



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

METODOS DE SEPARACION PARA EL ANALISIS QUIMICO
Y EL DESARROLLO TECNOLÓGICO:

"DESARROLLO Y OPTIMIZACION DE LOS METODOS DE
DIGESTION ACIDA EN HORNO DE MICROONDAS PARA
LA CUANTIFICACION DE SELENIO EN MUESTRAS
BIOLOGICAS"

INFORME DE SERVICIO SOCIAL-TITULACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA GLEASON HUERTA

ASESORA:
DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

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:

El Informe de Servicio Social: Métodos de separación para el Análisis Químico y el Desarrollo Tecnológico: " Desarrollo y Optimización de los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas para la Cuantificación de Selenio en Muestras Biológicas".

que presenta la pasante: María Eugenia Gleason Huerta
 con número de cuenta: 9660575-4 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 HABLARÁ EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2003.

PRESIDENTE	QFB. Delia Reyes Jaramillo	<u>Delia Reyes J.</u>
VOCAL	QFB. Marina L. Morales Galicia	<u>Marina L. Morales Galicia</u>
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vazquez	<u>Alma Luisa Revilla Vazquez</u>
PRIMER SUPLENTE	QFB. Juan Chiu Chan	<u>Juan Chiu Chan</u>
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. Adriana Morales Pérez	<u>Adriana Morales Pérez</u>

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ayudarme a pensar, crecer, demostrar lo que puedo hacer y permitirme vivir en compañía de los que amo.

A mis Padres (Samuel y Concepción) por el cariño, confianza, consejos y apoyo que me han brindado para realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida y sobre todo de cuidar mi más grande tesoro, no tengo como pagarles todo lo que han hecho por mí, los quiero y los admiro mucho.

A mis Hermanos (Mauricio, Samuel, Francisco) por su apoyo incondicional, consejos y cariño, a mis cuñadas (Arelí, María) y sobrinos (Saúl, Luis Mauricio y Samuel).

A mis abuelitas (Francisca) por su cariño y ternura, sobre todo a mi abuelita Consuelito (†) por sus consejos, regaños, confianza y darme ánimos para terminar la carrera y titularme.

A mis Suegros (Marco Antonio y Lourdes) por su apoyo incondicional y confianza que depositaron en mí, a Alex y José Antonio por su amistad.

A mi Esposo por su apoyo incondicional, su amistad, amor y comprensión que me ha brindado durante todo el tiempo que llevamos juntos. Te amo Flaco (Tony).

A Daniel hijo de mi vida por iluminar mi vida, llenarla de alegría y por enseñarme a seguir adelante te amo mucho.

A mi tía Maria Eugenia por su ejemplo de salir adelante y demostrar que lo que uno se propone se puede lograr con esfuerzo y dedicación.

A mi asesora de tesis Dra. Alma Luisa por su confianza y tiempo que me brindó para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Raquel López Arellano por su colaboración en este trabajo, consejos, recomendaciones y por su amistad.

A mis sinodales por el tiempo que dedicaron en revisar este trabajo y sus consejos.

A la Dra. Sara Valdez por su amistad durante todo este tiempo y por ser un ejemplo a seguir.

A Elivet y Cecilia por su amistad, consejos, regaños y sobre todo por que siempre han estado siempre a mi lado apoyándome en todo momento, las quiero mucho.

A Pili, Judit y Gabby por involucrarme en este trabajo y su amistad.

Luz, y Nancy por compartir buenos ratos y consejos durante todo este tiempo que hemos compartido.

A Fernando Nonato por su colaboración en este trabajo, tiempo y amistad.

A toda la Generación 23 y 23 ½.

A la UNAM (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan) por darme la oportunidad de formar parte de ella y a todos los profesores que colaboraron en mi formación académica.

INDICE

	Páginas
Objetivos.	I
Introducción	III
1.- Marco Teórico.	1
1.1.- Enfermedades comunes por deficiencia de selenio.	2
1.2.- Antecedentes.	4
1.3.- Conceptos teóricos de microondas.	5
1.4.- Descripción del equipo de microondas.	9
1.5.- Generalidades de espectrofotometría de absorción atómica	12
2.- Parte Experimental	17
2.1.- Equipos, Material y Reactivos	18
2.2.- Tratamiento de las muestras	20
2.3.- Método de cuantificación	25
3.- Resultados y Análisis	27
3.1.- Resultados Experimentales de Plasma	28
3.2.- Resultados Experimentales de Leche	40
4.- Conclusiones	49
5.- Bibliografía	51
6.- Anexos	54

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar y optimizar las condiciones empleadas en los métodos de digestión ácida en horno de microondas para la cuantificación de Selenio en muestras biológicas de plasma y leche de ganado vacuno.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Seleccionar las condiciones óptimas de la digestión ácida en horno de microondas para el tratamiento de plasma y leche liberando el selenio presente en las muestras y eliminando completamente la materia orgánica.
- Comprobar el porcentaje de selenio recuperado cuantificado en plasma y leche como placebos cargados (fortificadas) para la optimización de los métodos de digestión ácida en horno de microondas.
- Cuantificar selenio en plasma y leche de ganado vacuno tratado (bolo de selenio), para comprobar la eficiencia de los métodos.
- Comparar la optimización por pasos y mediante diseño experimental a fin de establecer las ventajas y desventajas de ambos métodos.

OBJETIVO ACADÉMICO:

Desarrollar y optimizar la digestión ácida para leche y plasma utilizando el horno de microondas con la finalidad de establecer las condiciones adecuadas para la preparación de muestras biológicas con el propósito de proveer información a futuro acerca de la biodisponibilidad del selenio.

OBJETIVO SOCIAL:

Establecer las condiciones adecuadas de los métodos de digestión ácida en horno de microondas para tratar las muestras biológicas facilitando la cuantificación de selenio, proveer información a los médicos veterinarios para detectar la deficiencia de selenio en los ganados vacuno y ovino evitando y controlando la muerte de crías, mejorar la reproducción y evitar la enfermedad del músculo blanco.

HIPÓTESIS

Al desarrollar y optimizar los métodos de digestión ácida en horno de microondas se tendrán recuperaciones con alta eficiencia que se determinarán cuantificando el selenio en muestras fortificadas y biológicas.

INTRODUCCIÓN

El selenio forma parte de varios procesos metabólicos y que son indispensables para el desarrollo normal del cerebro, además, es parte importante para prevenir la enfermedad del músculo blanco, que provoca la muerte en rumiantes, tiene influencia sobre el aspecto reproductivo y resistencia a enfermedades provocadas por el estrés. La deficiencia de selenio es un problema que afecta significativamente la producción ganadera pero no es fácilmente reconocible y es confundido con enfermedades dejando muchas veces a un lado el origen del problema. (1-4).

La determinación del selenio se realiza frecuentemente por Espectrofotometría de Absorción Atómica con el sistema de atomización Generador de Hidruros (EAA-GH), ya que es un método muy sensible, en el cual se pueden analizar concentraciones pequeñas de selenio (1-100 ppb) (5-6).

Sin embargo, las muestras biológicas (plasma, leche, alimento, etc) necesitan un pre-tratamiento que asegure la destrucción de la materia orgánica y la disolución del selenio en un medio ácido. Este tratamiento debe de ser reproducible y eficiente a fin de asegurar los resultados de la posterior determinación de selenio por EAA-GH. Dado que el selenio es un metal volátil, el empleo de sistemas cerrados y horno de microondas, facilita el lograr estas metas independientemente de la complejidad de la muestra.

Realizar la digestión ácida empleando el horno de microondas no sólo reduce el tiempo de digestión, sino también tiene otros beneficios tal como: reducción en la contaminación, disminuir el uso de reactivo y muestra, así como una reducción o eliminación en la pérdida de las especies volátiles (7).

MARCO TEORICO

1.1.- Enfermedades comunes por deficiencia de selenio.

Con investigaciones de tipo bioquímico se ha observado que el selenio es uno de los elementos esenciales para los animales. La deficiencia de selenio es difícil de diagnosticar por que al parecer interfieren otros factores como vitamina E, hierro.

El selenio es indispensable para el buen funcionamiento de los músculos, del hígado, corazón, riñones y páncreas. (8).

En la tabla 1 se muestra varios problemas médicos relacionados con la deficiencia de selenio.

Tabla 1. Enfermedades relacionadas a la deficiencia de Selenio.

Enfermedades	Especies
Necrosis Hepática	Rata, conejo, cerdo, pollo
Distrofia muscular	Cerdos, vacas, ovejas
Microangiopatía	Cerdos
Diátesis exudativa	Pollos, pavos
Fibrosis pancreática	Pollos
Retención placentaria	Vacas
Enfermedad de Keshan	Hombre
Cáncer y enfermedad cardiovascular	Hombre
Enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico.	Todas las especies

Con la deficiencia de selenio se ve afectada la reproducción en todas las especies tanto en machos como en hembras, por ejemplo:

- En las aves hay una disminución en la producción de huevos e incubar.
- En los cerdos disminuye el porcentaje de concepción, disminución de tamaño de camadas y aumenta la mortalidad de lechones.
- En los rumiantes incrementa la mortalidad embrionaria y se presenta retención de la placenta después del parto. (9).

Otras enfermedades relacionadas con la deficiencia de selenio es la distrofia muscular esta enfermedad se presenta en zonas en donde el alimento solo proporciona de 20 a 30 ppb de selenio, la distrofia se puede prevenir administrando 100 ppb de selenio en forma oral o parenteral en las primeras horas de vida de la cría u ovejas preñadas.

La enfermedad del músculo blanco se le conoce también como miopatía nutricional las lesiones que se presentan es la calcificación, degeneración del músculo esquelético y del miocardio, el principal signo que se manifiesta es la debilidad muscular, también se manifiesta en la manera de caminar del animal dando un paso rígido, tieso o engarrotado, evitan el movimiento, pierden condición y mueren.

También una enfermedad común de las vacas lecheras es placenta retenida: que es la falla de la placenta fetal para separarse de las cavidades maternas por más de 12 horas después del parto. (10-12).

1.2.- Antecedentes.

Existen diferentes métodos analíticos para cuantificar selenio como:

- Kjeldahl
- Gravimetría
- Potenciométrico
- Polarografía
- Espectrofotometría de Absorción Atómica
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Electroforesis Capilar.

El método que se va a utilizar para cuantificar selenio es por espectrofotometría de absorción atómica, ya que es un método muy sensible y específico para cada elemento que se desee analizar.

Las muestras biológicas, requieren de un pretratamiento antes de ser sometidas a un análisis, ya que rara vez se analizan sin un tratamiento previo.

Sin embargo, las técnicas de disolución convencionales son lentas, laboriosas y algunas pueden ser peligrosas para el analista. Por ejemplo el calentamiento de muestras en vasijas o vasos de precipitados abiertos sobre flama o quemadores se viene utilizando desde la época de los alquimistas.

En 1860 G.L. Carius introdujo el concepto de disolución de muestras en vasos cerrados, describiendo la oxidación en ácido nítrico en un vaso de vidrio grueso sellado (tubo de Carius).

En los últimos años y con el desarrollo de la tecnología, se ha logrado el uso de las microondas como método auxiliar para la disolución de muestras. (13-14)

Con el desarrollo del radar durante la segunda guerra mundial se estimuló el crecimiento de la tecnología de las microondas. Las primeras aplicaciones fueron mostradas en alimentos.

