



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**"Validación de un Método de digestión ácida en Horno
de microondas para la cuantificación de Selenio por
absorción atómica en materia prima y fluido ruminal"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA GABRIELA BAEZA HERNANDEZ

ASESORES:

DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO
DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

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

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

Validación de un método de digestión ácida en Horno de
microondas para la cuantificación de Selenio por absorción
atómica en materia prima y fluido ruminal.

que presenta 1a pasante: María Gabriela Baeza Hernández
con número de cuenta: 9950818-0 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Junio de 2005

PRESIDENTE	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
VOCAL	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Marina L. Morales Galicia</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q. Sonia Rincón Arce</u>	

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por la vida que él me presta para realizar mis metas y por iluminarme y guiarme siempre.

A mis padres gracias: Esperanza y Joaquín, por su paciencia, su lucha, sus desvelos, sus esfuerzos, su amor y comprensión.

Gracias a mi hermana, a Oscar y a Andrea por ser un apoyo en mi vida.

Gracias a mis profesores de toda la vida, por educarme y hacer de mí, una persona de bien.

Gracias a la UNAM, por permitirme estudiar la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

Gracias a mis asesoras: Dra. Raquel y Dra. Alma, por apoyarme en éste proyecto y estar al pendiente de todo.

Gracias a mis sinodales por sus observaciones y sugerencias.

Gracias al proyecto PAPIIT IN212903-3 por la ayuda económica para realizar éste trabajo.

Gracias Jessica, por ser mi amiga de toda la vida y por estar conmigo en todo momento.

Gracias a mis amigas: Erika y Maribel por ser parte de mi vida profesional, por escucharme siempre y por estar conmigo en toda la carrera.

Gracias Ceci, por tu amistad, comprensión y cariño.

Gracias Elivert, por permitirme conocerte y por brindarme tu amistad, te agradezco toda la ayuda que me has brindado y por ser un apoyo para mí. Me siento muy afortunada por haber trabajado contigo en éste tan importante proyecto para las dos.

Gracias Poncho por tu gran ayuda, por tu amor y comprensión.

Finalmente este trabajo lo dedico a todas aquellas personas que estuvieron siempre conmigo en las buenas y en las malas, espero no haberlas decepcionado con lo que con grandes esfuerzos he logrado,....

a todos ustedes GRACIAS.

M.G.B.H.

ÍNDICE	Pág
Objetivos	I
Hipótesis	II
Introducción	III
1. Generalidades del Selenio	1
2. Suplementación de selenio	2
2.1. Selenio inorgánico	2
2.2. Selenio orgánico	3
3. Fluido ruminal	4
3.1. Efecto de diferentes fuentes de Selenio sobre la flora ruminal	5
4. Generalidades del Horno de Microondas	6
4.1. Energía de microondas	8
4.1.1. Conducción iónica	12
4.1.2. Rotación dipolar	13
4.2. Componentes de un sistema de microondas	13
5. Generalidades de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA)	17
5.1. Instrumentación del EAA	18
5.2. Sistema de atomización por flama	20
5.2.1. Características de la flama	22
5.3. Sistema de atomización por Generador de Hidruros	24
5.3.1. Descripción del Generador de Hidruros	26

6.	Especificaciones para validar un método analítico	28
6.1.	Linealidad	29
6.2.	Precisión	29
6.3.	Exactitud	29
6.4.	Repetibilidad	29
6.5.	Reproducibilidad	30
6.6.	Criterios de aceptación	31
7.	Equipos, Materiales y Métodos	32
7.1.	Tratamiento de las muestras	34
7.2.	Métodos de cuantificación	37
7.3.	Validación	40
7.3.1.	Validación del sistema	40
7.3.2.	Validación del método	41
8.	Resultados y Discusión de la validación	44
8.1.	Linealidad del sistema	44
8.2.	Precisión del sistema	55
8.3.	Linealidad del método	57
8.4.	Precisión y exactitud del método	68
8.5.	Reproducibilidad y Repetibilidad del método	71
9.	Conclusiones	78
10.	Referencias bibliográficas	80
11.	Anexos	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema de una microonda	8
Figura 2. Energía electromagnética de una microonda	10
Figura 3. a) Esquema del calentamiento por conducción. b) Esquema de un calentamiento simple por energía de microonda.	12
Figura 4. Esquema de un magnetrón.	14
Figura 5. Esquema de la desviación de microondas generadas por el magnetrón.	16
Figura 6. a) Lámpara de cátodo hueco. b) Excitación de los átomos dentro del cátodo hueco bajo el impacto de iones neón.	18
Figura 7. Esquema del proceso de atomización por flama	20
Figura 8. Esquema de las zonas de la flama.	22
Figura 9. Esquema de un dispositivo de generador de hidruros.	26

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Especificaciones para la evaluación de los métodos.	31
Tabla 2. Condiciones de digestión para selenito de sodio.	35
Tabla 3. Condiciones de digestión para levadura.	35
Tabla 4. Condiciones de digestión para fluido ruminal.	35
Tabla 5. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de selenio en muestras de selenito de sodio.	44
Tabla 6. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de selenio en muestras de levadura.	45
Tabla 7. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de selenio en muestras de fluido ruminal.	46
Tabla 8. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema de selenito de sodio.	52
Tabla 9. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema de levadura.	52
Tabla 10. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema de fluido ruminal.	53

Tabla 11. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de selenito de sodio.	54
Tabla 12. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de levadura.	54
Tabla 13. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de fluido ruminal.	54
Tabla 14. Resultados de la precisión de los sistemas.	55
Tabla 15. Resultados para determinar la precisión del sistema.	56
Tabla 16. Resultados para evaluar la linealidad del método de selenito de sodio.	57
Tabla 17. Resultados para evaluar la linealidad del método de levadura.	58
Tabla 18. Resultados para evaluar la linealidad del método de fluido ruminal.	58
Tabla 19. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método de Selenito de sodio ($\alpha = 0.05$).	61
Tabla 20. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método de Levadura ($\alpha = 0.05$).	62

Tabla 21. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método de Fluido ruminal ($\alpha = 0.05$).	62
Tabla 22. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de selenito de sodio.	66
Tabla 23. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de levadura.	66
Tabla 24. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de fluido ruminal.	66
Tabla 25. Resultados obtenidos para evaluar la precisión y exactitud del método.	68
Tabla 26. Resultados de los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación de los porcentajes de cada muestra analizada.	69
Tabla 27. Resultados para determinar la exactitud del método.	70
Tabla 28. Porcentajes de recobro obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de selenito de sodio.	71
Tabla 29. Porcentajes de recobro obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de levadura.	72

Tabla 30. Porcentajes de recobro obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de fluido ruminal.	72
Tabla 31. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de selenito de sodio.	73
Tabla 32. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de levadura.	73
Tabla 33. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de fluido ruminal.	74
Tabla 34. Análisis de variancia de la linealidad del sistema de selenito de sodio.	88
Tabla 35. Análisis de variancia de la linealidad del sistema de levadura.	90
Tabla 36. Análisis de variancia de la linealidad del sistema de fluido ruminal.	92
Tabla 37. Análisis de variancia de la linealidad del método de selenito.	94
Tabla 38. Análisis de variancia de la linealidad del método de levadura.	96

Tabla 39. Análisis de variancia de la linealidad del método de fluido ruminal.	98
Tabla 40. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de selenito de sodio.	100
Tabla 41. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de selenito de sodio. (Analista anidado en el día).	100
Tabla 42. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de selenito de sodio. (Día anidado en el analista).	100
Tabla 43. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de selenito de sodio por analista con diferencia mínima significativa al 95%.	101
Tabla 44. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de selenito de sodio por día con diferencia mínima significativa al 95%.	101
Tabla 45. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de levadura.	103
Tabla 46. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de levadura (analista anidado en el día).	103
Tabla 47. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de levadura (día anidado en el analista).	103

Tabla 48. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de levadura por analista con diferencia mínima significativa al 95%. 104

Tabla 49. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de levadura por día con diferencia mínima significativa al 95%. 104

Tabla 50. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de fluido ruminal. 106

Tabla 51. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de fluido ruminal (analista anidado en el día). 106

Tabla 52. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de fluido ruminal (día anidado en el analista). 106

Tabla 53. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de fluido ruminal por analista con diferencia mínima significativa al 95%. 107

Tabla 54. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de fluido ruminal por día con diferencia mínima significativa al 95%. 107

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág
Gráfico 1. Linealidad del sistema de selenio para selenito de sodio.	47
Gráfico 2. Linealidad del sistema de selenio para levadura.	48
Gráfico 3. Linealidad del sistema de selenio para fluido ruminal.	48
Gráfico 4. Gráfico de residuales de selenito de sodio.	50
Gráfico 5 . Gráfico de residuales de levadura.	50
Gráfico 6 . Gráfico de residuales de fluido ruminal.	51
Gráfico 7 . Curva de regresión de la linealidad del método de selenito de sodio.	59
Gráfico 8 . Curva de regresión de la linealidad del método de levadura.	60
Gráfico 9 . Curva de regresión de la linealidad del método de fluido ruminal.	60
Gráfico 10 . Gráfico de residuales de selenito de sodio.	64
Gráfico 11 . Gráfico de residuales de levadura.	64
Gráfico 12 . Gráfico de residuales de fluido ruminal.	65

Gráfico 13 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor día de selenito de sodio. 74

Gráfico 14 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor analista de selenito de sodio. 75

Gráfico 15 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor día de levadura. 75

Gráfico 16 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor analista de levadura. 76

Gráfico 17 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor día de fluido ruminal. 76

Gráfico 18 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor analista de fluido ruminal. 77

LISTA DE ABREVIATURAS

EAA	Espectrofotometría de Absorción Atómica
EAA-GH	Espectrofotometría de Absorción Atómica por Generador de Hidruros
RRD's	Dispositivos de retención en rumen.
Ar	Arsénico
Se	Selenio
Pb	Plomo
Na	Sodio
Te	Telurio
Bi	Bismuto
N ₂	Nitrógeno
Ar	Argón
NaBH ₄	Borohidruro de Sodio
HNO ₃	Ácido Nítrico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
H ₂ O	Agua
Na ₂ SeO ₄	Selenato de Sodio
Na ₂ SeO ₃	Selenito de Sodio
mA	Miliampers
nm	Nanómetro
mg	Miligramo
kg	Kilogramo
μm	Micrómetro

μg	Microgramo
g	Gramo
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
min.	Minuto
M	Molar
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
MHz	Megahertz
W	Watts
C.N.Q.F.B.	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
C.V.	Coeficiente de variación
r^2	Coeficiente de determinación
r	Coeficiente de correlación
t	Prueba t de student
gl	Grados de libertad
P-Value	Valor de probabilidad
R.A.	Reactivo Analítico
Conc est.	Concentración estimada
Conc real	Concentración real
SS	Suma de cuadrados
MS	Media de cuadrados
F calc.	F calculada
F crít.	F crítica
Ho	Hipótesis nula

Ha	Hipótesis alterna
t cal	t calculada
t crítica	t crítica
LCI	Límite inferior de confianza
LSC	Límite superior de confianza
LSD	Diferencia Mínima Significativa
%	Porcentaje

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Validar los métodos de digestión ácida en horno de microondas para cuantificar selenio en selenito de sodio, levadura y fluido ruminal por espectrofotometría de absorción atómica, a fin de garantizar la confiabilidad del procedimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la cantidad de selenio en selenito de sodio, levadura (materia prima) y fluido ruminal con los métodos de digestión ácida en horno de microondas, empleando espectrofotometría de absorción atómica con el sistema de atomización de flama y generador de hidruros, respectivamente.
- Validar los métodos de digestión ácida de las diferentes muestras, determinando los parámetros de linealidad y precisión del sistema, así como la linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión y reproducibilidad del método.
- Establecer por medio de los resultados, si los métodos de digestión ácida cumplen con los propósitos para los cuales fueron diseñados.

HIPÓTESIS

- Al realizar la validación de los métodos de digestión ácida en horno de microondas, se podrá determinar la confiabilidad de los métodos para cuantificar el selenio en las muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal; así mismo, se podrá ayudar en futuros trabajos a los estudios farmacocinéticos, de bioequivalencia y de biodisponibilidad en el ámbito farmacéutico con los resultados que se generen en éste trabajo.

INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de su control de calidad de la forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. Así mismo, el método analítico debe ser capaz de satisfacer los requisitos para las aplicaciones requeridas. Por lo tanto, el propósito principal es unificar criterios entre los profesionistas, y así, hacer más fácil y productivo el trabajo de todos los que de alguna manera, estamos involucrados en este tipo de actividades.¹

El método que se valida en este trabajo es un proceso fisicoquímico, ya que el proceso que se lleva a cabo en las muestras de selenito de sodio, levadura enriquecida con selenio y fluido ruminal, es una digestión ácida. Dicho proceso es un pretratamiento que asegura la destrucción de la materia orgánica y la disolución del selenio en un medio ácido. Para llevar a cabo este proceso, se emplea un horno de microondas que ayuda a tener ciertos beneficios al utilizarlo, como son: reducir costos y tiempo, así como el uso de reactivos y muestras; además, evita la pérdida de elementos volátiles, para posteriormente, realizar la determinación de selenio mediante espectrofotometría de absorción atómica con el sistema de atomización flama y Generador de Hidruros (EAA-GH). Este último, es un método muy sensible, en el cual, se pueden analizar concentraciones muy pequeñas de selenio (1-100 ppb).

La finalidad de validar estos métodos es asegurar que el tratamiento que se les da a las muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal, sean reproducibles y confiables, y así mismo, demostrar que los resultados de la posterior determinación de selenio por absorción atómica, cumplan con las especificaciones requeridas para suplementar el selenio en los rumiantes.

Dado que el selenio es un metal volátil, el empleo de sistemas cerrados y el horno de microondas, facilita el lograr estas metas independientemente de la complejidad de la muestra.

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades del selenio

El selenio es un elemento esencial para los seres vivos, ya que forma parte de varios procesos metabólicos indispensables para el desarrollo normal del cerebro, además, es parte importante para prevenir la enfermedad del músculo blanco que provoca la muerte en rumiantes y tiene influencia sobre la reproducción y resistencia a otras enfermedades. El elemento es incorporado dentro de la molécula de la enzima glutatión peroxidasa, la cual, es vital para proteger a los glóbulos rojos y membranas celulares contra las reacciones indeseables con peróxidos solubles que se acumulan en los tejidos.

El selenio tiene la capacidad de acumularse en el organismo y provocar serios casos de intoxicación. Este elemento principalmente se excreta por la orina, la cual, es usada como una matriz importante para determinar altas concentraciones de selenio. Es transformado en varios compuestos orgánicos e inorgánicos y excretado de ésta manera.

Varias técnicas se utilizan para la determinación de selenio total en muestras biológicas. La determinación generalmente se realiza por espectrofotometría de absorción atómica con los sistemas de atomización: flama, generador de hidruros (e inclusive por horno de grafito), espectrofotometría por plasma y acoplamiento inductivo y fluorescencia molecular.²

El selenio se considera como uno de los elementos más tóxicos para los animales a concentraciones superiores de 5 ppm en sangre. Tiene un margen de tolerancia de 0.05 y 2 ppm. La intoxicación de los animales generalmente se debe al consumo de plantas con alto contenido de selenio.

La intoxicación por selenio puede darse en forma aguda o crónica. La intoxicación aguda generalmente se produce por la ingestión de suficiente cantidad de plantas con alto contenido de selenio. No obstante, la intoxicación crónica se produce cuando los animales consumen forraje, cereales, hierbas y plantas que contienen pequeñas cantidades de selenio, pero que las consumen en un período largo, es decir, durante semanas o meses.

La deficiencia de selenio se ve reflejada por una disminución en la actividad sanguínea de la enzima glutatión peroxidasa, relacionada con el sistema inmunológico y el tracto reproductivo de los animales. Se considera una deficiencia del elemento en los animales cuando la concentración de selenio es inferior a 0.1 – 0.2 ppm.

Algunas de las principales enfermedades por la deficiencia de selenio son:

- Enfermedad del músculo blanco
- Distrofia muscular
- Diarrea
- Efectos sobre el sistema inmune
- Infertilidad
- Placenta retenida
- Síndrome de crecimiento deficiente
- Debilidad neonatal

2. Suplementación de selenio

La suplementación de selenio para rumiantes, se puede realizar a través de compuestos orgánicos e inorgánicos. Las fuentes de suplementación inorgánica, suelen ser una buena alternativa para mantener las concentraciones de selenio constantes en el animal.³

2.1. Selenio inorgánico

El selenito de sodio (Na_2SeO_3) es la forma inorgánica más común del selenio y es un compuesto de gran importancia en nutrición para rumiantes, el cual, contiene un 45% de selenio.

