantidad considerable de ácidos grasos insaturados que ayudan a controlar el colesterol (por disminuir el LDL-colesterol conocido como colesterol malo). El contenido en ácidos oleico y linoleico es importante desde el punto de vista nutricional porque son muy importantes para el buen estado de las arterias. La levadura contiene además esteroides de distintos tipos moleculares y compuestos como la lecitina⁽¹¹⁾.
- **Carbohidratos:** La cantidad total de carbohidratos está en el orden del 30% a 35 % de sustancia seca. Son principalmente carbohidratos de reserva tales como glucógeno y trealosa; el material estructural de la pared celular son polímeros de glucosa y manosa (glucanos y mananos) muy poco asimilables por el hombre.
- **Fibras:** La levadura de cerveza es rica en fibra siendo su valor de alrededor del 18% de la materia seca. Hoy sabemos de la importancia del aporte de fibras en la dieta del ser humano ⁽¹¹⁾.

Bajo condiciones apropiadas, las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) son capaces de acumular grandes cantidades de trazas de elementos, como el Selenio e incorporarlos a compuestos orgánicos. Se ha encontrado que la introducción de sales de Selenio hidrosolubles al medio de cultivo para levaduras resulta en la absorción del elementos por el microorganismo ⁽¹²⁾.

3. Generalidades de Electroforesis Capilar

La Electroforesis Capilar (EC) es una técnica analítica de separación que se utiliza también para identificación y cuantificación. Ha sido recientemente introducida a México y actualmente crece el número de aplicaciones debido al interés de investigadores y la Industria de todo el mundo, además de su inclusión en la USP 26 como método general de análisis.

La versatilidad de esta técnica reside en los elementos del equipo que se pueden controlar como: la polaridad de los electrodos, el diámetro interno y la longitud del capilar, el tipo de introducción de la muestra, el uso de diferentes detectores, la variedad de electrólitos soporte, así como el uso de aditivos que permiten un amplio rango de aplicaciones que van desde pequeños iones hasta macromoléculas.

En la actualidad existen equipos comerciales de Electroforesis Capilar, todos ellos cuentan con los mismos componentes básicos ⁽¹⁴⁾ (Figura 1, página 16):

- Capilar (comúnmente de sílice fundida con recubrimiento de poliimida)
- Electroodos (Cátodo y ánodo)
- Fuente de poder
- Depósito de buffer o electrólito soporte
- Sistema de introducción de muestra
- Sistema de enfriamiento

- Detector
- Computadora

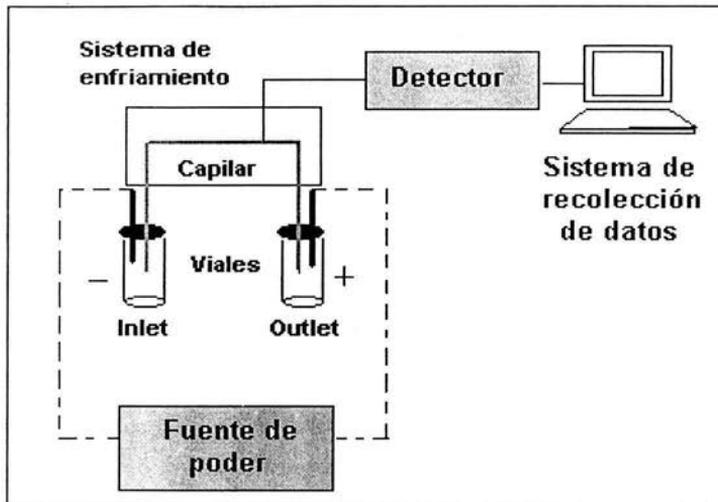


Figura 1. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar

3.1. Fundamentos de la separación

Al igual que la Electroforesis Clásica en Gel, la Electroforesis Capilar se basa en la diferencia de velocidades de migración de especies cargadas en solución cuando se aplica un campo eléctrico ⁽¹³⁾. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez son resultado de la relación masa/carga y de la conformación estructural de los analitos. La diferencia reside en el nombre, la Electroforesis Capilar (EC) se realiza en un capilar de sílice fundida de unas cuantas micras de diámetro ⁽¹⁴⁾.

A diferencia de la Electroforesis Clásica, el uso de procesadores de datos en línea con el equipo permiten la obtención de datos mediante diferentes detectores que se traducen en el electroferograma (Figura 2). El electroferograma es una gráfica de tiempo contra la señal obtenida (ejemplo, absorbancia) en la que los analitos se observan como picos gaussianos.

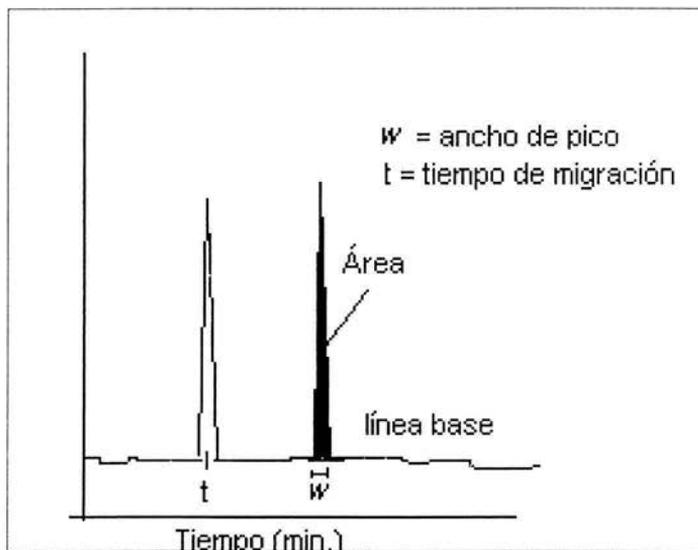


Figura 2. Ejemplo de electroferograma

3.2 Conceptos importantes en Electroforesis Capilar

Movilidad electroforética: El movimiento de las especies cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico es característico de su movilidad electroforética (μ), la cual depende del tamaño y de la densidad de la carga del soluto, la temperatura, la constante dieléctrica y la viscosidad del electrolito soporte ⁽¹³⁾.

La movilidad electroforética se puede representar de la siguiente manera:

$$\mu = \frac{q}{6 \pi r \eta} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde q es la carga, r es radio de la molécula y η es la viscosidad del buffer.

La movilidad electroforética de un analito puede determinarse experimentalmente a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (cm}^2/\text{V min.)} = \frac{L_e \times L_t}{V \times t} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde L_t es la longitud total del capilar, L_e es la longitud efectiva o la longitud al detector, V es el voltaje aplicado y t es el tiempo de migración del analito obtenido del electroferograma.

Flujo electroosmótico: Es el flujo que se origina en presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada, en el caso de capilares de sílice fundida dicha superficie contiene grupos silanol ⁽¹³⁾.

Los cationes en solución en el electrolito soporte son atraídos hacia los grupos silanol (a pH mayor de 7) y se forma una doble capa iónica como se muestra en la Figura 3, una capa está unida fuertemente debido fuerzas electrostáticas (capa compacta: grupos silanol - cationes) y, la otra capa esta unida más débilmente (capa difusa: resto de la solución). Cuando se aplica una diferencia de potencial, la capa difusa se rompe y se mueve hacia el cátodo, arrastrando consigo la solución del electrolito ⁽¹³⁾.

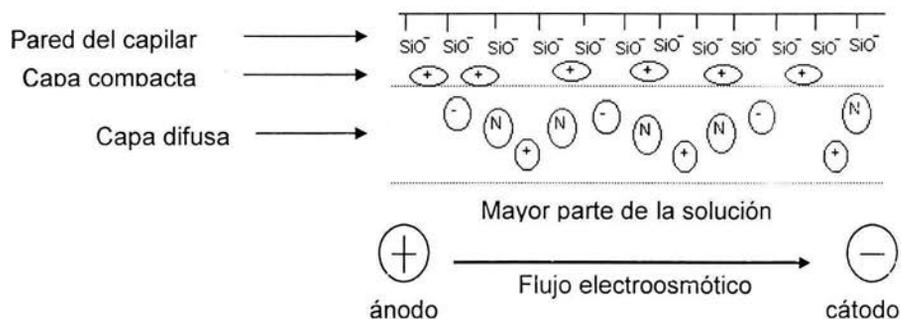


Figura 3. Doble capa eléctrica

De tal manera que los cationes pasan primero por el detector (que se encuentra casi al final de capilar), seguido de los compuestos neutros que migran junto con el flujo electroosmótico, y finalmente los aniones, que en algunas ocasiones no son detectados.

Platos teóricos: Son una medida de la eficiencia de la separación, que se pueden determinar del electroferograma a partir de la siguiente ecuación:

$$N = 5.54 (t/w_{1/2})^2 \quad (\text{Ec. 3})$$

donde N es el número de platos teóricos, t es el tiempo de migración y $w_{1/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura, esta ecuación sólo es válida para picos Gaussianos ⁽¹³⁾. Mientras mayor sea el número de platos teóricos el proceso de separación se considera más eficiente.

Resolución: Es la medida cuantitativa de la capacidad para separar dos analitos. Una resolución de 1.5 indica una separación esencialmente completa ⁽¹⁴⁾.

En EC la Resolución es función de tres parámetros: selectividad, eficiencia del capilar y tiempo de migración. Cada parámetro es influenciado por diversos factores como voltaje aplicado, pH del buffer, fuerza iónica y el comportamiento de la pared interna del capilar ⁽¹³⁾. La Resolución (R_s) puede calcularse la siguiente forma:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4 \sigma} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde t es el tiempo de migración, w es el ancho del pico, y σ es la desviación estándar temporal.

3.3. Modos de separación

La versatilidad de la técnica ha permitido la existencia de diferentes modalidades de trabajo como: la Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM), Enfoque Isoeléctrico Capilar (EIC), Isotacoforesis Capilar (inglés ITPC), Electroforesis Capilar en Gel (ECG) y Electro cromatografía Capilar (ECC) ⁽¹⁵⁾.

La Electroforesis Capilar de Zona es la forma más simple de EC porque el capilar es llenado sólo con un electrólito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La separación de mezclas de analitos iónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Esta modalidad se utiliza para separar compuestos de bajo peso molecular, que tengan carga y que no sufran adsorción en la superficie del capilar ⁽¹⁶⁾.

En este trabajo se utilizó el modo de Electroforesis Capilar de Zona con el uso de un surfactante, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), para revertir el sentido del flujo electroosmótico y poder realizar la separación.

Normalmente el flujo electroosmótico se mueve de ánodo a cátodo. Para revertirlo (y se dirija de cátodo a ánodo) es necesario que la carga de la pared sea positiva, esto se logra adicionando un surfactante catiónico.

A cierta concentración el surfactante catiónico modifica la pared del capilar debido a que se adsorbe como una doble capa con una carga global positiva, de esta manera el flujo electroosmótico viaja en la misma dirección que los aniones (Figura 4) ⁽⁵⁾.

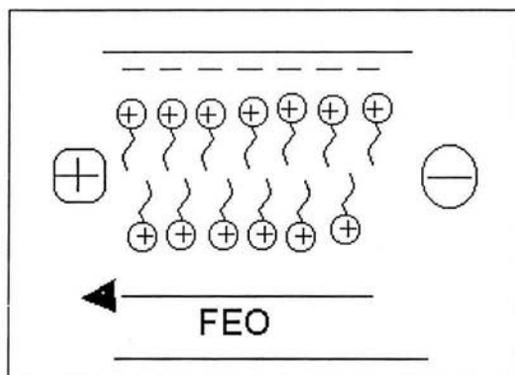


Figura 4. Efecto del CTAB sobre el FEO.

Cabe mencionar que la concentración empleada de surfactante es siempre menor a la Concentración Micelar Crítica^a, a fin de evitar la formación de micelas.

