

Desarrollo de un método analítico para la determinación de selenio en huevos fortificados de gallinas (*Isa Brown*) por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros

Development of an analytical method for the determination of selenium in fortified hens eggs (Isa Brown) by atomic absorption spectroscopy hydride generation

LUIS VICENTE GUTIÉRREZ PEÑA^{1,2*}, PABLO E CARRERO², YELITZA J DELGADO^{C2}, DAVID PICÓN², LUIS A PAZ¹, JOSÉ R VIELMA¹, ARLENIS Y QUINTERO¹, EVER O GUTIÉRREZ¹, ISERSLIS A GUTIÉRREZ¹

RESUMEN

El huevo es una fuente proteica de uso masivo, en consideración a su bajo costo, es consumido con mayor frecuencia por toda la población. Por esta razón, es de gran interés introducir al mercado un tipo de huevo "saludable", que disminuya los riesgos ligados a enfermedades cardiovasculares y que actúe como antioxidante.

Por ello, se evaluó la incorporación del Selenio Orgánico (Sel-Plex®, Alltech Inc) en el programa de alimentación de gallinas ponedoras comerciales raza *isa brown* con el objeto de obtener huevos fortificados con selenio. Estos fueron evaluados empleando la técnica de espectroscopia analítica con generación de hidruros (HGAAS) y para llevar a cabo la digestión se empleó una mezcla de HNO₃/H₂O₂. El intervalo lineal fue de 6,0 a 200,0 µg/L para el selenio. Con un límite de detección de 0,11 µg/L. La precisión de 0,82% y la recuperación de 97-104,4% y una frecuencia de análisis de 24 muestras/hora. La principal ventaja de este método es la determinación de selenio en huevo completo. Los resultados indican que luego de un período de 12 semanas la concentración de selenio es de 62,45 de µg Selenio/huevo lo que muestra que estos proporcionan los requerimientos necesarios. Por lo tanto los huevos enriquecidos en Venezuela contribuirían a mejorar la dieta diaria de estos consumidores.

Palabras claves: Selenio, huevo, hidruro, absorción atómica.

ABSTRACT

The egg is a protein source for mass use, considering its low cost, is most commonly consumed by the population. For this reason, it is of great interest to enter the market a type of egg "healthy" to decrease the risks associated with cardiovascular disease and act as an antioxidant. Therefore, it evaluated the incorporation of organic selenium (Sel-Plex®, Alltech Inc.) in the feeding program commercial layers "*Isa Brown*" race in order to obtain eggs fortified with selenium. These were assessed using analytical technique spectroscopy with hydride generation (HGAAS) and to conduct the digestion was used a mixture of HNO₃/H₂O₂. The linear range was from 6.0 to 200.0 mg / L for selenium. With detection limit of 0.11 mg / L 0.82% accuracy and recovery of 97 to 104.4% and a frequency analysis of 24 samples / hour. The main advantage of this method is the determination of selenium in whole egg. The results indicate that after a period of 12 weeks the concentration of selenium is 62.45 Selenium mg / egg showing that these provide the necessary requirements. Therefore enriched eggs in Venezuela would help improve the diet of these consumers.

Keywords: Selenium, eggs, hydride atomic absorption.

1. Universidad Experimental Sur del Lago "Jesús María Semprum". Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR). Santa Bárbara del Zulia. Estado Zulia. Venezuela.
2. Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. *gutierrezlv@unesur.edu.ve

INTRODUCCIÓN

El selenio es un micromineral antioxidante que protege al ser humano contra enfermedades cardiovasculares, además de estimular el sistema inmunológico, ya que, disminuye el proceso de envejecimiento celular por lo que se asocia a la prevención del cáncer⁽¹⁻³⁾. Esto se debe que el selenio está relacionado con el contenido de selenoproteínas que actúan junto a la enzima glucosa peroxidasa en la eliminación de los llamados radicales libres.

Es importante señalar, que Venezuela es un país con altos niveles de selenio en el suelo, por lo que la mayoría de los productos de consumo diario presentan un contenido de selenio que cumple con los requerimientos establecidos por el Instituto Nacional de Nutrición,⁽⁴⁾ Donde las Ingestas Dietéticas Recomendadas (RDA) para Venezuela son 15 y 20 µg/día para recién nacidos, 20 a 30 µg/día para niños, 40 µg/día para adolescentes y 55 µg/día para adultos (hombres y mujeres), aumentado a 60 µg/día para el embarazo y 70 µg/día para la lactancia, en cualquiera de sus rangos de edad (14-18, 19-30 y 31-50 años).

No obstante, existen países cuyo contenido de selenio es notablemente bajo, entre los que se destacan los territorios de suelos volcánicos, así como los regadíos intensivos y en general los suelos ácidos. Esto indica que el consumo de este elemento de la población que habita en estas zonas es bajo y se hace necesario la ingesta de alimentos que lo contengan, tales como los pescados, mariscos y los huevos⁽⁵⁾.