Es uno de los suplementos más comunes en las formas de selenio para rumiantes junto con el selenato de sodio (Na_2SeO_4 contiene el 42% de selenio). Comparando estas dos fuentes inorgánicas, el selenato de sodio tiene más variabilidad en la concentración de selenio que el selenito de sodio dentro de los tejidos. En animales rumiantes se han hecho estudios administrando 0.20 mg/Kg como dieta en forma de selenato de sodio, con lo cual se ve incrementada la concentración de selenio en plasma y sangre. Al administrar selenito de sodio, la concentración en plasma y sangre no se ve afectada. Es por ello, que comúnmente se utiliza el selenito de sodio como un suplemento de selenio para los rumiantes.^{4, 5}

2.2. Selenio orgánico

La suplementación del elemento se puede realizar a través de compuestos orgánicos como selenometionina y selenocisteína. El selenio orgánico de levaduras es excelente fuente de suplementación de selenio para todas las especies animales, debido a su elevada biodisponibilidad y es retenido más efectivamente en el músculo, leche y tejidos que el selenio inorgánico (selenito de sodio, selenato de sodio).³

Cuando se administra selenio orgánico en animales rumiantes, se ha observado que incrementa la concentración del elemento en muestras de leche, sangre e hígado que si se administrara selenio en su forma inorgánica. La concentración de selenio se incrementa en un orden de 2 a 3 veces más que el selenio inorgánico. Por ejemplo, en estudios realizados con muestras de leche se determinó un incremento del contenido de selenio en un 130% comparado con un control, mientras que el incremento de selenio por selenito y selenato fue solo del 20%.³

3. Fluido ruminal

El rumen es considerado como el pre-estómago del animal. El reticulorumen proporciona ciertos factores para facilitar la aplicación de sistemas de liberación. Al suministrar un bolo dentro del rumen, se puede mantener ahí con medios adecuados sirviendo como una plataforma para la lenta liberación de los fármacos.

El pH del rumen oscila entre 5 y 7, esto depende de la salud, especie y el tipo de dieta de cada animal. Es importante considerar el pH del rumen, debido a que a los animales que se les suministran dispositivos para liberar fármacos de forma controlada, son sensibles a los cambios de pH, al igual que a los bolos. Sin embargo, estos últimos, pueden tener variaciones en su funcionamiento debido a estos cambios. Dichos dispositivos se les denomina "dispositivos de retención en rumen" (RRD's). Estos dispositivos pueden permanecer en el reticulorumen por días, semanas, o hasta años, esto depende del tipo de fármaco, dosificadores y excipientes. Las condiciones de la atmósfera del rumen son altamente reductoras, las cuales, se consideran anaeróbicas. Los gases que se encuentran dentro del rumen son: dióxido de carbono, hidrógeno y metano.⁶

3.1. Efectos de diferentes fuentes de Selenio sobre la flora ruminal

La microflora del rumen es simbiótica y ha coevolucionado para efectuar la predigestión de polisacáridos de difícil degradación, como son las celulosas.

Los microorganismos del rumen, tienen la capacidad de incorporar selenio inorgánico a los aminoácidos, pero también tienen la capacidad de desincorporarlo cuando es suplementado.

La regulación de estos procesos no está claramente explicada, pero se ha relacionado la disponibilidad y la forma química del selenio en la dieta y el porcentaje de proteína y carbohidratos en la misma, entre los factores que alteran la transformación del selenio por parte de los microorganismos.

Las contribuciones nutricionales de los microorganismos dependen de la dieta, de la anatomía del sistema digestivo, del pH y del tiempo de retención de la digestión.⁶

Unos de los factores que influyen en el metabolismo del selenio son los microorganismos del rumen, en el cual, el selenio inorgánico administrado en los rumiantes, generalmente es reducido durante el proceso de fermentación, y lo reducen a formas insolubles.

4. Generalidades del Horno de Microondas

El calentamiento por un sistema de microondas consiste en la absorción directa de energía por el material para ser calentado. Actualmente, el diseño de equipos de microondas le permite a la Química Analítica, hacer uso de ésta tecnología para digerir diversas muestras biológicas; así mismo, pueden determinarse otros elementos de la tabla periódica.

Las muestras biológicas no son completamente solubles en agua o en solventes orgánicos. Así que, su análisis implica la descomposición de materia orgánica mediante un pre-tratamiento (digestión ácida).⁷

Algunos factores que influyen en el calentamiento de soluciones están relacionados con las propiedades físicas y características iónicas de las muestras. Con respecto a las propiedades físicas se encuentran: viscosidad, temperatura, polaridad y capacidad calorífica. Sin embargo, la polaridad es el factor más importante para el calentamiento, ya que la acción de las microondas requiere que las soluciones sean altamente polares para efectuar el calentamiento de las mismas. Con respecto a las características iónicas se encuentran: concentración del analito, carga, movilidad y tamaño. Este último, es también muy importante, ya que entre más fina sea la partícula, más fácil se disolverá.

Las técnicas de digestión que se han empleado y se han reportado para la descomposición de la materia orgánica, son: el secado de la materia prima mediante la combustión en una mufla o a bajas temperaturas, adicionando mezclas de ácidos; pero, éstas técnicas tienen ciertas desventajas.

Una de ellas es el proceso de calentamiento prolongado; además, de que se obtienen recobros muy bajos de elementos y existe una pérdida apreciable de elementos volátiles (Ar, Se, Pb).

En métodos de digestión en vaso cerrado se utilizan mezclas de ácidos fuertes, existe menos riesgo de contaminación y volatilización de los elementos, a diferencia de los métodos de digestión en vaso semicerrado. Recientemente la digestión ácida efectuada en horno de microondas ha sido recomendada como un método auxiliar para la disolución de muestras biológicas. Se tienen ciertas ventajas al utilizar este método: se pueden alcanzar altas temperaturas que permiten que el punto de ebullición aumente debido a la presión que se produce dentro del vaso, se efectúan reacciones que no son posibles en condiciones normales, el tiempo de digestión es reducido debido a las altas temperaturas producidas en el vaso cerrado, se reduce la posibilidad de perder elementos volátiles y la cantidad de reactivos y muestra utilizados.⁷

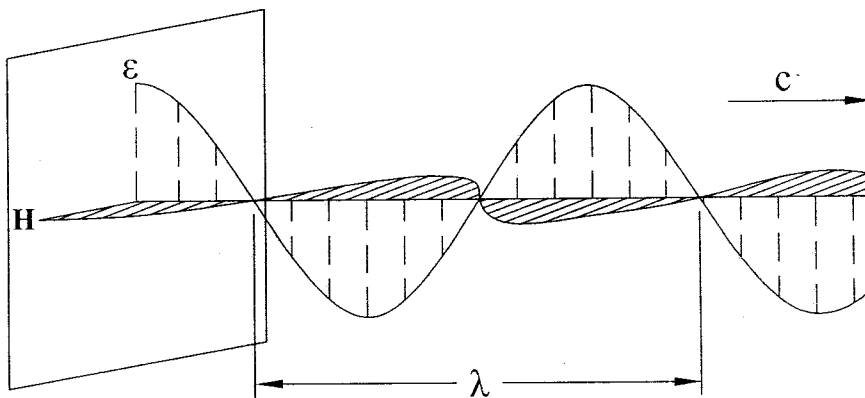
Los aspectos importantes que se deben considerar en la preparación de las muestras para someterlas a un sistema de microondas son los siguientes:

- Las muestras sólidas o líquidas deben permanecer en solución acuosa.
- Destruir toda la materia orgánica.
- Retener todos los analitos de interés a concentraciones detectables.
- No adicionar iones interferentes.
- Ajustar viscosidad y sólidos de la muestra, para un óptimo análisis.

4.1. Energía de Microondas

Una microonda (Figura 1) es una energía electromagnética, la cual, decrece en el espectro electromagnético y es definida en una medida de frecuencia de 300-300,000 MHz. La frecuencia preferente en un horno de microondas es de 2450 MHz, ya que con esta frecuencia se tiene la penetración adecuada y profunda para interaccionar con las muestras contenidas en los vasos. Esta frecuencia se ha convertido hoy en día como estándar.

Una Microonda



E = Campo Eléctrico

λ = Campo magnético

H = Longitud de onda (12.2 cm por 2450 MHz)

c = Velocidad de la luz (300,000 km/s)

Figura 1. Esquema de una microonda.

La energía de microonda es una radiación ionizante que causa movimiento molecular por migración de iones y la rotación de dipolos, sin causar ningún cambio en la estructura molecular. Esta energía no solo es absorbida por los ácidos minerales para producir calor en la solución de muestras, sino también es absorbido por las moléculas de las muestras.

Las interacciones de radiación con las moléculas puede ser insignificante o extremadamente significativo, esto depende de la composición y de la cantidad de muestra presente.

En general, las moléculas iónicas y polares interaccionan con la energía de microonda a través de los mecanismos de rotación dipolar y conductividad iónica. Estas interacciones pueden ayudar a la descomposición de algunas muestras y particularmente a la descomposición rápida.

La energía electromagnética (Figura 2) está formada por dos campos: magnético y eléctrico, los cuales, se mueven en dirección perpendicular, donde la energía electromagnética oscila entre un intervalo amplio de longitudes de onda y frecuencia. Solamente el campo eléctrico transfiere la energía en calor a una sustancia.⁸

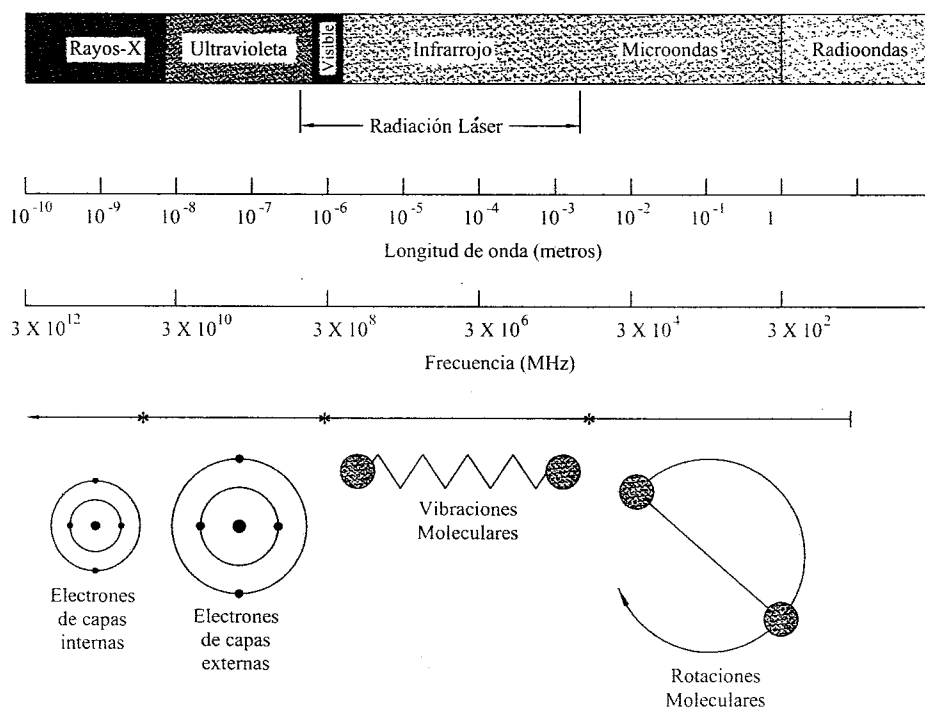


Figura 2. Energía electromagnética de una microonda.

La energía de microonda es absorbida por la muestra, a una cierta velocidad que depende de la disipación del factor de dispersión ($\tan\delta$).⁸ Dicho factor es la relación que existe entre la pérdida dieléctrica de la muestra (ϵ'') y su constante dieléctrica (ϵ'), donde tenemos que:

$$(\tan\delta = \epsilon'' / \epsilon').$$

La constante dieléctrica (ϵ') es la capacidad que tiene la muestra para obstruir la energía de microonda al pasar a través de ella y es la medida del factor de dispersión de la energía dispersada. Por lo tanto, el modelo de calentamiento de una muestra que es calentada con energía de microondas, depende del factor de dispersión de una muestra ($\tan\delta$).

La energía de microonda perdida indica que la cantidad de energía de microondas de entrada se pierde al dispersarse en forma de calor por la muestra. Este proceso se puede dar por dos diferentes mecanismos: conducción iónica y rotación dipolar.⁸

4.1.1. Conducción iónica

La conducción iónica (Figura 3) es la migración conductiva de iones que se encuentran en solución dentro de un campo electromagnético dado. La migración iónica consiste en un flujo de corriente que resulta del proceso de calentamiento, debido a la resistencia del flujo del ión. Todos los iones en una solución contribuyen al proceso de la conducción, pero la fracción de corriente cargada por alguna especie dada, es determinada por su concentración relativa y su movilidad inherente en el medio.

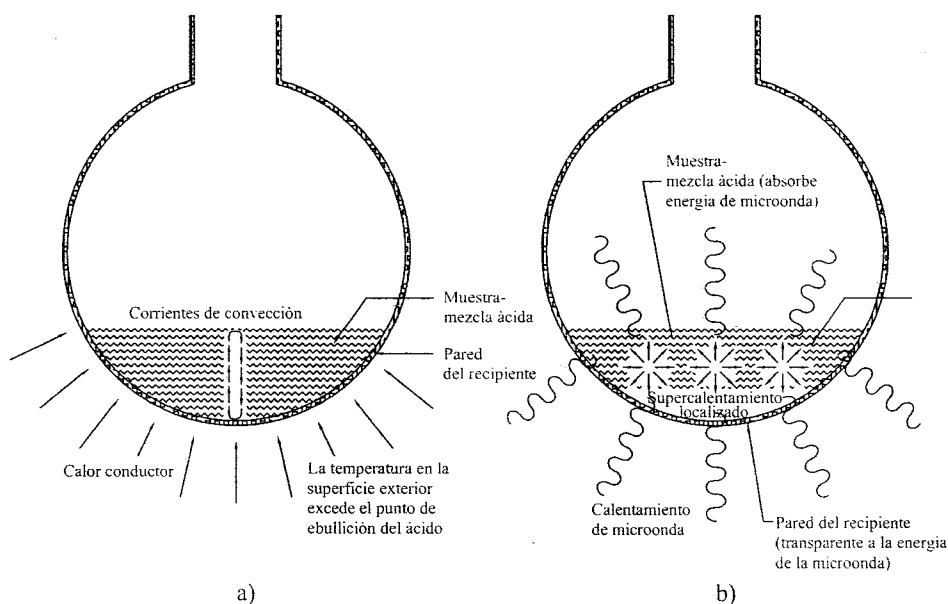


Figura 3. a) Esquema del calentamiento por conducción. b) Esquema de un calentamiento simple por energía de microonda.

4.1.2. Rotación dipolar

La rotación dipolar se refiere a una alineación de moléculas en la muestra que permanece o induce momentos dipolares dentro del campo eléctrico. Este campo eléctrico hace que la energía de microonda aumente y provoque la alineación de las moléculas polarizadas. La energía de microonda aplicada en el campo, causa que las moléculas pasen en un cierto tiempo a través del campo, apuntando en una sola dirección, y no en varias direcciones. Por lo tanto, existe un orden molecular permanente y una energía inducida.⁸

4.2. Componentes de un sistema de microondas

El objetivo principal de diseñar equipos de microondas es la preparación de muestras con la suficiente capacidad para hacer muestras múltiples, monitorear y controlar las reacciones que se lleven a cabo, tener un alto rendimiento de muestras y automatizar el sistema.⁹

Los componentes de un sistema de microondas son los siguientes:

- Magnetron (generador de microonda)
- Guía de onda
- Cavity
- Agitador
- Extractor
- Rotor
- Atenuador
- Control del ciclo de trabajo

El magnetrón (Figura 4) es el encargado de producir la energía de microonda, propagada en la guía de onda e inyectada directamente desde la cavidad de microonda donde el agitador distribuye la energía en varias direcciones. El magnetrón es un diodo cilíndrico constituido con un ánodo y un cátodo. Un campo magnético está sobrepuesto sobre el diodo que está alineado con el cátodo. En el ánodo se encuentra un anillo de cavidades resonantes con un potencial de volts alcanzado a través del diodo. Debido al campo eléctrico, los electrones son liberados, los cuales, resuenan cuando el magnetrón oscila. Los electrones oscilantes liberan energía hasta el campo de microonda que radia desde una antena cerca de un tubo con vacío. La energía de microonda ejercida por el magnetrón es generalmente medida en watts y se encuentra entre 600 y 700 W.⁸

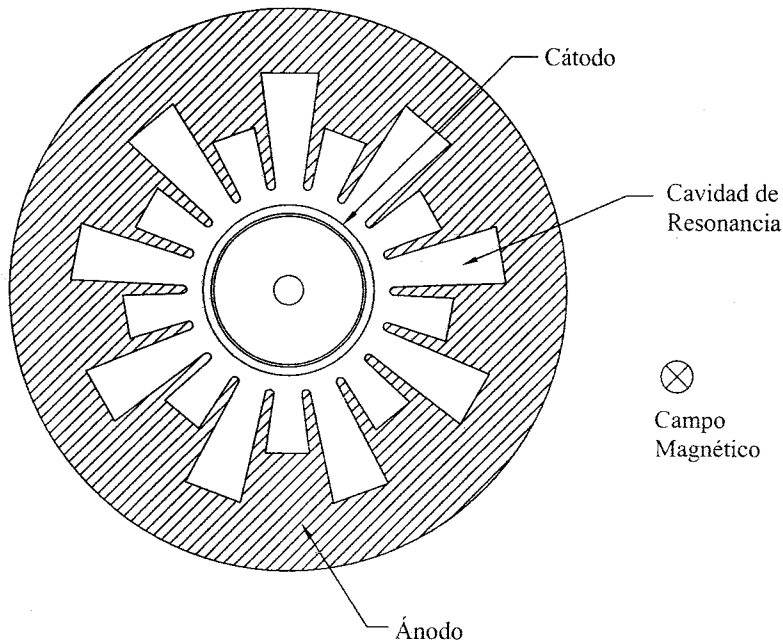


Figura 4. Esquema de un magnetrón.