^a La Concentración Micelar Crítica es el valor que se tiene que alcanzar para que un tensoactivo (compuesto de cadena hidrocarbonada largo y un grupo iónico) comience a formar micelas en solución acuosa.

4.0 Características de la muestra

La muestra que se propone como problema a resolver en este trabajo es un suplemento alimenticio veterinario en polvo, obtenido del crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en un medio rico en Selenio. De acuerdo a la información de la compañía Alltech, que lo fabrica, el 99% del contenido total de Selenio es de forma orgánica, principalmente selenoaminoácidos ⁽²⁾.

Con base a la cuantificación por cromatografía de gases, el contenido de Selenometionina en Selplex es de 1013 ppm, equivalente a 407.83 ppm de Selenio en su presentación de 1000 ppm ⁽²⁾. En este trabajo se realizó el análisis de la presentación de 2000 ppm, de la cual no hay información, para conocer si realmente cumple con el contenido de selenio orgánico. Este trabajo forma parte de un proyecto en el que el suplemento se utiliza para en la fabricación de bolos de uso veterinario que son usados en rumiantes.

5.0 Aplicaciones de Electroforesis Capilar al análisis de Selenio

Como se mencionó en la introducción (pág. 5), varios autores han reportado sus trabajos sobre el Selenio en Electroforesis Capilar.

Zheng y colaboradores⁽⁶⁾ trabajaron con ECZ y CCEM para la especiación de 6 compuestos orgánicos e inorgánicos de Selenio para aplicarlo en el control de calidad de un suplemento alimenticio.

Mediante Electroforesis Capilar de Zona Gilon y su grupo⁽⁵⁾ pudieron cuantificar Selenio en agua natural, mientras que Casiot⁽⁷⁾ reportó la especiación de compuestos de Arsénico, Selenio, Telurio y Estaño para el análisis de muestras ambientales.

El trabajo de Hagege⁽⁸⁾ en ECZ consistió en la optimización de las condiciones de análisis para mejorar los límites de detección, logrando medir 200 ppm de Seienito, Selenato y Selenometionina, mientras que para la Selenocisteína sólo 500 ppm como mínimo.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Al realizar un pretratamiento adecuado a la levadura enriquecida con Selenio (Selplex de Alltech) se podrá realizar la separación y cuantificación de todos los selenocomponentes presentes en la muestra por un método desarrollado por Electroforesis Capilar, asegurando que cumple con lo especificado por el contenido de Selenio y ser de utilidad en la fabricación de bolos de uso veterinario.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

2 vasos de precipitado de 25mL.

2 vasos de precipitado de 50mL

5 vasos de precipitado de 10mL

1 Embudo de vidrio

1 Espátula.

Filtros de 0.45 μ m

Papel filtro

1 micropipeta 100-1000 μ l.

1 micropipeta 20-200 μ l.

1 micropipeta 5-50 μ l.

Puntas para micropipeta

Piseta

EQUIPO

Balanza analítica Sartorius

Agitador magnético Cimarec®2

Equipo de Electroforesis Capilar (Beckman-Coulter PACE-MDQ)

REACTIVOS

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker)

TTAB (bromuro de trimetiltetradecilamonio) (Sigma-Aldrich)

CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Sigma-Aldrich)

HCl 0.1 M

NaOH 0.1 M

Agua Desionizada

Estándares:

Selenito de Sodio (Sigma-Aldrich) Pureza: 98% P.M. = 172.9

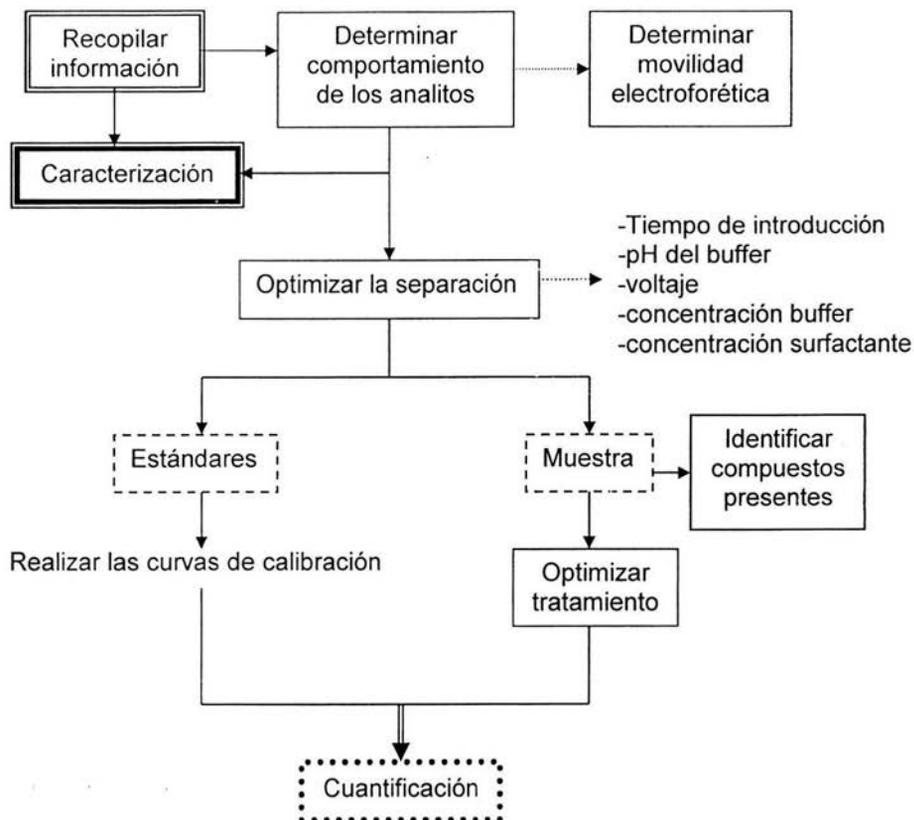
Selenato de Sodio Anhidro (Sigma-Aldrich) P.M. = 188.9

Seleno-DL-metionina Anhidro (Sigma-Aldrich) P.M. = 196.1

Seleno-DL-cisteína Anhidro (Sigma-Aldrich) P.M. = 334.1

Los estándares se prepararon disolviendo cada uno en agua desionizada, sólo a la Selenocisteína se le agregaba HCl 0.1 M para lograr la disolución total. Todas las soluciones se guardaban en frascos ámbar cerrados y se filtraban con acrodiscos de $0.45 \mu\text{m}$ antes de ser analizadas.

VI. METODOLOGÍA



Antes de empezar a trabajar, cada día, se lava el capilar introduciendo agua desionizada 3 min. a 20 psi, seguido de NaOH 0.1 M por 3 min. a 20 psi, enjuagando con agua desionizada 3 min. 20 psi y, finalmente, equilibrando el capilar con buffer de lavado (el mismo con el que se realiza la separación) por 8 min. a 20 psi.

Para determinar el comportamiento de los analitos se prueban buffer con diferentes valores de pH, se determina el tiempo de migración y con ello la movilidad electroforética de los analitos. Al determinar el tiempo de migración con los estándares ya se podrá determinar la presencia de los analitos en la muestra.

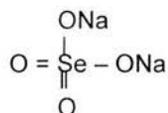
Al desarrollar un método se deben considerar las características de los analitos: estructura, peso molecular, pK_a , solubilidad. De esta manera se pueden determinar una condiciones iniciales de análisis, que se van modificando hasta conseguir los resultados deseados en la separación.

En la optimización del método se modifican diversos factores como: el tiempo y el tipo de introducción de la muestra, el pH y la composición del buffer, la concentración del surfactante, el voltaje aplicado y el cuidado que debe tenerse con las muestras.

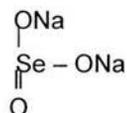
Con el uso de estándares se realizan curvas de calibración que permiten obtener datos importantes como reproducibilidad y linealidad, aparte de permitir la cuantificación de la muestra.

Para encontrar el mejor tratamiento de la muestra se busca la mejor manera de tener disueltos los analitos que se encuentran en la mezcla, para esto se prueban diferentes disolventes como: agua, buffer diluido, CTAB 1.0 mM, acetonitrilo y metanol.

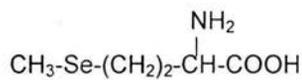
Las estructuras químicas de los estándares utilizados son:



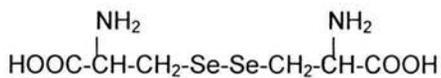
Selenato de Sodio



Selenito de Sodio



Selenometionina



Selenocisteína

Con base a la revisión hemerográfica⁽⁶⁾, el comportamiento de los cuatro compuestos de interés para este trabajo a diferentes valores de pH es el siguiente:

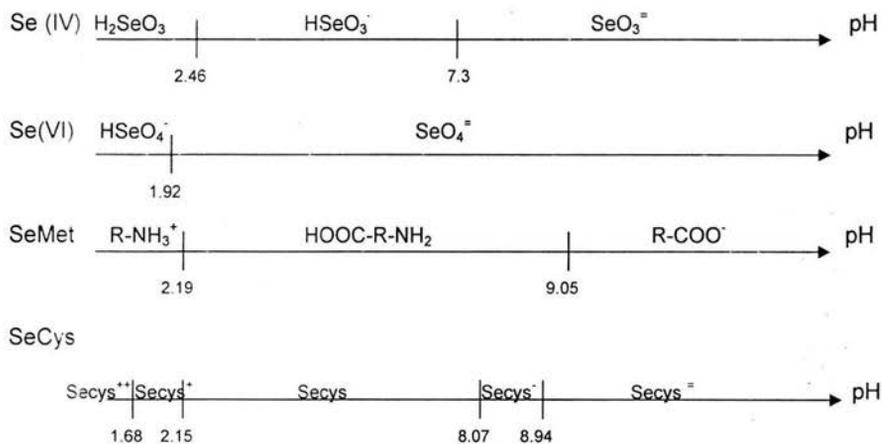


Figura 5. Escalas de zonas de predominio de los compuestos de Selenio

De acuerdo a las escalas de zonas de predominio y a los pK_a 's reportados, la separación puede realizarse a pH mayor de 8, ya que cada compuesto tiene una carga y un peso molecular diferente que ayudaría a la separación.

A pH mayor de 8 el Selenato, el Selenito y la Selenocisteína son aniones divalentes, y la diferencia de peso molecular permite que migren a diferente velocidad y lograr la separación; mientras que la Selenometionina es un anión monovalente que tiene una velocidad de migración más lenta que los otros tres analitos. No conviene hacer la separación a pH menor a 8 porque los dos selenoaminoácidos no tiene carga y no se podrían separar.

Teóricamente el orden de migración sería Selenato, Selenito, Selenocisteína y Selenometionina.

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Determinación del comportamiento experimental de los analitos

Se determinó experimentalmente el comportamiento de los cuatro compuestos a diferentes valores de pH con el propósito de verificar si los resultados teóricos corresponden con los experimentales. Se usaron las siguientes condiciones iniciales de análisis:

- Capilar de 75 μm de diámetro interno (d.i.), 62 cm de longitud total (L_t), 52 cm de longitud efectiva (L_e) o longitud al detector.
- Buffer Boratos 20 mM pH 8.2, 9.0 y 10.2
- Buffer Fosfatos 20 mM pH 3.08, 4.0 y 5.12
- Lavado del capilar con buffer por 2 min. a 20 psi
- Voltaje de separación 30 kV polaridad normal
- Temperatura del capilar: 25°C
- Marcador neutro: Óxido de Mesitilo

De este análisis se obtuvo una serie de electroferogramas, con un tiempo de análisis de 10 minutos, de los que se calculó la movilidad electroforética de los analitos, los resultados se pueden observar en la Figura 6 (pág: 33).