En base a esto, es posible determinar que los productos avícolas representan una ventaja adicional para la salud humana debido a la capacidad que tienen las aves de almacenar compuestos antioxidantes esenciales para el metabolismo humano en sus formas altamente disponibles. Algunos estudios indican que los huevos han demostrado ser un eficaz vehículo para complementar las deficiencias de selenio⁽⁵⁾. El contenido de este elemento en los huevos es fácil de tratar cuando las gallinas se alimentan bajo la forma orgánica de selenio (es decir, selenometionina). La mayoría de los estudios demuestran que en las gallinas alimentadas, los huevos enriquecidos contienen entre 0,3 a 0,5 mg de Se/gramo por día⁽⁶⁾.

Una de las ventajas adicionales que presentan, los huevos siendo un alimento tradicional y sobre todo se encuentran a precios asequibles en muchos países y culturas, por lo tanto los huevos enriquecidos con selenio deberían ser realmente aceptables. Para poder llevar a cabo estudios de estos huevos enriquecidos, es necesario tomar en cuenta que, el mismo es un sistema emulsionado naturalmente formado por componentes tales como fosfolípidos, lipoproteínas y proteínas^(7,8), sin embargo debido a su alta viscosidad y su alto contenido de materia orgánica la medición de elementos traza directamente por técnicas espectroscópicas es particularmente difícil.

Por lo tanto, los métodos para la determinación de elementos trazas deben presentar un cuidado especial durante el tratamiento de la muestra, para evitar pérdidas por volatilización durante la etapa de calentamiento en el proceso de digestión. Adicionalmente, en base a lo reportado en la literatura para llevar la determinación de Selenio en huevo se han empleado diversos métodos de digestión, entre los que se destacan, mezclas de ácidos y peróxidos,^(8,9) combinación de algunos reactivos para su determinación por ultravioleta,⁽¹⁰⁾ o por digestión con microondas.^(11,12) Sin embargo, todos estos métodos involucran pasos adicionales (determinación por separado de la clara y la yema) que traen consigo, errores de muestreo, contaminación y pérdida del analito durante la manipulación de la muestra, además de incrementar los tiempos de análisis.⁽¹³⁾

La espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HGAAS), se ha usado con éxito en la determinación de selenio en muestras biológicas y ambientales ya que esta puede incrementar la sensibilidad de la técnica producto de la generación de especies metálicas volátiles como lo son los hidruros de este elemento, permitiendo así eliminar las posibles interferencias⁽¹⁴⁾.

En ese sentido, en Venezuela, la industria alimentaria está desarrollando e implementando la exportación de alimentos fortificados con alto contenido de selenio que satisfagan la demanda de estos países con deficiencia del elemento. Sin embargo, no existe un control de calidad, que indique cuantitativamente cuales son los niveles de selenio en huevo enriquecidos,

que son adquiridos y que son necesarios para la aceptación del producto a nivel internacional.

En base a lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo se basó en evaluar la incorporación del Selenio Orgánico (Sel-Plex®, Alltech Inc) en el programa de alimentación de gallinas ponedoras comerciales raza *Isa Brown* con el objeto de obtener huevos fortificados con selenio y su determinación mediante la técnica de espectroscopia analítica con generación de hidruros, además de optimizar la digestión de dicha matriz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Para la realización de este trabajo se emplearon huevos suministrados por la Granja Experimental HUEVOS DE HOY en Santa Cruz de Aragua, Edo. Aragua-Venezuela. La recolección de los huevos se llevó a cabo en un periodo de 16 semanas. Para llevar a cabo el estudio se usaron 2000 gallinas de raza *Isa*

Brown de 49 semanas de edad, de peso promedio 2,0 kg. El procedimiento empleado por la Granja consistió en alimentar a un grupo de gallinas, sin suplemento de selenio, que servirán como grupo control (galpones 1, 2, 3 y 4); a otro grupo se le suministro Selplex en su alimentación con dosis de 300 gr/Kg (galpones 14, 15, 16 y 17). Los huevos para el estudio fueron recolectados en diferentes periodos de tiempo. Inicialmente en un tiempo 0, en donde no se había suministrado el suplemento alimenticio, y posteriormente cada 4 semanas (semanas 4, 8, 12 y 16). Se tomaron 17 huevos al azar para cada grupo y posteriormente se realizó la determinación del selenio.

Digestión de la muestra

El proceso de digestión se realizó empleando la matriz bajo diferentes características físicas, es decir, el huevo líquido y el huevo liofilizado o muestra seca (sólido). (Figura 1).