La guía de onda (Figura 5, pág 16) es una vía donde se dirigen las microondas generadas por el magnetrón mediante la cavidad de microonda.

La cavidad de microonda se localiza en los extremos del horno de microondas. Las microondas son propagadas alrededor de ésta, las cuales, se reflejan en forma repetida proporcionando el calor a la muestra.

El agitador es una forma de abanico con cuchillas que se usa para mezclar y distribuir la energía que entra desde la guía de onda en la cavidad de microonda, para calentar la muestra.

El rotor es un dispositivo que se localiza en el centro del horno y sirve para colocar la tornamesa o carrusel y girar los vasos durante el proceso de digestión, permitiendo un calentamiento homogéneo. Los vasos de digestión son contenedores de material resistente (teflón) que permiten la entrada de la energía de microondas hacia la muestra. Las microondas no son absorbidas por el vaso, lo cual, favorece una mayor eficiencia en el calentamiento.

El atenuador sirve como protección para evitar que las microondas que no son absorbidas, puedan dañar de alguna forma al magnetrón y por lo tanto, pueden provocar una menor eficiencia del calentamiento.

El extractor sirve para mantener una temperatura considerable dentro del equipo de microondas a una cierta velocidad, generalmente es de 100 pies³/min.

El control del ciclo de trabajo permite mantener las condiciones óptimas durante el proceso de calentamiento. El equipo trabaja en modos de rampeo, en el cual, el factor de control es la temperatura y la presión.

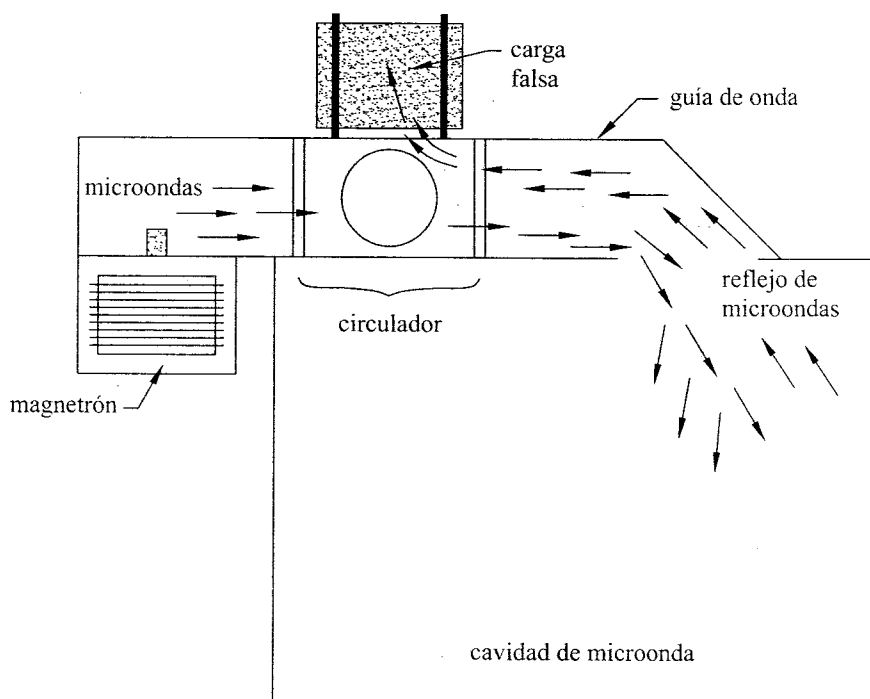


Figura 5. Esquema de la desviación de microondas generadas por el magnetrón.

5. Generalidades de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA)

La absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Es un proceso mediante el cual, los átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía radiante a una longitud de onda específica. Las muestras se vaporizan (atomización) y se convierten en átomos libres. Sobre la muestra atomizada se hace incidir la radiación electromagnética que será absorbida parcialmente por el analito.¹⁰

Un átomo no emite ni absorbe energía mientras sus electrones (partículas eléctricamente negativas) se mantienen en sus respectivas órbitas llamadas estacionarias. Si el átomo es excitado en alguna forma, el electrón puede saltar a un nivel de mayor energía y absorber energía; al regresar a la órbita en que estaba, emite energía.¹¹

La aplicación de la técnica de absorción atómica como herramienta analítica se ha difundido ampliamente a nivel mundial. Se emplea en el análisis de aguas, suelos, Bioquímica, Toxicología, Medicina, Industria Farmacéutica, Alimenticia y Petroquímica; entre otros. La absorción atómica debe adecuarse al tipo de muestra por analizar y las concentraciones de las especies presentes, para lo cual se han desarrollado implementos que colaboran a obtener mejores resultados como son: horno de grafito y generador de hidruros. Sin embargo, en la práctica cotidiana se ha encontrado que los buenos resultados de la aplicación de estas herramientas depende del tratamiento de las muestras.

5.1. Instrumentación del EAA

1. *Lámpara de cátodo hueco.* Es un tubo de vidrio (Figura 6) que contiene argón o neón a baja presión (1-5 torr) y dos electrodos. El ánodo suele ser de wolframio y el cátodo, de forma cilíndrica, está hecho del metal que se desea determinar. Cuando se aplica una diferencia de potencial suficiente entre los dos electrodos, tiene lugar la ionización del gas y los cationes gaseosos son acelerados hacia el cátodo, adquiriendo la suficiente energía cinética. Los átomos son excitados al chocar con los iones gaseosos, y al regresar a su estado fundamental, emiten una radiación característica.

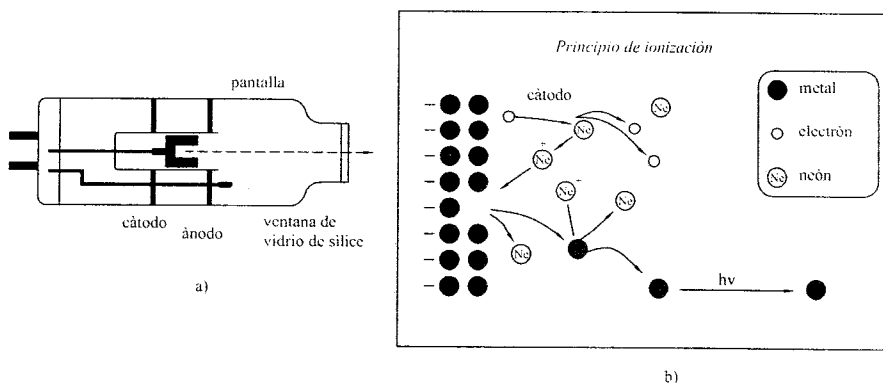


Figura 6. a) Lámpara de cátodo hueco. b) Excitación de los átomos dentro del cátodo hueco bajo el impacto de iones neón.

2. *Monocromador*. Tiene la finalidad de aislar la línea de resonancia del elemento de interés; así, proporciona una mejor separación de las longitudes de onda, reduciendo el flujo total de luz que llega al detector.

3. *Detector*. Convierte la radiación en una señal eléctrica medible. La señal es amplificada y usada para dar una medida cuantitativa de absorción. El detector universalmente usado es el tubo fotomultiplicador, ya que ningún otro sistema ofrece la misma sensibilidad en el margen de longitudes de onda (190 – 850 nm) utilizado en esta técnica.

5.2. Sistema de atomización por flama

La atomización (Figura 7) es el paso más importante de la absorción atómica. El objetivo es producir átomos libres en forma de vapor, y hacerlos que absorban luz a una determinada longitud de onda. Para llevar los componentes en solución a un estado atómico, se requiere de ciertos dispositivos, los cuales son: nebulizador, cámara de atomizado y quemador.

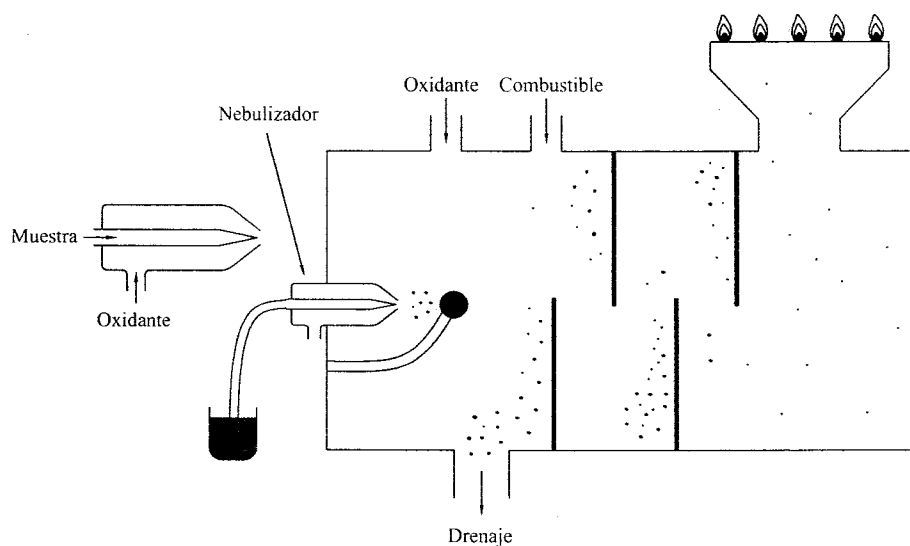


Figura 7. Esquema del proceso de atomización por flama.

Las etapas que deben seguir los átomos de un analito en el proceso de atomización por flama son las siguientes:

1. *Transporte de la muestra.* La muestra (en solución) es transportada hasta la cámara de nebulización a través de un capilar mediante un proceso de aspiración.
2. *Nebulización.* Esta etapa consiste en la conversión de la solución en una niebla muy fina o aerosol. La gran velocidad del gas oxidante en el extremo del capilar, permite que el líquido se disperse en gotitas muy finas.
3. *Transporte del aerosol.* Esta etapa tiene la finalidad de asegurar que solamente lleguen hasta la llama las gotitas de tamaño adecuado (diámetro inferior a $10\mu\text{m}$). Esto se consigue mediante una esfera de impacto pretendiendo eliminar las gotitas de mayor tamaño producidas en la nebulización.
4. *Desolvatación.* Eliminación de agua y otros disolventes de la muestra.
5. *Vaporización.* Consiste en la transformación de las partículas sólidas o fundidas en vapor. Es una etapa crítica, ya que depende de la composición química del analito, del tamaño de las partículas y de la temperatura de la flama.

5.2.1. Características de la flama

La flama (Figura 8) es el resultado de una reacción exotérmica entre un gas combustible y un gas oxidante acarreados hacia el quemador. El quemador debe proporcionar un soporte adecuado y estable para la flama. Generalmente los quemadores son alargados y estrechos para proporcionar un apropiado camino de interacción del vapor atómico con el haz de luz.

La flama generada en el quemador, tiene tres zonas que la caracterizan: zona interna, zona intermedia y cono externo.

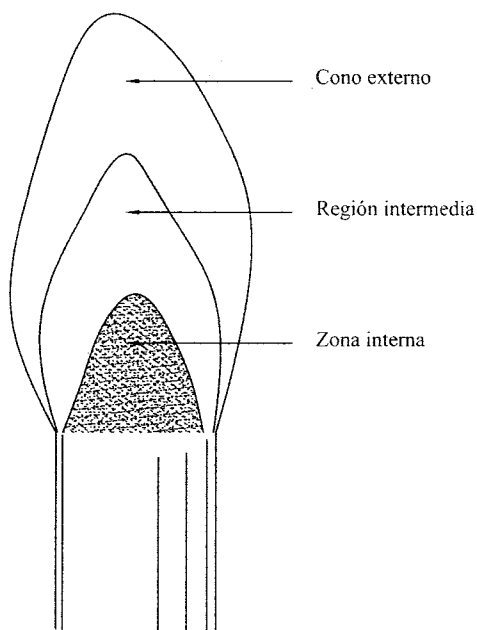


Figura 8. Esquema de las zonas de la flama.

En la **zona interna**, la combustión es incompleta; suele presentar color azul, como consecuencia de la emisión producida por C_2 , CH y otros radicales. Esta zona nunca se utiliza en trabajos analíticos.

La **zona intermedia** o región interconal, es la parte más caliente de la flama; en ella tiene lugar la combustión completa y prácticamente se alcanza un equilibrio termodinámico. Esta es la zona más utilizada en trabajos analíticos.

El **cono externo** es una zona en la que productos parcialmente oxidados en las regiones más internas pueden completar su combustión. Esta zona no se utiliza, debido a que se enfría por el aire circundante.

La flama aire-acetileno es la más utilizada en absorción atómica, ya que resulta apropiada para la atomización efectiva de elementos. Su temperatura máxima es de aproximadamente 2100 – 2400 °C. La temperatura depende de la mezcla de gases (oxidante y combustible) de la flama.^{10, 12}

5.3. Sistema de atomización por generador de hidruros

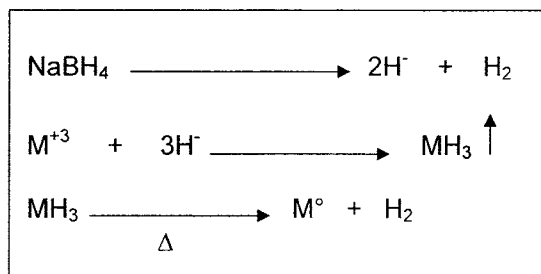
La atomización por generador de hidruros es un método muy sensible que implica la separación de los elementos en forma gaseosa. Esta técnica se utiliza para aquellos elementos que pueden formar hidruros covalentes volátiles, como son: As, Se, Sb, Sn, Te, Bi, Pb. Una muestra acuosa acidificada de estos elementos, reacciona con una sustancia reductora como es el borohidruro de sodio, para formar los correspondientes hidruros gaseosos extremadamente volátiles a temperatura ambiente.

El hidruro gaseoso y el hidrógeno, producidos por la reacción, son arrastrados por un gas inerte, argón o nitrógeno, a una celda de cuarzo, en donde los hidruros son atomizados. Posteriormente, se produce una señal que es detectada por el espectrofotómetro de absorción atómica, donde, la altura de la señal es proporcional a la cantidad de analito en la muestra. La técnica de generador de hidruros ofrece una excepcional sensibilidad para el análisis de elementos formadores de hidruros volátiles en niveles de detección de ppb ($\mu\text{g/L}$).

Para la formación de hidruros, el analito debe estar en su estado óptimo de oxidación, esto se lleva a cabo mediante una digestión utilizando oxidantes fuertes como son: HNO_3 y H_2SO_4 . Posteriormente se requiere de una reducción del mismo analito por la acción de un agente reductor (NaBH_4 1%).

El medio de reacción debe ser ácido para que la reacción sea cuantitativa. Cuando la celda de cuarzo es calentada con flama aire acetileno se obtiene el hidruro del elemento.⁹

Las reacciones que se dan en el generador de hidruros son las siguientes:



5.3.1. Descripción del Generador de Hidruros

El generador de hidruros (Figura 9) es un instrumento de flujo continuo que cuenta con un sistema de mangueras y un separador gas - líquido, a través de los cuales la muestra y los reactivos son bombeados continuamente, al igual que el gas de arrastre, obteniéndose así una producción constante de hidruros gaseosos a través del haz de luz.