Bajo estas condiciones los compuestos inorgánicos: Selenito y Selenato no pudieron ser detectados debido a que su comportamiento es aniónico en todos los valores de pH analizados experimentalmente (pH 3.08, 4.0, 5.2, 8.2, 9.0 y 10.2); debido a que las condiciones establecidas de flujo

electroosmótico (FEO) y polaridad normales no hacen posible la detección de dichos compuestos inorgánicos debido a su carga y a su bajo peso molecular que les permite migrar más rápido que el FEO migrando hacia el ánodo y no pasar por el detector (Ver pág. 19).

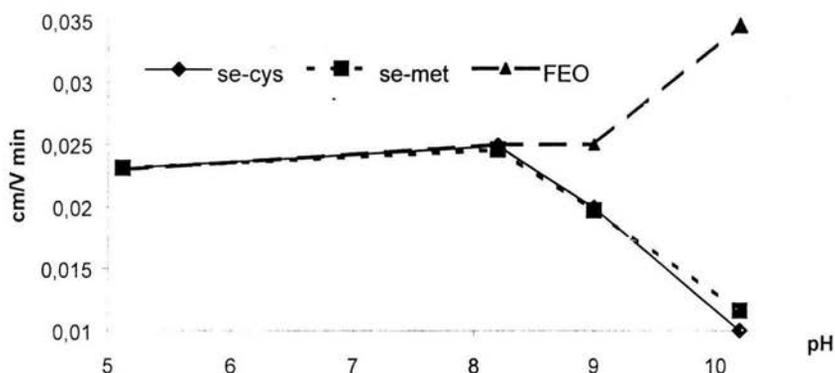


Figura 6. Movilidad efectiva en función del pH

A pH 5.2 los dos selenoaminoácidos no tienen carga, lo que corresponde a sus valores de pK_a 's, y al ser neutros tienen una movilidad cercana al FEO, como se muestra en la Figura 6.

Resulta de interés destacar que a pH menor de 5 no se logra detectar a los selenoaminoácidos bajo las condiciones utilizadas porque el FEO es muy lento y no permite que los compuestos neutros pasen por el detector.

Como se observa en la Figura 6, sólo a pH mayor de 9 los selenoaminoácidos se comportan como aniones y su movilidad difiere del FEO por lo que aparecen después de éste, obteniendo una buena separación a pH de 10.2.

También se observa que la movilidad de los selenoaminoácidos disminuye en función del pH, debido a que su carga neta efectiva negativa aumenta con el pH; debido a su comportamiento aniónico son atraídos más fuertemente al ánodo y su dirección de migración es en sentido contrario al FEO, sin embargo son arrastrados al detector por el flujo electrosmótico.

Estos resultados obligaron a cambiar las condiciones usando voltaje de polaridad invertida (-30 kV) y buffer de Boratos 20 mM pH 10.2 con adición de un surfactante catiónico, el Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB, por si siglas en inglés) con una concentración de 0.5 mM, con el fin de invertir el FEO y obtener la separación de los cuatro compuestos analizados: Selenito, Selenato, Selenocisteína y Selenometionina en su forma aniónica; como se observa en la Figura 7.

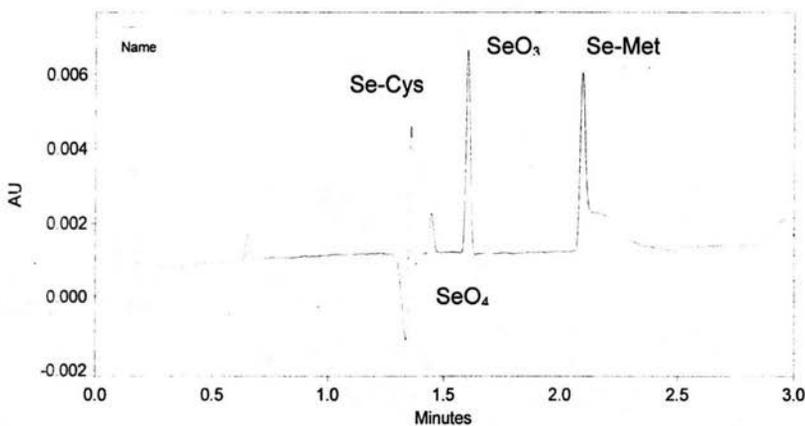


Figura 7. Separación de los compuestos en forma aniónica usando Boratos 20 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5.

Con el propósito de detectar los compuestos inorgánicos y lograr la separación de los orgánicos se invirtió el FEO y la carga de los electrodos para que el FEO, el ánodo y el detector estuvieran en la misma dirección (Figura 8), y así obtener la señal de los aniones cuando pasen por el detector.

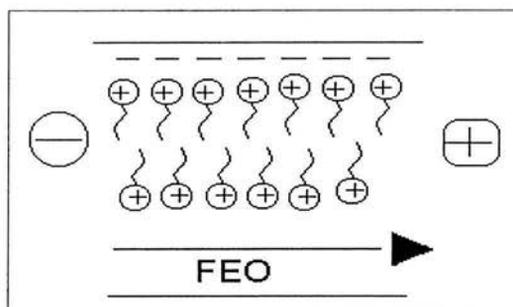


Figura 8. Condiciones dentro del capilar al invertir el Flujo electroosmótico y la carga de los electrodos

Si no se revirtiera el flujo electroosmótico y sólo se cambiara la carga de los electrodos, los aniones migrarían en sentido contrario a éste y el tiempo de análisis sería muy largo.

Se realizaron tres análisis continuos con una mezcla de Selenito, Selenometionina y Selenocisteína con concentración de 20 ppm cada uno, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. Datos obtenidos de la repetición del análisis con las condiciones iniciales.

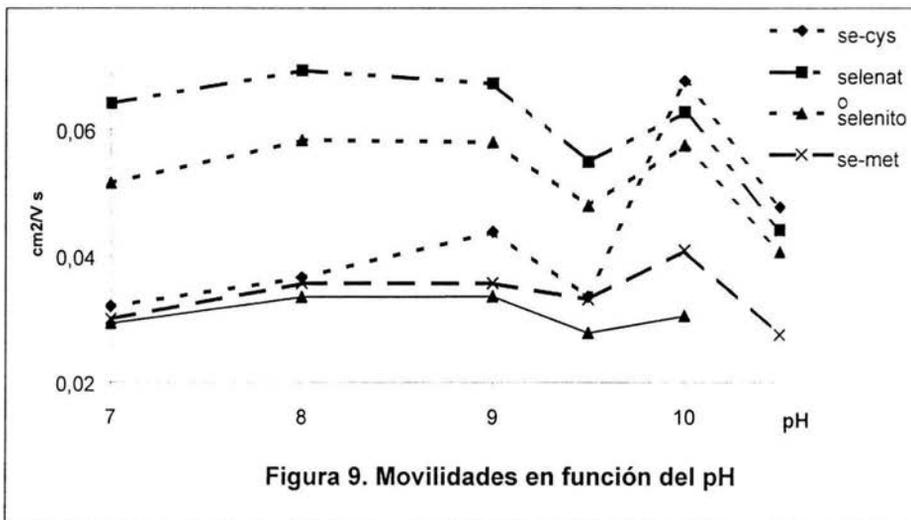
	Selenometionina		Selenocisteína		Selenito	
	TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA
	2.096	8751	1.358	2994	1.604	6983
	2.133	9534	1.354	4328	1.625	7265
	2.163	9901	1.363	4142	1.642	7074
Promedio	2.131	9395.3	1.358	3821.3	1.625	7107.3
D.E.	0.033	587.4	0.004	721.8	0.019	143.9
C.V. (%)	1.575	6.25	0.332	18.9	1.01	2.02

Como se observa en la tabla 3, los tiempos de migración son reproducibles (C.V. menor a 1.5), mientras que los valores de las áreas de los selenoaminoácidos no se consideran así.

Con el fin de obtener mejores resultados se cambió de capilar y se fijaron las siguientes condiciones:

- Capilar de 50 μm de diámetro interno (d.i.), 60.5 cm de longitud total (L_t), 52 cm de longitud efectiva (L_e).
- Buffer Boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.0
- Lavado del capilar con buffer por 2 min. a 20 psi
- Introducción hidrodinámica de la muestra a 0.5 psi, 20 s
- Voltaje de separación 30 kV polaridad invertida o negativa
- Temperatura del capilar: 25°C
- Detección a 210 nm
- Mezcla de los estándares con concentración final de 40 ppm para cada analito

Se realizó una prueba usando buffer de Boratos a diferentes valores de pH entre 9 y 11. Los resultados de movilidad electroforética se muestran en la figura 9, donde se observa que la movilidad de la Selenocisteína tiene un cambio drástico a pH mayor de 9.5 con las condiciones utilizadas, este comportamiento se observa también en el capilar de 75 μm de diámetro interno.



No se observa una gran diferencia entre el comportamiento de los analitos a pH 10 y a 10.5, y debido al orden en el que se desarrolló el trabajo experimental, para el capilar de 75 μm de diámetro interno se utilizó pH 10 y en el de 50 μm de diámetro interno pH 10.5.

B. Determinación de las condiciones óptimas de separación.

Al establecer que la separación de los compuestos debía realizarse en su forma aniónica con el flujo electroosmótico y la polaridad invertida, se debían de determinar cada uno de los factores que intervienen en la separación para obtener los resultados más favorables.

Los parámetros que consideraron para seleccionar las condiciones óptimas de análisis fueron los platos teóricos debido a que son una medida de la eficiencia del sistema de separación. Se tomaron en cuenta principalmente los resultados de Selenocisteína y Selenometionina, que son los compuestos de mayor interés en este trabajo (Sección 4.0 en Generalidades, pág 23).

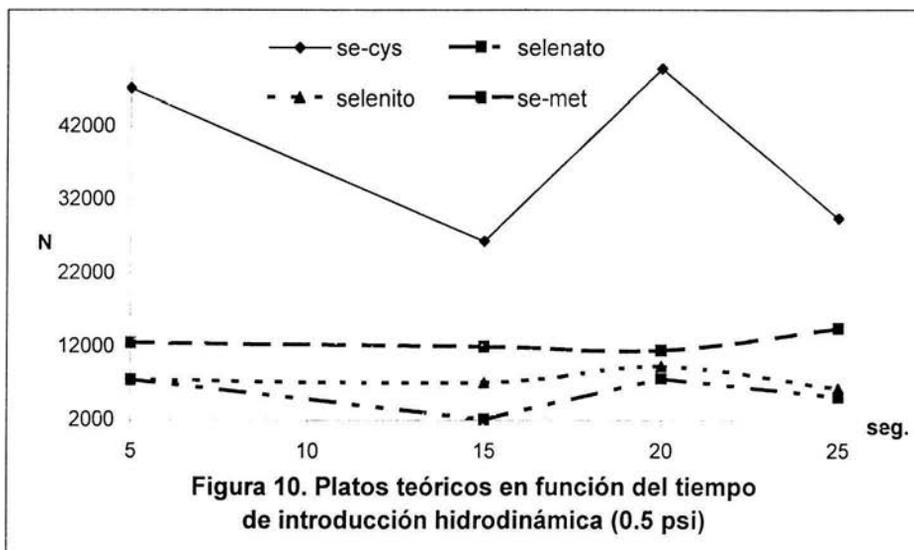
B.1. Optimización del tiempo de introducción de la muestra

Se realizaron pruebas de introducción de la muestra para obtener el tiempo óptimo y poder detectar la menor cantidad posible, se siguieron las condiciones utilizadas anteriormente:

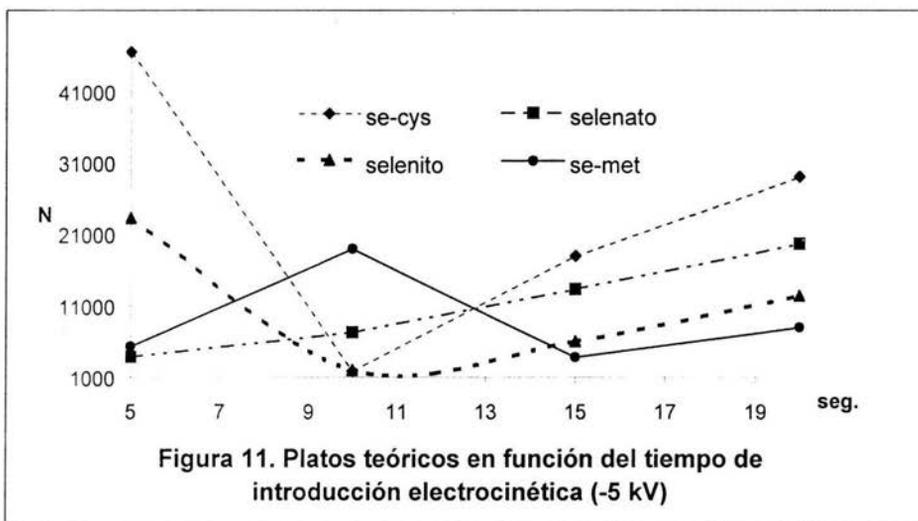
- Capilar de 75 μm de diámetro interno (d.i.), 62 cm de longitud total (L_t), 52 cm de longitud efectiva (L_e) o longitud al detector.
- Buffer Boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.0
- Lavado del capilar con buffer por 2 min. a 20 psi
- Voltaje de separación 30 kV polaridad invertida
- Temperatura del capilar: 25°C

El equipo Beckman-Coulter utilizado en este trabajo cuenta con dos tipo de introducción de la muestra: la hidrodinámica que se realiza mediante diferencia de presión y la electrocinética que se realiza mediante la electromigración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico

Se introdujo una mezcla de los analitos de concentración de 20 ppm. La introducción hidrodinámica por 25 segundos a 0.5 psi es la óptima para la Selenometionina, como se observa en la Figura 10, mientras que para los otros compuestos es de 20 segundos, finalmente se decidió usar la introducción por 25 segundos porque permite introducir una mayor cantidad de muestra. Un tiempo mayor a éste provocaba una caída de corriente.



Al comenzar las pruebas de introducción electrocinética ocurrió una caída de corriente, por lo que las muestras se prepararon con 10% de buffer para solucionar el problema. La mayor eficiencia que se obtuvo fue aplicando una diferencia de potencial de -5 kV por 20 segundos (Figura 11).



De ambos tipos de introducción se seleccionó la hidrodinámica porque ofrece platos teóricos mayores y permite introducir mayor cantidad de Selenometionina.

Cabe aclarar que al introducir la muestra de levadura a las condiciones seleccionadas para la introducción electrocinética (-5 KV, 20 s), se observa un pico muy grande (Figura 12, pág. 40). Este pico puede ser el Selenato que se introduce en mayor cantidad que la Selenocisteína, debido

a que su bajo peso molecular le permite viajar más rápido hacia el ánodo; finalmente se observa un solo pico que puede ser la unión de los dos compuestos (Selenato y Selenocisteína, no se observa Selenometionina).

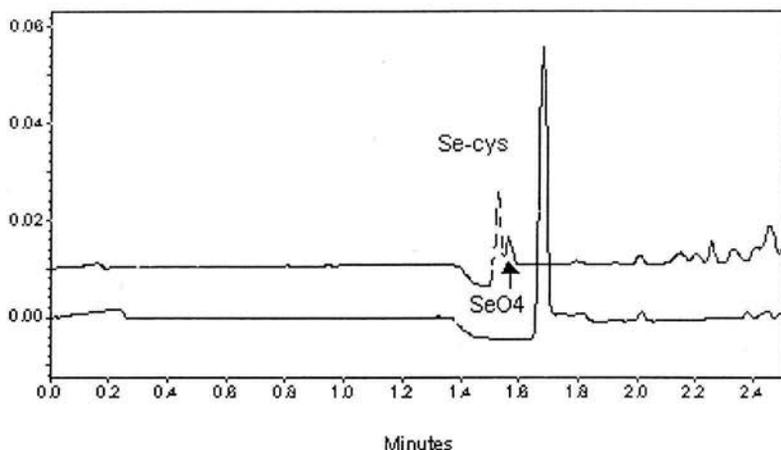


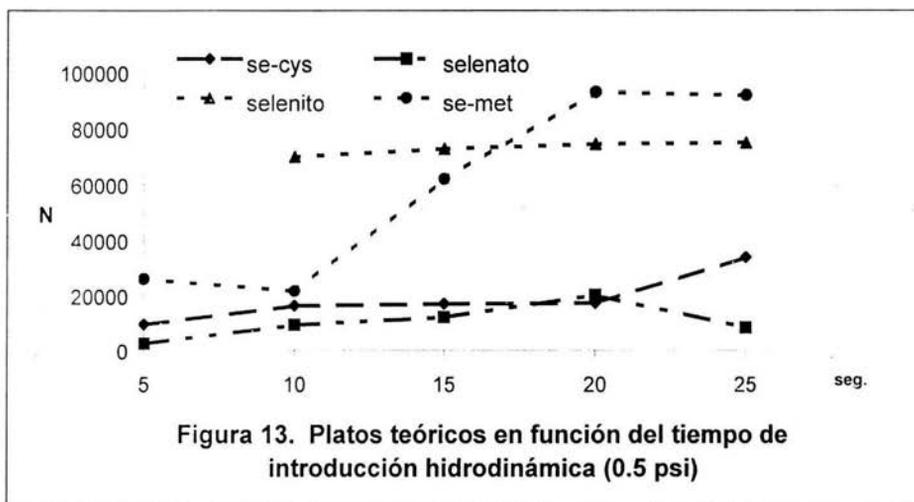
Figura 12. Comparación del a introducción hidrodinámica (línea punteada) con la introducción electrocinética (línea continua) de la muestra de Selplex

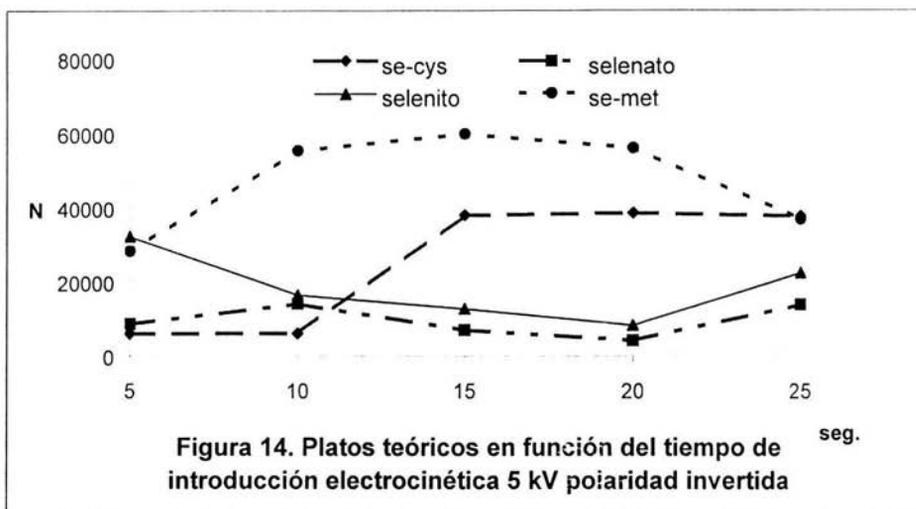
El método utilizado desde este momento, en el capilar de 75 μm de diámetro interno, con 48.5 cm de longitud efectiva y 59 cm de longitud total, incluía un lavado con buffer por 2 minutos a 20 psi, la introducción de la muestra hidrodinámicamente a 0.5 psi por 25 segundos, separación a 25°C aplicando -30 kV , recolectando los datos a 214 nm.

Se cambió a un de capilar 50 μm de diámetro interno, 60.5 cm de longitud total, 50 cm de longitud efectiva y se fijaron las siguientes condiciones:

- Buffer Boratos 10 mM, CTAB 0.5 mM
- Lavado del capilar con buffer por 3 min. a 20 psi
- Voltaje de separación 30 kV polaridad invertida
- Temperatura del capilar: 25°C
- Detección a 210 nm
- Mezcla de los estándares con concentración final de 30 ppm para cada analito y buffer diluido 1:10

Aí igual que con el capilar más ancho se obtiene que la introducción hidrodinámica es más efectiva usando una presión de 0.5 psi por un tiempo de 25 segundos, mientras que para la introducción electrocinética se debería usar -5 kV por 15 segundos (Figuras 13 y 14, pág 43).





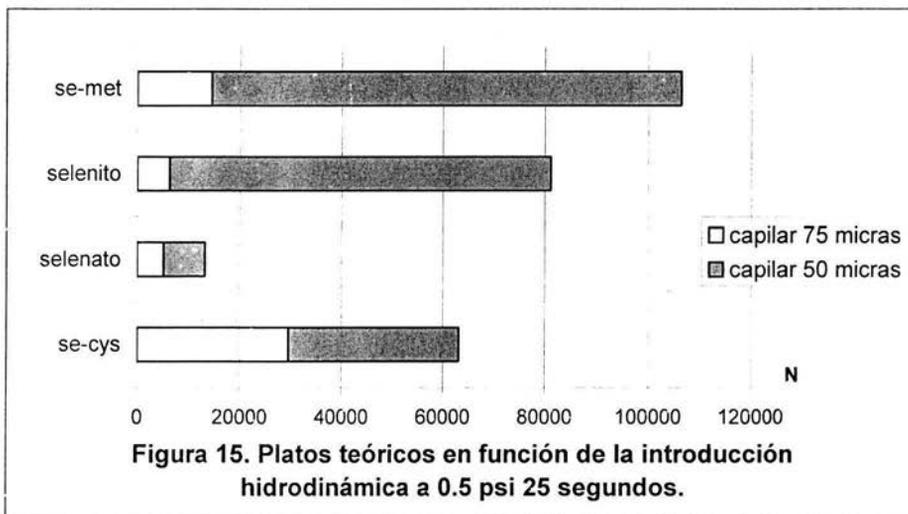
También se comparó la señal obtenida de los analitos que es el área bajo la curva para determinar cual modo permite introducir una mayor cantidad de muestra.

Tabla 4. Comparación de las áreas bajo la curva de los analitos con el tipo de introducción de la muestra.

Analito	Introducción electrocinética	Introducción hidrodinámica
Selenocisteína	11359	6152
Selenato	32351	17789
Selenito	29301	18287
Selenometionina	7590	11903

Con base a estos resultados se seleccionó la introducción hidrodinámica porque nos permite obtener la mayor cantidad de Selenometionina.

Para determinar con cual de los dos capilares utilizados se obtenían mejores resultados, se compararon los platos teóricos obtenidos hasta ahora con la optimización del tiempo de introducción (Figura 15) y se encontró que la separación era más eficiente en el capilar de 50 μm de diámetro interno, sobre todo para la Selenometionina.



Con estos resultados se decide seguir la optimización sólo con el capilar de 50 μm de diámetro interno y 50 cm de longitud efectiva.