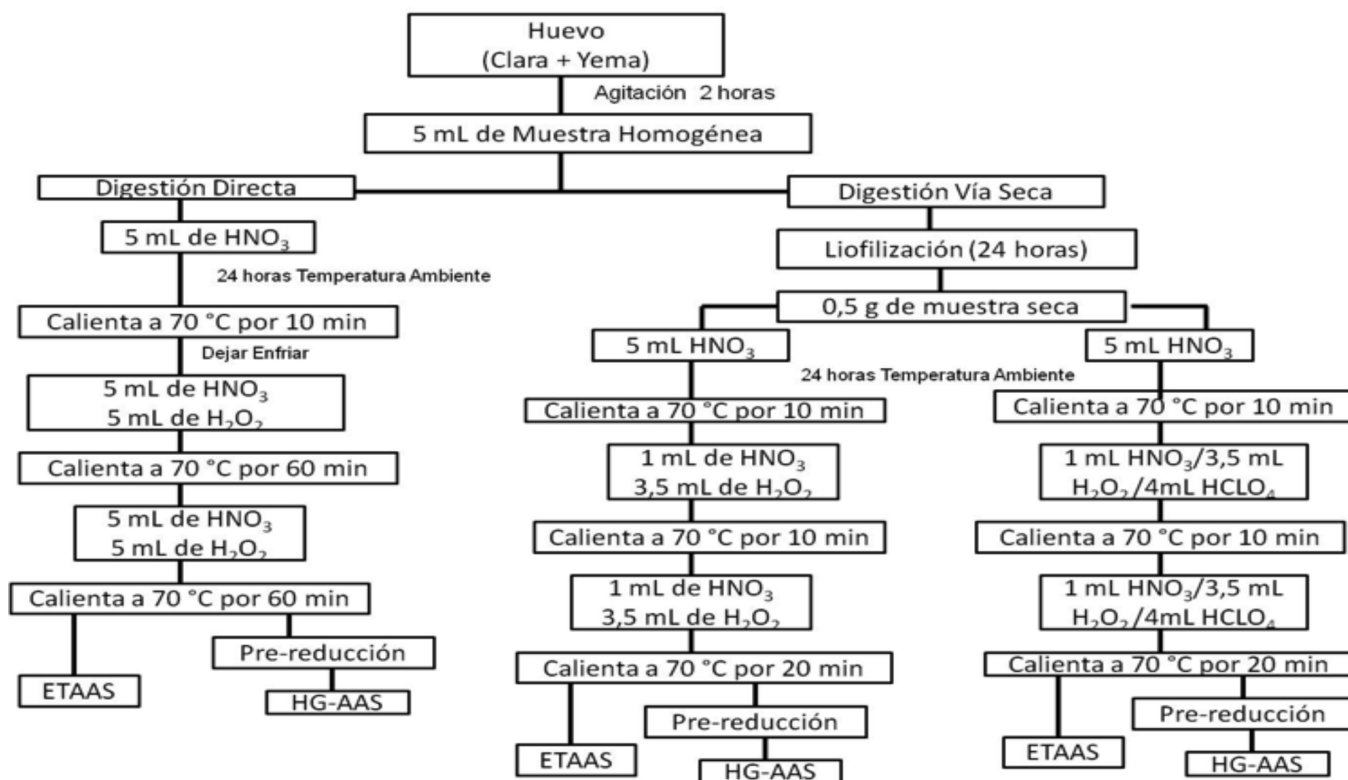


Figura 1. Procesos de digestión empleados

Digestión directa

Se tomó un huevo, se pesó y se colocó completamente (clara y yema) en un vaso precipitado, se agitó por dos horas en una plancha de agitación para obtener una mezcla homogénea y se pesó nuevamente.

Se midieron 5 mL de la muestra homogenizada, se colocaron en un vaso de precipitado y se le añadieron 5 mL de ácido nítrico (HNO_3). La mezcla se deja a temperatura ambiente por 24 horas, luego se calienta a 70°C en una plancha de calentamiento durante 10 minutos, posteriormente se dejó enfriar la solución y se le agregaron 5 mL más de HNO_3 y 5 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), para luego volver a calentar a 70°C por 60 minutos. La solución se dejó enfriar, y se le añadieron 5 mL de HNO_3 y 5 mL H_2O_2 , calentando nuevamente a la misma temperatura por 60 minutos hasta obtener una solución clara.

Una vez que la solución ha alcanzado la temperatura ambiente, esta se diluye a 25 mL en un matraz aforado para realizar las determinaciones por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

Digestión vía seca

Se siguió el procedimiento empleado para la digestión directa pero una vez pesada la mezcla, se le añadieron 10 mL de nitrógeno líquido y se llevaron al liofilizador por 24 horas. En la Figura 1 se describe el procedimiento a seguir para ambas digestiones hasta la medida de las muestras en el sistema instrumental.

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se empleó selenito de sodio (NaSeO_3) (Sigma, St – Louis, MO, USA 99% pureza) en la preparación de los estándares de selenio. Las soluciones de borohidruro de sodio fueron preparadas diariamente a partir de NaBH_4 marca Sigma (Sigma, St – Louis, MO, USA 98% de pureza). Para evitar la descomposición del reactivo las soluciones fueron estabilizadas en un medio de 0,05 % p/v de NaOH (Riedel-de-Haën 99%;).

El ácido fue preparado mediante dilución apropiada de los volúmenes correspondientes de HCl concentrado (Riedel de Haën, 37%, $d = 1.19 \text{ g mL}^{-1}$). El agua empleada para preparar las soluciones fue desminera-

lizada y desionizada (Millipore) con una conductividad de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Para la reducción del Se(VI) a Se(IV) se tomaron 2 mL de la muestra digerida, se le añaden 2 mL HCl 6 M. Luego la mezcla es calentada a 100°C en un baño de agua por 15 minutos, se deja enfriar la solución y se diluye a 10 mL en un matraz aforado para realizar las determinaciones por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros. Se construyeron gráficas de calibración con patrones de 0,6, 12, 25, 50, 100, 150, y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, de selenio respectivamente.