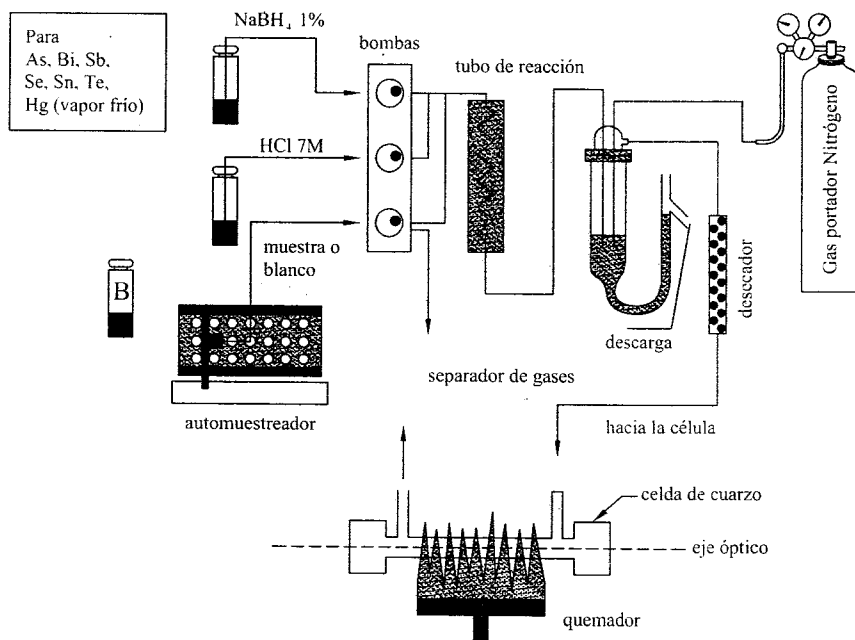


Figura 9. Esquema de un dispositivo de generador de hidruros.

El flujo de los reactivos (ácido, reductor y muestra) son adicionados continuamente por una bomba peristáltica junto con el de gas de arrastre (N_2 o Ar) donde se mezclan con la muestra. La mezcla se lleva a cabo en un serpentín de reacción dirigiéndose a un separador gas – líquido, donde la fase líquida es drenada y el gas es arrastrado junto con los hidruros generados hacia la celda de cuarzo.¹²

La celda de cuarzo tiene una entrada en el centro y dos salidas en sus extremos y reducido su diámetro en la parte central, por donde son introducidos los hidruros. La celda debe ser calentada a una temperatura de 1000 °C aproximadamente mediante una flama aire-acetileno para atomizar a los hidruros.

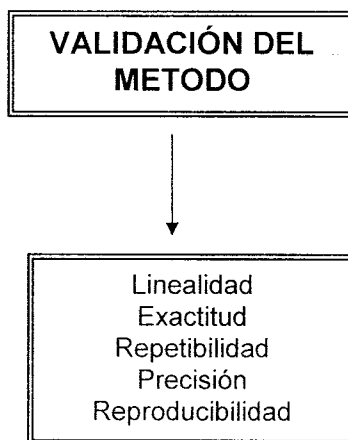
6. Especificaciones para validar un método analítico

La validación de un método analítico, es un proceso, mediante el cual se confirma y se demuestra por estudios de laboratorio, que el método cumple con las especificaciones requeridas para la aplicación analítica deseada. Este proceso debe estar perfectamente documentado.¹³

Desde el punto de vista biológico, la validación de métodos bioanalíticos deben generar datos confiables para los estudios farmacocinéticos, de bioequivalencia y biodisponibilidad.

El método de validación, según la USP (United States Pharmacopeia) y FDA (Food and Drug Administration), establece que el método analítico debe de garantizar que la metodología es exacta, precisa, reproducible y lineal.¹

En el ensayo de validación del método de digestión ácida, se consideraron las siguientes características de acuerdo a la guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (C.N.Q.F.B.)¹⁴:



6.1. Linealidad

La linealidad del sistema o método es la capacidad que tiene el sistema de medición o el método para asegurar que los resultados analíticos, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Los resultados pueden ser obtenidos directamente o mediante una transformación matemática.

6.2. Precisión

Es la cualidad del método relacionada con la dispersión de los resultados analíticos que deben ser concordantes entre sí, alrededor de su valor medio.

6.3. Exactitud

Es la concordancia entre un valor obtenido (media) y el valor aceptado o de referencia. El porcentaje de recobro del analito, debe acercarse al 100% para considerarlo como exacto. En el caso de elementos traza, se consideran recuperaciones aceptables entre un 80 y 90%.

6.4. Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y el mismo método, es decir, bajo las mismas condiciones.

Es el grado de concordancia entre los ensayos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

La precisión es considerada como una medida del grado de repetibilidad y/o reproducibilidad de un método analítico bajo las condiciones normales de operación que normalmente se expresa como el porcentaje de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación entre un número significativo de muestras.

6.5. Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, usando diferentes instrumentos y laboratorios, es decir, bajo diferentes condiciones.

6.6. Criterios de aceptación.

La Tabla 1 muestra los criterios especificados para que el método pueda ser confiable, según la Guía de validación del C.N.Q.F.B.

Tabla 1. Especificaciones para la evaluación de los métodos.

Parámetro	Criterio de evaluación	Criterio de aceptación
Linealidad del sistema	C.V. r^2 r	C.V. $\leq 2\%$ $r^2 \geq 0.98$ $r \geq 0.99$
Precisión del sistema	C.V.	C.V. $\leq 2\%$
Linealidad del método	C.V. r^2 r	C.V. % de recobro $\leq 3\%$ (mta no biológica) C.V. % de recobro $\leq 5\%$ (mta biológica) Cant adic vs cant rec. $r^2 \geq 0.98$ $r \geq 0.99$ IC (β_1) incluir la unidad IC (β_0) incluir el cero
Precisión del método	C.V.	C.V. $\leq 3\%$ (mta no biológica) C.V. $\leq 5\%$ (mta biológica)
Exactitud	Prueba de <i>t de student</i>	$t_{exp} < t_{crítica} (\alpha, gl)$ $t_{crítica} (0.001, 5) = 6.8688$
Reproducibilidad y repetibilidad	Modelo factorial jerárquico	ANALISTA $F_{exp} < F_{crítica} (\alpha, gl \text{ Analista}, gl \text{ Día})$ ó $P\text{-value} > 0.05$ $F_{crítica} (0.05, 1, 2) = 5.3176$ DÍA $F_{exp} < F_{crítica} (\alpha, gl \text{ Día}, gl \text{ Error})$ ó $P\text{-value} > 0.05$ $F_{crítica} (0.05, 2, 8) = 4.4590$

PARTE EXPERIMENTAL

7. Equipos, Materiales y Métodos

EQUIPOS

- Balanza Analítica BOECO. 120g Máximo - 0.01g Mínimo. Alemania
- Horno de Microondas Mars 5 CEM Corporation Falcon USA.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica SpectrAA 800 Varian Australia.
- Generador de Hidruros VG 77 Varian Australia.

MATERIAL

- Micropipetas Finnpipette Labsystems (1-5 mL), (100-1000 μ L), (20-200 μ L), (5-50 μ L).
- Matraces volumétricos Kimax México. Tipo A. (10, 25, 50, 100 mL).
- Matraz volumétrico Pirex México. Tipo A. (10 mL)
- Matraz volumétrico Blau Brand (1000 mL).
- Probeta IVA Argentina patente 151475 (1000mL).
- Probeta Kimax México (10mL).
- Vaso de precipitados Kimax México (150mL)
- Papel *parafilm*
- Vasos de teflón HP500 plus Falcon USA. Temp. Máx. 210°C. Presión máx. 350psi.
- Tapones de teflón HP500 plus Falcon USA.
- Membranas para vasos HP500 safety CEM #431300 Falcon USA.
- Sensor de temperatura de fibra óptica CEM Mod. RTP-300 Plus (-40°C - 250°C).
- Lámpara de cátodo hueco de selenio HC Lamp-Se Varian Australia. 01k0308.
- Celda de cuarzo Varian Australia.
- Tubos de bomba morado/negro y negro/negro VGA

REACTIVOS

- Ácido Clorhídrico R.A. 36.5-38% de pureza J.T. Baker de México.
- Ácido Nítrico R.A. 65.4% de pureza J.T. Baker de México.
- Peróxido de Hidrógeno en solución al 30% J.T. Baker de México.
- Hidróxido de Sodio perlas 98.4% de pureza bajo en carbonatos J.T. Baker de México.
- Borohidruro de Sodio 99% de pureza Aldrich.
- Agua desionizada. 18.2 MΩ cm. Millipore.

ESTÁNDARES

- Estándar de selenio High-Purity 1000 ± 3 µg/mL en 2% de Ácido Nítrico. 99.999% de pureza.
- Estándar de selenio Cientific Company Selenium Powder. 99.58% de pureza.

MUESTRAS

- Selenito de Sodio.
- Levadura Sel – Plex™. Lote: ES – 392. 2000 ppm.
- Fluido ruminal de vaca Holsteing no tratada.

GASES:

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

7.1. Tratamiento de las muestras

Mediante el desarrollo y optimización de los métodos de digestión ácida que realizó nuestro grupo de trabajo (Gleason, 2004)¹⁵ en las muestras biológicas de leche y plasma, se cuantificó el selenio total en selenito de sodio, levadura (por flama) y fluido ruminal (por generador de hidruros) siguiendo la técnica por absorción atómica. Los métodos y las condiciones de digestión para cada una de las muestras se presentan en el esquema siguiente:

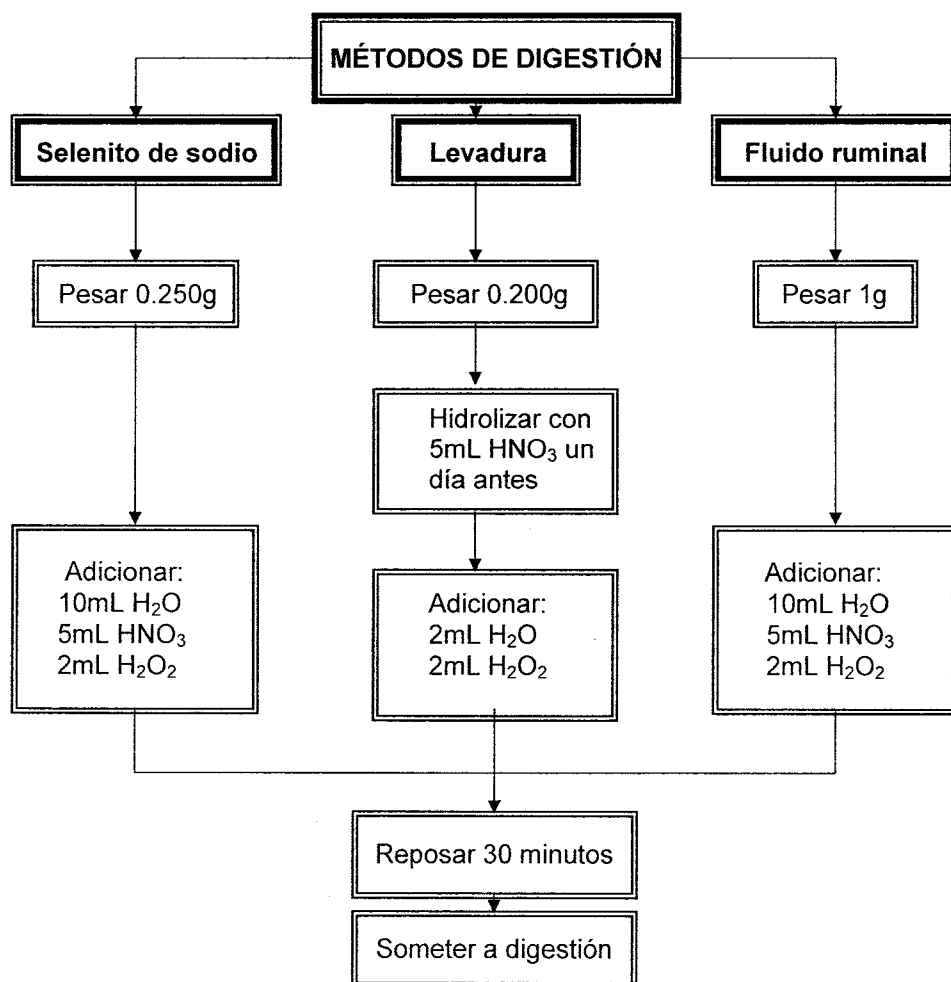


Tabla 2. Condiciones de digestión para selenito de sodio.

Potencia	% de potencia	Tiempo de alcance (min)	Temperatura (°C)	Presión (psi)	Tiempo de Mantenimiento (min)
1200 W	100	6.24	100	350	5.12
1200 W	100	4.15	140	350	6.12

Tabla 3. Condiciones de digestión para levadura.

Potencia	% de potencia	Tiempo de alcance (min)	Temperatura (°C)	Presión (psi)	Tiempo de Mantenimiento (min)
1200 W	100	30	140	200	20

Tabla 4. Condiciones de digestión para fluido ruminal.

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

❖ *NOTA:* Los programas del horno de microondas para las muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal fueron: Leche2, ALIMENTOO y Plasma2, respectivamente. ¹⁵

Después de terminado el proceso de digestión, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Las muestras digeridas de selenito de sodio y fluido ruminal se transfirieron a matraces volumétricos de 50 mL y se llevaron a la marca de aforo con HCl 7M. Las muestras de levadura se aforaron con agua desionizada. Los vasos y los tapones se enjuagaron tres veces con HCl 7M y agua, respectivamente.

Para el caso de selenito de sodio, se realizó una dilución 1/50 de cada una de las muestras, para la determinación del selenio total por absorción atómica. Finalmente, las muestras fueron transferidas a recipientes de polietileno y se dejaron reposar hasta el día siguiente para su posterior análisis.

Las curvas de calibración de selenio para cada una de las muestras se prepararon de acuerdo al tipo de sistema de atomización (flama y generador de hidruros).

Para determinar el selenio total en las muestras de selenito de sodio, se preparó una curva de calibración de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$ partiendo de una solución stock de selenio de 200 $\mu\text{g/mL}$. (El stock se preparó con agua desionizada, y la curva con HCl 7M). Esta curva se analizó mediante el sistema de atomización de flama.

Para el análisis de las muestras de levadura, la preparación de la curva fue de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$ (con agua desionizada), partiendo de una solución stock de selenio de 50 $\mu\text{g/mL}$ analizada por flama.

Por último, la curva de calibración para la determinación del selenio en las muestras de fluido ruminal, fue de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/L}$ (con HCl 7M), partiendo de una solución stock de selenio de 2 $\mu\text{g/mL}$ preparada con agua desionizada. Esta curva se analizó por el sistema de atomización de generador de hidruros.

7.2. Métodos de cuantificación

Los métodos de cuantificación utilizados para determinar el selenio total en las diferentes muestras fue el de espectrofotometría de absorción atómica con el sistema de atomización de flama y generador de hidruros.

En el caso de las muestras de selenito de sodio y levadura, la determinación del selenio fue mediante el sistema de atomización de flama (antes mencionado), ya que éste sistema tiene la capacidad de determinar concentraciones en partes por millón (ppm), mientras que para las muestras de fluido ruminal, la determinación del elemento fue mediante el sistema de atomización de generador de hidruros, éste sistema determina concentraciones en partes por billón (ppb).

Para iniciar el análisis se necesita abrir los tanques de acetileno y óxido nítrico, verificando que las presiones sean adecuadas (20 y 50 psi de presión, respectivamente). Una vez que se tienen los tanques abiertos y las presiones adecuadas, se prosigue a abrir las llaves de paso del acetileno, óxido nítrico y aire. Se prende el equipo y la computadora para abrir al programa SpectrAA y editar el método indicando el elemento que se va a analizar (en este caso, el selenio).

Los parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0 para determinar selenio en flama, se muestran en el anexo 1 (pág 85). Posteriormente se alinea el quemador y se selecciona el número de muestras que se van a leer. Después se mide el flujo, el cual se requiere de 4 a 6 mL/min para poder tener una buena determinación del elemento. Finalmente se optimiza la señal con el tercer punto de la curva para tener una buena sensibilidad del elemento.

Una vez optimizado el flujo de la muestra y de la señal, se prosigue con la lectura de las absorbancias de la curva de calibración y de las muestras.

El método de cuantificación utilizado para determinar el selenio total en fluido ruminal, fue el mismo para selenito de sodio y levadura, a diferencia de la utilización del sistema de atomización generador de hidruros que detecta concentraciones a nivel trazas (1 a 100 ppb). Los tanques de gas que se utilizan son acetileno y nitrógeno. La presión recomendada del nitrógeno es de 50 psi de presión. El proceso de análisis es el mismo; los parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0 para determinar selenio con generador de hidruros, se muestran en el anexo 2 (pág 86). Una vez, editado el método, se monta el generador de hidruros (VGA 77) colocando la celda de cuarzo sobre el soporte junto con la trampa. El soporte se coloca sobre el quemador, verificando que la señal no sea obstruida por la celda. Después se colocan las mangueras de la muestra, ácido y reductor en los módulos de entrada, en los cuales, se indica el tipo de solución. Una vez colocadas las mangueras, se optimiza el flujo de cada solución (muestra, ácido, reductor.) Los flujos que se requieren son de 7 a 8 mL/min para la muestra y de 1 mL/min para el ácido y reductor.