La aplicación de la tecnología a nivel industrial se dió durante la década de los 40's utilizando las microondas en el tratamiento de carbón para eliminar azufre orgánico y otros contaminantes potenciales.

El uso de la energía del microondas como una fuente de calor en los procedimientos de calcinación fue en 1975; se describía sus aplicaciones usando vasos abiertos o cubiertos (a una presión atmosférica), para la disolución ácida de huesos, tejidos biológicos, matrices botánicas, etc.

Se han comparado diferentes técnicas con los procedimientos de digestión, dando ejemplos exitosos en muestras biológicas compatibles para la absorción atómica y espectroscopia de emisión de tal manera que se han establecido parámetros que influyen en la disolución ácida en el sistema de microondas como son temperatura y presión (13-14).

El presente trabajo tiene como finalidad desarrollar y optimizar las condiciones empleadas en los métodos de digestión ácida en horno de microondas asegurando la destrucción total de la materia orgánica presente en plasma y leche, liberando el selenio y facilitando su cuantificación por Espectrofotometría de absorción atómica

1.3.- Conceptos Teóricos de Microondas

La energía electromagnética está constituida por un campo magnético y eléctrico oscilantes que se mueven en dirección perpendicular, la energía electromagnética cubre un intervalo amplio de longitudes de onda y frecuencia. Debido a esto se clasifica en diferentes grupos: Rayos X, Ultravioleta, Visible, Infrarrojo, **microondas**, radioondas (15). La energía de las microondas es una radiación no ionizada que causa movimiento molecular por la migración de iones y rotación de dipolos, pero no causa cambios en la estructura molecular. La energía de microondas tiene un intervalo de frecuencia de 300 a 300, 000 MHz, (figura 1).

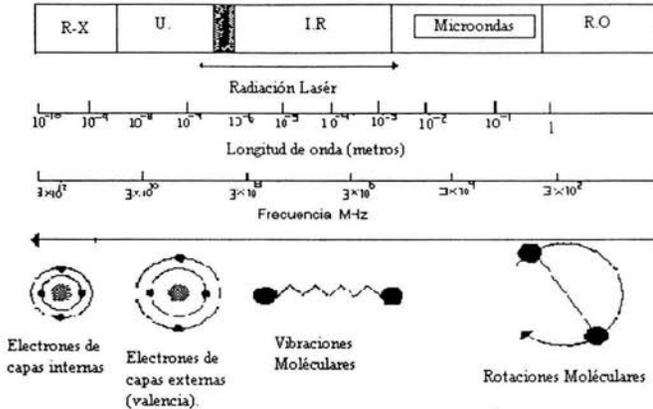


Figura 1. Espectro de la Radiación Electromagnética

La frecuencia que más se utiliza en el horno de microondas doméstico es de 2450 Mhz. El rendimiento de la energía en un sistema de microondas es de 600 – 700 W. En 5 minutos, aproximadamente 43,000 calorías se proporcionan a la cavidad del microondas para el calentamiento de la muestra.

Pérdida Dieléctrica.

El modelo de un proceso de calentamiento de una muestra sometida a calor con energía de microondas depende, en parte, al factor de dispersión de la muestra que se denomina $\tan \delta$, donde la proporción de la pérdida dieléctrica de una muestra se le nombra E'' , y a la constante dieléctrica E' .

$$\tan \delta = E'' / E'$$

La constante dieléctrica es la medida de la habilidad de una muestra para obstruir la energía de microondas que atraviesa y la pérdida factorizada de la energía dispersa. La palabra “pérdida” se usa para indicar la cantidad de energía de microondas de entrada que se pierde al dispersarse como calor que puede darse a través de 2 mecanismos:

Conducción iónica y rotación dipolar a continuación se describen brevemente dichos mecanismos.

Conducción Iónica: Es la migración de iones disueltos en el campo electromagnético aplicado. Esta migración iónica es un flujo de corriente que produce la pérdida de calor debido a la resistencia al flujo del ion. Todos los iones en una solución contribuyen al proceso de la conducción. (Figura 2).

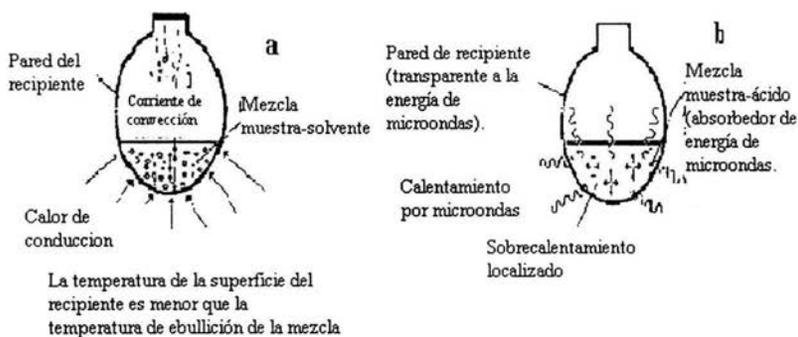


Figura 2. a) esquema del calentamiento de una muestra por conducción, b) esquema del calentamiento de una muestra con microondas.

Rotación Dipolar: Es la alineación de las moléculas debido al campo eléctrico, en donde las moléculas tienen momentos dipolares permanentes o inducidos. La rotación dipolar se ilustra en la figura 3.

Interacción del campo eléctrico de las microondas con la molécula de agua

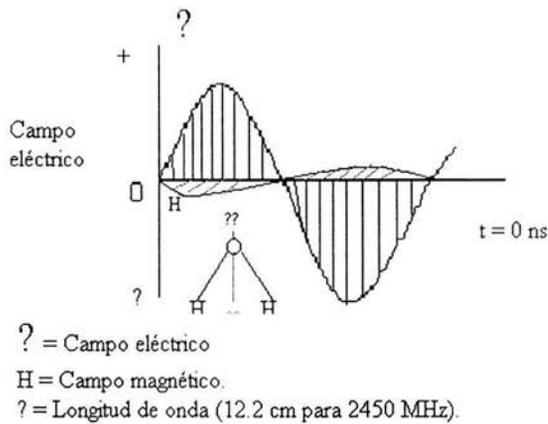


Figura 3. Esquema del momento dipolar del agua cuando se alinea con un campo eléctrico.

Cuando el campo eléctrico de la energía de microonda incrementa, las moléculas polarizadas se alinean (figura 4). Cuando decrece el campo eléctrico, el desorden inducido se restaura (figura 5). Sin embargo, la eficacia de calentar por rotación dipolar depende de las características de la muestra: tiempo de relajación dieléctrica, temperatura y viscosidad.

Interacción del campo eléctrico de las microondas con la molécula de agua

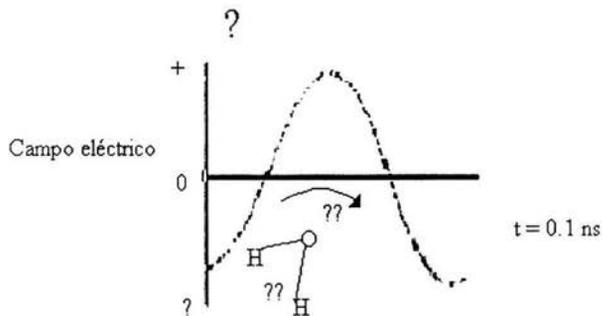


Figura 4. Esquema del momento dipolar donde el agua gira en un intento de seguir el campo eléctrico.

Interacción del campo eléctrico de las microondas con la molécula de agua

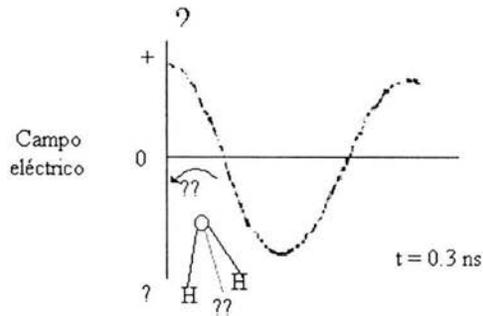


Figura. 5. Esquema del momento dipolar del agua gira en dirección opuesta tratando de alinearse con un campo eléctrico.

La contribución de estos dos mecanismos de calentamiento depende de la movilidad, concentración de iones y disminución de tiempo de calentamiento de la muestra. Si la movilidad y la concentración de iones en la muestra son bajas, el calentamiento de la muestra será dominado por la rotación dipolar. Y si la movilidad y concentración de iones son incrementados el calentamiento de la muestra es dominado por la conducción iónica.

El tiempo de calentamiento depende del sistema de microondas, del tamaño de la muestra y no solamente de la absorptividad dieléctrica de la muestra como se solía pensar.

1.4 Descripción del Equipo de Microondas.

El horno de microondas típico usado para calentar las muestras analíticas esta formado por seis componentes: 1 magnetrón (generador de microondas), 2 guía de onda, 3 cavidad de microonda, 4 agitador, 5 diseminador, 6 plataforma giratoria.

La energía de microonda se produce en el magnetrón, la cual se propaga por la guía de onda, que se inyecta directamente en la cavidad del microonda donde el agitador distribuye la energía entrante en varias direcciones. (figura 6).

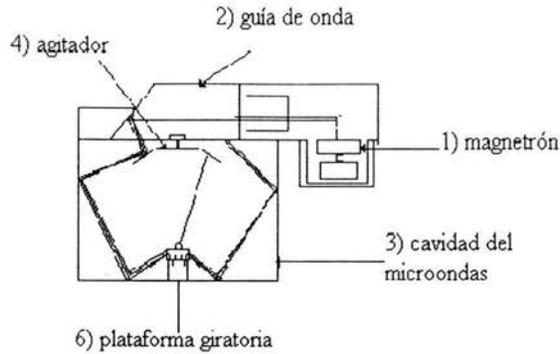


Figura 6. Esquema de la cavidad del microonda, guía de onda, y magnetrón.

El magnetrón está constituido por un diodo cilíndrico con un ánodo y cátodo. Sobrepuesto en el diodo está un campo magnético que es alineado con el cátodo. Un anillo de cavidades resonantes que se encuentra en el ánodo, el cual posee energía de varios volts y es alcanzado a través del diodo, los electrones liberados bajo la influencia del campo magnético resuenan y el magnetrón oscila. (figura 7)

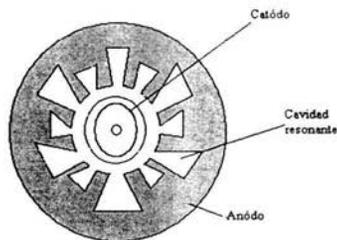


Figura 7. Esquema del magnetrón "Diodo"

Las oscilaciones se diseñan para liberar energía de las microondas a una frecuencia de rendimiento de 2450 ± 13 MHz, el magnetrón recibe aproximadamente 1200 W de la línea de poder eléctrica que se convierte a 600 W de energía electromagnética, la energía restante se convierte en calor el cual debe ser disipado por un flujo de aire frío

Guía de onda: Las ondas de microondas producidas por el magnetrón se dirigen por la guía y estas se construyen de materiales reflexivos como metal.

Agitador: Ayuda a distribuir la energía que entra por la guía de onda para que el calentamiento de la muestra sea más independiente de la posición.

Cavidad del horno de microondas: Es el lugar en donde se reflejan repetidamente las microondas que entran de pared a pared. (Figura 8)(14).