B.2. Optimización del pH del buffer

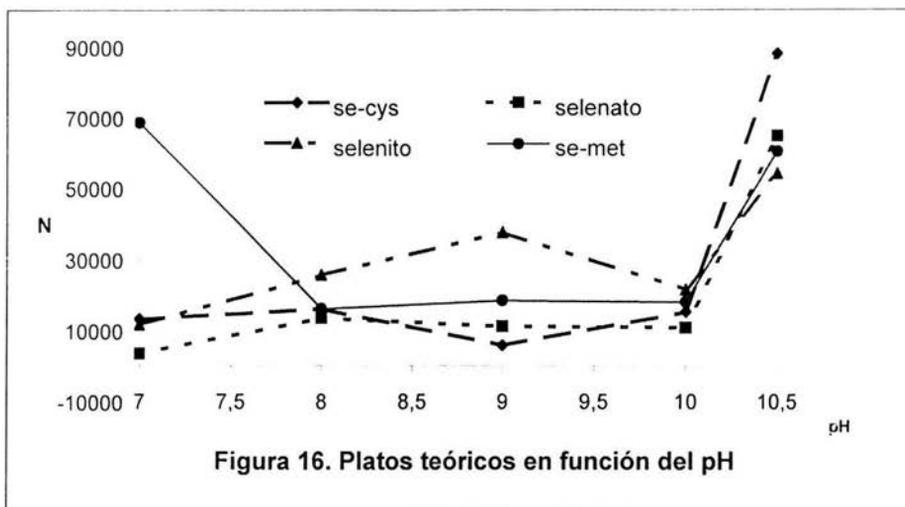
Para optimizar el pH del buffer se prepararon las siguientes soluciones:

- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10 mM CTAB 0.5 mM pH 7
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10 mM CTAB 0.5 mM pH 8
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10 mM CTAB 0.5 mM pH 9
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5 mM Na_2HPO_4 5 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5

Se realizó el análisis con las siguientes condiciones:

- Lavado del capilar con buffer por 2 min. a 20 psi
- Introducción hidrodinámica de la muestra a 0.5 psi, 25 s
- Voltaje de separación 30 kV polaridad invertida
- Temperatura del capilar: 25°C
- Detección a 210 nm
- Mezcla de los estándares con concentración final de 40 ppm para cada analito

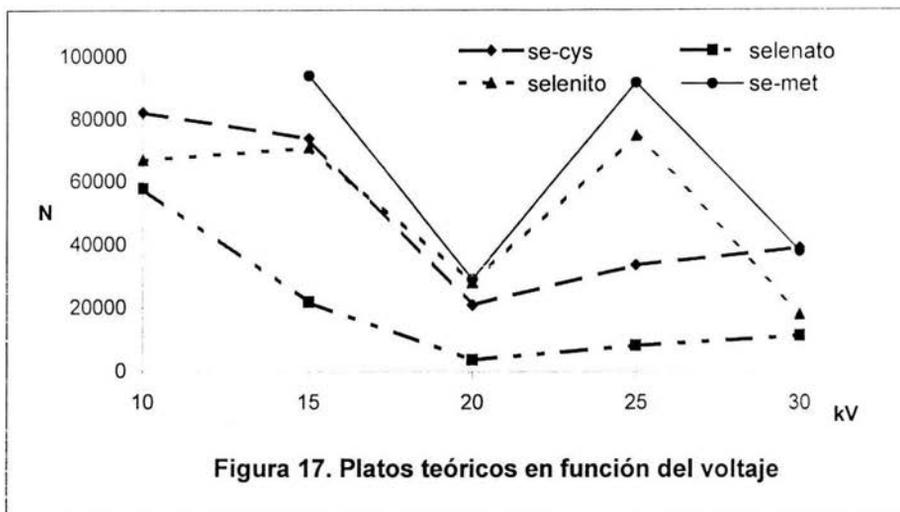
El pH seleccionado para la separación fue el de 10.5 debido a que es el óptimo para todos los compuestos, además de ofrecer los mejores resultados para la separación, como se aprecia en la Figura 16 (pág. 46).



B.3. Optimización del voltaje aplicado

Para determinar el voltaje óptimo de separación se eligieron las siguientes condiciones:

- Buffer $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5 mM Na_2HPO_4 5 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5
- Mezcla de los estándares con concentración final de 50 ppm para cada analito
- Introducción hidrodinámica de la muestra a 0.5 psi, 25 s
- Temperatura del capilar: 25°C
- Detección UV a 210 nm
- Lavado del capilar con buffer por 2 min. a 20 psi después de cada corrida.



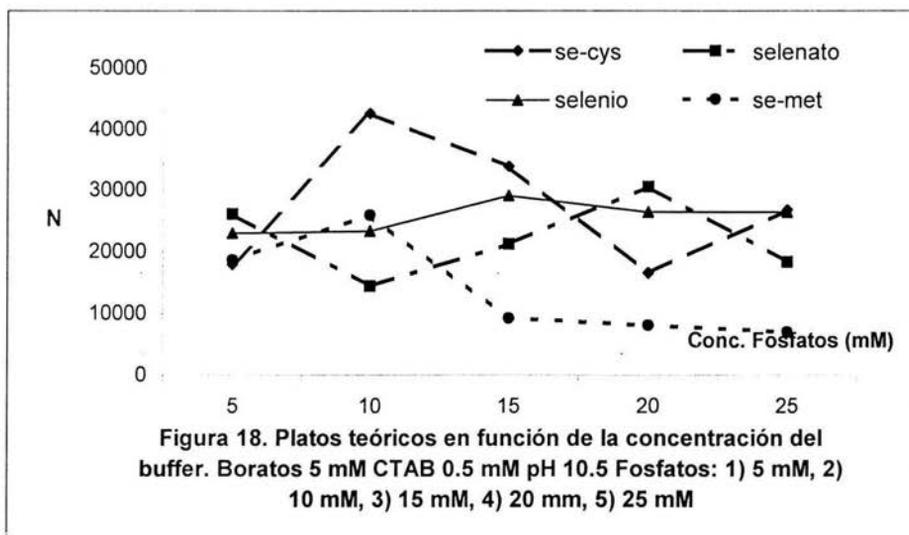
El voltaje seleccionado fue de -25 kV (recordar la polaridad invertida de los electrodos) por el efecto observado en la Selenometionina.

B. 4. Optimización de la concentración del buffer

La optimización de la concentración del buffer se realizó a las condiciones establecidas anteriormente:

- Lavado del capilar con cada buffer por 5 min. a 20 psi
- Introducción hidrodinámica de la muestra a 0.5 psi, 25 s
- Voltaje de separación 25 kV polaridad invertida
- Temperatura del capilar: 25°C
- Detección a 210 nm
- Mezcla de los estándares con concentración final de 40 ppm para cada analito
- Para cada buffer preparado se mantuvo constante la concentración de Boratos y CTAB, sólo se varió la de Fosfatos.

Los resultados indican que se obtiene un mayor número de platos teóricos para la Selenocisteína y la Selenometionina con la concentración de 10 mM de Fosfatos.



Sin embargo, se observó que el ancho de pico de la Selenometionina aumenta proporcionalmente a la concentración del buffer, como se observa en la figura 19 (pág. 49) y en la tabla 5, por lo que se decidió usar el buffer de concentración 5 mM de Boratos y 5 mM de Fosfatos. Además con el buffer de Boratos 5 mM Fosfatos 10 mM el tiempo de análisis aumenta casi 1 minuto y se pierde simetría en el pico de Selenato, como se observa en la Figura 19 (pág. 49).

Tabla 5. Relación del ancho de pico de la Selenometionina con la concentración del buffer.

CONC. BUFFER	ANCHO DE PICO
5-5	0.12
5-10	0.13
5-15	0.28
5-20	0.22
10-10	0.31

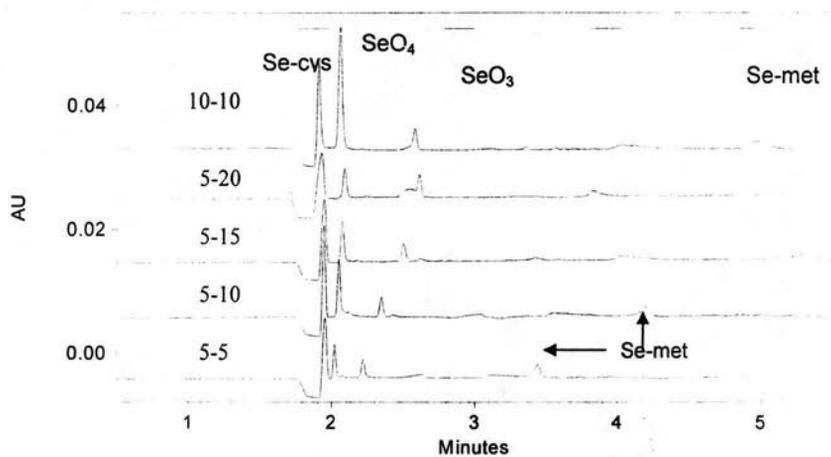


Figura 19. Separación de la mezcla de estándares usando Boratos - Fosfatos CTAB 0.5 mM pH 10.5.

B.5. Optimización de la concentración de surfactante

Hasta ahora con la adición de CTAB se habían obtenido buenos resultados, de todas formas se decidió probar el bromuro de trimetiltetradecilamonio (TTAB) y trabajando en las mismas condiciones usadas anteriormente se obtuvieron los resultados mostrados en el siguiente electroferograma:

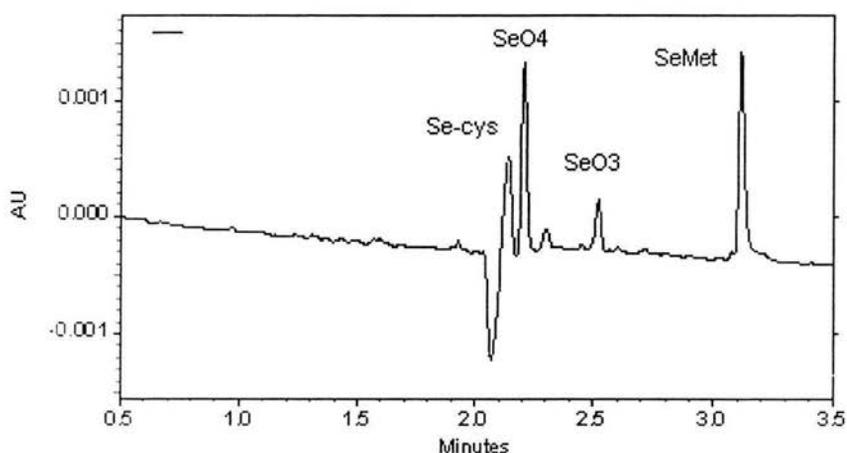


Figura 20. Separación de la mezcla de estándares con Boratos 10 mM TTAB 0.5 mM pH 10.0.

Tabla 6. Datos obtenidos con el uso de TTAB como surfactante

Analito	Tiempo de migración	Área bajo la curva	Ancho de pico
Selenocisteína	2.142	1532	0.06
Selenato	2.208	2471	0.06
Selenito	2.521	520	0.06
Selenometionina	3.112	2466	0.06

La resolución obtenida con CTAB es de 6.7 (Selenocisteína $t = 1.358$ $w = 0.03$ y Selenato $t = 1.625$ $w = 0.05$ según Figura 7, pág. 34) y la resolución obtenida con TTAB es sólo de 1.1 (Según tabla 6 y ecuación 4, pág. 20), por lo que se decidió seguir usando CTAB como surfactante.

Las concentraciones de CTAB que se probaron fueron 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 (Figura 21), no se probó una mayor concentración para no rebasar la concentración micelar crítica ($CMC=1.3$ mM) y seguir en Electroforesis Capilar de Zona. La concentración óptima es de 1.0 mM.

