

## Determinación fluorimétrica de selenio. Estudios séricos en un grupo de población

J.A. Cocho, C. Parrado, J.R. Cervilla, J.R. Alonso-Fernández y J.M. Fraga

*Se estudió la concentración de selenio en suero con una técnica fluorimétrica. Después de la destrucción de la materia orgánica las muestras fueron tratadas con 2,3 diaminonaftaleno (DAN). El complejo piazoselenol formado se extrajo con ciclohexano y se midió la fluorescencia a 520 nm con excitación a 370 nm.*

*Usando esta técnica se midieron los niveles de selenio en 89 muestras de suero de niños escolares. El valor medio de concentración de selenio en suero encontrado en niños gallegos fue de 0,72 (DE = 0,20)  $\mu\text{mol/l}$ .*

*The selenium concentration of serum with a fluorimetric techniques was measured. After digestion, the samples were treated with 2,3 diaminonaftaleno (DAN). The complex piazoselenol was extracted with cyclohexane and the fluorescence measured at 520 nm. with excitation at 370 nm.*

*Using this technique the selenium levels in 89 serum samples of school children was measured. We found a mean selenium concentration in the serum of children of 0,72 (SD = 0,20)  $\mu\text{mol/l}$ .*

### Introducción

Se sabe que el selenio es un elemento esencial para numerosas especies de mamíferos a partir del primer trabajo de Schwarz en 1957 (1).

Así mismo, desde 1973 se sabe que el selenio es parte integrante de la gluatión peroxidasa (2) que posee 4 átomos de selenio por mol y cuya función más importante es la degradación de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno.

Se conocen otras funciones del selenio en el organismo aunque la más divulgada es su papel como desintoxicador disminuyendo la toxicidad de metales pesados como el cadmio y el mercurio (3). Sin embargo hasta 1979 no fue descrita una relación entre niveles bajos de selenio, como consecuencia de una deprivación ambien-

tal y el padecimiento de una miocardiopatía (4). Este hecho afectaba a un 1,1% de los niños de un área de población china. Posteriormente se han observado casos individuales en Europa que han sido publicados en 1981 (5).

Puesto que la deficiencia de selenio no acarrea síntomas específicos en el hombre y que, además, el habitat es el único y principal condicionante de la ingesta de selenio, se hace necesario disponer de datos acerca de los niveles de selenio en los líquidos biológicos, en la población en general y en la infantil.

Con este fin se ha valorado los métodos para la determinación de selenio descritos en la literatura y seleccionado uno. Con él se ha hecho un estudio de los niveles de selenio en suero en un grupo de población escolar de Galicia.

### Material y métodos

Se ha seleccionado la técnica fluorimétrica propuesta por el Comité de Métodos Analíticos de la Royal Che-

Laboratorio de Alteraciones Metabólico-Genéticas y Nutricionales.  
Departamento de Pediatría. Hospital General de Galicia.  
Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.  
Apartado 149. Santiago de Compostela.

**Tabla I**

**Determinación Fluorimétrica de selenio en suero**

1. Destrucción de la materia orgánica
  - \* 0,3 ml. suero + 1 ml. ac. nítrico y ac. perclórico 1:1
  - \* 30 minutos a 150 °C
  - \* 90 minutos a 190 °C
  - \* 120 minutos a 210°C
  - \* 0,5 ml. ac. clorhídrico 6M
2. Reducción de selenato a selenito
  - \* Se añade 2 ml. de AEDT + NH<sub>4</sub>OH
  - \* 130° C hasta tener pH 1-2
  - \* Toda la noche a temperatura ambiente
3. Formación del complejo piazoselenol y medición
  - \* Añadir 0,5 ml. de DAN (4 g/l)
  - \* Incubar a 40 °C durante 30 minutos
  - \* Extracción con ciclohexano
  - \* Medida de la fluorescencia de la fase orgánica a 520 nm. con excitación a 370 nm.

mical Society (6), según la modificación descrita por Lalonde (8) para líquidos biológicos. A este método se ha introducido ligeras modificaciones que se describen más adelante.

El método se basa en medir la fluorescencia del complejo piazoselenol formado con el selenio por el 2-3 diaminonaftaleno (DAN).