Equipos

Para realizar la determinación de selenio en las muestras de huevo se emplearon los siguientes equipos: un espectrómetro de Absorción Atómica (AAS) Perkin – Elmer modelo A-analyst 200. Un espectrofotómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) Perkin – Elmer modelo A-analyst 600, bajo las condiciones reportadas por C.V.S Leggli y colaboradores ⁽⁷⁾.

Como fuente de radiación se utilizó una lámpara de cátodo hueco de selenio con una longitud de onda de 196 nm (Perkin–Elmer). Un liofilizador, marca LyovaC GT2. Leybold – Heraeus. Bombas peristálticas (Ismatec-Cole – Parmer, Vernon Hills, IL, USA).

Determinación de selenio con el sistema de inyección en flujo (FI)

El sistema de FI se muestra en la Figura 2. Los canales para la introducción de muestra y borohidruro de sodio consistieron en tuberías de Tygon de 1,02 mm de diámetro; mientras que para la introducción de ácido al sistema y eliminación de desechos se utilizaron tuberías de Tygon de 2,06 mm de diámetro. Se empleó un separador de fases de vidrio construido en el laboratorio.

Para la formación del hidruro se mezcló a un flujo de 3,0 mL/min el HCl (4 mol/L) con la muestra que contenía selenio en un serpentín de reacción (a) simultáneamente se añade el NaBH_4 (0,5% m/v) a un flujo de 3,0 mL/min en donde se genera el hidruro y es arrastrado con nitrógeno con un flujo de 150 mL/min al serpentín de reacción (b), seguidamente es separado

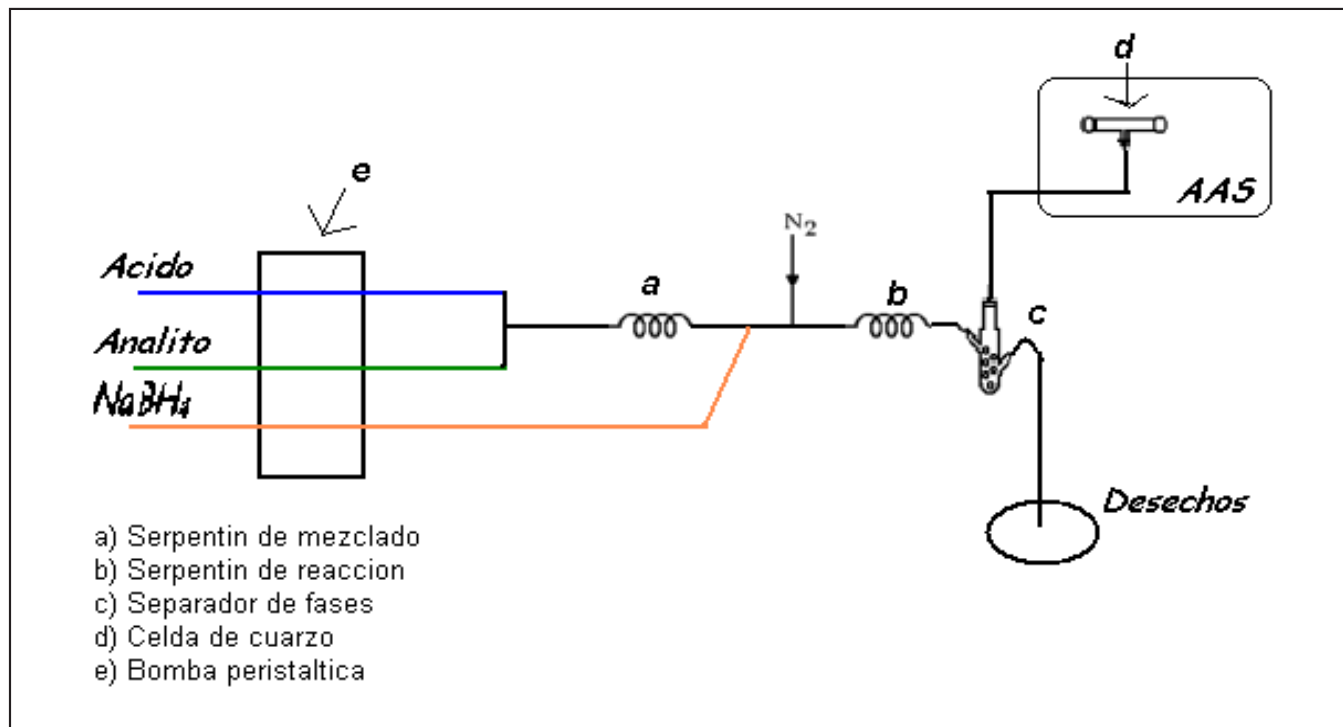


Figura 2. Diagrama de inyección en flujo utilizado para la generación de hidruros.

de la fase líquida y transportado hasta la celda de atomización con la ayuda del gas de purga (Nitrógeno).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tratamiento de la muestra (huevo completo)