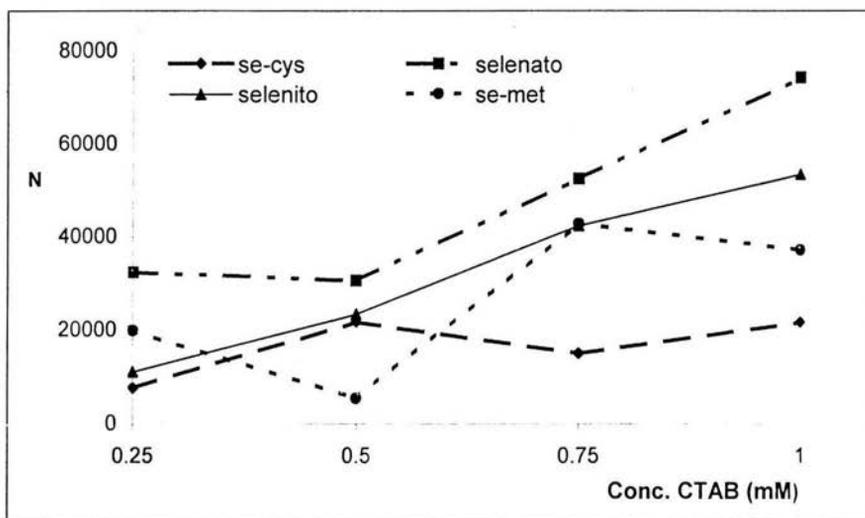


Figura 21. Platos teóricos en función de la concentración de CTAB

C. Pruebas con diferentes tipos de buffer

El buffer usado de Boratos-Fosfatos pH 10.5 tuvo que ser preparado diariamente, ya que el pH al siguiente día de preparación era ligeramente menor a 10.5.

Se decidió probar si otros buffer con pK_a 's mayores amortiguaban mejor. Primero se probó con NH_4OH 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5, pero el amonio absorbe más que los analitos a 210 nm, y no se logró detectar ninguno de los cuatro analitos.

Después se utilizó K_2CO_3 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5 en el que se observó que el orden de migración de los analitos cambia con esta solución amortiguadora (Figura 22), aunque el pH es el mismo usado anteriormente, los datos obtenidos para una mezcla de estándares de 40 ppm se observan en la tabla 7 (pág. 53).

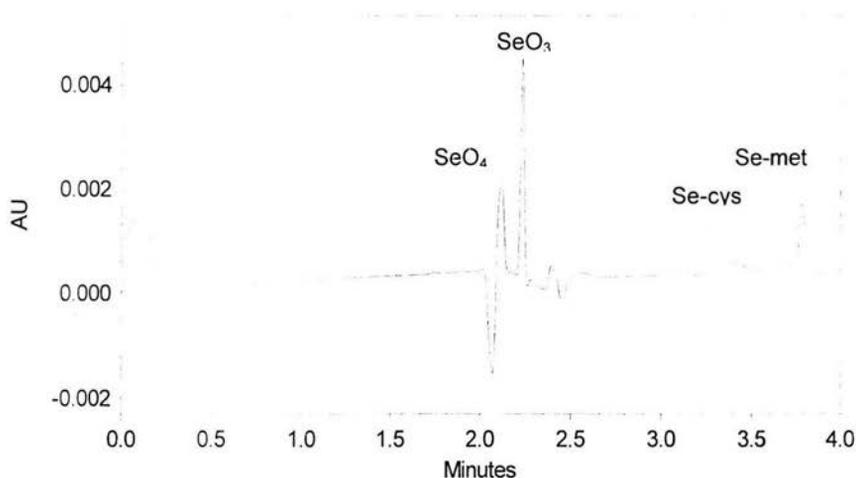


Figura 22. Separación de la mezcla de estándares usando K_2CO_3 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5.

Tabla 7. Datos obtenidos con K_2CO_3 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.5

Analito	Tiempo de migración	Área bajo la curva	Ancho de pico	Platos teóricos
Selenato	2.071	4286	0.07	19397
Selenito	2.233	5525	0.05	44198
Selenocisteína	3.317	1776	0.08	38096
Selenometionina	3.783	2996	0.09	39152

Se observa que el comportamiento es muy diferente al usar como buffer Boratos (Figura 7, pag. 34), Fosfatos o Boratos-Fosfatos en comparación con el de Carbonatos (Figura 22), ya que la Selenocisteína migra más rápido que los otros tres compuestos, que siguen el orden de predicción (pág. 31). En base a la figura 9 (pág. 37) de movilidades en función del pH, podemos decir que el cambio de comportamiento se presenta a pH mayor de 9.5.

Se decidió no usar el buffer de Carbonatos porque la línea base es irregular y se pierde simetría en los picos de Selenometionina y Selenocisteína (Figura 22, pág. 52), afectando la integración de los datos.

Se probaron además dos buffer orgánicos: Glicina 5 mM CTAB 1.0 mM pH 10.5 y 4-metilbencilamina 5 mM CTAB 1.0 mM pH 10.5. Con la 4-metilbencilamina se observó que la absorbancia del buffer es mayor a la de los analitos y no se logró detectar ninguno de los cuatro analitos.

Con el buffer de Glicina la Selenocisteína no pudo ser analizada, ya que aparece como varios picos mal definidos sin poder determinarse su tiempo de migración.

D. Determinación de otros factores que afectan el análisis

Al usar concentraciones bajas de los estándares se observaba la aparición de otros compuestos que aumentaban de área con el tiempo y el aumento de temperatura. Estos factores retrasaron el trabajo, ya que las muestras deben ser de reciente preparación o estar refrigeradas.

Antes de seguir experimentando se decidió obtener los espectros de absorción de los estándares en un espectrofotómetro (Figuras 23-27) porque en los electroferogramas se observada la presencia de otros compuestos en pequeña cantidad, sobre todo de Selenato al analizar cada una de las soluciones stock.

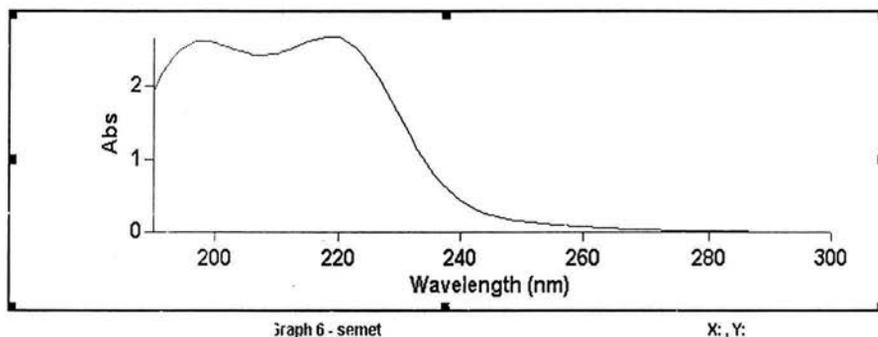


Figura 23. Espectro de absorción Selenometionina 200 ppm. Blanco: agua

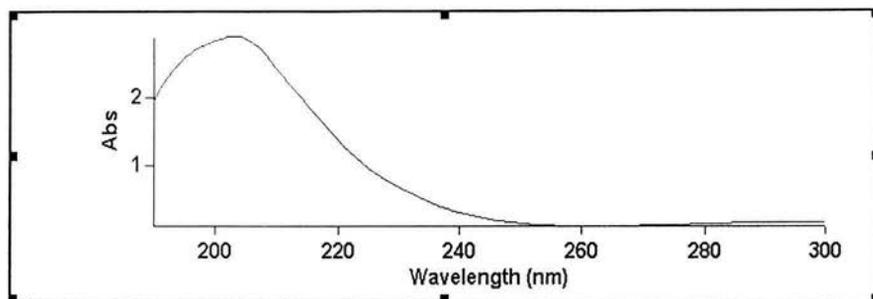


Figura 24. Espectro de absorción Selenocisteína 200 ppm. Blanco: agua

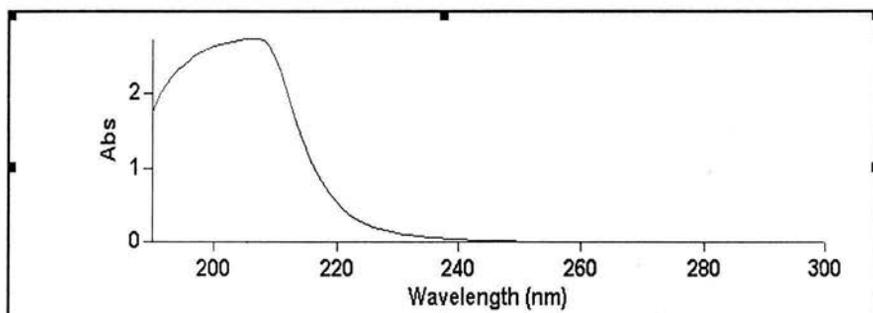


Figura 25. Espectro de absorción Selenito 200 ppm. Blanco: agua

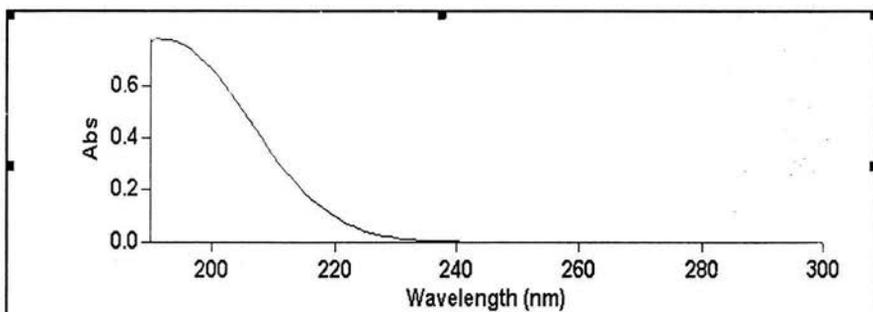
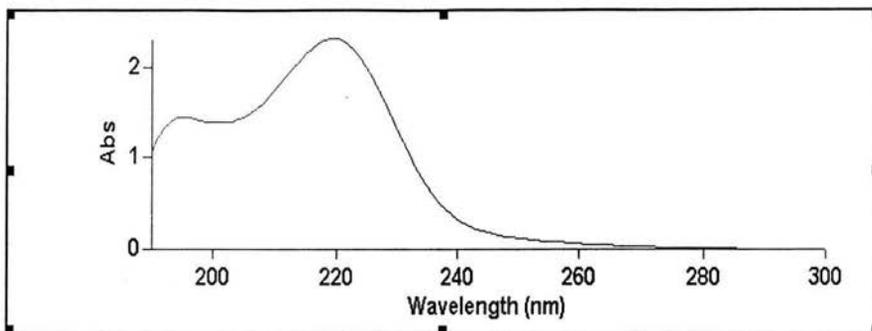


Figura 26. Espectro de absorción Selenato 200 ppm. Blanco: agua



Graph 10 - semetVS4

X: , Y:

Figura 27. Espectro de absorción Seleniometionina 200 ppm. Blanco: Selenato 200 ppm

En el espectro de absorción de la Seleniometionina usando como blanco agua (Figura 23, pág. 54) se observa una doble curva, mientras que en el espectro de absorción obtenido usando como blanco selenato (Figura 27) se observa sólo un máximo. Esto es indicativo de una cantidad de Selenato en la solución stock de Seleniometionina, recordando que esta se prepara del reactivo puro por lo que el Selenato puede estarse formando de la descomposición de la Seleniometionina.

Se puede suponer que este efectos ocurre de mismo modo en la muestra de levadura analizada, por lo que si hay presencia de Selenato es debido a la descomposición de los selenoaminoácidos y no así de su composición original.

Con base a los resultados obtenidos de los electroferogramas y los espectros de absorción se decidió refrigerar las soluciones de estándares y las muestras, además se tomó la cantidad necesaria de muestra una por una para introducir al equipo antes de comenzar la separación. Para seguir

experimentando se cuidó la temperatura y el tiempo de exposición de los estándares y de la muestra a las condiciones ambientales.

E. Preparación de la muestra

Después de seleccionar las condiciones apropiadas de introducción de la muestra (Sección B.1, pág. 38), se realizaron diferentes pruebas para la preparación de la muestra.