Plataforma giratoria: Este tipo de sistema se utiliza para poder girar los vasos durante la digestión, lo que hace que la energía de microondas sea igual para todos los sistemas.



Figura 8. Esquema del Horno de microondas

1.5 Generalidades de Espectrofotometría de Absorción Atómica

La Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) ha sido el método más utilizado durante casi medio siglo para la determinación de elementos en muestras analíticas. Al instrumento utilizado para medir la absorbancia de átomos libres se le conoce como espectrofotómetro de absorción atómica. Este equipo de absorción atómica consta de las siguientes unidades fundamentales: Fuente de radiación, atomizador, monocromador, detector y registrador. (15)

En la espectroscopia analítica se utilizan dos tipos de fuentes de radiación: continua y de línea, por ejemplo fuentes de radiación continua se pueden mencionar las lámparas de Tungsteno, Deuterio y el arco de Xenón, y como fuentes de líneas, las lámparas de cátodo hueco, lámparas de descarga sin electrodos, vapor de sodio y láser.

Las lámparas de cátodo hueco son más utilizadas ya que son específicas para cada elemento, requieren poco mantenimiento, son estables, simples, durables y relativamente económicas.

Las lámparas de cátodo hueco consisten en un ánodo de wolframio y un cátodo cilíndrico cerrado herméticamente en un tubo de vidrio lleno con neón o argón a una presión de 1 a 5 torr. Cuando se aplica un potencial del orden de 300 V entre los electrodos se produce la ionización del gas inerte, lo que da lugar a una corriente de aproximadamente 5 a 15 mA al tiempo que los iones y electrones migran hacia los electrodos produciendo la ionización del gas. (figura 9)

Las lámparas de metales volátiles tales como el Arsénico, Selenio y Mercurio, envejecen más rápidamente y las de metales no volátiles duran un poco más.(16)

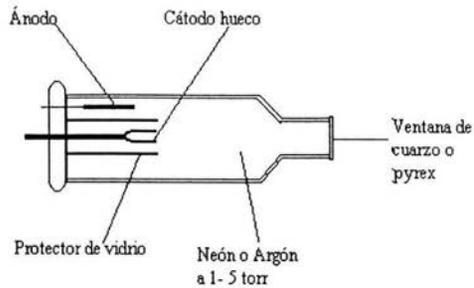


Figura 9. Lámpara de cátodo hueco (Selenio)

Monocromador

Está diseñado para realizar barridos espectrales, proporcionando una mejor separación de las longitudes de onda para un mismo tamaño del elemento, también se utiliza para aislar las líneas deseadas de otras líneas de emisión y reduce notablemente el flujo total de luz que llega al detector. (16).

Sistemas de atomización:

Existen 3 métodos para atomizar la muestra en E.A.A, atomización de flama, Horno de grafito y Vapor frío y/o Generador de hidruros.

Atomización de Flama: Se emplean en Espectroscopia de emisión, absorción y fluorescencia atómica. El aerosol, formado por el flujo del gas oxidante, se mezcla con el combustible y pasa a través de una serie de deflectores que eliminan las gotitas de disolución que no sean muy finas.

Pasos en el sistema de atomización en flama

- Desolvatación, se evapora el disolvente hasta producir un aerosol de moléculas de sólido finamente dividido.
- Disociación de las moléculas produce un gas atómico.
- Los átomos formados se ionizan originando cationes y electrones.
- Los átomos se excitan por el calor de la llama, produciéndose así espectros de emisión moleculares, atómicos e iónicos.

Sistema de Atomización de Horno de grafito: La ventaja que presenta este sistema es el uso de muestras en microlitros la cual se evapora a baja temperatura y luego, se calcinan a una temperatura más alta en un tubo de grafito, se calienta eléctricamente, después de la calcinación, la corriente se incrementa rápidamente a varios, cientos de amperios, por lo que la temperatura se eleva a unos 2000 o 3000 °C; la atomización de la muestra se produce en un período de tiempo de pocos milisegundos a segundos. En estas condiciones, se mide la absorción de las partículas atomizadas en la zona situada inmediatamente por encima de la superficie calentada.

Atomización en Vapor frío: Es un método de atomización aplicable solamente a la determinación de Mercurio (Hg), ya que es el único elemento metálico que tiene una presión de vapor apreciable a temperatura ambiente. La determinación de mercurio en distintos tipos de muestras. Es de vital importancia actualmente, debido a la toxicidad de varios compuestos orgánicos de Hg. El mercurio se reduce a Hg^{+2} con Cloruro Estanoso ($SnCl_2$), el cual es conducido a un tubo de absorción de camino óptico largo, burbujeando una corriente de gas inerte a través de la mezcla a partir de la cual se forma el elemento. El análisis se completa midiéndose a una absorbancia a 253,7 nm.

El Generador de Hidruros: Es un sistema para introducir muestras que contienen arsénico, antimonio, estaño, selenio, bismuto y plomo en forma de gas, este procedimiento mejora los límites de detección de estos elementos de 10 a 100 veces.

Debido a que varias de estas especies son altamente tóxicas y es de gran importancia su determinación a concentraciones bajas. Su toxicidad obliga también a que los gases producidos en la atomización deban eliminarse de una manera segura y eficaz. (Figura 10).

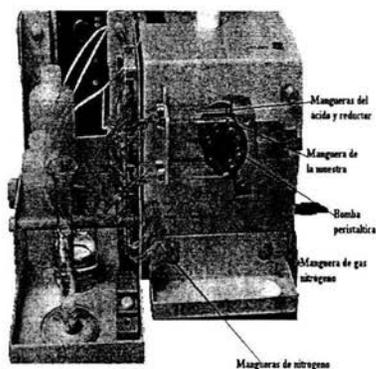


Figura 10. Generador de Hidruros VGA 77

Regularmente se pueden generar rápidamente hidruros volátiles adicionando una disolución acuosa acidificada de la muestra a un volumen pequeño de una disolución acuosa al 1% de borohidruro de sodio (NaBH_4), una reacción característica se puede representar por la expresión.



El hidruro volátil en este caso, arsina, es arrastrado a la cama de atomización por un gas inerte (nitrógeno), la cámara de cuarzo es calentada a varios cientos grados centígrados en flama, donde se descompone el hidruro originándose los átomos del analito (16). La concentración se determina por la medida de la absorción. (revisar la bibliografía 17 y el anexo 3).

Detector: Es un dispositivo mecánico, eléctrico o químico que identifica, registra o indica un cambio en alguna de las variables de su entorno, tal como la presión, la temperatura, la carga eléctrica, la radiación, electromagnética, radiación nuclear, las partículas o las moléculas. Su función es convertir la radiación en una señal medible.

La señal eléctrica es entonces amplificada y usada para dar una medida cuantitativa de absorción.

El detector recibe 3 tipos de señal luminosa: señal de la lámpara de cátodo hueco, de la flama y obscura. (16).

PARTE EXPERIMENTAL

2.1.- EQUIPOS Y MATERIAL.

EQUIPOS:

- Horno de Microondas Mars 5 CEM corporation Falcon USA.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Spectral AA 800 Varian Australia.
- Generador de Hidruros VGA 77 Varian Australia.

MATERIAL:

- Vasos de teflón para Horno de Microondas HP-500 plus temperatura máxima 210°C y presión máxima 350 psi. Falcon USA
- Membranas para los vasos HP-500 safety membranas CEM 140 piezas. Use part # 431300 Falcon USA.
- Sensor de temperatura de fibra óptica CEM modelo FOT-L-CEM-1, rango -50°C a 250°C.
- Lámpara de selenio HC Lamp-Se Varian Australia no. Parte 56-101270-00 no. de serie 01k0308.
- Celda de cuarzo Varian Australia.
- Micropipeta Finnpipette Labsystems capacidad de 100-1000 µl.
- Micropipeta Finnpipette Labsystems capacidad de 5-50 µl.
- Micropipeta Finnpipette Labsystems capacidad de 1-5 ml.
- Pipeta volumétrica de 5 ml Kimax México
- Pipeta volumétrica de 2 ml Kimax México
- Pipeta volumétrica de 1 ml Kimax México
- Matraz volumétrico de 25 ml. Kimax México. tipo "A"
- Matraz volumétrico de 50 ml Kimax México tipo "A"
- Matraz volumétrico de 1000 ml IVA Argentina vidrio borosilicato.
- Probeta de 1000 ml IVA Argentina patente no. 151475 vidrio borosilicato.

- Probeta de 10 ml Kimax México ± 0.10 ml. PE 20°C.

REACTIVOS:

- Ácido Nítrico R.A 65.4 % de pureza Baker de México.
- Ácido Clorhídrico R.A 36.5-38 % de pureza Baker de México.
- Peroxido de Hidrogeno en solución al 30% Baker de México.
- Estándar de Selenio High-Purity 1000 ± 3 $\mu\text{g/ml}$ en 2% de ácido nítrico con 99.999 % de pureza.
- Hidróxido de sodio perlas 98.4 % de pureza bajo en carbonatos Baker de México.
- Borohidruro de sodio 98% de pureza Baker USA.
- Agua desionizada

MUESTRAS BIOLÓGICAS:

- Plasma de vaca Holsteing.
- Leche de vaca Holsteing;

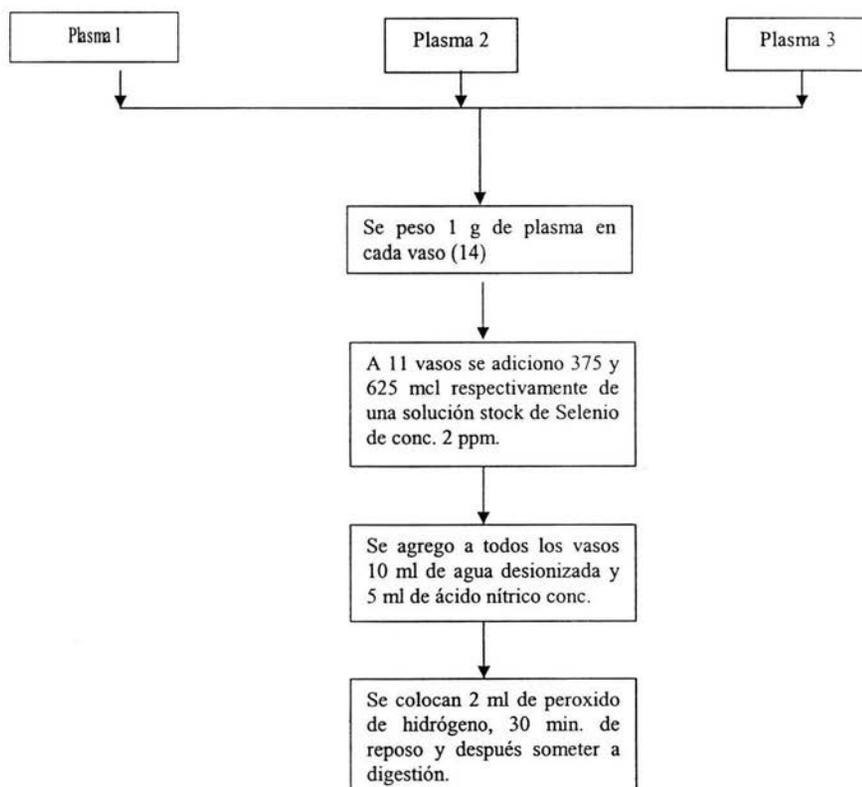
GASES:

- Acetileno AGA de México
- Nitrógeno 99.9 % de pureza AGA de México.
- Aire comprimido

2.2.- Tratamiento de las muestras (Digestión ácida en Horno de Microondas).