En esta investigación se estudiaron dos vías de digestión una directa y otra por digestión vía seca realizando una liofilización en el huevo completo (clara y yema). Como se puede observar en la Figura 2 para la digestión directa agregar 15 ml $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ necesarios para descomponer de 5 mL de huevo homogenizado y un tiempo de 130 minutos para completar la digestión, mientras que la digestión por vía seca solo se necesitan 2 mL y 7 mL de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ respectivamente y un tiempo de 60 minutos. Esto minimiza en gran proporción el tiempo en el tratamiento de la muestra. Adicionalmente, al realizar la combinación $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HClO}_4$, se determinó que esta mezcla no permite llevar a cabo la conversión de los compuestos de selenio presentes

a selenio orgánico lo que origina una baja recuperación (88 - 92%). Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada uno de los procedimientos descritos, indica que la digestión ácida vía seca, con la mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, proporciona los mejores resultados. Por esta razón, en las experiencias a realizar a lo largo de este trabajo se tomarán estas condiciones como las óptimas.

En la Tabla 1 se resumen las condiciones optimizadas de todo el sistema para la determinación de selenio en las muestras de huevo o en forma de selenio (IV).

La optimización de las condiciones experimentales del sistema, se realizó por el método univariado. En ese sentido, para el sistema propuesto (Figura 2) se optimizaron todas aquellas variables involucradas para lograr un buen tiempo de análisis y una máxima sensibilidad. Para ello se optimizaron la concentración de ácido clorhídrico (HCl) y de borohidruro de sodio (NaBH_4), el flujo de la solución portadora y del gas portador descrito a continuación.

Tabla 1.
Condiciones Óptimas para la determinación de Selenio por Generación de Hidruros en Huevo de Gallina

Componente	Parámetro	Valor
Absorción Atómica	Longitud de onda	196 nm
	Apertura de rendija	0,7 nm
	Corriente de lámpara	16 mA
	Temperatura de la celda	900°C
	Corrector de fondo	Deuterio
Generación de Hidruros	Analito selenio Se(IV)	100 µg/L
	[solución portadora] de HCL	4 mol/L
	[NaBH ₄]	0,5% m/v
	Flujo de Nitrógeno	150 mL/min
	Flujo de muestra	3,0 mL/min
	Flujo de reductor [HCL]	3,0 mL/min
Tratamiento de la Muestra	Flujo de NaBH ₄	3,0 mL/min
	Masa de la muestra	0,5 gramos
	Volumen de HNO ₃	7 mL
	Volumen de H ₂ O ₂	7 mL
	Tiempo de digestión	60 minutos
	Temperatura de digestión	70 °C
	Volumen final de dilución	25 mL

Efecto de la concentración de HCl.

Para este estudio se evaluó la absorbancia del selenio (IV) empleando un intervalo de concentración de HCl de 1,0 a 8,0 mol L⁻¹. El efecto de la concentración de HCl que genera el hidruro, se muestra en la Figura 3(a). En esta gráfica se observa un aumento de la señal hasta una concentración de ácido de 4,0 mol L⁻¹. Posteriormente se observa un ligero decaimiento de la señal. Este comportamiento se puede explicar por el hecho de que, concentraciones de ácido menores a 3,0 mol L⁻¹ son insuficientes para generar de manera eficiente y total el hidruro de selenio (para que todo el selenio presente, sea llevado al hidruro respectivo). El decaimiento de la señal para concentraciones de ácido mayores a 6,0 mol L⁻¹, puede deberse a la dilución del hidruro generado por el exceso de hidrógeno formado a altas concentraciones de ácido. Para estudios poste-

riores se tomó como concentración óptima de ácido 4 mol L⁻¹.

Efecto de la concentración de NaBH₄.

El siguiente parámetro optimizado fue la concentración óptima de NaBH₄. La concentración del mismo se varió entre 0,05 – 1,00 % m/v manteniendo el flujo de éste constante en 3 mL/min. En la Figura 3(b), se observa un aumento en la señal a medida que la concentración del reactivo aumenta hasta 0,50 % m/v, luego de la cual la señal decae ligeramente. Este comportamiento puede ser explicado de manera análoga al comportamiento observado para el estudio anterior; concentraciones bajas de borohidruro son insuficientes para la total reducción del selenio presente al hidruro respectivo. Luego del máximo, el decaimiento puede ser explicado, tanto por dilución producida por exceso