**Instrumentación**

- Espectrofluorímetro Hitachi-Perkin Elmer, modelo 204
- Bloque calefactor para tubos termostatizados Selecta
- Agitador "vortex" Hecima
- Micropipetas automáticas de diversos volúmenes Nichiryo

**Reactivos**

- Acido nítrico "suprapur", Merck 441
- Acido perclórico "suprapur", Merck 517
- Acido clorhídrico "suprapur", Merck 318
- Amoníaco "suprapur", Merck 5428
- Ciclohexano "Uvasol", Merck 2828
- Patrón de selenio, 1 g/l, Merck, Titrisol 9915
- DAN, pureza superior al 99%, Sigma D-2757
- AEDT, Merck 8418
- Púrpura de bromocresol, Merck 3025
- Agua calidad "Reactivo" obtenida por sistema Milli-Q de Millipore

**Procedimiento**

En la Tabla I se muestran los sucesivos pasos seguidos en las tres etapas: destrucción de la materia orgánica, reducción de selenato a selenito y formación del complejo

**Tabla II**

**Estudio de precisión y exactitud de los resultados en la determinación de selenio en suero**

	N	X μmol/l	DE μmol/l	CV %
Intradía	14	0,54	0,03	5,4
Interdía	22	0,91	0,07	7,5

Recuperación: 96-104%

piazoselenol con posterior medición fluorimétrica, las modificaciones introducidas en el método original.

El calibrado se realizó mediante el método de adición de patrones, incluyéndose en cada experiencia dos blancos. El método es lineal hasta 5 μmol/l. Se calibró con concentraciones añadidas de 0,63; 1,27 y 2,53 μmol/l. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

**Población estudiada:**

Se ha determinado el nivel de selenio en suero de 89 niños cuyas edades estaban comprendidas entre 6 y 17 años. De ellos 47 son niñas y 42 niños, procedentes de distintos centros de la región gallega.

Se extrajeron 2 ml. de sangre venosa que fueron recogidos en tubos de polietileno previamente tratados en ácido nítrico al 10% durante 48 horas. El suero, una vez separado, se guardó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

**Métodos estadísticos**

El estudio comparativo de diferencia entre medias de los distintos grupos se hizo mediante el test t de Student, ya que la concentración de selenio en suero tiene una distribución normal (P>0,05).

**Resultados**

Con el fin de establecer las limitaciones del método y observar como afectaban los resultados se realizó un estudio de precisión y de exactitud del método, cuyos resultados más importantes se indican en la Tabla II.

Se realizó un control intra-día, determinando selenio en 14 muestras iguales obteniéndose un coeficiente de variación del 5,4%.

Así mismo, con las sucesivas experiencias se realizó un control de los resultados inter-día haciendo el calibrado por adición de patrones acuosos siempre sobre un mismo "pool" de sueros preparados para ello. El coeficiente de variación inter-día resultante a lo largo de 22 experiencias fue del 7,5%.

En cuanto a precisión el porcentaje de recuperación del método para las distintas adiciones osciló entre el 94 y el 104%.

En la Tabla III se muestran las concentraciones medias de selenio en suero de los 19 niños divididos en dos

**Tabla III**

**Selenio en suero de niños en edad escolar  
(Valores en  $\mu\text{mol/l}$ )**

Edad (años)	N	X	DE	Intervalo Referencia
6 a 10	46	0,72	0,19	(0,34-1,10)
> 10	43	0,71	0,22	(0,27-1,15)
Total	89	0,72	0,20	(0,32-1,12)

grupos de edad: hasta 10 años y mayores de 10 años. Así mismo, se muestran los resultados globales: una media de  $0,72 \mu\text{mol/l}$  con una desviación estándar de  $0,20 \mu\text{mol/l}$ . El intervalo de referencia con un nivel de confianza del 95% es:  $0,32$  a  $1,12 \mu\text{mol/l}$ .

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $0,45 > p > 0,40$ ) entre los grupos de edad descritos en la Tabla III.

Así mismo, no se hallaron diferencia estadísticamente significativa en los niveles de selenio según el sexo ( $0,25 > p > 0,20$ ).