Finalmente se optimiza la señal y se calibra el equipo a cero colocando el ácido (HCl 7M) y el reductor (NaBH_4 1%) en las mangueras correspondientes. Ya que se tiene optimizado y calibrado el equipo, se inicia el análisis con la curva de calibración de selenio y las muestras.

(Para más información, se recomienda consultar la referencia de Nonato¹⁶, Sistemas de atomización...).

7.3. Validación

7.3.1. Validación del sistema

Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó mediante la preparación de una curva de calibración a partir de una solución stock de selenio preparada en agua desionizada a una concentración de 200, 50 y 2 µg/mL (para selenito, levadura y fluido ruminal, respectivamente). Con la primera solución stock de selenio se prepararon por triplicado soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL, preparadas con HCl 7M. Con la segunda, se prepararon por triplicado soluciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL, preparadas con agua desionizada. Con la última solución stock de selenio, se prepararon por triplicado soluciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/L, preparadas con HCl 7M.

Precisión del sistema

Para la evaluación de la precisión de los sistemas, se prepararon por sextuplicado soluciones a un nivel de concentración de 60 µg/mL, 15 µg/mL y 15 µg/L a partir de las soluciones stock de selenio de 200, 50 y 2 µg/mL respectivamente. Estos sistemas se analizaron de acuerdo al tipo de sistema de atomización correspondiente.

NOTA: El estándar que se utilizó para validar las muestras de levadura y fluido ruminal fue un Estándar de selenio en solución con HNO₃ 2% (anexo 14, pág 110). El estándar utilizado para la validación de las muestras de selenito de sodio fue un Estándar de selenio en polvo. (Anexo 13, pág 109).

7.3.2. Validación del método

Las muestras que se utilizaron para validar los métodos fueron selenito de sodio al 45%, levadura Sel – Plex 2000ppm y fluido ruminal de vacas no tratadas. Dichas muestras se analizaron de acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos cuando no se conocen los componentes de las muestras.³²

Linealidad del método

Para la evaluación de la linealidad del método de selenito de sodio, se pesaron primero las muestras en cada uno de los vasos de teflón del horno de microondas y posteriormente se adicionó el estándar de selenio en polvo, pesando 25, 75 y 125 mg por triplicado. Posteriormente se sometieron a digestión preparándose de acuerdo al método para su posterior análisis. Al final, las concentraciones de selenio fueron de 52, 72 y 92 $\mu\text{g/mL}$.

Para las muestras de levadura y fluido ruminal, se prepararon soluciones stock de selenio de 50 y 2 $\mu\text{g/mL}$ en agua desionizada, respectivamente. De la solución stock de selenio de 50 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron alícuotas de 2.5, 7.5 y 12.5 mL por triplicado y se adicionaron en las muestras de levadura (previamente hidrolizadas desde un día antes), en los vasos de teflón del horno de microondas. De la solución stock de selenio de 2 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron alícuotas de 125, 375 y 625 μL por triplicado y también se adicionaron en cada uno de los vasos de teflón del horno de microondas con las muestras de fluido ruminal. Después se sometieron a digestión, preparándose de acuerdo al método para su posterior análisis.

Las concentraciones de selenio en estas soluciones de levadura fueron de 9, 14, 19 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las concentraciones de selenio en estas soluciones de fluido ruminal fueron de 5, 15 y 25 $\mu\text{g/L}$.

Cabe señalar que se utilizaron únicamente tres niveles de concentración para evaluar la linealidad del método porque se requería tener resultados con las mismas condiciones de análisis dentro del proceso de digestión en el horno de microondas. El cupo máximo de vasos del carrusel son 14, por lo que se dejaron tres vasos como "blancos" (con muestra pero sin adicionar estándar), y los vasos restantes se dejaron con muestra y estándar. Esto se realizó para todo el proceso de validación.

Precisión y exactitud del método

Para evaluar la precisión y exactitud del método de selenito de sodio se pesó la muestra y el estándar de selenio en polvo por sextuplicado, pesándose 75 mg del estándar en cada uno de los vasos de teflón del horno de microondas. Posteriormente se sometieron a digestión preparándose de acuerdo al método para su posterior análisis. La concentración de selenio en estas soluciones de selenito de sodio eran de 72 $\mu\text{g/mL}$.

Para los métodos de levadura y fluido ruminal, se prepararon soluciones stock de selenio de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 2 $\mu\text{g/mL}$ en agua desionizada, respectivamente. De la solución stock de selenio de 50 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron alícuotas de 2.5 mL por sextuplicado y se adicionaron en cada uno de los vasos de teflón que contenían las muestras hidrolizadas de levadura. Las concentraciones de selenio en las muestras de levadura fueron de 9 $\mu\text{g/mL}$.

De la solución stock de selenio de 2 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron alícuotas de 375 μL por sextuplicado y se adicionaron en cada uno de los vasos de teflón con las muestras de fluido. Las concentraciones de selenio en las muestras de fluido ruminal fueron de 15 $\mu\text{g/L}$. Posteriormente se sometieron a digestión preparándose de acuerdo al método para su posterior análisis.

Reproducibilidad y repetibilidad

Para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad del método de selenito de sodio, se necesitaron de dos analistas. Cada uno pesó por triplicado muestra y estándar de selenio en polvo (pesando 75 mg de estándar) en los vasos de teflón. Posteriormente se sometieron a digestión preparándose de acuerdo al método para su posterior análisis. La concentración de selenio final fue de 72 $\mu\text{g/mL}$. Cada analista realizó el mismo análisis durante dos días.

El mismo procedimiento se siguió para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad del método de levadura y fluido ruminal. Cada analista preparó una solución stock de selenio de 50 y 2 $\mu\text{g/mL}$ en agua desionizada, respectivamente. De la solución stock de selenio de 50 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron alícuotas de 2.5 mL por triplicado y se adicionaron en los vasos de teflón (con las muestras pesadas previamente). De la solución stock de selenio de 2 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron alícuotas de 375 μL por triplicado y se adicionaron en cada uno de los vasos de teflón del horno de microondas (con las muestras pesadas previamente). Finalmente se sometieron a digestión preparándose de acuerdo al método para su posterior análisis.

Las concentraciones de selenio en las muestras de levadura fueron de 9 $\mu\text{g/mL}$ y las concentraciones de selenio en las muestras de fluido ruminal fueron de 15 $\mu\text{g/L}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. Resultados y Discusión de la validación

8.1. Linealidad del sistema

En las siguientes tablas (5, 6 y 7, pág 45 y 46), se muestran las respuestas obtenidas para evaluar la linealidad del sistema de las muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal.

Las condiciones del equipo de EAA para determinar la linealidad del sistema (por flama y EAA-GH), se muestran en los anexos 1 y 2 (pág 85 y 86).

Tabla 5. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de selenio en muestras de selenito de sodio.

Sistema	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Conc est / Conc real ($\mu\text{g/mL}$)
1	20	0.0893	1.0248
2	20	0.0867	0.9949
3	20	0.0890	1.0214
4	40	0.1743	1.0011
5	40	0.1697	0.9747
6	40	0.1691	0.9712
7	60	0.2599	0.9955
8	60	0.2659	1.0185
9	60	0.2647	1.0139
10	80	0.3417	0.9818
11	80	0.3525	1.0129
12	80	0.3486	1.0016
13	100	0.4323	0.9938
14	100	0.4291	0.9864
15	100	0.4432	1.0189
			C.V. = 1.67%

Tabla 6. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de selenio en muestras de levadura.

Sistema	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Conc est / Conc real ($\mu\text{g/mL}$)
1	5	0.0256	1.0013
2	5	0.0252	0.9856
3	5	0.0259	1.0131
4	10	0.0515	1.0101
5	10	0.0518	1.0159
6	10	0.0511	1.0022
7	15	0.0754	0.9868
8	15	0.0750	0.9816
9	15	0.0760	0.9947
10	20	0.1011	0.9929
11	20	0.1035	1.0165
12	20	0.1022	1.0037
13	25	0.1273	1.0004
14	25	0.1276	1.0028
15	25	0.1269	0.9973
			C.V. = 1.04%

Tabla 7. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de selenio en muestras de fluido ruminal.

Sistema	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	Conc est / Conc real ($\mu\text{g/mL}$)
1	5	0.0861	0.9779
2	5	0.0867	0.9849
3	5	0.0890	1.0118
4	10	0.1759	1.0139
5	10	0.1721	0.9918
6	10	0.1738	1.0017
7	15	0.2539	0.9800
8	15	0.2584	0.9976
9	15	0.2625	1.0135
10	20	0.342	0.9926
11	20	0.3471	1.0074
12	20	0.3539	1.0273
13	25	0.4223	0.9818
14	25	0.4291	0.9977
15	25	0.4326	1.0059
			C.V. = 1.40%

Se aplicó el programa de Statgraphics Plus versión 5.0 para el análisis estadístico.

Las ecuaciones que se obtuvieron mediante un análisis de regresión para las tres curvas de las muestras de selenito de sodio (curva 1), levadura (curva 2) y fluido ruminal (curva 3) son las siguientes:

CURVA	MODELO DETERMINADO
1	Respuesta = $0.000176667 + 0.00434817 * (\text{Concentración})$
2	Respuesta = $0.000146667 + 0.005084 * (\text{Concentración})$
3	Respuesta = $0.00246667 + 0.017104 * (\text{Concentración})$

Los gráficos 1, 2 y 3 (pág 48) muestran las rectas de regresión que se obtuvieron para el análisis de la linealidad de cada una de las muestras.

Gráfico 1. Linealidad del sistema de selenio para selenito de sodio.

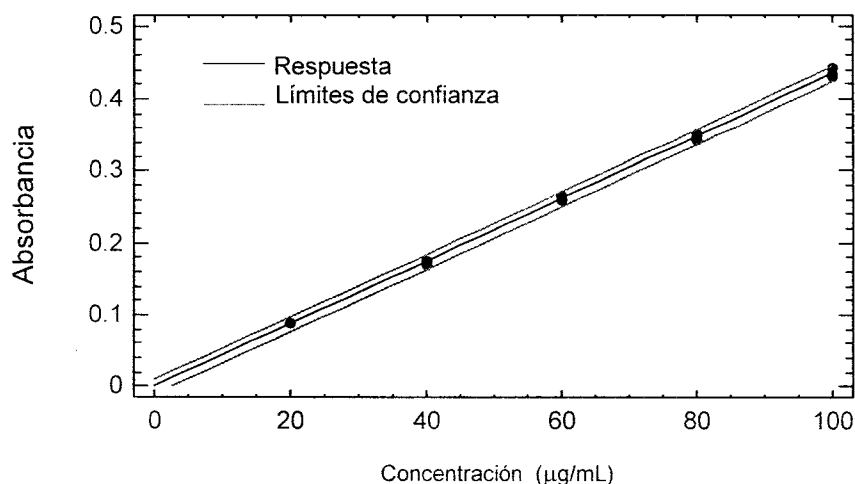
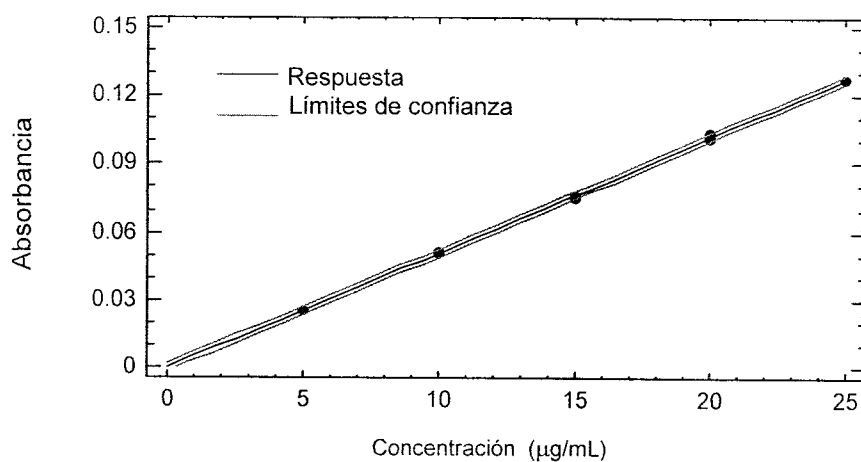
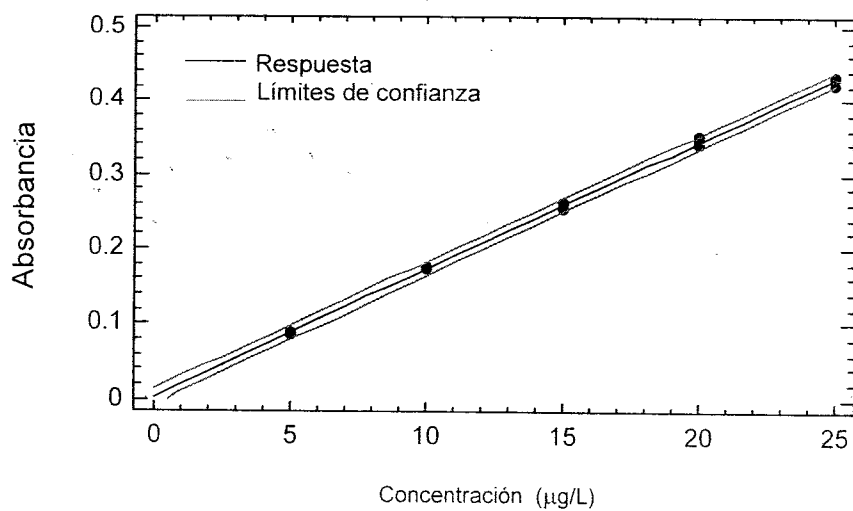


Gráfico 2. Linealidad del sistema de selenio para levadura.**Gráfico 3.** Linealidad del sistema de selenio para fluido ruminal.

Los parámetros estadísticos de la regresión que se obtuvieron de las tres curvas se muestran a continuación:

Parámetros estadísticos de la regresión	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Coeficiente de correlación (r)	0.998854	0.999792	0.999497
Coeficiente de determinación (r^2)	0.999427	0.999585	0.998994
Coeficiente de determinación ajustada (r^2)	0.998765	0.999553	0.998917
Coeficiente de variación (C.V.)	1.67%	1.04%	1.40%

Con base a los datos de regresión obtenidos de las diferentes rectas de regresión, se puede observar que el 99.94%, 99.95% y 99.89% de la variación de la respuestas obtenidas (absorbancia) está explicada por los cambios en la concentración de selenio para selenito de sodio, levadura y fluido ruminal, respectivamente. Ver anexos 4, 5 y 6 (pág. 88 - 92).

Por otro lado, los coeficientes de variación que se obtuvieron en las tres curvas de calibración son menores a lo establecido por la guía de validación para métodos espectrofotométricos (< 2%).

En seguida, se muestran los gráficos de residuales 4, 5 y 6 (pág. 50 y 51) que explican la desviación de los datos experimentales con respecto a los valores estimados por cada una de las rectas de regresión.

Gráfico 4. Gráfico de residuales de selenito de sodio.

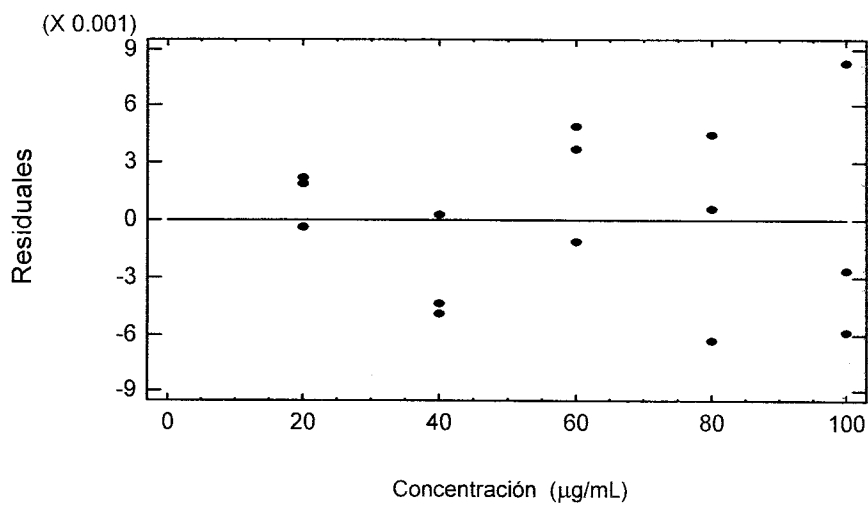


Gráfico 5 . Gráfico de residuales de levadura.