PLASMA

Debido a que se ha trabajado con sangre completa en las digestiones ácidas en microondas reportadas en el manual del equipo MARS 5 CEM, se propuso estudiar 3 métodos para la digestión ácida de plasma para facilitar así la cuantificación de selenio por Espectrofotometría de absorción atómica con el sistema de atomización de generador de hidruros. Para lo cual se describe el procedimiento para cada uno de los métodos, disminuyendo tiempos y el número de rampas.



➤ Nota el procedimiento se siguió para cada uno de los métodos de plasma

Condiciones propuestas para la digestión de plasma

Método: *Plasma 1*

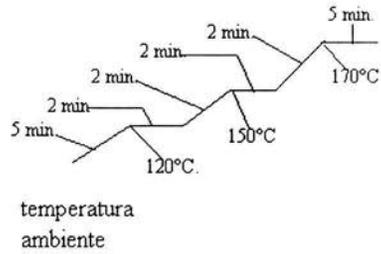
Potencia W	% potencia	Tiempo de alcance min.	Temperatura °C	Presión psi	Tiempo de mantenimiento min.
1200	100	5	120	350	2
1200	100	2	150	350	2
1200	100	2	170	350	5

Método: *Plasma 2*

Potencia W	% potencia	Tiempo de alcance min.	Temperatura °C	Presión psi	Tiempo de mantenimiento min.
1200	100	5	120	350	2
1200	100	5	170	350	5

Método: *Plasma 3*

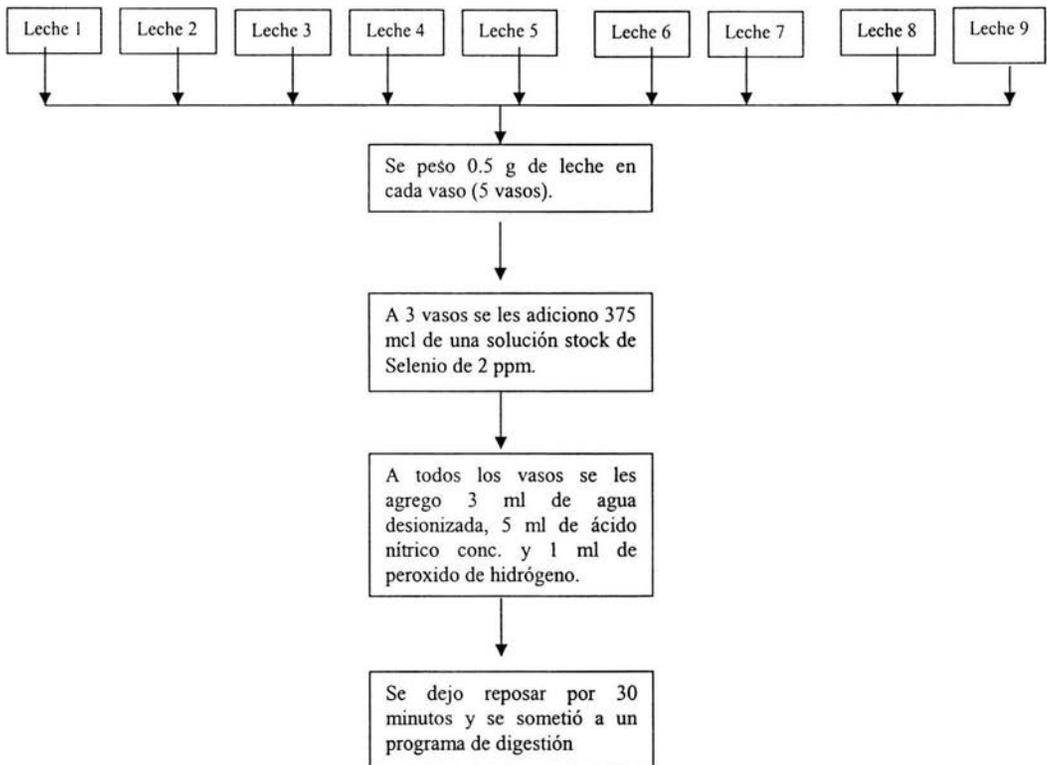
Potencia W	% potencia	Tiempo de alcance min.	Temperatura °C	Presión psi	Tiempo de mantenimiento min.
1200	100	15	170	350	5



Rampa de temperatura que se sigue durante la digestión, temperatura ambiente, en 5 minutos se llega a la temperatura de 120°C y se mantiene 2 minutos, en 2 minutos alcanza la temperatura de 150°C manteniéndose 2 minutos y en 2 minutos llega a 170°C manteniéndose 5 minutos, prosiguiendo la etapa de enfriamiento.

LECHE

Se decidió trabajar con leche para observar cuanto selenio esta eliminando la vaca por esta vía, y cuanto le esta aportando a los becerros.



Condiciones propuestas para la digestión de leche

Método	Potencia (W)	% potencia	Min. Rampa	Temp. (°C)	Presión (psi)	Min. Mantenimiento
1	1200	100	5	100	350	2
	1200	100	5	140	350	7
2	1200	100	7	100	350	2
	1200	100	3	140	350	7
3	1200	100	5	100	350	6
	1200	100	3	140	350	7
4	1200	100	7	100	350	6
	1200	100	5	140	350	7
5	1200	100	5	100	350	2
	1200	100	3	140	350	5
6	1200	100	7	100	350	2
	1200	100	5	140	350	5
7	1200	100	7	100	350	6
	1200	100	3	140	350	5
8	1200	100	6	100	350	4
	1200	100	4	140	350	6
9	1200	100	5	100	350	6
	1200	100	5	140	350	5

Nota: Estas condiciones se obtuvieron del diseño experimental que se observa en la tabla 15, basándose de las condiciones que se encuentran en el anexo 2.

- Al término de la digestión se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- El contenido de los vasos se colocó en matraces volumétricos de 50 ml (enjuagándose 3 veces cada vaso con HCl 7 M) y llevar a volumen de aforo HCl 7M.
- De los matraces volumétricos las muestras fueron transferidas a recipientes de polietileno y se etiquetaron para su posterior análisis.

Para realizar el análisis de las muestras se preparó una curva de calibración de 5, 10, 15, 20, y 25 ppb de selenio.

2.3.- Método de Cuantificación

En la cuantificación se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica con el sistema de atomización generador de hidruros debido que este equipo detecta concentraciones pequeñas (1-100ppb).

Para iniciar se necesitó abrir los tanques de gas nitrógeno y acetileno, verificando que la compresora estuviera encendida, observando que la presión de los gases fuera la indicada para el equipo (nitrógeno 50 psi, acetileno 20 psi), se encendió el equipo y la computadora, una vez que acceso al programa spectral AA se editó el método, e indicando el sistema de atomización que se va a utilizar, el elemento que se va a analizar, así como señalar el número de muestras que se van a leer, se alineó el quemador, posteriormente se montó la unidad generadora (VGA 77) conectando la celda de cuarzo y colocarla sobre el quemador.

El módulo el cual consta de tubos capilares que absorben las soluciones requeridas por medio de una bomba peristáltica hacia una manguera de aproximadamente 50 cm de longitud donde se mezclan todas las soluciones y se lleva a cabo la formación del hidruro. En el módulo se indica el tipo de solución que deberá ser aspirada por cada uno de los

capilares (ácido, reductor y muestra). La preparación de dichas muestras dependerá del elemento a analizar (Se).

Los flujos que se requieren para la muestra es de 8 ml por minuto y de 1 ml por minuto para el ácido y el reductor. Es importante optimizar los flujos de los reactivos para poder tener una buena sensibilidad del elemento a analizar.

Posteriormente se optimizó la lámpara de cátodo hueco y se calibró a cero el equipo conectando los reactivos en las mangueras correspondientes.

Una vez ya calibrado el equipo se procedió a la cuantificación, colocando cada estándar en el capilar respectivo, después de correr la curva de calibración se leyeron las absorbancias de las muestras y se interpolaron en ella para obtener así las concentraciones de cada una de ellas.

**RESULTADOS
Y
ANÁLISIS**

3.1.- Resultados Experimentales de Plasma

Las condiciones de digestión para plasma se basaron en el programa del manual de CEM para sangre completa, solo se disminuyo la temperatura porque en plasma no tiene la misma cantidad de materia orgánica que la sangre. Los resultados de los tres métodos estudiados se presentan en las siguientes tablas: 2, 3, y 4 en donde se tienen la concentración del plasma sin cargar (15- 25 ppb), y la concentración esperada de los sistemas.

Tabla 2 Resultados de la digestión con el método plasma 1

Sistema	Concen. esperada	Cantidad determinada	% de Se recuperado
1*	0	3.44	
4	28.44	21.17	74.41
5	28.44	22.93	80.60
6	28.44	23.61	82.99
7	28.44	24.46	85.98
8	28.44	22.7	79.79
9	28.44	23.93	84.12
10	28.44	24.05	84.54
11	28.44	22.7	79.79
12	28.44	24.06	84.57
13	28.44	24.06	85.98
14	28.44	24.34	85.56

* Cantidad promedio de los sistemas 1-3 determinada en el plasma utilizado: 3.4466 ppb

Tabla 3 Resultados de la digestión con el método plasma 2

Sistema	Concen. esperada	Cantidad determinada	% de Se recuperado
1*	0	1.405	-
3	16.40	15.1	92.04
4	16.40	14.39	87.71
5	16.40	14.25	86.86
6	26.40	23.92	90.58
7	26.40	22.32	84.52
8	26.40	21.92	83.01
9	16.40	13.92	84.85
10	16.40	15.96	97.28
11	16.40	15.9	96.92
12	26.40	22.84	86.49
13	26.40	24.32	92.10
14	26.40	24.61	93.20

* Cantidad promedio de los sistemas 1-2 determinada en el plasma utilizado: 1.405 ppb

Tabla 4 Resultados de la digestión con el método plasma

Sistema	Concen. esperada	Cantidad determinada	% de Se recuperado
* 1		1.535	
3	16.535	13.3	81.07
4	16.535	13.33	81.25
5	16.535	12.93	78.81
6	26.535	23.59	89.33
7	26.535	22.62	85.66
8	26.535	20.00	75.74
9	16.535	15.42	93.99
10	16.535	15.12	92.16
11	16.535	15.29	93.20
12	26.535	24.61	93.20
13	26.535	21.75	82.37
14	26.535	20.12	76.19

* Cantidad promedio determinada del sistema 1-2 1.535 ppb.

Los resultados obtenidos, se sometieron a un análisis estadístico con el programa statgraphics version 4.0

Se_recuperado = Variable de respuesta

Método = Factor controlado o variable independiente

Numero de observaciones: 43

Numero de niveles: 3

En la figura 10 y en la tabla 5 se puede observar que el método 2 permite obtener los mayores porcentajes promedios 90.27% de selenio (este porcentaje se obtiene de todos los resultados experimentales del método 2) y con menor dispersión con un coeficiente de variación de 4.22%.