**Discusión**

Los métodos fluorimétricos y de espectrofotometría de absorción atómica (EAA) han sido recientemente propuestos por el Comité de Métodos Analíticos de la Royal Chemical Society (6). En un reciente trabajo publicado por Kumpulainen (7) sobre los resultados de un programa interlaboratorio para la determinación de selenio en suero entre distintos laboratorios de Estados Unidos y Finlandia aparecen unos resultados que reflejan una desviación estándar respecto a la media de un 10% en el caso de las técnicas fluorimétricas, un 35% para el caso de EAA con generación de hidruros y un 6% en el caso de EAA con cámara de grafito. Sin embargo, la cámara de grafito, además de hacer más costosos los análisis, presenta problemas con el sistema de corrección de fondo solamente soslayados de forma óptima con los modernos aparatos dotados de sistema Zeeman de corrección de fondo.

En consecuencia, en la literatura aparecen numerosos trabajos que emplean técnicas fluorimétricas, debido a la fiabilidad de los resultados, pese a ser técnicas laboriosas y a no permitir un análisis multielemental.

Para la determinación del status del selenio se pueden considerar diferente especímenes como indicadores. En 1974 Griffith y Thomson (9) mostraron que el contenido en la sangre total podía ser un indicador del nivel de selenio en el organismo. Los denominados como "valores normales" en sangre total muestran grandes variaciones geográficas dependiendo de la ingesta; en la Tabla IV aparecen los niveles de selenio en sangre total procedentes de distintas regiones, usados ampliamente como indicadores del selenio. Sin embargo, este valor es reflejo de los niveles tisulares solamente cuando éstos

**Tabla IV**

**Concentración de selenio en sangre total,  
en la población de distintos países**

País	Se $\mu\text{mol/l}$	Referencia
Nueva Zelanda	0,86	Griffith 1974 (9)
Finlandia	1,10	Westermarck 1977 (10)
Alemania	1,29	Lombeck 1977 (11)
Canadá	2,30	Dickson 1967 (12)
Estados Unidos	2,60	Allaway 1968 (13)
Venezuela (areas seleníferas)	12,65	Mondragón 1976 (14)

son anormales, pues cuando los niveles en sangre alcanzan un nivel adecuado ya no se elevan con incrementos en la dieta hasta alcanzar un nivel tóxico (15). El valor al que parecen estar reguladas las concentraciones de selenio en sangre es de  $2,5 \mu\text{mol/l}$ , aproximadamente. La sangre total a niveles por debajo de la toxicidad crónica, pues, más útil como indicador.

Se han sugerido otros indicadores como la cantidad del selenio en cabello, orina, o la medición de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Otros estudios en seres humanos sugieren que los niveles de selenio en suero son indicadores válidos, incluso mejores que en sangre total, por encontrarse bajo control homeostático (16).

Otros autores sugieren combinar, en una segunda etapa, la concentración de selenio en suero con otro indicador biológico (cabello, orina, etc.).

A la vista de la literatura consultada se ha seleccionado el uso del suero para valorar el contenido en selenio en el grupo de población objeto de estudio, por parecer el mejor indicador de los cambios en la ingesta de selenio en períodos cortos de tiempo. Los cambios en el otro posible indicador válido, la actividad glutatión peroxidasa, sólo se reflejarán con rapidez (1-3 semanas) en los casos de pacientes con déficit de selenio, cuando se les suplementa la dieta (17,18). En la población sana los cambios en la actividad de la enzima solo se reflejarán a más largo plazo, superior a tres meses, o incluso pueden pasar desapercibidos (17,18,19).

Aparte de otras causas, las variaciones del contenido de selenio en suero muestran una clara relación con la edad (20,11) como se ve en la Tabla V. Nosotros sin embargo no hemos encontrado diferencias entre los dos grupos de población escolar que hemos establecido en la Tabla III. Los valores en suero en Galicia son al nacer  $0,51 \mu\text{mol/l}$  (20) y en edad escolar se ha obtenido  $0,72 \mu\text{mol/l}$ . Estas diferencias son aún mayores en los niños alemanes (11) debido quizás a que el aporte mayor de selenio favorezca una mayor diferenciación entre los distintos grupos de edad.