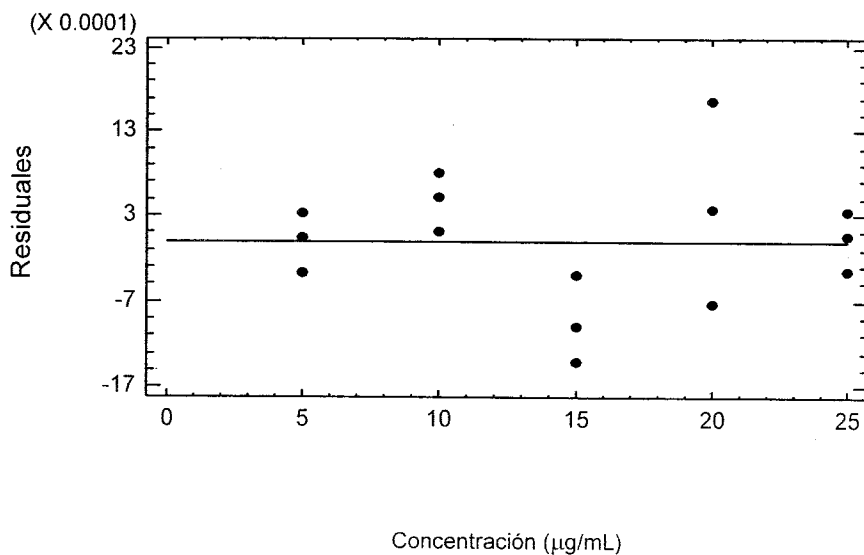
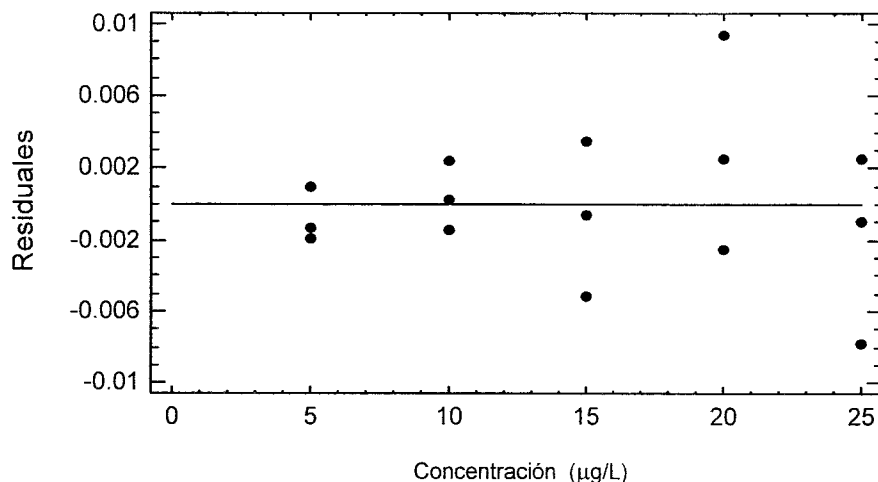


Gráfico 6 . Gráfico de residuales de fluido ruminal.

En el análisis de residuales que se realizó para cada una de las rectas, se puede observar en el gráfico 4, (pág 50), la concentración de 100 µg/mL referente a selenito de sodio, se observa una desviación más grande con respecto a las demás, presentando un residuo de 0.00820667, el cual, corresponde a un error estándar del 2.39429%. El gráfico 5 (pág 50) que corresponde al análisis de residuos de la recta de levadura, la concentración con mayor desviación en los datos experimentales fue la de 20 µg/mL, en la cual, se presenta un error de 0.00167333, correspondiente a un estándar del 2.74737%. Finalmente, en el gráfico 6, se tiene el máximo error residual en la concentración de 25 µg/mL de selenio para la recta de fluido ruminal, presentando un residuo de -0.00776667 y un 2.49342% de error estándar.

Por otro lado, se realizó un análisis de variancia para establecer y demostrar si existe una relación entre las variables en estudio y si existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Para ello, se plantearon las siguientes hipótesis para cada una de las rectas de regresión:

HIPÓTESIS

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho.

Las tablas 8, 9 y 10 (pág 53) muestran los análisis de variancia para cada una de las rectas de regresión.

Tabla 8. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema de selenito de sodio ($\alpha = 0.05$).

Origen	SS	gl	MS	F	F crit
Entre grupos	0.22687864	4	0.22687864	11325.94119	1.67013E-20
Dentro de grupos	0.000260413	10	2.00130E-05		
Total	0.227139053	14			

Tabla 9. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema de levadura ($\alpha = 0.05$).

Origen	SS	gl	MS	F	F crit
Entre grupos	0.01938529	4	0.01938529	31276.948	2.2762E-23
Dentro de grupos	8.0573E-06	10	6.1979E-07		
Total	0.01939335	14			

Tabla 10. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema de fluido ruminal ($\alpha = 0.05$).

Origen	SS	gl	MS	F	F crit
Entre grupos	0.21941011	4	0.21941011	12910.138	7.1376E-21
Dentro de grupos	0.00022094	10	1.6995E-05		
Total	0.21963105	14			

Las tablas 8, 9 (pág 52) y la tabla 10, muestran que la F calculada es mayor a la F crítica en las tres curvas de regresión con una probabilidad del 95%, demostrando así, que no existe diferencia estadísticamente significativa. Por lo tanto, con base a estos resultados y de acuerdo a la hipótesis establecida en el análisis de variancia para cada una de las rectas, se rechaza H_0 , indicando que la variación de la respuesta está explicada por la variación de la concentración con un nivel de significancia de 0.05.

Por otro lado, se estableció la hipótesis para la ordenada al origen y la pendiente, con la finalidad de demostrar que las diferentes rectas de regresión pasan por el valor de cero con un nivel de significancia de 0.05.

HIPÓTESIS

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_a : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza H_0 .

Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza H_0 .

Tabla 11. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de selenito de sodio.

Parámetro	Estimado	Error estándar	t estadística	t crítica	P-value	LCI 95%	LSC 95%
Intercepto	0.000176667	0.00271016	0.0651867	2.144789	0.9490	-0.00568	0.00603
Pendiente	0.00434817	0.00004086	106.423		0.0000	0.00426	0.00444

Tabla 12. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de levadura.

Parámetro	Estimado	Error estándar	t estadística	t crítica	P-value	LCI 95%	LSC 95%
Intercepto	0.000146667	0.000476716	0.30766	2.144789	0.7632	-0.00088322	0.00117655
Pendiente	0.005084	0.0000287471	176.853		0.0000	0.0050219	0.0051461

Tabla 13. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de fluido ruminal.

Parámetro	Estimado	Error estándar	t estadística	t crítica	P-value	LCI 95%	LSC 95%
Intercepto	0.00246667	0.00249631	0.988125	2.144789	0.3411	-0.00292628	0.00785962
Pendiente	0.017104	0.000150533	113.623		0.0000	0.01677879	0.01742921

LCI (Límite inferior de confianza); LSC (Límite superior de confianza)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de variancia y a la hipótesis establecida, se acepta H_0 , demostrando que no existe diferencia estadísticamente significativa ($P\text{-value} > 0.05$) y que la ordenada al origen de las rectas de regresión pasan por el valor de cero con un 95% de probabilidad. Los valores de las pendientes tienen diversos valores debido a la absortividad del analito.

8.2. Precisión del sistema

Se analizaron por sextuplicado soluciones de selenio a concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ 60, 15 y $15\mu\text{g/L}$ para determinar si las absorbancias del sistema con respecto a la concentración de selenio son precisas. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en la precisión de los sistemas.

Tabla 14. Resultados de la precisión de los sistemas.

Curva	Concentración de Selenio	Absorbancia	
1	60 $\mu\text{g/mL}$	0.2529	0.2568
		0.2559	0.2544
		0.2493	0.2481
2	15 $\mu\text{g/mL}$	0.0744	0.0755
		0.0757	0.0755
		0.0751	0.0740
3	15 $\mu\text{g/L}$	0.2602	0.2599
		0.2696	0.2639
		0.2667	0.2620

Las curvas 1, 2 y 3 presentadas en la tabla 14, corresponden a los sistemas para muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal, respectivamente.

Para evaluar si las respuestas del sistema (absorbancias) son precisas, se determinó la desviación estándar, el promedio y el coeficiente de variación de las absorbancias de cada una de las curvas. Estos parámetros se muestran en la tabla 15, (pág 56).

Tabla 15. Resultados para determinar la precisión del sistema.

Curva	Concentración	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	60 µg/mL	0.2529	0.0035	1.3975
2	15 µg/mL	0.0750	0.0007	0.9143
3	15 µg/L	0.2637	0.0038	1.4531

De acuerdo a los coeficientes de variación obtenidos de la tabla 15, se puede observar que son menores del 2%, por lo tanto, los sistemas para cada una de las muestras son precisos.

8.3. Linealidad del método.

En la evaluación de la linealidad del método para cada una de las muestras, se prepararon por triplicado tres niveles de concentraciones para cada muestra analizada, sometiéndolas posteriormente a digestión. Se obtuvieron las concentraciones y los recobros de cada una de ellas, los cuales se muestran en las tablas 16, 17 y 18 (pág 58).

Tabla 16. Resultados para evaluar la linealidad del método de selenito de sodio.

Muestra adicionada	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro
1	134.45	130.50	97.06
2	134.67	131.00	97.28
3	134.71	131.25	97.43
4	184.39	180.00	97.62
5	184.44	180.25	97.73
6	184.52	179.75	97.41
7	234.68	229.00	97.58
8	234.59	229.25	97.72
9	234.68	229.50	97.79
			Promedio: 97.51
			C.V. = 0.25%

Cabe mencionar que los resultados obtenidos de las muestras de selenito de sodio se reportan en cantidad, debido a que se utilizó el estándar de selenio en polvo.

Tabla 17. Resultados para evaluar la linealidad del método de levadura.

Muestra adicionada	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recobro
1	9.7	9.1	96.91
2	9.7	9.5	94.85
3	9.7	9.6	95.88
4	14.7	14.4	97.96
5	14.7	14.8	96.80
6	14.7	14.3	97.28
7	19.7	19.6	98.48
8	19.7	19.8	97.97
9	19.7	19.2	97.46
			Promedio: 97.06 C.V. = 1.17%

Tabla 18. Resultados para evaluar la linealidad del método de fluido ruminal.

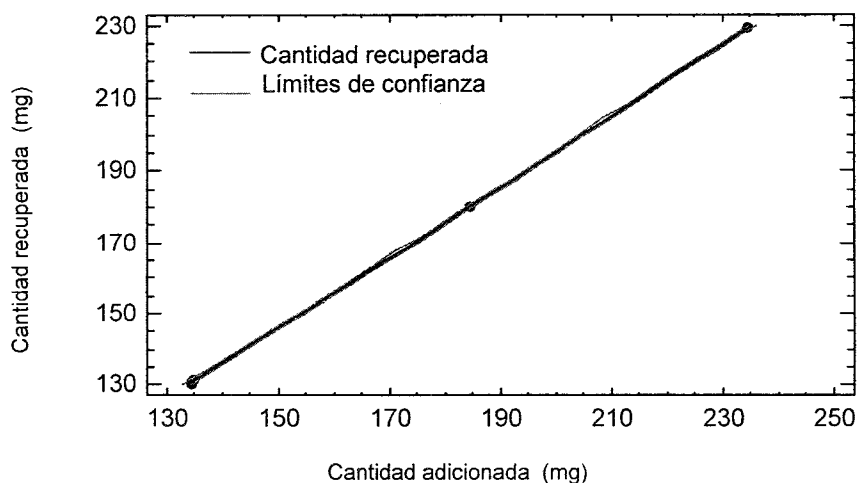
Muestra adicionada	Concentración adicionada ($\mu\text{g/L}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/L}$)	% de Recobro
1	5.90	5.29	89.66
2	5.90	5.36	90.85
3	5.90	5.61	95.08
4	15.90	15.41	96.92
5	15.90	15.67	98.55
6	15.90	15.57	97.92
7	25.90	25.61	98.88
8	25.90	25.45	98.26
9	25.90	25.71	99.27
			Promedio: 96.16 C.V. = 3.72%

Para determinar la linealidad del método, se realizó un análisis de regresión lineal, en el cual, se determinaron los modelos que explican la variación de las cantidades y concentraciones recuperadas en función de las cantidades y concentraciones adicionadas para las diferentes muestras.

En el gráfico 7, se observa la relación lineal entre la cantidad recuperada y la cantidad adicionada de selenito de sodio explicada por la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad recuperada} = -1.3657 + 0.98294 * (\text{Cantidad adicionada})$$

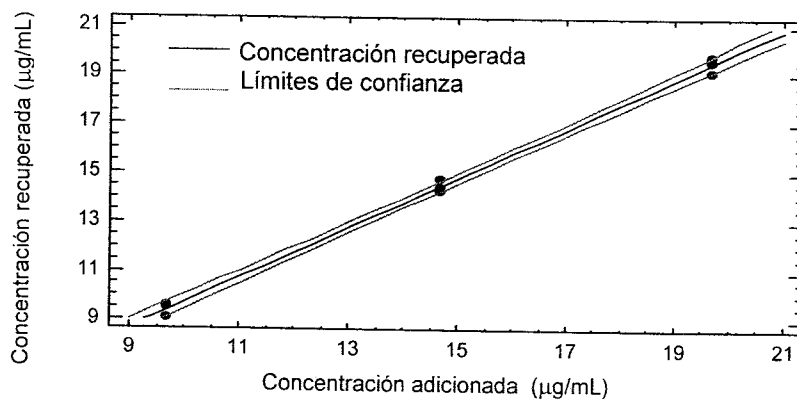
Gráfico 7 . Curva de regresión de la linealidad del método de selenito de sodio.



Los gráficos 8 y 9 (pág 60) muestran la relación lineal entre la concentración recuperada y la concentración adicionada de levadura y fluido ruminal, explicada por sus respectivas ecuaciones.

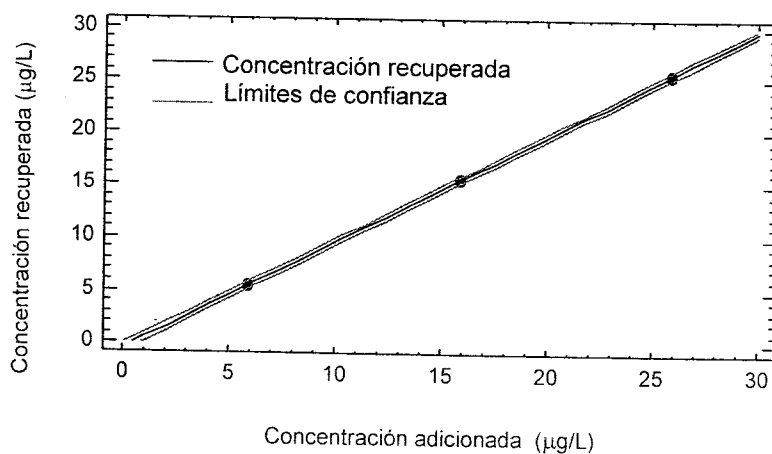
$$\text{Concentración recuperada} = -0.4182 + 1.013 * (\text{Concentración adicionada})$$

Gráfico 8 . Curva de regresión de la linealidad del método de levadura.



$$\text{Concentración recuperada} = -0.51515 + 1.0085 * (\text{Concentración adicionada})$$

Gráfico 9 . Curva de regresión de la linealidad del método de fluido ruminal.



Por otro lado, se estableció una hipótesis para demostrar si existe una relación lineal entre las variables en estudio realizando un análisis de variancia. La hipótesis es la siguiente:

HIPÓTESIS

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho.

Las tablas 19, 20 y 21(pág 62) muestran el análisis de variancia para cada una de las muestras.

Tabla 19. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método de Selenito de sodio ($\alpha = 0.05$).

Origen	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grupos	14504.3	1	14504.3	228935.30	4.5998E-17	5.59145974
Dentro de grupos	0.443488	7	0.0633554			
Total	14504.7	8				

Tabla 20. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método de Levadura ($\alpha = 0.05$).

Origen	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grupos	154.026667	1	154.026667	2299.45024	4.4873E-10	5.59145974
Dentro de grupos	0.46888889	7	0.06698413			
Total	154.49556	8				

Tabla 21. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método de Fluido ruminal ($\alpha = 0.05$).

Origen	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grupos	610.24335	1	610.24335	32998.8679	4.0434E-14	5.59145974
Dentro de grupos	0.12945	7	0.01849286			
Total	610.3728	8				

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de variancia, se rechaza H_0 , por lo tanto existe evidencia estadística con un nivel de significancia de 0.05 que la variación de la cantidad y concentración recuperada se encuentra relacionada linealmente con la variación de la cantidad y concentración adicionada.

Los parámetros estadísticos de la regresión que se obtuvieron de las tres curvas se muestran a continuación:

Parámetros estadísticos de la regresión	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Coeficiente de correlación (r)	0.999985	0.998481	0.999894
Coeficiente de determinación (r^2)	0.999969	0.996965	0.999788
Coeficiente de variación (CV)	0.14%	1.79%	0.88%

Curva 1. Selenito de sodio; Curva 2. Levadura; Curva 3. Fluido ruminal.