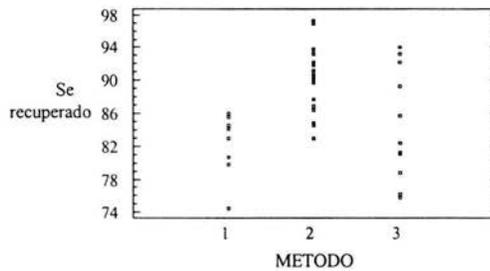


Figura 10. Gráfica de dispersión de los datos por método

TABLA 5. Resumen estadístico para el % recuperado de selenio en plasma.

METODO	No. de observaciones	Promedio	Coefficiente de variación
1	11	82.58	4.34%
2	20	90.27	4.22%
3	12	85.25	8.08%
Total	43	86.90	6.62%

En la figura 11. Se observan los intervalos de confianza de la media de cada método de los % recuperados de selenio, observando claramente que el mejor método para digerir es el método 2.

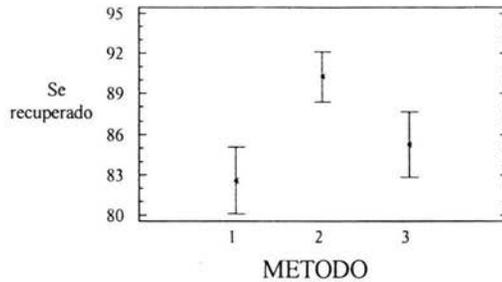


Figura 11. Media del intervalo de confianza del 95.0%, Tukey HSD

En la tabla 6 se muestra el análisis de varianza que permite comparar los tres métodos digestión de la muestra, observa que el nivel de significancia de los datos es de 0.0003, esto implica que hay una diferencia significativa de al menos un par de medias como se ve en la figura 11, que en el método 2 es estadísticamente diferente su media respecto al método 1 y método 3, entre el método 1 y el 3 no hay diferencia significativa porque sus intervalos de confianza se traslapan, esto se observa en la tabla 7 en donde se hacen los contrastes de todos los intervalos de confianza de las medias.

Tabla 6. Análisis de varianza del Método para % recuperado de Se

Origen	Suma de Cuadrados	gl	Media de cuadrado	F-Calculada	P-Value Nivel de Significancia.
Entre los grupos	465.123	2	232.561	10.03	0.0003
Dentro de los grupos	927.503	40	23.1876		
Total	1392.63	42			

En la figura 12 se muestra los valores mínimos y máximos, la media, los cuadrados y la media para cada uno de los métodos pudiéndose observar que el método 2 permite observar que presenta la menor dispersión y el mayor porcentaje recuperado de selenio en plasma de bovino.

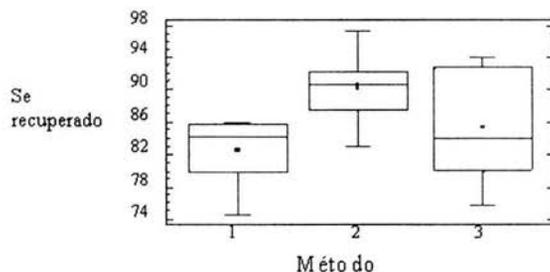


Figura 12. Gráfica que presenta los valores mínimos, máximos y la media de cada método

Tabla 7. Tabla de medias para selenio recuperado por método con 95% de confianza y los intervalos de diferencia significativa de Tukey

Método	N	Media	S	Limite inf.	Limite sup.
1	11	82.58	1.45	80.08	85.08
2	20	90.27	1.07	88.41	92.12
3	12	85.25	1.39	82.85	87.64
Total	43	86.90			

En la figura 13 se observa que el método 2 los residuales son menores que los del método 3 y se observa también que hay un comportamiento aleatorio.

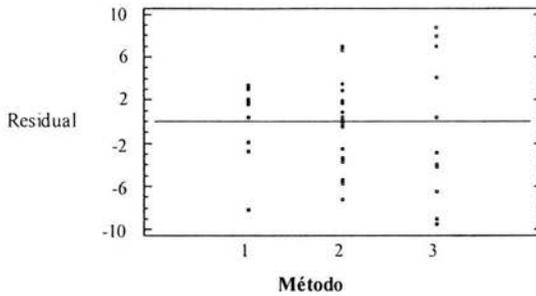


Figura 13. Gráfica de residuales de Selenio recuperado

En la tabla 8 Pruebas de rango múltiples para el Selenio recuperado por método en donde los contrastes rebasan los valores de límite del intervalo de Tukey son los que presentan diferencia significativa. La columna de grupos homogéneos cuando se muestra la X alineada en la misma columna significa que no hay diferencia significativa entre esos grupos y cuando la X no se encuentra alineada hay una diferencia significativa entre los grupos.

Tabla 8. Método con el 95% de confianza en base a la prueba de Tukey (anexo 4).

Método	N	Media	Grupos Homogéneos
1	11	82.5819	X
3	12	85.2525	X
2	20	90.2723	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite de Tukey
1 - 2	*-7.69038	4.40017
1 - 3	-2.67057	4.89302
2 - 3	*5.01981	4.28025

* DENOTA UNA DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA.

Después de realizar el análisis estadístico del plasma usando como variable los métodos, se quiso comprobar que las diferentes concentraciones utilizadas no afecta el porcentaje de selenio recuperado en los métodos.

Variable dependiente o variable de respuesta: Se_ recuperado

Factores = variables independientes o factores controlados

X1 = pipeta

X2 = concentración de la solución estándar

Número de casos completos: 43

El análisis de varianza (tabla 9) muestra que la pipeta con la que se toma el estándar tiene un efecto significativo sobre los porcentajes recuperados de selenio, por lo que se prefiere utilizar micropipeta, y el análisis de varianza indica que la concentración presenta una influencia significativa sobre los porcentajes recuperados ya que presentan un nivel de significancia superior al 0.05, por lo tanto es independiente que en el análisis se pueda preparar a 25 o 15 ppb ya que en estos dos niveles de concentración no afectan la respuesta analítica.

Tabla 9. Análisis de varianza para Se_ recuperado - Tipo III Suma de cuadrados

Fuente de variación (efectos principales)	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	P-value nivel de significancia
A:X1	217.178	1	217.178	7.81	0.0079
B:X2	4.06322	1	4.06322	0.15	0.7043
RESIDUAL	1112.43	40	27.8107		
TOTAL	1392.63	42			

En la figura 14 se presenta las gráficas de los intervalos de confianza al 95% de las medias de cada nivel para el factor X1 (gráfica 3.5A tipo de pipeta), en la cual se observa que el porcentaje de selenio recuperado si se ve afectado si se utiliza micropipeta o pipeta volumétrica, por lo que se observa se va a trabajar con micropipetas, y el factor X2 (gráfica 3.5 B concentración de la solución estándar), en la cual nos indica que no afecta la concentración con el % recuperado de selenio (estas concentraciones se trabajaron con micropipeta),

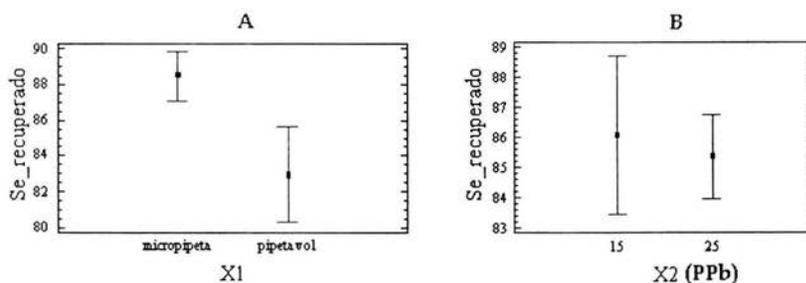


Figura 14. Gráficas de intervalo de confianza al 95% de las medias de cada nivel para el factor X1 (tipo de pipetas) y X2 (concentración del estándar).

Tabla 10. Medias y sus intervalos de confianza al 95% para el factor X1 (tipo de pipeta) y X2 (concentración de la solución estándar).

Nivel de cada factor	N	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Media global X1	43	85.71			
Micropipeta	32	88.48	0.96	86.53	90.42
Pipeta vol. X2	11	82.94	1.85	79.19	86.70
15	12	86.08	1.81	82.41	89.75
25	31	85.34	0.98	83.34	87.34

La tabla 10 muestra el valor de la media global de todas las observaciones y las medias para cada nivel de el factor X1 y X2 así como también muestra el limite inferior y el superior para el intervalo de confianza para cada una de las medias. los intervalos de confianza para cada uno de los factores se calcularon en base a la prueba de Tukey .

En la tabla 11 se muestran en la columna de grupos homogéneos cuando coinciden verticalmente las “X” esto indica que no hay diferencia significativa entre los niveles del factor en cuestión e indica lo contrario cuando están desfasadas las “X” por lo tanto se concluye que hay diferencia significativa entre pipeta y micropipeta, y que la micropipeta permite mejorar el % de selenio recuperado.

En la tabla 12. se observa que no hay diferencia significativa entre los dos niveles de concentración utilizados para la preparación del estándar de selenio y por lo tanto es indistinto que el estándar varia entre esos dos niveles de concentración ya que no afecta los % recuperados de selenio.

Tabla 11. Prueba de rangos para comparar el Se recuperado (%) en función de la pipeta utilizada para la solución estándar de selenio.

X1	N	Media	Grupos Homogéneos
Pipeta vol.	11	82.94	X
micropipeta	32	88.48	X

Contrast	Diferencia entre las medias	+/- Limites
Micropipeta – pipeta vol.	*5.53194	3.72522

Tabla 12. Prueba de rangos para comparar el Se recuperado en función de la concentración utilizada en la solución estándar de selenio.

X2(pbb)	N	Media	Grupos Homogéneos
25	31	85.34	X
15	12	86.08	X

Contrast	Diferencia entre las medias	+/- Limite
15 - 25	0.736045	3.6237

* indica una diferencia estadística significativa

Como se puede observa en los resultados estadísticos que el mejor método de digestión ácida es plasma 2, y que no influye la concentración, pero si influye el uso de pipeta volumétrica por lo que se decidió utilizar la micropipeta, y el método seleccionado se realizo por triplicado la digestión para optimizar el método obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 13. Resultados de optimización de la digestión por triplicado

Sistema	Concen. adicionada	Cantidad determinada	% Se recuperado
1			
3	25.91	23.41	90.35
4	25.91	23.9	92.24
5	25.91	23.81	91.89
1	26.38	23.9	90.58
2	26.38	23.68	89.74
3	26.38	23.77	90.08
1	26.71	24.35	91.14
2	26.71	25.05	93.76
3	26.71	24.09	90.17

Como se observa en los resultados en la tabla 13 de la digestión por triplicado se tiene que el método si es confiable ya que este es reproducible, teniendo un porcentaje de selenio recuperado promedio de las tres digestiones es de 91.1% y un coeficiente de variación de 1.19% por lo que el método se puede aplicar a muestras problemas reales, llevándose acabo la realización de la digestión de plasma de animales tratados con bolo de selenio esperando que la concentración aumente y disminuya con el tiempo.

Como se muestra en la tabla 14 y en la figura 15 los resultados de la concentración de selenio son confiables, por que como se observa la concentración en el día cero antes de administrar el bolo en comparación con el del día 15 en donde ya se administro el bolo de selenio casi se duplica la concentración, por lo que en la grafica se observa un pico y se demuestra que ambos animales muestran la misma tendencia, se recomienda para estudios similares realizar el muestreo cada 8 días para observar mejor la tendencia de cómo se va elevando la concentración.