La concentración media obtenida,  $0,72 \mu\text{mol/l}$ , es de los más bajos que aparecen en la literatura (21), incluso dentro de áreas no seleníferas, pero no es indicativo de

**Tabla V**

**Comparación de los niveles séricos de selenio en niños, hallados en Galicia (13) y en Alemania (12) (Valores en  $\mu\text{mol/l}$ )**

Edad	$\bar{X}$ Alemania	$\bar{X}$ Galicia
Neonatos	0,63	0,51
1-6 meses	0,43	—
6-12 meses	0,73	—
1-5 años	1,04	—
Escolares	1,16	0,72

un déficit de selenio. En la literatura aparecen valores entre 0,50 y 2,40  $\mu\text{mol/l}$  (21) establecidos como normales en distintas poblaciones que no sufren déficit de selenio.

**Agradecimientos:**

Al Dr. JM Paz del Laboratorio Central del Hospital General de Galicia.

**Bibliografía**

1) Schwarz K, Foltz OM., Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Amer Chem Soc* 1957; 79: 3292.  
 2) Rotruck Jt, Pope Al, et al. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179:588-590.

3) Hill CH. Reversal of selenium toxicity in chicks by Hg, Cu and Cd *J Nutr* 1974; 104:593-598.  
 4) Editorial. Selenium in the heart of China. *Lancet* 1979; 889-890.  
 5) Collipp PJ, Chen SY. Cardiomyopathy and selenium deficiency in a two-year-old girl. *N Engl J Med* 1981; 304: 1304-1305.  
 6) Analytical Methods Committee, Royal Chemical Society. Determination of small amount of selenium in organic matter. *Analyst* 1979; 104:778-787.  
 7) Kumpulainen J, Koivistonen P. Interlaboratory comparison of selenium levels in human serum. *Kenia-Kemi* 1981; 6:372-373.  
 8) Lalonde L, Jean J, Roberts KD, Chapdelaine A, Bleau G. Fluorimetry of selenium in serum or urine. *Clin Chem* 1982; 28:172-174.  
 9) Griffith NM, Thomson CD. Selenium in whole blood of New Zealand residents. *New Z J Med* 1974; 80:199-202.  
 10) Westermarck T, Raunu P, Kirjarinta M, Lappalainen L. Selenium content of whole blood and serum in adults children of different ages from different parts of Finland. *Acta Pharmacol Toxicol* 1977; 40:465.  
 11) Lombeck I, Kasperek K, Harbisch HD, Feinendegen LE, Bremer HJ. The selenium state of Healthy Children. *Europ J Pediat* 1977; 125:81-88.  
 12) Dickson RC, Tomlinson RH. Selenium in blood and human tissues. *Clin Chim Acta* 1967; 16:311.  
 13) Allaway WH, Kubota J, Losee F, Roth M. Selenium, molybdenum and vanadium in human blood. *Arch Environ Health* 1968; 16:342.  
 14) Mondragon MC, Jaffe WG. The ingestion of selenium in Caracas compared with other cities. *Arch Latinoam Nutr* 1967; 26:343.  
 15) Valentine JL, Kang HK, Spivey GH. Selenium levels in human blood, urine and hair in response to exposure via drinking water. *Environ Res* 1978; 17:347-355.  
 16) Burk RF. Selenium in man. En: Prasad AS y Oberleas D eds. Trace Elements in human health and disease. Essential and Toxic Elements, vol. 2 New York: Academic Press, 1976.  
 17) Lombeck I, Menzel H, Steiner G, Kasperek K. Selenium supplementation: Plasma glutathione peroxidase and indicator of selenium intake. *Klin Pädiat* 1982; 194:303-305.  
 18) Steiner G, Menzel H, Lombeck I, Ohnesorge FK, Bremer HJ. Plasma Glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state. *J Pediatr* 1982; 138:138-140.  
 19) Hoekstra WG. Glutathione peroxidase activity of animal tissue as an index of selenium status. En: Hemphill DD, ed.: Trace substances in environmental health. Columbia: University of Missouri, 1975; 331.  
 20) Fraga JM, Cocho JA, Alvela M, Alonso JR, Peña J, Tojo R. Selenium state of children. The selenium content of the serum of normal children and children with inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 1983; 6 (supp 2): 99-100.  
 21) Versiek J, Cornelis R. Normal levels of the trace elements in human blood plasma or serum. *Anal Chim Acta* 1980; 116:217-254.