Conforme a los datos de regresión obtenidos, la regresión de las tres muestras está explicada en un 99.99%, 99.69% y 99.97% respectivamente con un $\alpha = 0.05$, estableciéndose así que la variación de la concentración recuperada está en función del cambio en la concentración adicionada para las tres muestras. Ver anexo 7, 8 y 9. (pág 94 – 98).

Los coeficientes de variación de las tres rectas de regresión se encuentran dentro de especificaciones (menor al 3% y 5% para muestras biológicas).

En los gráficos 10, 11 y 12 (pág 64 y 65), se muestran los residuales que explican la desviación de las concentraciones pronosticadas por el modelo de regresión con respecto a las concentraciones determinadas experimentalmente. Los residuales que se obtuvieron para cada curva a partir de los residuos contra la concentración adicionada se muestran a continuación.

Gráfico 10 . Gráfico de residuales de selenito de sodio.

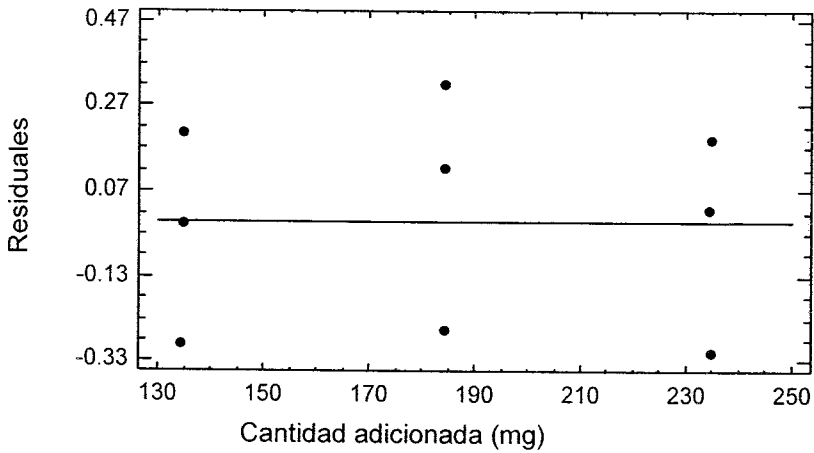


Gráfico 11 . Gráfico de residuales de levadura.

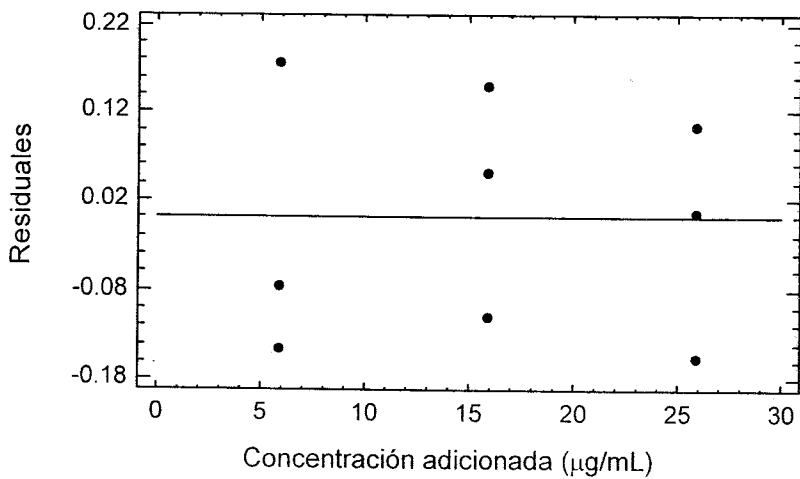
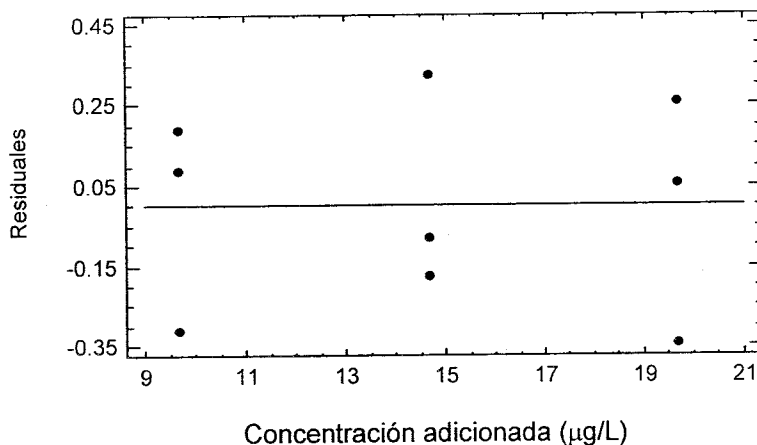


Gráfico 12 . Gráfico de residuales de fluido ruminal.

En el gráfico 10 (pág 64) se observa que la mayor desviación de los residuales de selenito de sodio es con un residuo de -0.310684 y un error estándar de 1.60971% correspondiente a la cantidad adicionada de 184mg de selenio. En el gráfico 11 (pág 64), la mayor desviación que se observa es a la concentración de $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ con un residuo de 0.175 y un error estándar de 1.70964% . Finalmente, en el gráfico 12, se puede observar que la mayor desviación es en la concentración de $5\text{ }\mu\text{g/L}$ con un residuo de -0.34444 y un error relativo de 1.7888% .

Por otro lado, se realizó un análisis estadístico para determinar si las ordenadas al origen de las diferentes rectas de regresión son significativas y diferentes de cero con un $\alpha = 0.05$, estableciéndose la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Ha: La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza Ho.

Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza Ho.

Tabla 22. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de selenito de sodio.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	t estadística	t crítica	P-Value	LCI 97.5%	LSC 97.5%
Intercepto	-1.3657	0.38834	-3.51676	2.365	0.0980	-2.284788	0.443024
Pendiente	0.98294	0.002054	478.472		0.0000	0.963621	1.002225

Tabla 23. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de levadura.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	t estadística	t crítica	P-Value	LCI 97.5%	LSC 97.5%
Intercepto	-0.4182	0.3224	-1.29723	2.365	0.2357	-1.3342314	0.497787
Pendiente	1.01333	0.021132	47.9526		0.0000	0.9539222	1.073375

Tabla 24. Resultados obtenidos para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de fluido ruminal.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	t estadística	t crítica	P-Value	LCI 97.5%	LSC 97.5%
Intercepto	-0.51515	0.0992307	-5.19144	2.365	0.0530	-0.7970885	0.2332115
Pendiente	1.0085	0.0055517	181.656		0.0000	0.9953723	1.0242737

Referente a los resultados obtenidos en las tablas 22, 23 y 24 (pág 66) y de acuerdo a la hipótesis establecida en el análisis de variancia, se acepta H_0 , demostrando que existe evidencia estadística que la ordenada al origen de la rectas de regresión pasan por el valor de cero con una probabilidad del 97.5%.

Los valores de las pendientes que se obtuvieron en el análisis estadístico, incluyen la unidad dentro del intervalo de confianza, por lo tanto, el método puede recuperar hasta en un 100% la cantidad adicionada para las diferentes muestras.

8.4. Precisión y exactitud del método

Se analizó por sextuplicado un nivel de concentración de selenio de cada una de las muestras para evaluar la precisión y exactitud del método. Se obtuvieron los porcentajes de recuperación para cada concentración analizada. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Resultados obtenidos para evaluar la precisión y exactitud del método.

MUESTRA	CANTIDAD Y CONCENTRACIÓN ADICIONADA DE SELENIO	% DE RECOBRO DE SELENIO
Selenito	75mg	98.07 97.28 99.22 98.38 98.08 98.92
Levadura	5 µg/mL	99.00 96.00 96.00 97.00 99.40 96.60
Fluido ruminal	15 µg/L	96.19 90.31 91.99 94.75 99.94 95.12

En la tabla 26 (pág 69) se muestran los promedios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de los porcentajes determinados en la tabla 25.

Tabla 26. Resultados de los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación de los porcentajes de cada muestra analizada.

MUESTRA	CANTIDAD Y CONCENTRACIÓN ADICIONADA DE SELENIO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
Selenito	75 mg	98.33	0.69	0.67
Levadura	5 µg/mL	97.33	1.50	1.54
Fluido	15 µg/L	94.72	3.36	3.55

Los resultados obtenidos en la tabla 26, muestran que los coeficientes de variación de las tres muestras se encuentran dentro de especificaciones, por lo tanto, los tres métodos son precisos.

La exactitud del método de las tres muestras se determinó mediante la prueba de "t"; para ello, se estableció la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Ho: El promedio del porcentaje adicionado es igual al promedio del porcentaje determinado.

Hi: El promedio del porcentaje adicionado es diferente al promedio del porcentaje determinado.

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza Ho.

Se determinaron los intervalos de confianza al 99.999% para cada una de las muestras analizadas. La tabla 27 (pág 70) muestra los resultados obtenidos para determinar la exactitud del método.

Tabla 27. Resultados para determinar la exactitud del método.

MUESTRA	CANTIDAD Y CONCENTRACIÓN ADICIONADA DE SELENIO	PROMEDIO	t calc	t crítica	INTERVALO DE CONFIANZA AL 99.999%	
					LCI	LCS
Selenito	75mg	98.33	5.9425	6.8685	95.098	101.135
Levadura	5 µg/mL	97.33	4.3540		93.127	101.540
Fluido	15 µg/L	94.72	3.8529		85.293	104.141

LCI: Límite inferior de confianza; LCS: Límite superior de confianza

Los métodos son exactos a un nivel de confianza del 99.999% debido a que los valores de t calculada son menores al valor de t crítica como se muestra en la tabla 27, además se incluye el 100% dentro de los intervalos de confianza. Por lo tanto, son confiables y recomendables para determinar el selenio en las muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal.

8.5. Reproducibilidad y Repetibilidad del método

Se determinó la reproducibilidad y la repetibilidad del método para cada una de las muestras mediante los porcentajes de recobro obtenidos de selenio en un nivel de concentración dado ($72\mu\text{g/mL}$, $9\mu\text{g/mL}$, $15\mu\text{g/L}$). Dichos parámetros se evaluaron con dos analistas y en dos días diferentes.

Los resultados de los porcentajes de recobro de selenio para determinar la reproducibilidad y la repetibilidad del método de las muestras de selenito de sodio, levadura y fluido ruminal se muestran en las tablas 28, 29 y 30 (pág 72).

Tabla 28. Porcentajes de recobro obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de selenito de sodio.

	DIA 1	DIA 2
ANALISTA 1	98.46	99.83
	99.63	99.79
	98.36	99.65
ANALISTA 2	99.74	98.14
	98.33	98.51
	98.67	98.80
Selenio adicionado: 75mg		

Promedio: 98.99%
 C.V. = 0.68%

Tabla 29. Porcentajes de recobro obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de levadura.

	DIA 1	DIA 2
ANALISTA 1	99.00	98.46
	97.00	98.46
	98.00	101.54
ANALISTA 2	100.51	100.51
	99.49	101.54
	100.51	98.46
Selenio adicionado: 5 µg/mL		
Promedio: 99.47% C.V. = 1.46%		

Tabla 30. Porcentajes de recobro obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de fluido ruminal.

	DIA 1	DIA 2
ANALISTA 1	97.78	97.41
	93.23	93.10
	93.35	93.54
ANALISTA 2	92.85	96.84
	90.63	94.37
	96.71	92.97
Selenio adicionado: 15 µg/L		
Promedio: 94.40% C.V. = 2.38%		

Para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método se realizó un análisis de variancia mediante un diseño anidado o jerárquico entre los porcentajes de recobro determinados en cada una de las muestras, para ello, se estableció la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Ho: No existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

Hi: Existe efecto del analista y/o el día en el porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación:

Si $F_{\text{exp}} < F_{\text{crítica}}$ no se rechaza Ho ó P-Value > 0.05

Si $F_{\text{exp}} > F_{\text{crítica}}$ se rechaza Ho ó P-Value < 0.05

Tabla 31. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de selenito de sodio.

Parámetro	SS	gl	MC	F-Ratio	P-Value
Analista	1.03841	1	1.03841	1.30	0.3730
Analista(Día)	1.60275	2	0.801375	2.77	0.1221
Residual	2.31687	8	0.289608		
Total	4.95803	11			

Tabla 32. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de levadura.

Parámetro	SS	gl	MC	F-Ratio	P-Value
Analista	6.10613	1	6.10613	3.68	0.1949
Analista(Día)	3.31527	2	1.65763	0.95	0.4258
Residual	13.9345	8	1.74181		
Total	23.3559	11			

Tabla 33. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad y la repetibilidad del método de fluido ruminal.

Parámetro	SS	gl	MC	F-Ratio	P-Value
Analista	1.36013	1	1.36013	1.02	0.4190
Analista(Día)	2.66937	2	1.33468	0.21	0.8164
Residual	51.3069	8	6.41336		
Total	55.3364	11			

De acuerdo a los resultados de las tablas 31, 32 (mostradas en la página 73) y tabla 33, conforme a la hipótesis establecida, no se rechaza H_0 , por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los recobros determinados de los dos analistas y en los dos días. Por lo tanto, el método de cada una de las muestras es reproducible entre analistas y repetible entre días. Ver anexo 10, 11 y 12 (pág 100 – 106).

Gráfico 13. Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor día de selenito de sodio.

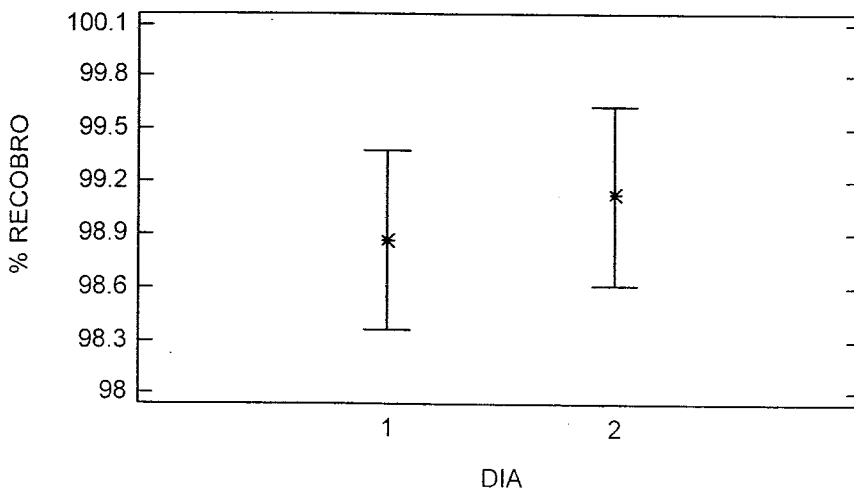


Gráfico 14 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor analista de selenito de sodio.

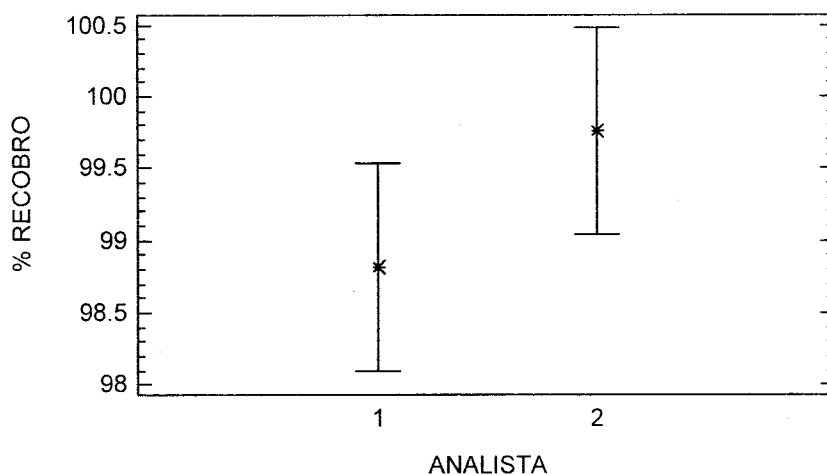


Gráfico 15 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor día de levadura.

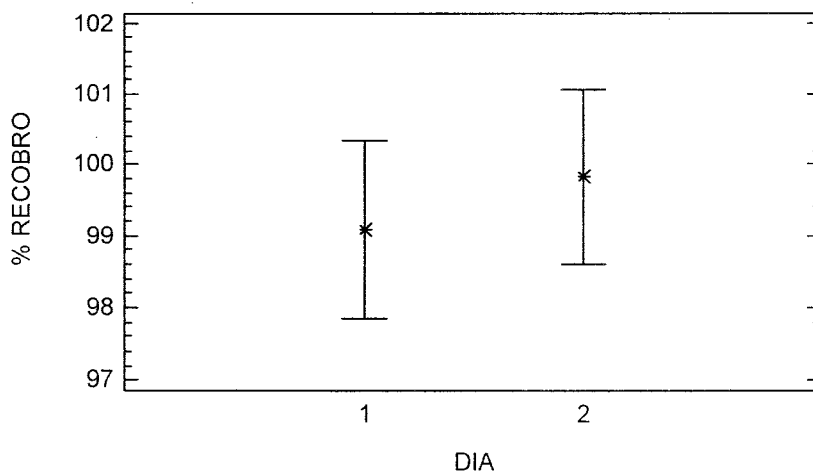


Gráfico 16 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor analista de levadura.