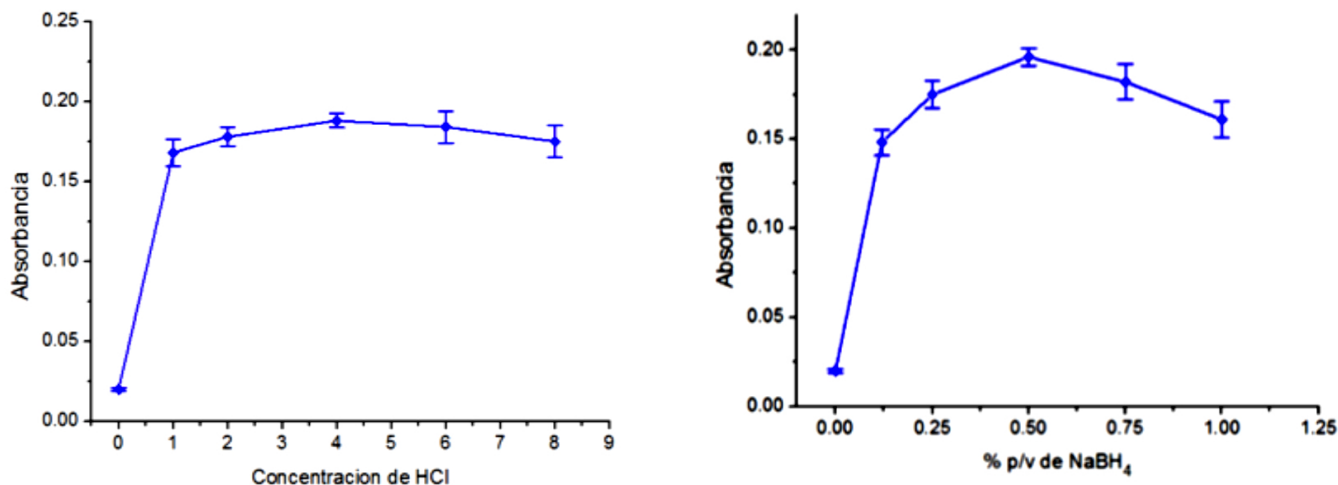


Figura 3. Estudio de la concentración de HCl (a) y NaBH₄ (b) en la generación del Hidruro

de hidrógeno formado, como por interferencia del ion BH₄⁻. Por tal razón se consideró 0,50 % m/v de NaBH₄ como la concentración óptima.

Efecto del flujo del gas portador.

El gas de arrastre no solo tiene como función el transportar el hidruro de selenio hasta el atomizador, sino que ayuda a liberar a éste del seno de la fase líquida permitiendo una separación más eficiente entre las fases. En este trabajo se varió el flujo del gas de arrastre (N₂) en el rango comprendido entre 25 y 200 mL/min. El efecto del gas portador sobre la señal analítica del selenio muestra una baja reproducibilidad para flujos del gas portador por debajo de 70 mL/min. La señal se incrementó a medida que el flujo de gas portador aumentó, hasta alcanzar un máximo alrededor de 150 mL/min en donde la reproducibilidad de la señal mejoró. Sin embargo a mayores valores de flujo la señal decae drásticamente debido a que disminuye el tiempo de residencia del analito en la celda de atomización. Se seleccionó como flujo óptimo de gas portador 150 mL/min.

Una vez optimizado los parámetros instrumentales se procedió a llevar a cabo el estudio de las muestras reales para ellos se requería obtener las mejores condiciones para llevar a cabo la etapa de extracción de los

analitos de la matriz. Tomando en cuenta que los métodos para la determinación de elementos trazas deben presentar un cuidado especial, además de tomar en cuenta las características más relevantes de la matriz, ya que, este es un sistema emulsionado naturalmente formado por componentes tales como fosfolípidos, lipoproteínas y proteínas^(7,8) que posee una alta viscosidad y un alto contenido de materia orgánica.

Para realizar la optimización de todos los parámetros instrumentales se utilizaron muestras acuosas enriquecidas con selenio (IV) a la concentración de 100 µg/L.

Validación del Método

El sistema desarrollado fue caracterizado evaluando, la sensibilidad (expresada como la pendiente de la curva de calibrado), intervalo lineal, límite de detección (expresada como la concentración que presenta una absorbancia igual a tres veces la desviación estándar de la absorbancia del blanco) y la precisión del mismo (expresada como RSD). Para determinar la exactitud del método se realizaron estudios de recuperación y la determinación de selenio en muestras de huevo.

Se construyeron gráficas de calibración con patrones de 0, 6, 12, 25, 50, 100, 150, y 200 mg L⁻¹, de selenio respectivamente, utilizando las condiciones ex-

perimentales óptimas mostrada en la Tabla 1. El sistema respondió de manera lineal ($r = 0,9966$) para las concentraciones estudiadas. Obteniéndose un límite de detección de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ y un límite de cuantificación de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$.

Adicionalmente se realizó una adición de estándar que consistió en tomar 2 mL de la muestra digerida, escogidas al azar con el fin de obtener un pool de muestra representativa con un volumen total de 25 mL, de dicho pool se tomaron 2 mL y se le adicionaron cantidades exactamente conocidas de selenio, llevándolas posteriormente a un volumen final de 10 mL, para garantizar que no había interferencia por parte de la matriz. Figura 4 Se llevó a cabo un estudio estadístico (t Student). Los resultados mostraron que no existía diferencia significativa entre las curvas de calibración y adición de estándar donde se evidencia que no existe interferencia de matriz, por lo cual se pueden evaluar las muestras de huevos a través de la curva de calibración.