Tabla 14 Resultados de la digestión de las muestras problemas

# de vaca	Raza	Día de muestreo	Peso de la muestra	Conc. (ppb)	Absorbancia	Conc.(ppb) Real en la muestra
140	Holsteing	0	1.0125	1.46	0.0301	65.4345
140	Holsteing	15	1.0313	1.90	0.0323	92.1167
140	Holsteing	30	1.0094	1.64	0.0224	81.2363
141	Holsteing	0	1.0295	1.79	0.0378	86.9354
141	Holsteing	15	1.0088	3.29	0.0564	163.065
141	Holsteing	30	1.0322	1.61	0.0286	77.9887

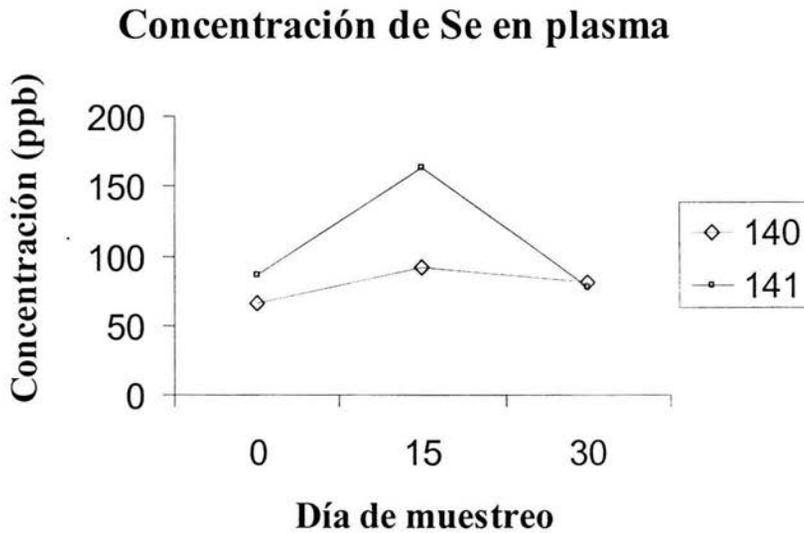


Figura 15 grafica de concentración real de selenio en plasma contra día de muestreo

3.2 Resultados Experimentales de Leche

Las condiciones para tratar la muestra de leche se obtuvo o se baso en las condiciones que se encontraron en un artículo (ver nexa 6.1.2).

Para la optimización del método para digerir la muestra de leche con el fin de cuantificar selenio se hizo un diseño experimental fraccionado 2^{4-1} con un punto central para estudiar el efecto de cuatro factores (rampa 1, mantenimiento 1, rampa 2, mantenimiento 2). en 9 experimentos. El diseño se corrió en un solo bloque y se aleatorizaron los experimentos.

Plan de diseño en la tabla 15

Tabla 15 Diseño Experimental (statgraphics versión 4.0).

Corrida	rampa 1	mant 1	rampa 2	mant. 2	% Se recuperado
1	1.0	1.0	-1.0	-1.0	_____
2	-1.0	1.0	1.0	-1.0	_____
3	1.0	-1.0	1.0	-1.0	_____
4	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	_____
5	1.0	1.0	1.0	1.0	_____
6	-1.0	1.0	-1.0	1.0	_____
7	-1.0	-1.0	1.0	1.0	_____
8	0.0	0.0	0.0	0.0	_____
9	1.0	-1.0	-1.0	1.0	_____

(Plan experimental, diseño factorial 2^{4-1} con un punto central.)

Tabla 16 Factores de Estudio o variables independientes para optimizar el método para digerir muestras de leche de vaca.

Factor (unidades)	Nivel		
	-1	0	1
X1= rampa 1 (°C/min.)	14.29	17.14	20.00
X2= mantenimiento 1 (min. Mant.)	2.00	4.00	6.00
X3= rampa 2 (°C/min.)	28.00	37.33	46.66
X4= mantenimiento 2 (min. Mant)	5	6	7

La respuesta o variable dependiente a optimizar es el porcentaje de selenio recuperado.

Tabla 17. Resultados del plan experimental.

Run	rampa 1	mant 1	rampa 2	mant. 2	% Se recuperado
1	1.0	1.0	-1.0	-1.0	75.78
2	-1.0	1.0	1.0	-1.0	74.56
3	1.0	-1.0	1.0	-1.0	70.48
4	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	68.23
5	1.0	1.0	1.0	1.0	72.27
6	-1.0	1.0	-1.0	1.0	78.92
7	-1.0	-1.0	1.0	1.0	90.38
8	0.0	0.0	0.0	0.0	102.02
9	1.0	-1.0	-1.0	1.0	102.46

El análisis de resultados se realizó con la ayuda del software Statgraphics Plus versión 4 con el módulo General Linear Models. Obteniendo la siguiente gráfica (Figura 16), en la cual se puede observar un área verde en donde se seleccionaron las condiciones de la digestión de la muestra de leche, que se muestran en la tabla 17.

Contorno de Superficie de Respuesta

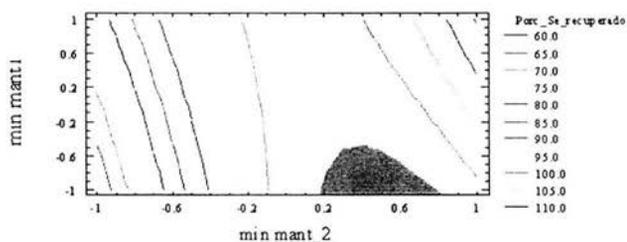


Figura 16. Gráfica de contorno de superficie de respuesta estimada con el modelo determinado en función de min. Mantenimiento 1 y min. Mantenimiento 2.

En la tabla 18 se observan las condiciones adecuadas para la digestión de la muestra de leche, para optimizar estas condiciones se tuvo que realizar la digestión por triplicado obteniendo los siguientes resultados que se muestran en la tabla 19.

Tabla 18 Condiciones adecuadas para la digestión de leche

Potencia	% potencia	Tiempo de alcance	Temp. °C	Presión psi.	Tiempo de mantenimiento
1200 w	100	6.24	100	350	5.12
1200 w	100	4.15	140	350	6.12

Tabla 19. Factores codificados de las condiciones de la digestión ácida y % de selenio recuperado.

rampa 1	min mant1	rampa2	min mant2	% de Se recuperado
1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	75.78
-1.0000	-1.0000	0.9993	1.0000	74.56
1.0000	1.0000	0.9993	1.0000	70.48
-1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000	68.23
1.0000	-1.0000	0.9993	-1.0000	72.27
-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	78.92
-1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000	90.38
-0.1667	0.0000	-0.2500	0.0000	102.02
1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000	102.46
-0.3910	0.5600	-0.3855	0.1200	90.55
-0.3910	0.5600	-0.3855	0.1200	90.80
-0.3910	0.5600	-0.3855	0.1200	93.06

Los resultados obtenidos en la tabla anterior se les realizó el análisis estadístico en Statgraphics Versión 4.0 con el modulo General Linear Models.

El modelo que se determino fue el siguiente: Ecuación 1(X1,X2,X3,X4 son los factores de las condiciones que se usaron en la digestión).

$$\%Se_recuperado = Y = 102.00 + 6.85X4 + 61.72X1X2 + 64.21X3X4 + 6.65X4X2 + 22.87X4X4$$

El modelo anterior permite predecir el % recuperado de selenio (Y) en muestras de leche en donde el 87.07 % de la variabilidad observada en dicha respuesta esta explicada por el modelo de la ecuación 1; en la tabla 20 se muestra el análisis de varianza de dicho modelo su nivel de significancia es de cero traduciendo esto como que el modelo tiene una probabilidad de 1.

Tabla 20 Análisis de varianza para Selenio recuperado (%)

Fuente	Suma de cuadrado	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	P- value (nivel de significancia)
Model	3998.34	5	799.667	32.32	0.0000
Residual	593.872	24	24.7447		
Total	4592.21	29			

Los niveles de significancia de los coeficientes del modelo determinado todos fueron inferiores a 0.05 lo que implica que tienen una probabilidad superior a 0.95 (tabla 21). El factor que tiene mayor influencia sobre la respuesta estudiada es la interacción entre la rampa 2 y mantenimiento 2. El valor de los coeficientes indicados en la tabla 19 nos permite jerarquizar el orden de importancia de los factores implicados en la optimización de la digestión de muestras de leche, por lo tanto se deduce que el orden de importancia del efecto de los factores sobre la respuesta es:

- rampa 2*min mant_2 → coeficiente 64.21.
- rampa 1*min mant 1 → coeficiente 61.72
- min mant_2*min mant → coeficiente 22.87
- min mant_2 → coeficiente 06.85
- min mant_2*min mant1 → coeficiente 06.65

Este análisis permite deducir que el proceso de la digestión es crítico para la cuantificación de selenio en leche.

Tabla 21 Suma de Cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F- Calculada	P-value (nivel de signif.)
X4= min mant_2	1128.14	1	1128.14	45.59	0.0000
X1*X2=rampa 1*min mant1	172.717	1	172.717	6.98	0.0143
X3*X4= rampa 2*min mant_2	186.271	1	186.271	7.53	0.0113
X4*X2= min mant_2*min mant1	1062.55	1	1062.55	42.94	0.0000
X4*X4= min mant_2*min mant_2	1393.21	1	1393.21	56.30	
Residua	593.872	24	24.7447		0.0000
Total	4592.21	29			

R-cuadrada = 87.0678 %

R-cuadrada (ajustada por gl) = 84.3736 %

Error estándar of Est. = 4.9744

Error absoluto media = 3.66703

Cuando el mantenimiento 2 se tiene en el nivel bajo (-1= 5 min.) el porcentaje de selenio es menor que cuando se mantiene en el nivel central (0=6 min.) de dicho factor observándose que con este nivel se puede maximizar el porcentaje de selenio recuperado.

Figura 17 Comportamiento del porcentaje recuperado de Selenio en función de los niveles del mantenimiento 2.

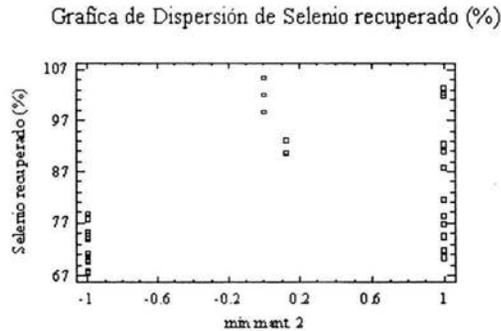


Figura 17 Gráfica de Dispersión de Selenio recuperado (%)

Tabla 22. Análisis de significancia de los coeficientes del modelo determinado para el porcentaje de selenio recuperado.

Parámetro	Coefficiente del modelo estimado	Error estándar	Limite inf.	Limite sup.	V.I.F.
CONSTANT	102.00	2.87	96.07	107.92	
min mant 2	6.85	1.01	4.75	8.95	1.00
rampa 1*min mant1	61.724	23.36	13.50	109.94	532.2
rampa 2*min mant 2	-64.21	23.40	-112.51	-15.90	531.0
min mant 2*min mant1	-6.65	1.01	-8.74	-4.55	1.00
min mant 2*min mant	-22.86	3.047	-29.15	-16.57	1.77

Superficie de respuesta Estimada

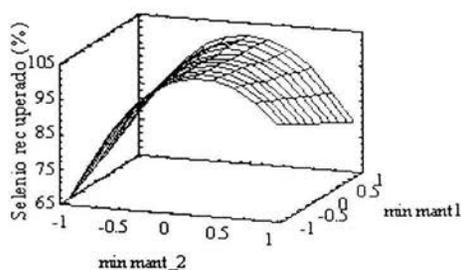


Figura 18. Superficie de respuesta estimada para predecir el comportamiento de selenio recuperado en función del tiempo de mantenimiento después de la rampa 1 y rampa 2 para la digestión de las muestras de leche.