Primero se pesaron 3 muestras de 0.08 g y luego se disolvieron en 10 mL de los siguientes líquidos: agua, buffer diluido 1:10 y CTAB 0.5 mM; todas las muestras se disolvieron por agitación suave durante 3 minutos y se filtraron al vacío en papel Whatman de 70 μ m y luego se filtraron con acrodiscos de 45 μ m para ser introducidas y analizadas (Figura 28 pág 58)

Las áreas obtenidas para la Selenometionina eran más pequeñas a las de la curva de calibración (tabla 10, pág. 62) por lo que las muestras tenían menos de 25 ppm de Selenometionina. Sin embargo, estas pruebas permitieron obtener datos importantes.

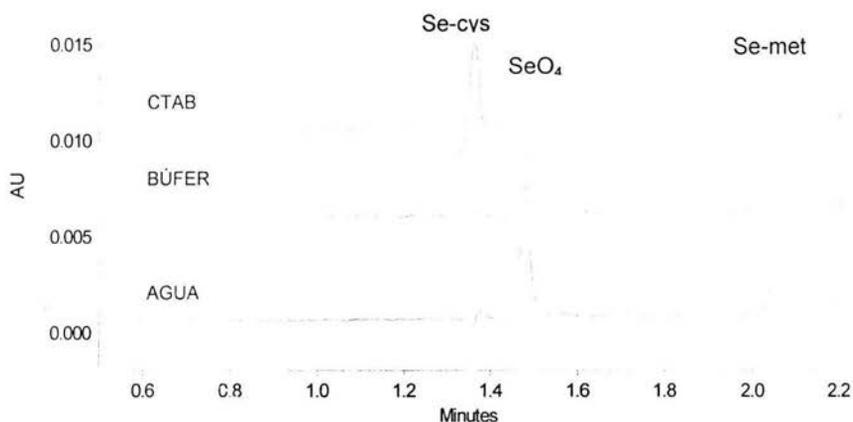


Figura 28. Separación de la muestra de Selplex. Boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.0 Introducción hidrodinámica 0.5 psi, 25 segundos.

Con base a las áreas obtenidas (tabla 8) de Selenocisteína (6172), Selenato (2928) y Selenometionina (1063) se pudo determinar la forma de preparar la muestra (no se encontró Selenito en la muestra), considerando que el CTAB es el mejor disolvente, ya que con los otros disolventes no es apreciable la cantidad de Selenocisteína.

Tabla 8. Comparación de las áreas bajo la curva de los analitos en la preparación de la muestra con diferentes disolventes.

DISOLVENTE	Selenocisteína	Selenato	Selenometionina
AGUA	207	9400	922
BUFFER 1:10	605	2850	625
CTAB 0.5mM	6172	2928	1063

Se realizaron las mismas pruebas, pero ahora disolviendo la muestra con metanol, acetonitrilo, acetonitrilo-agua 1:1, metanol-agua 1:1 (Figura 29), obteniendo los mismos resultados con las mezclas que con los disolventes sin agua (metanol igual a metanol-agua y acetonitrilo igual a acetonitrilo-agua). Además con el uso de acetonitrilo se observa pérdida de simetría en el pico de Selenometionina.

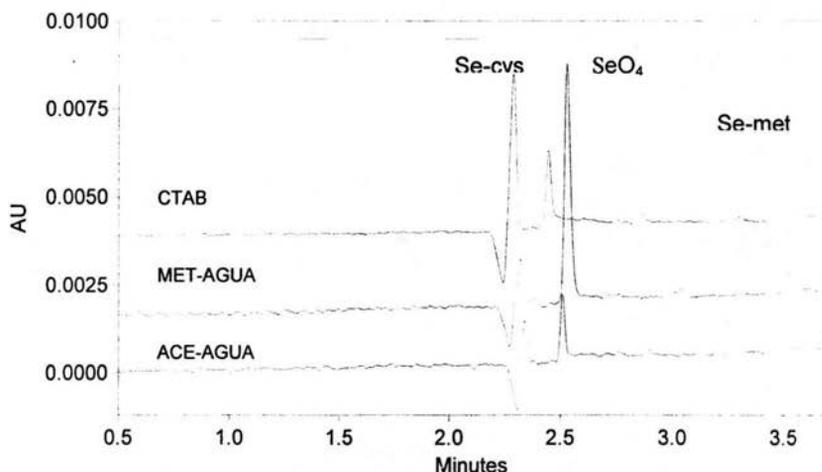


Figura 29 Separación de la muestra de Selplex. Boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.0. Introducción hidrodinámica 0.5 psi 25 segundos.

Tabla 9. Comparación de la áreas bajo la curva de los analitos en la preparación de la muestra con disolventes orgánicos y CTAB.

DISOLVENTE	Selenocisteína	Selenato	Selenometionina
CTAB	8093	3516	861
METANOL- AGUA 1:1	2311	13009	1968
ACETONITRIL- AGUA 1:1	1452	2273	934

Como se observa en la Figura 29 (pág. 59) el área de Selenato (13009) y de Selenometionina (1968) aumentan en gran proporción con el uso de metanol como disolvente en comparación a las otras muestras. Se supone una descomposición de los selenoaminoácidos al ser disueltos en metanol, debido a la elevada cantidad de selenato encontrada en la muestra sólo al ser empleado dicho disolvente.

Para la preparación de la muestra se determinó que la disolución en CTAB proporciona la mayor cantidad de Selenocisteína soluble como en observa en las Figuras 28y 29 (pág. 58-59).

F. Método óptimo

Con los resultados obtenidos del análisis de los estándares y de la muestra (mostrados en las secciones anteriores) se establecieron las siguientes condiciones como óptimas para la separación de los compuestos de Selenio contenidos en la muestra de levadura:

- **Capilar de 50 μm de diámetro interno, 59 cm de longitud total, 48.5 cm de longitud efectiva.**
- **Buffer $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5 mM Na_2HPO_4 5 mM CTAB 1.0 mM pH 10.5**
- **Introducción hidrodinámica 0.5 psi 25 segundos**
- **Voltaje de separación 25 kV polaridad invertida o negativa**
- **Lavado del capilar con buffer por 1 min. a 20 psi después de cada separación**
- **Temperatura del capilar: 25°C**
- **Detección a 210 nm**
- **Las soluciones de estándares y la muestra se mantienen en refrigeración y deben prepararse antes de ser introducidas.**

G. Curvas de Calibración

Con el capilar de 75 μm d.i., 62 cm L_t , 52 cm L_e sólo se realizó una curva de calibración de Selenometionina usando buffer de boratos 10 mM CTAB 0.5 mM pH 10.2, introduciendo la muestra de manera hidrodinámica por 5 s a 0.5 psi, usando un voltaje de separación de -30 kV.

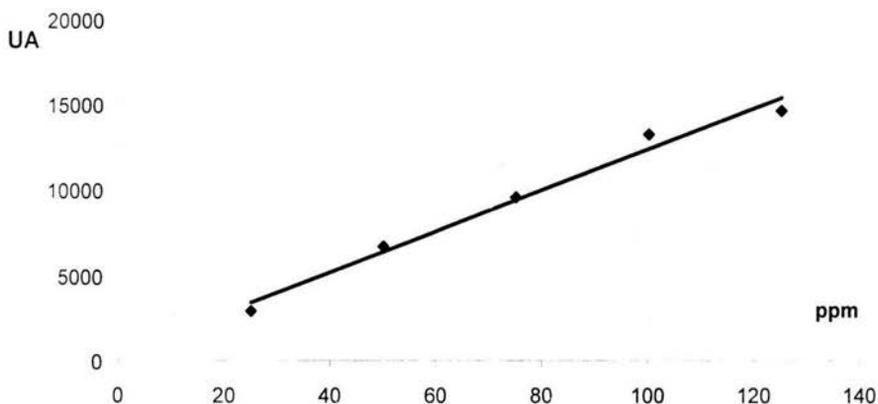


Figura 30. Curva de calibración de selenometionina

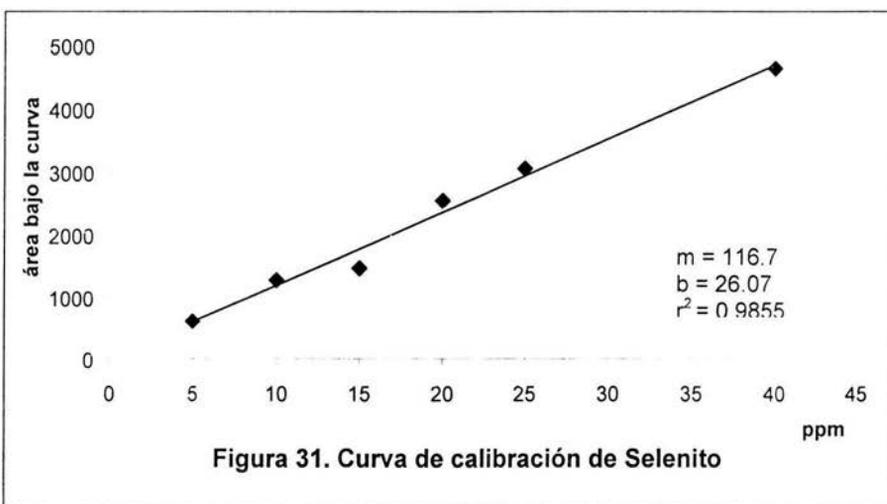
Tabla 10. Datos de la curva de calibración de Selenometionina

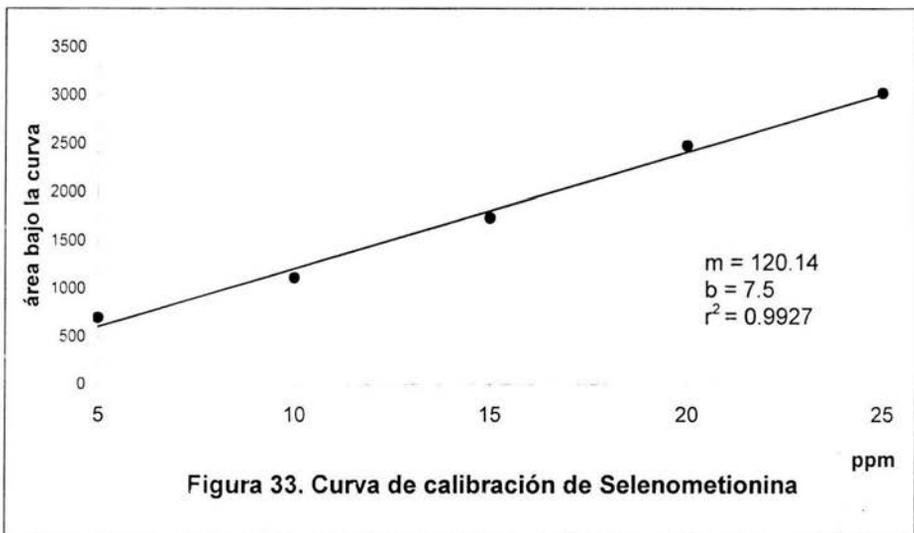
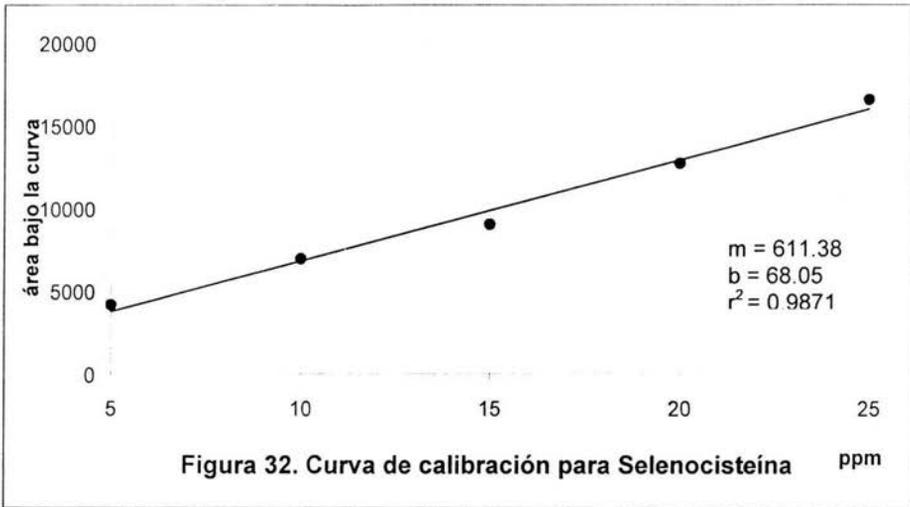
Se-met ppm	Tiempo	Area
25	2.237	2911
50	2.237	6708
75	2.250	9547
100	2.258	13218
125	2.267	14605

Se obtuvo un correlación de 0.9818 y tiempos de migración con un coeficiente de variación de 0.5841. El límite de detección para este estudio fue de 5 ppm.