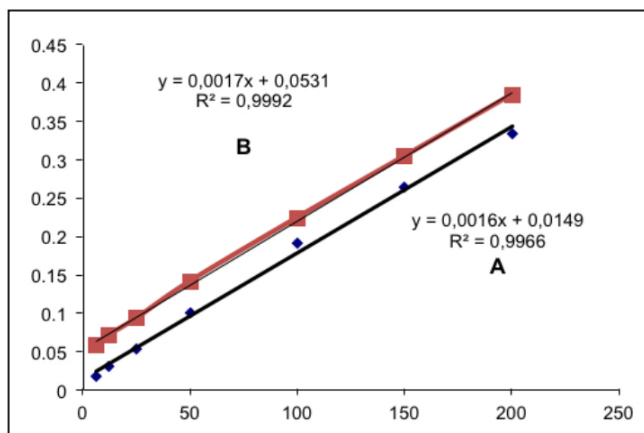


Figura 4. Curva de calibración (A) y adición estándar (B) para la determinación de selenio en huevo por HGAAS

La precisión del procedimiento en función de la concentración y expresada como RSD es de 0,82% calculada para diez medidas ($n=10$) de $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se. Los estudios de recuperación se realizaron sobre muestras de huevo (pool) a las que se le adicionaron cantidades exactamente conocidas de selenio, llevándolas posteriormente a un volumen final de 10 mL.

Dado que, los valores obtenidos para la recuperación de selenio en las diferentes muestras estudiadas, se encuentran entre el intervalo aceptable para los estudios de recuperación (97-104,4%), podemos afirmar entonces que el sistema presenta una buena exactitud.

El método desarrollado también se validó analizando las muestras reales utilizando ambos métodos (HGAAS Y ETAAS). Para ello se escogieron de forma aleatoria 12 muestras de huevo, haciendo posteriormente un gráfico de correlación de los valores obtenidos para ambos métodos. Un valor de $r^2 = 0,9942$ indica una buena correlación. Éstos fueron evaluados estadísticamente y mostraron que no existían diferencias significativas, confirmando así la exactitud de los resultados obtenidos por el método propuesto. Es importante señalar, que aunque es factible llevar a cabo el procedimiento por ambos métodos, el costo que equivale el empleo del horno de grafito, supera en gran proporción al del método desarrollado.

Comparación del Método Propuesto con otros publicados en la Literatura

Al comparar el método propuesto con otros métodos reportados en la literatura se observa que en estos últimos en la mayoría de los casos realizan la determinación de selenio por separado, es decir, primero en la yema y luego en la clara del huevo, ya que esta matriz es considerada bastante compleja, sin embargo el tratamiento de la muestra en sí es bastante tedioso ya que involucra una serie de etapas donde se consume tiempo y cantidades importantes de solventes, además de estar sujetos a errores que se ven reflejados directamente en la exactitud del método. ⁽¹⁵⁻²⁰⁾.

Caso contrario a lo expuesto en este trabajo, donde se realiza el análisis en el huevo completo con un tratamiento de muestra relativamente sencillo y donde se consumen menor cantidad de ácidos y solventes lo que minimiza en gran medida tanto el tiempo como el costo del mismo, además mejora de la sensibilidad debido a la reducción de selenio orgánico a selenio (IV).

Análisis de muestras reales

En los últimos años, se ha tratado de mejorar en gran medida la composición del huevo, fortificándolo con elementos esenciales. Entre estos se encuentra el

Se, cuya recomendación nutricional para gallinas ponedoras con fines comerciales en base a lo expuesto por el Consejo de Investigación Nacional de Estados Unidos (NRC) ⁽¹²⁾ es de 0,05 mg Se/Kg (Masa seca (MS)).

Por tal motivo, para este estudio a las gallinas se les proporcionó una dieta rica en selenio, pero con un nivel de concentración superior al reportado por el NRC. Sin embargo, esto no presentó ningún inconveniente o cambios anatómicos en las gallinas (plumaje y peso) o en la producción de huevos.

Los resultados obtenidos de selenio en muestras de huevos tomadas al inicio y luego de alimentar las gallinas con la levadura de selenio (Sel-Plex®, Alltech Inc.) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos durante la alimentación de las gallinas con Sel-Plex®

Semana	Concentración μg de Selenio/huevo
Inicio (Sin fortificar)	$7,76 \pm 1,64$
4	$14,40 \pm 2,21$
8	$41,28 \pm 6,01$
12	$62,45 \pm 12,58$
16	$67,35 \pm 14,24$

Con respecto a los estudios realizados se observó un aumento en la concentración del selenio a medida que se alimentan las gallinas con Sel-Plex® hasta la semana 12, luego tienden a estabilizarse los niveles del elemento. De esta manera se logra incrementar en gran proporción el contenido de selenio en los huevos pues este valor corresponde a 9 veces el valor obtenido para el control.

Estos resultados son superiores a los reportados en la literatura. (4-15-20) Un 62,45 de Selenio/huevo respondería a los requerimientos de Europa (55 μg) y EUA (70 μg de Selenio). Por lo tanto los huevos enriquecidos en Venezuela contribuirían a mejorar la dieta diaria de estos consumidores y se encuentran dentro

de los valores establecidos por la RDA para Venezuela⁽⁴⁾.

Esto indica que el selenio orgánico (Sel-Plex®) se transfiere al huevo más eficientemente que el Se inorgánico, lo que puede ser de especial interés alimenticio y una estrategia para aumentar la ingesta de selenio en las poblaciones con deficiencia de este. Por lo tanto, se considera que el Selenio orgánico es el ideal para suplementos alimenticios y que el (Sel-Plex®) cumple con dichos requerimientos.