En la Figura 19 Se muestra que se puede tener diferentes combinaciones entre los tiempos de mantenimiento de las temperaturas después de la rampa 1 y de la rampa 2 para maximizar el porcentaje de selenio recuperado en el proceso de digestión de la muestras de leche. Es importante remarcar que es más crítico el tiempo de mantenimiento después de la rampa 2 que el tiempo de mantenimiento de la rampa 1 ya que el intervalo que permite optimizar el porcentaje recuperado de selenio es más limitado.

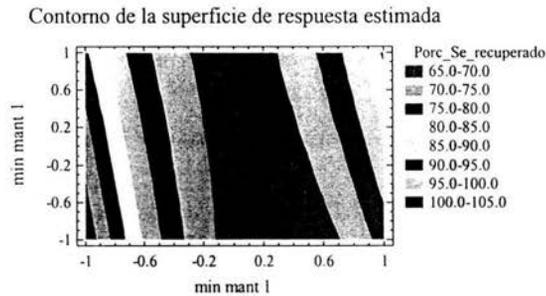


Figura 19. Grafica de Contorno de la superficie de respuesta estimada con el modelo determinado en función de min. Mantenimiento 1 y min. Mantenimiento 2

La figura 20. Permite estimar la linealidad del método. Como algunos valores experimentales se alejan de la recta esto indica que puede haber factores no considerados en el estudio y que están afectando el comportamiento del selenio recuperado, es por ello que la r cuadrada del modelo es de 87.06% por lo tanto se puede estimar que el error de estimación esta aproximadamente de 13%.

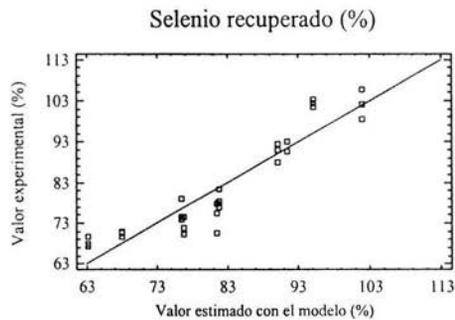


Figura 20. Correlación entre los valores experimentales de selenio recuperado y los valores predichos por el modelo determinado para dicha respuesta.

El resultado promedio de selenio recuperado (%) para la muestra de leche es de 91.53% obteniendo un coeficiente de variación de 2.26, por lo que el método si es confiable y se puede utilizar para muestras problemas. Las muestras de leche de las vacas tratadas con bolo de selenio se sometieron a digestión obteniendo los resultados que se expresan en la tabla 23 y en la figura 21 siendo los resultados que se esperaban, por lo que si es confiable el método de digestión de las muestras de leche.

Tabla 23 Resultados de la digestión de las muestras problemas

# de vaca	raza	Día de muestreo	Peso de la muestra	Conc. (ppb)	Absorbancia	Conc.(ppb) Real en la muestra
140	Holsteing	0	0.4955	4.12	0.0647	206.0
140	Holsteing	15	0.5117	3.00	0.0473	150.0
140	Holsteing	30	0.5059	2.93	0.0461	146.5
140	Holsteing	45	0.5089	2.33	0.0367	116.5
140	Holsteing	60	0.5092	2.78	0.0437	139.0
140	Holsteing	75	0.5092	3.59	0.0564	179.4
141	Holsteing	0	0.4987	2.43	0.0383	121.5
141	Holsteing	15	0.5032	2.50	0.0395	125.0
141	Holsteing	30	0.5013	2.63	0.0414	181.5
141	Holsteing	45	0.5191	3.59	0.0564	179.5
141	Holsteing	60	0.4953	2.42	0.0383	121.0
141	Holsteing	75	0.5162	2.68	0.0423	134.0

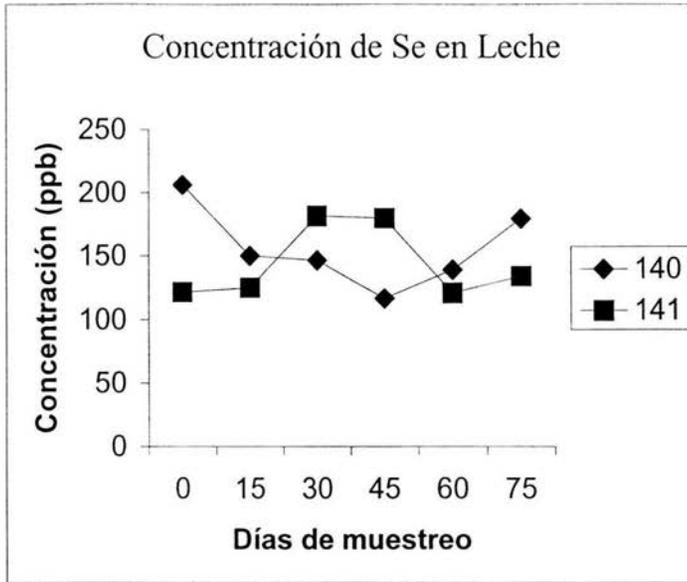


Figura 21. Grafica de concentración de selenio en leche.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se determinaron las condiciones óptimas para la Digestión Ácida en Horno de Microondas de plasma bovino, con un 91% de recuperación de Selenio.
- Mediante un diseño experimental se seleccionaron las condiciones óptimas de la digestión ácida en horno de microondas para leche obteniéndose un 91% de recuperación.
- La eficiencia de la Digestión Ácida en Horno de Microondas usando muestras biológicas problemas es adecuada, ya que se obtuvieron los resultados esperados.
- Es conveniente el uso de un diseño experimental, por que este facilita el trabajo experimental, disminuyendo tiempos de trabajo, gasto de reactivos y de muestras.
- Es importante siempre utilizar el mismo material durante todo trabajo para obtener resultados confiables.
- El equipo utilizado debe manejarse con mucho cuidado, mantenerse en buen estado ya que este si influye en los resultados.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Allan Christian B. Lacourciere Gerard M., and Stadtman Theresa C. Responsiveness of selenoproteins to Dietary Selenium *Annu. Rev. Nutr.* 1999 19: 1-16.
2. Arthur J.R, Nicol F., Beckett G.J. Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem.J.* (1990) 272: 537-540.
3. Barradas, L.H.V. y COOK, R.M. Contenido mineral de suelos, pastos y ganado de ranchos de las regiones Central y Norte del Estado de Veracruz Méx. XV Reunion Anual de INIP (1981) p 167-170.
4. Kryvkov G.V. Kryvkov V.M., Gladysheu V.N. New mammalian selenocysteine containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem* (1999) 274: 388-397.
5. University of Florida. Institute of food and agricultural Sciences. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales.*, Ed. Mcagrico Feed Ingredients, ed. 3ra.
6. Benavides, S.T y Silva, M.F. *Selenosis*, 2da ed, Bogotá Colombia, Instituto Geográfico, Agustín Codazzi, p 151. 1965.
7. Kathryn J. Lamble, Steve J. Hill, Microwave digestion procedures for environmental matrices, *Analyst*, July Vol.123, p.p 103R-133R, 1998.
8. Church, D.C. *Fisiología Digestiva y Nutrición de los rumiantes.* Ed. Acribia, Zaragoza, España 1974, pp 483.
9. Buck, B., William et al. *Toxicología Veterinaria, Clínica y Diagnóstica.* 7 ed. España. Escribia, pp 444-445, 1981.
10. Bonucci. E., and Sadun. Experimental calcification of the myocardium ultrastructural and histochemical investigations. *Am. J. Pathol.* 71: 167-192, 1973
11. Whanger, P.D., P.H., Weswing, S. A Schmitz, and S. F. Oldfield. Effects of selenium levels, tissue glutathione peroxidase activities and white muscle disease in sheep fed purified or diets 3. *Rev. Nutr.* 107: 1298-1307. 1977
12. Callahan, C.J., Post parturient infection of dairy cattle, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 155: 1963-1964. año 1969.
13. Kingston, *Introduction to Microwave sample preparation (Theory and Practice)*, Ed. ACS Professional Reference Book, Washington 1988, pp 1-31.

14. Instrumentos y Equipos Falcon, Últimos Avances en Digestión de Muestras por Microondas y Análisis Elemental por Absorción Atómica, ICP e ICP-Masas, CEM, 2000 México D.F., pp 2-8.
15. Hobard H. Willard, Métodos Instrumentales de Análisis, ed. 1ra, Ed. Continental, sexta impresión, 1984, México D.F. pp 388-392.
16. Douglas Skoog, Principios de Análisis Instrumental, ed. 5 ta., Ed. McGraw-Hill, 2001, Madrid España, pp 213-215,219-237.
17. Nonato Fernando, Sistemas de Atomización utilizados en Espectrofotometría de Absorción Atómica: Flama, Horno de Grafito, Generador de Hidruros y Vapor frío, para Análisis de Muestras Complejas, Tesis para Obtener el Título Ing. Químico, 1997, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, pp 5-9, 28-33, 56-58.
18. Programa de sangre completa Mars 5 para vaso XP 1500 Manual del CEM, Falcon de México año 2000
19. De la Fuente Miguel Angel, Guerrero Gonzalo, and Juarez Manuela, Manganese and Zinc Analysis in Milk by Microwave Oven Digestion and Platform Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Reprinted from Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, Vol.43 No. 9) pp 2407-2410.
20. Pérez Cesar, Econometría y Análisis Estadístico Multivariable con Statgraphics (Técnicas avanzadas), Ed. RA-MA Madrid España 1996 p. 575.
21. Montgomery, Douglas, Diseño y Análisis de Experimentos, Ed. Iberoamericana México D.F. 1991, pp 70-71.

ANEXOS

Anexo 1

Condiciones de digestión ácida de plasma y leche.

Las condiciones en que se baso la digestión ácida para plasma se uso el del programa MARS 5 del CEM para sangre completa, este programa utiliza los vasos XP-1500, las condiciones son las siguientes.

Se adiciona 5 ml de ácido nítrico concentrado, 2 ml de Peroxido de hidrogeno y 2 gramos de muestra, se utilizaron 3 rampas de temperatura y tiempo.

Tabla 23 Condiciones del Programa de Digestión del CEM (sangre completa)(18)

Condiciones	Rampa 1	Rampa 2	Rampa 3
Potencia (W)	1200	1200	1200
% de potencia	100	100	100
Rampa tiempo	4	2	2
Presión (bar)	Máx.	Máx.	Máx.
Temperatura (C)	140	180	200
Tiempo de mantenimiento	2	2	2

Condiciones para la digestión de leche que se obtuvieron del artículo: “Manganese and Zinc Analysis in Milk by Microwave Oven Digestion and Platform Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry”, Miguel Angel de la Fuente, Gonzalo Guerrero, and Manuela Juárez. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 1995,43.

Tabla.- 24 Condiciones del Programa de Digestión de Leche (19).