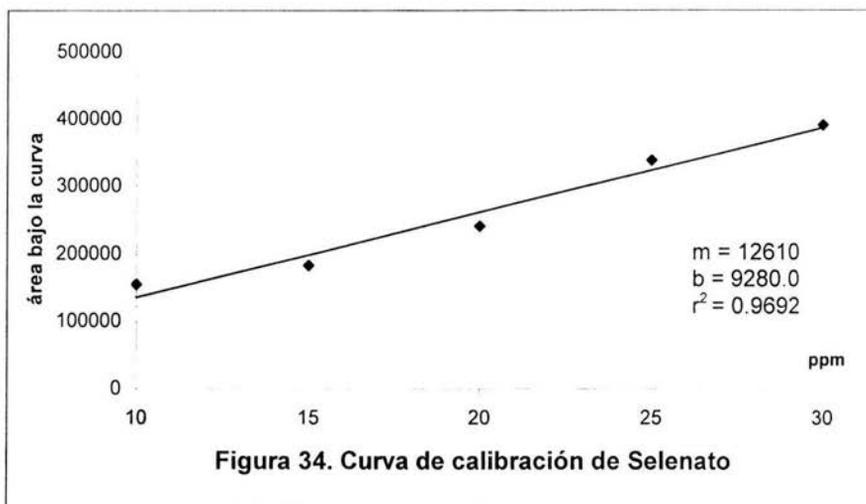
Se realizaron varias curvas de calibración con el método optimizado para los 4 analitos. Sin embargo, no se pudo obtener una curva de calibración lineal para Selenato debido a que hay variaciones en el área del pico, que no se pueden controlar manteniendo la temperatura constante ni disminuyendo la exposición de las soluciones stock a la luz y al aire.

Como se observa en los datos de las figuras 31, 32 y 33 todas las curvas tienen una buena correlación y hay una relación lineal entre las áreas bajo la curva y la concentración de los analitos.





Para la curva de calibración se Selenato se usó un reactivo estándar que se obtiene a partir de Selenio metálico que es oxidado y disuelto en HNO_3 al 5% (Figura 34, pág. 65) en la que se observa una relación lineal entre la concentración y el área bajo la curva obtenida de los electroferogramas.



Se probó el uso de Selenito, Cloro en forma de LiCl y óxido de mesitilo como estándar interno con el propósito de mejorar los coeficientes de variación (C.V.) de las áreas. Aunque si se obtuvieron C.V. menores, como se observa con el cloro (Tabla 11), se pierde la linealidad de las curvas. Finalmente se decidió no usar ninguno de éstos compuestos como estándar interno.

Tabla 11. Resultados de la corrección del área bajo la curva de los analitos en base al área bajo la curva del cloro

Analito	Área bajo la curva			Corregido con cloro		
	Prom.	D.E.	C.V.	Prom.	D.E.	C.V.
Cloro	20476	1304	6.37	--		--
Selenocisteína	19122	1177	6.16	0.937	1×10^{-3}	0.14
Selenato	3099	936	30.2	0.144	1×10^{-3}	1.06
Selenito	3317	194	5.84	0.167	1×10^{-3}	4.7
Selenometionina	3886	445	11.46	0.197	1×10^{-3}	4.0

H. Análisis de la muestra de levadura

Se prepararon muestras de Selplex (2000 ppm de Se) el mismo día que las curvas de calibración, pesando 0.033 g de la muestra de levadura y disolviendo en 4 mL de CTAB 0.1 mM, filtrando una vez en acrodiscos de 0.45 mM. Se tomaron 2 mL del filtrado y se le agregaron 0.5 mL de SeO_3 de 200 ppm aforando a 5 mL, de esta solución se tomaron 0.4 mL para introducir al equipo y analizarla con el método optimizado, En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos.

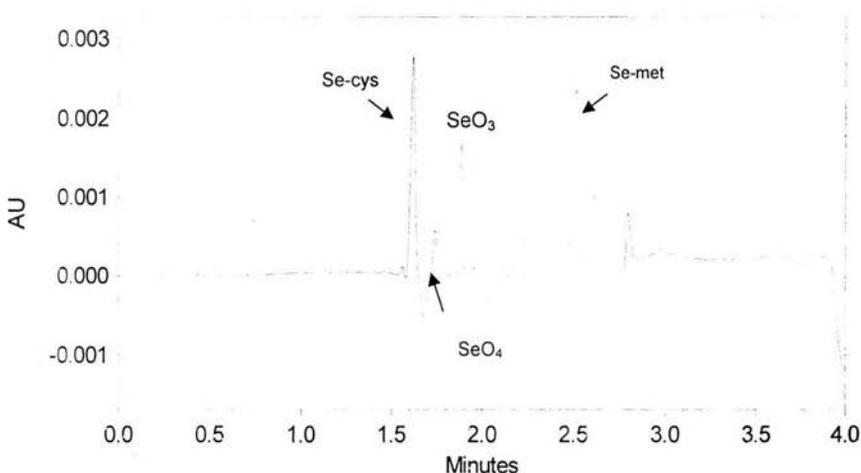


Figura 35. Separación de la muestra de Selplex preparado en CTAB 1.0 mM usando Boratos 5 mM Fosfatos 5 mM CTAB 1.0 mM pH 10.5

Tabla 12. Datos obtenidos de la muestra de Selplex de 2000 ppm de Selenio.

PDA - 210nm

Pico #	Tiempo	Area	Altura	Ancho
Selenocisteína	1.617	5587	2993	0.09
Selenato	1.738	536	459	0.04
Selenito	1.883	2005	1636	0.06
Selenometionina	2.796	1168	695	0.07

Cuantificando con base a las curvas de calibración se obtienen 2424 ppm de Selenocisteína (1139 ppm de Se) y 2918 ppm de Selenometionina (1176 ppm de Se), lo cual concuerda con el contenido indicado para el Selplex. La cantidad de Selenato es despreciable, Selenito no se encontró en la muestra y el que se observa en el electroferograma fue el que se adicionó a la muestra.

VIII. CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo de un método de identificación y cuantificación de cuatro compuestos de Selenio: Selenito, Selenato, Selenocisteína y Selenometionina, mediante Electroforesis Capilar; mejorando el tiempo de análisis (3 min.) y los límites de detección (5 ppm) reportados en otros trabajos.

El uso de CTAB 1 mM para la disolución de la muestra (Sel-plex) permitió extraer la mayor cantidad de analitos de la levadura enriquecida, siendo éste el mejor pretratamiento.

El método desarrollado permitió la caracterización de una levadura enriquecida con Selenio de uso veterinario, determinando que el contenido de Selenoaminoácidos corresponde con el indicado por el fabricante. El contenido de Selenio inorgánico en la muestra es despreciable. Estos resultados indican que los bolos fabricados a partir de el Sel-plex si contienen Selenio orgánico.

La búsqueda de las condiciones óptimas de análisis de los selenocompuestos permitió conocer más sobre su comportamiento en diferentes sistemas de separación, lo cual puede ser útil para futuros trabajos relacionados con estos analitos.

XI. REFERENCIAS

1. Krystyna Pyrzyńska. *Talanta* 55 (2001) 657-667.
3. Alltech. SEL-PLEX Organic Selenium: Redefining Selenium Supplementation. (2003).
4. Arthur, J.R. Non-glutathione peroxidase functions of selenium. Proceedings of the 13th Annual Symposium Nottingham University Press, England, 1997.
4. Clark L.C., Combs G.F. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Journal of the American Medical Association* (1996) 276:1957-1963.
5. Nicole Gilon, Martine Potin-Gautier. *Journal of Chromatography A*, 732 (1996) 362-376.
6. J. Zheng, H. Greschonig, F. Liu y w. Kosmus. *Trace Elements and Electrolytes* 17 (2000) 40-47.
7. Corinne Casiot, Maria Carmen Varicela Alonso, Jolanda Boisson, Olivier F.X. Donard y Martine Potin-Gautier. *The Analyst* 123 (1998) 2887-2893.
8. Agnés Hagege, Christina Troyer, Manfred Grasserbauer y Maurice J.F. Leroy. *Mikrochimica Acta* 127 (1997) 113-118.
9. Passwater, Richard A., 1999. *All about Selenium*, Avery Publishing Group, E.U.A.
10. Combs, G.F., Combs S.B. Academic Press, New York (1986).
11. C.M. Bourgeois, 1995. *Microbiología Alimentaria*, Acribia, España.
13. Weston A, Brown P.R., 1997 "HPLC and CE: Principles and Practice", Academic Press. USA.
12. H. Chassaigne, C.C. Chéry, G. Bordin, A.R. Rodriguez. *Journal of Chromatography A*, 976 (2002) 409-422.
14. Skoog Douglas, James J. L., 1994 "Análisis Instrumental" 4a ed. Mc Graw Hill. España.
15. M. Castillo. FESC Cuautitlán, 2000.

16. Heiger N. David, (1997) "High performance Capillary Electrophoresis ". Hewlett Packard Company. 3a Ed. Francia.
17. Altria Kevin D., 1998 "Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis", Glaxo Wellcome. Vol.2 Alemania.
18. Claessens H. A., Billiet H. A., 1995 "Capillary Electro separation Methods" Delft University of Technology, Mayo.
19. Foret Frantisek, Bocek T., Krivánková L., 1993 "Capillary Zone Electrophoresis" Ed. VCH, Alemania.
20. Landers. James P., 1993 "Handbook of Capillary Electrophoresis" CRC press. USA.
21. Paul R. Haddad, Dr Mirek Macka, 2000 "Ion analysis by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography" University of Tasmania, Australia.
22. Rivera Vega, Maria P. 1996 "Electroforesis Capilar, una nueva herramienta para la química analítica" Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.
23. Rubinson J.F., Rubinson K.A., 2000 "Química Analítica Contemporánea, Pearson Education, México.
24. Winefordner J. D., Khaledi M., 1998 "Chemical Analysis. High-Performance capillary Electrophoresis" Wiley-Interscience, USA.
25. Walter Goessler, Doris Kuehnelt, Claudia Schlagenhaufen, Kurt Kalcher, Mulat Abegaz, Kurt J. Irgolic. Journal of Chromatography A, 789 (1997) 233-245.
26. Nicole Gilon, Martine Potin-Gautier, M. Astruc. Journal of Chromatography A, 750 (1996) 327-334.
27. R. Lobinski. J.S. Edmonds, K. T. Suzuki, P. C. Uden. Pure Appl. Chem., Vol. 72, No. 3, pp 447-461, 2000.
28. Mihály Kotrebai, Julian F. Tyson, Eric Block, Peter C. Uden. Journal of Chromatography A, 866 (2000) 51-63.
29. Shona McSheehy, Wenjie Yang, Florence Pannier, Joanna Szpunar, Ryszard Lobinski, Jacques Auger, Martine Potin-Gautier. Analytica Chimica Acta 421 (2000) 147-153.