CONCLUSIONES

El método desarrollado, permitió evaluar el selenio en los niveles de concentración encontrados en la matriz estudiada. El procedimiento de mineralización favoreció la adecuada disolución de la muestra, evitando pérdida y contaminación de la misma.

Se comprobó que no había efecto matriz, por lo que las muestras de huevo pueden ser evaluadas con una curva de calibración preparada a partir de estándares acuosos de los analitos. Adicionalmente, la sensibilidad y precisión alcanzada en el método propuesto así como la alta frecuencia de análisis hace que pueda ser utilizado como un método de rutina para estudios de alimentos fortificados.

Los resultados obtenidos fueron validados también empleando espectroscopia de atomización electrotrémica (ETAAS). Dichos valores fueron evaluados estadísticamente y mostraron que no existen diferencias significativas entre ambos métodos, confirmando así la exactitud y veracidad de los resultados obtenidos por el método propuesto. Además, el instrumental del sistema generación de hidruro no es muy costoso y adicionalmente su uso disminuye el consumo de reactivos por lo que se reduce significativamente el costo del análisis. Nuestros resultados indicaron que la inclusión de selenio orgánico en la dieta de gallinas aumento significativamente en el huevo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Creación, Producción, Promoción y Divulgación de Saberes de la Universidad Experimental Sur del Lago "Jesús María Semprum". Al Proyecto Selenio. Al Laboratorio de Espectroscopia

Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Demirezen D, Uruç . Comparative study of trace elements in certain fish, meat and mead products. *Meat science*. 2006; (74): 255-260
- (2) Manjuscha K Dash, D Karunasagar. UV-Photolysis assisted digestion of food sample for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry(ETAAS). *Food Chemistry*. 2007; (1): 260-265
- (3) Bohrer D, Becker E, Do Nascimento C. Comparison of graphite furnace and hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of selenium status in chicken meat. *Food Chemistry*. 2007; (2): 868-875.
- (4) Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Instituto Nacional de Nutrición. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población Venezolana. Revisión 2000. Serie Cuadernos Azules. Número 53. Caracas: Editorial Texto CA; 2000.
- (5) Weiss W P. Selenium nutrition of dairy cows: Comparing responses to organic and inorganic selenium forms In: *Nutritional Technology in the feed and food Industries. Proceedings of Alltech's 19th Annual Symposium*, Ed. by Lyons T.P. and Jacques. p. 333-343
- (6) Alzate A, Cañas B, Pérez-Munguía S, Hernández-Mendoza H, Pérez-Conde C, Gutiérrez AM, Cámara C. Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS. *Journal Agricultural Food Chem*. 2007; 28;55(24):9776-9783.
- (7) Ilegli CVS, Bohrer D, Noremberg S, do Nascimento PC, de Carvalho LM, Vieira SL, Reis RN. "Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 2009; (64): 605-609.
- (8) Hart DJ, Fairweather-Tait SJ, Broadley MR, Dickinson Foot SJ, Knott I, McGrath SP. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*. 2011; (126) 1771-1778.
- (9) Surai PF, Fisinin VI. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. 2014; (191): 1-15.
- (10) Tuzen M, Soylak M. Determination of trace metals canned fish marketed in Turkey *Food Chemistry*. 2007; (101): 1378-1382.
- (11) Bohrer D, Becker E, Cicero do Nascimento P, Dessuy M, Machado de Carvalho L. Comparison of graphite furnace and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of selenium status in chicken meat *Food Chemistry*. 2006. En revision.
- (12) Pappa E, Pappas A, Surai P. Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake *Science of the Total Environment*. 2006; (372): 100-108.
- (13) Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius D. Metabolism of hydrogen peroxide in insoluble hepatocytes: Relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenous and generated H₂O₂" *Archives of Biochemistry and Biophysics*; (210): 505- 516.
- (14) Surai Peter. *Selenium in Nutrition and Health* Nottingham: Nottingham University Press; 2006
- (15) Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view" *Nutrition Reviews*. 1996; (52): 253-265.
- (16) Hart DJ, Fairweather-Tait SJ, Broadley MR, Dickinson SJ, Foot I, Knott P, McGrath SP, Mowat H, Norman K, Scott PR, Stroud JL, Tucker M, White PJ, Zhao FJ, Hurst R. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*. 2011; (126) 4, 15: 1771-1778.
- (17) Navarro-Alarcón M, López Martínez MC. Essentiality of selenium in the human body: Relationship with different diseases. *The science of the total environment*. 2000; (249): 347-371.
- (18) Nakamuro Katsuhiko, Okuno Tomofuni, Hasegawa Tatsuya. Metabolism of selenoaminoacids and contribution of selenium methylation to their toxicity. *Journal of Health Source*. 2000; 46 (6): 418-421.
- (19) Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. *The National Academy of Science*; 2000.
- (20) Montel Ruiz de Alda A, López Colon JL, de Prádena y Lobón JM. Metodología recomendada para la determinación de selenio en especímenes biológicos. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología" Molecular. Comité Científico. Comisión de Elementos Traza*; 2000.

Recibido: 02 de Julio de 2014 / Aprobado: 11 de noviembre de 2014