Condiciones	Rampa 1
Potencia (W)	583
Temperatura de la primera rampa (°C)	100
Rampa tiempo de la primera rampa	5
Presión (psi)	66.
Temperatura de la segunda rampa (°C)	140
Tiempo de la segunda rampa	10

Nota: En el artículo no indica tiempo de mantenimiento de las dos rampas

Anexo 2

Resultados de las primeras digestiones de plasma bajo las siguientes condiciones.

Tabla 25 Condiciones del Programa de Digestión Plasma 1

Condiciones	Rampa 1	Rampa 2	Rampa 3
Potencia (W)	1200	1200	1200
% de potencia	100	100	100
Rampa tiempo	5	2	2
Presión (350 psi)	Max.	Max.	Max.
Temperatura (C)	120	150	170
Tiempo de mantenimiento	2	2	5

Durante las primeras digestiones que se realizaron se presentaron varios problemas como fuga de selenio de los vasos que no se encontraban bien sellados, las primeras muestras que se sometieron a digestión sin peróxido presentaban diferentes tonalidades de amarillo desde claro o más oscuro y el porcentaje de recuperación de selenio de esas muestras variaba dando coeficientes de variación de 26. Obteniendo los siguientes resultados que se expresan en la tabla 26

Tabla 26 de resultados de la primera digestión de plasma

Sistemas	Conc.	Ml de stock	Cantidad adicionada	Cantidad determinada	% de Se recuperado
1	0	0		5.54	
2	0	0		5.12	
3	0	0		4.62	
4	12	1	17.09	3.52	20.59
5	12	1	17.09	3.64	21.29
6	12	1	17.09	3.06	17.90
7	24	2	29.09	5.42	18.62
8	24	2	29.09	5.48	18.83
9	24	2	29.09	5.73	19.69
10	36	3	41.09	11.7	28.47
11	36	3	41.09	11.89	28.93
12	36	3	41.09	10.43	25.38
13	48	4	53.09	18.13	34.14
14	48	4	53.09	18.89	35.57

Promedio: 24.49

Dev. Est: 6.40

C.V: 26.16

*** Cantidad promedio del plasma utilizado 5.09 ppb**

Estos resultados que se obtuvieron fue por que se presento fuga en los vasos, por lo que se recomienda cerrar bien los vasos apretando los tornillo bien manualmente y posteriormente con una llave dando una media vuelta más, con esto se disminuyo la perdida de selenio por fuga, para solucionar el problema de la coloración de las muestras se siguieron los pasos de preparación de las muestras de sangre completa del manual del CEM que adicionan 2ml de peroxido de hidrogeno y 5 ml de ácido nítrico, pero lo que se cambio fue la cantidad de muestra disminuyendo la cantidad de 2 gramos a 1 gramo, adicionando diez ml de agua desionizada para diluir más la muestra y así poder destruir toda la materia orgánica que se encuentra presente en la muestra , así se fue mejorando los resultados hasta obtener el 91% de selenio recuperado.

Anexos 3

Cuidados de la lámpara de Selenio y el Generador de Hidruros.

Durante el trabajo experimental se presentaron problemas con la lámpara de Se y el generador de Hidruros.

El principal problema que se presento con la lámpara fue de que la señal quedaba ya era muy pequeña y a veces hasta negativa, al abrir el área en donde se colocan las lámparas en el equipo de EAA se observo que la lámpara de selenio parpadeaba mucho y en el software se vio que el voltaje no bajaba de 600, lo cual nos indica que había llegado a su tiempo de vida (5,000 mAmperes/Hora), por lo que se compro una lámpara nueva.

Los cuidados que se deben que tener con la lámpara de Selenio (y cualquiera de la lámpara que se encuentran en la Sección de Química Analítica):

1.- Elaborar una bitácora para la lámpara Se: En donde se debe especificar el día en que se usa, el tiempo de uso y los mAmperes que se gastaron como se observa en la tabla 27.

Tabla 27 Contenido que debe tener la bitácora de la lámpara.

Fecha	Horas	mAmperes usados	Volts de la lámpara
15/09/02	11:00-13:00	10 mA *2= 20 mA	417

Cada lámpara especifica a que mAmperes trabaja (selenio trabaja con 10 mAmperes), el número de horas que se trabajan se marca como 1 o 2 dependiendo el tiempo que se haya trabajado, como en el ejemplo se trabajaron 2 horas se indica como 2 y este se multiplica por los mAmperes que trabaja la lámpara que en este caso son 10 y esto nos indica que en las 2 horas de trabajo se gastaron 20 mAmperes, se le da un seguimiento al voltaje para ver

como se va incrementando con el tiempo, ya que si este sube a más de 500 volts, la señal va a disminuir.

2.- La lámpara al colocarse o retirarse del equipo de EAA, se debe tener cuidado de no golpearse por que se puede fracturar y dejar escapar el gas y ya no se puede utilizar así.

3.- No se debe tocar la punta de la lámpara, por que interfiere con la señal de esta.

4.- Se debe guardar en su caja correspondiente.

*Es importante cuidar la lámpara y llevar bien la bitácora para poder dar un seguimiento a su vida de estas.

Cuidado del Generador de Hidruros.

Siempre que se va ha trabajar con este equipo se debe que verificar que la presión del gas nitrógeno sea de 50 psi y no mayor o menor a esta.

1.- Montar con cuidado el Generador de Hidruros en el EAA.

2.- Conectar la trampa en el separador gas-liquido y en la celda de cuarzo que se coloca en el quemador. (la trampa se debe lavar cada 2 o 3 semanas dejando remojar en mezcla cromica por 8 a 12 hrs. y lavar bien con dextran, enjuagar con abundante agua de la llave y luego enjuagar con agua desionizada, secar la trampa a vacío y al conectarla de nuevo en el equipo se deja estabilizar por 15 a 20 minutos (Figura23).

El separador de gas-liquido (Figura 24) se debe lavar cada 2 meses o si se observa que en la parte superior esta muy sucio, se deja en mezcla cromica, se lava con dextran y se enjuaga con agua de la llave y posteriormente se enjuaga con agua desionizada, se seca y se coloca en el equipo).

- 3.- Colocar las mangueras para la muestra, ácido y el reactivo (las mangueras deben que ser para cada analito que se vaya a analizar y no usar las mismas para diferentes).
- 4.- Encender el equipo del Generador de Hidruros.
- 5.- Medir el flujo de la manguera de la muestra (7-8 ml por minuto).
- 6.- Medir los flujos de las mangueras del ácido y reductor (1 ml por minuto).
- 7.- Al verificar los flujos se coloca los capilares en las soluciones correspondientes, solo el de la muestra se coloca en agua hasta estabilizar al equipo.
- 8.- Al optimizar la señal se coloca la concentración más alta de la curva de calibración y si da la absorbancia que se espera, se prosigue a la lectura.
- 9.- El tiempo que transcurre en para que aparezca la primera lectura es de 45 segundos, y se saca el capilar de la muestra y se coloca en agua. (esto se hace para enjuagar el capilar, ya que durante los 45 segundo en que tarda para aparecer la primera lectura el sistema se satura y da las siguiente 2 lectura, por que este software la da por triplicado cada estándar y muestra).
- 10.- Al termino de las lecturas se deja enjuagando el equipo con agua por 5 minutos, luego se deja enjuagando con ácido clorhídrico por 5 minuto y al final con agua desionizada. (cada 4 o 5 meses se lava el equipo con dextran al 20% y se enjuaga bien con agua desionizada).
- 11.- Se saca el agua que queda en las mangueras y capilares, se desconecta y se desmonta el equipo.

12.- Se cierra el programa SpectraAA, se apaga la computadora y el EAA.

13.- Se cierran las llaves de paso de las líneas de los gases (aire, acetileno, nitrógeno) y los tanques.

El principal problema que se presentó durante el trabajo experimental con el generador de hidruros fue la fuga del gas nitrógeno de las mangueras que impulsan a la bomba peristáltica del equipo, obteniendo resultados muy pequeños y hasta se caían las lecturas de las curvas de calibración que se habían leído y daban lineales.

Este problema se solucionó al cambiar las mangueras del gas nitrógeno que alimentan a la bomba peristáltica.(Figura 25).

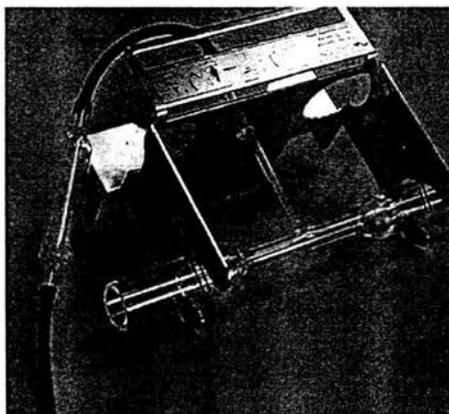


Figura 23. Esquema de la Trampa (que se localiza del lado izquierdo) y Celda de cuarzo (lado derecho).

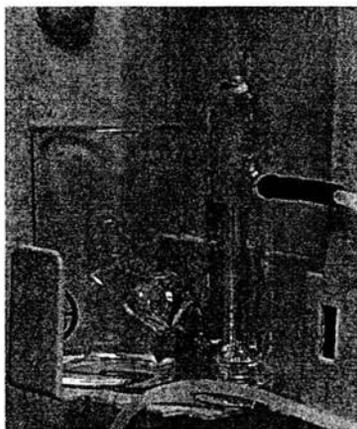


Figura 24. Esquema del Separador Gas-Líquido.

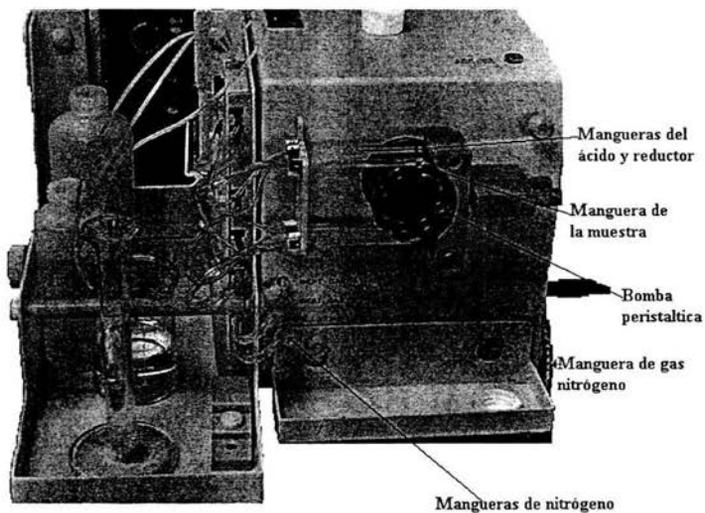


Figura 25. Esquema del Generador de Hidruros modelo VGA 77.

Anexo 4

Prueba de Tukey: Tukey (1953) propuso un procedimiento de comparación múltiple que también está basado en los intervalos. Su procedimiento requiere el uso de $q_{\alpha}(a, f)$ para determinar el valor crítico de todas las comparaciones por pares, independientemente de cuantas medidas estén en un grupo, Así, la prueba de Tukey declara dos medias significativamente diferentes si el valor absoluto de sus diferencias maestras excede

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(a, f) S_{\gamma_i}$$

La prueba de Tukey tiene un nivel de error tipo 1 de α para todas las comparaciones por pares con base en cada experimento. (20-21)