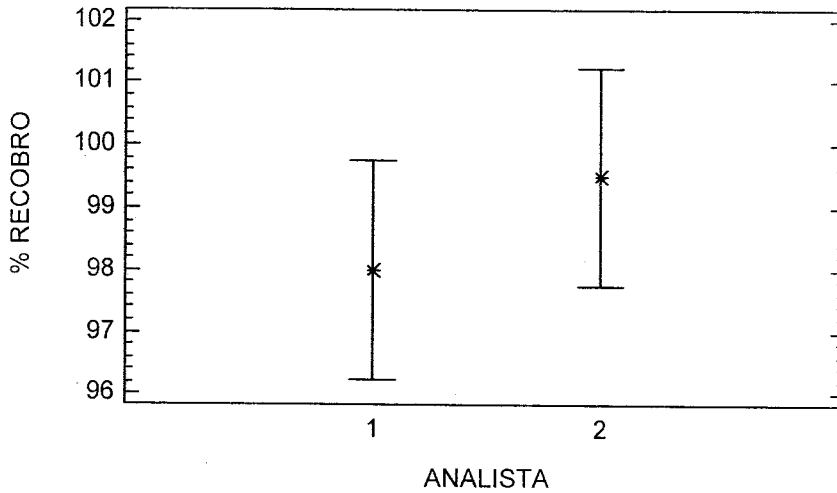


Gráfico 17 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor día de fluido ruminal.

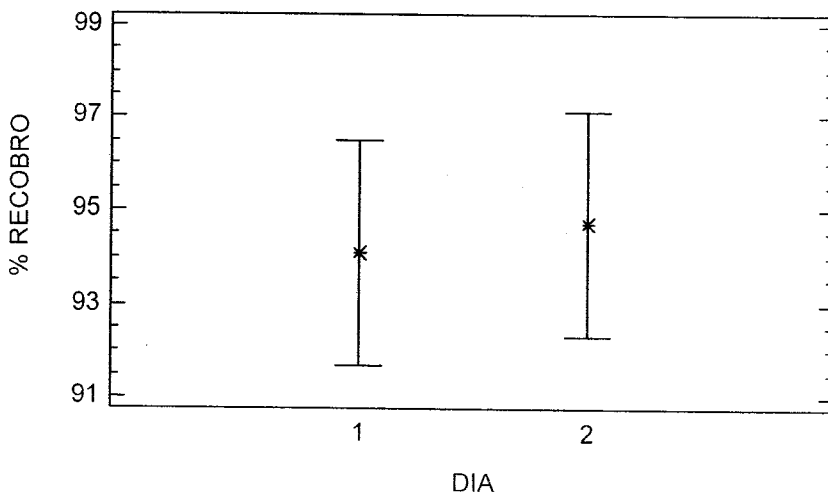
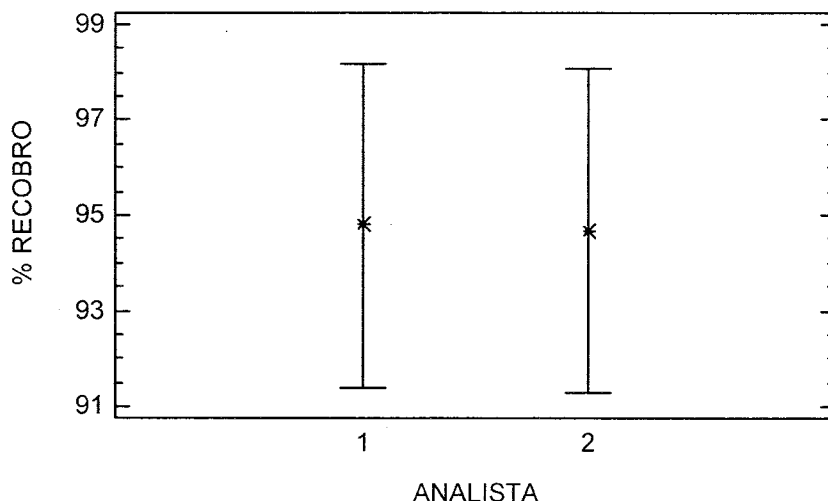


Gráfico 18 . Gráfico representativo de los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con Diferencia Mínima Significativa al 95% del factor analista de fluido ruminal.



En los gráficos 13, 14, 15, 16, 17 (pág 74 - 76), y en el gráfico 18 se puede observar que los intervalos de las medias de los porcentajes de recobro con LSD (diferencia mínima significativa) al 95% correspondientes a los diferentes factores analizados (día, analista) para cada muestra se traslapan, por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos factores y los métodos para determinar selenio en selenito de sodio, levadura y fluido ruminal son reproducibles y repetibles entre día y analista.

CONCLUSIONES

9. Conclusiones

Los métodos de digestión ácida desarrollados en cada una de las muestras son confiables para medir niveles de selenio en rumiantes que se encuentren bajo tratamiento cumpliendo con los propósitos para los cuales fueron diseñados.

Se recomienda ampliamente el empleo de estos métodos en estudios que el químico analista considere pertinentes.

Haciendo referencia a la cuantificación de selenio por el método de digestión ácida que se desarrolló en el presente trabajo se tiene que:

Selenito de sodio

- ✓ Es lineal en un intervalo de concentraciones de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$ con un porcentaje de recuperación del 97.51% y con un coeficiente de variación de 0.25%.
- ✓ Es exacto y preciso con un 98.33% de recuperación y un coeficiente de variación del 0.70%.
- ✓ Es repetible y reproducible en diferentes días y con diferentes analistas recobrando un 98.99% con un coeficiente de variación del 0.67%.

Levadura

- ✓ - Es lineal en un intervalo de concentraciones de 5 a 25 $\mu\text{g/mL}$ con un porcentaje de recuperación del 97.06% con un coeficiente de variación del 1.17%.
- ✓ - Es exacto y preciso con un porcentaje de recuperación del 97.33% y con un coeficiente de variación del 1.54%.
- ✓ - Es repetible y reproducible con un porcentaje de recuperación del 99.47% y con un coeficiente de variación del 1.46%.

Fluido ruminal

- ✓ - Es lineal en un intervalo de concentraciones de 5 a 25 $\mu\text{g/L}$ con un porcentaje de recuperación del 96.16% con un coeficiente de variación del 3.72%.
- ✓ - Es exacto y preciso con un porcentaje de recuperación del 94.72% y con un coeficiente de variación del 3.55%.
- ✓ - Es repetible y reproducible con un porcentaje de recuperación del 94.40% y con un coeficiente de variación del 2.38%.

REFERENCIAS

10. Referencias bibliográficas

1. FREDERICK J. Validtaion of Aseptic Pharmaceutical Proceses. Edit. Marcel Dekker, Inc. New York. 1986. Pp 1-27; 515-522; 683-680.
2. SABÉ, R. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. Univ. de Barcelona. 2000. 419(2000). Pp 121-135.
3. SARABIA, M. Desarrollo de un bolo intrarruminal de liberación prolongada con selenio orgánico de levaduras para bovinos productores de leche. Tesis que para obtener el grado de maestro en ciencias. UNAM. C. Izc. Méx. 2004. Pp 5-42.
4. SERRA, A.B. Inorganic selenium for sheep. I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. Facultad de Agricultura. Japan. 1993. Pp 83-89.
5. SERRA, A.B. Inorganic selenium for sheep. II. Its influence on rumen bacterial yield, volatile fatty acid production and total tract digestion of timothy hay. Facultad de Agricultura. Japan. 1993. Pp 91-96.
6. STEVENS, E. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Colegio de medicina veterinaria. Australia. Vol 78. No. 2. 1998. Pp 393-420.

7. BURGUERA, J.L. Microwave-Aided Micro-Dissolution of Biological Samples Prior to flow injection atomic absorption spectrometry. Dto. De Química. Mérida 5101-A, Venezuela. Pp 67-71.
8. COLLINS, Michael J. Drug discovery at the speed of light. Microwave synthesis is an idea whose time has come: an emerging technology that will have a major impact on drug discovery and development over the next 3-5 years. Pp 1-7.
9. CURSO teórico-práctico. Últimas técnicas de preparación de muestras por microondas (Digestión-Extracción) y análisis por absorción atómica (Flama, Generador de hidruros y Horno de grafito), Espectrómetros de emisión óptica acoplado inductivamente ICP. Instituto de Geofísica, IEFSa, Falcon México. 2004.
10. HERNÁNDEZ, L. Introducción al análisis instrumental. Edit. Ariel Ciencia. 2002. 1ª edición. España. Pp 119-152.
11. JUÁREZ, F. Espectroscopia de absorción atómica. Laboratorio de radiactividad natural. Instituto de Geofísica, UNAM. 2004.
12. HAROLD F. Análisis Químico e Instrumental moderno. Editoriar Reverté. España, Barcelona. 1983. Pp 243-260.
13. ERTAS, O.S. A validated cold vapour AAS method for determining mercury in human red blood cells. Faculty of Pharmacy. Bornova. August 2004. 36(2004). Pp 893-897.

14. GUÍA de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de Químicos farmacéuticos Biólogos México. A. C. Edición 2002.
15. GLEASON, M. Desarrollo y optimización de los métodos de digestión ácida en Horno de Microondas para la cuantificación de Selenio en muestras Biológicas. Tesis para obtener el Título de Química Farmacéutica Bióloga. 2004. C. Izcalli. Méx. Pp 12-14.
16. NONATO, F. Sistemas de atomización utilizados en espectrofotometría de absorción atómica: flama, horno de grafito, generador de hidruros y vapor para el análisis de muestras complejas. Tesis para obtener el título de Ing. Químico. C. Izc. Méx. 1197. UNAM. Pp 1-16.
17. HARZDORF C. Application of microwave digestion to trace organoelement determination in water samples. March 1998. Pp 200-214, 374(1998).
18. GÓMEZ M. Determination of five selenium compounds in orine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation atomic absorption spectrometric detection. Fac. de Química. Madrid Spain. Junio 1998. Pp 241-251, 374(1998).
19. AWADEN F.T. Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. Washington State University. (1998). Pp 1089-1094.

20. MARTINS P. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. Instituto de Química. Brazil. Agosto 2002. Pp 195-204, 470(2002).
21. GÓMEZ J.L. Speciation analysis of selenium compounds in yeasts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography microwave assisted digestion hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Univ. de Huelva. Spain. Abril 2004. Pp 305-314, 524(2004).
22. GUITERAS, J. Curso experimental en Química Analítica. Edit. Síntesis España. 1ª edición. 1999. Pp 84-86.
23. ROVESSAC, F. Análisis Químico, Métodos y Técnicas instrumentales Modernas, Teoría y ejercicios resueltos. McGraw Hill/Interamericana. España Madrid, 2003. Pp 137-416.
24. RUBINSON, J. F. Química Analítica Contemporánea. Edit. Perarson Education, Prentice Hall Hispanoamericana. Méx. 2000. 1a edición. Pp 29-66; 330-348.
25. BETTENCOURT DA SOLVA. F. Validation and quality control schemes based on the expresion of resultas with uncertainty. Faculdade de Ciencias da Universidade de Lisboa. 1999, 393(1999). Pp 167-175.
26. MINDAK, W. Determination of Arsenic and Selenium in Food using a Microwave Digestion Dry Ash Preparation and Flow Injection hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. Washington. USA. 1999. Pp 111-122.

27. SWARTZ, M. Analytical meted development and validation. Edit. Marcel Dekker. Inc. New York. 1997. 1a edición. Pp 17-65.
28. SALVADOR, A. Determination of selenium, zinc and cadmium in antidandruff shampoos by atomic spectrometry after microwave assisted sample digestion. Facultad de Química. Spain. 51(2000). Pp 1171-1177.
29. SMRKOLJ, P. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Dto. De ciencias. Slovenia. 512(2004). Pp 11-17.
30. LENG, L. The urinary excretion of selenium in sheep treated with a vasopressin analogue. Univ. de medicina veterinaria. Rep. Eslovaquia. 31(2000). Pp 499-505.
31. RAMÍREZ, J.E. La carencia de selenio, su diagnóstico y suplementación en un sistema de producción caprina del sureste del Estado de Tlaxcala. Tesis que para obtener el grado de maestro en ciencias. UNAM. C. Izc. Méx. 1995. Pp. 3-40.
32. BACH, S.J. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid in vitro. Canada. 104(2003). Pp 179-189.
33. HOBARD H. Willard, Métodos Instrumentales de Análisis, ed. 1ra ed. Continental. 6ª impresión. 1984. Méx. DF. Pp 388-392.

ANEXOS

Anexo 1. Condiciones de trabajo del equipo de Espectrofotometría de absorción atómica con flama.

Los parámetros ajustados en la técnica de Espectrofotometría de absorción atómica con flama son los siguientes:

- ❑ Modo de muestreo:
 - Manual
 - Longitud de onda: 196nm
 - Flujo del oxido nitroso: 11L / min
 - Flujo del acetileno: 6.63 L / min
 - Flujo del aire: 13.5 L / min
- ❑ Modo de medición: integración
- ❑ Calibración: concentración
- ❑ Réplicas: 3 para estándar y muestra
- ❑ Corriente de la lámpara: 10mA

Anexo 2. Condiciones de trabajo del equipo de Espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros.

Los parámetros ajustados en la técnica de Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros son los siguientes:

- Modo de muestreo:
 - Manual
 - Longitud de onda: 196nm
 - Flujo del acetileno: 2.10 L / min
 - Flujo del aire: 13.5 L / min
 - Flujo de la muestra: 8 mL / min
 - Flujo del reductor y ácido: 1 mL / min
- Modo de medición: integración
- Calibración: concentración
- Réplicas: 3 para estándar y muestra
- Corriente de la lámpara: 10mA

Anexo 3. Instrumentación básica del Horno de Microondas MARS 5 CEM Corps.

La instrumentación básica del Horno de Microondas MARS 5 CEM Corps es la siguiente:

- ❑ Vasos de teflón HP500 plus
- ❑ Sensor de temperatura (temperatura máx 210°C)
- ❑ Sensor de presión (presión máx 350 psi)
- ❑ Tornamesa
- ❑ Marcos de soporte
- ❑ Chaquetas
- ❑ Capilar de zafiro (thermowell)
- ❑ Tapones de seguridad
- ❑ Membranas de seguridad
- ❑ Tapón para sensor de temperatura
- ❑ Tapones para vaso control
- ❑ Tapas de teflón para el vaso control y vasos HP500 plus.
- ❑ Discos para vaso control y vasos HP500 plus
- ❑ Adaptador de la tapa para el vaso control

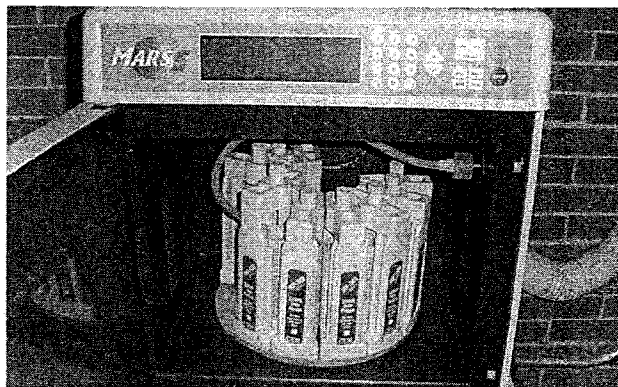


Figura 11. Imagen del Horno de Microondas MARS 5.

Anexo 4 . Análisis estadístico de la linealidad del sistema de selenito de sodio.

Tabla 34. Análisis de variancia de la linealidad del sistema de selenito de sodio.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Concentración	0.226879	1	0.226879	11325.94	0.0000
Residual	0.000260413	13	0.0000200318		
Total	0.227139	14			

Coeficiente de determinación = 99.8854

Coeficiente de determinación (ajustado) = 99.8765

Error estándar = 0.00447569

Valor medio de residuales = 0.00345733

Prueba estadística de Durbin-Watson = 2.071 (P=0.3279)

De acuerdo los resultados obtenidos de la tabla anterior, la variabilidad en la respuesta del sistema de selenito de sodio, está explicada en un 99.88%. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales que es de 0.00447569. El valor medio de los residuales es de 0.00345733. Por otro lado, la prueba de Durbin-Watson de los residuales es mayor a 1.4, con un P-value 0.3279, esto quiere decir que no existe una seria autocorrelación en los residuales.

Gráfico 19 . Curva de regresión de la respuesta observada y el pronóstico de la respuesta del sistema de selenito de sodio.

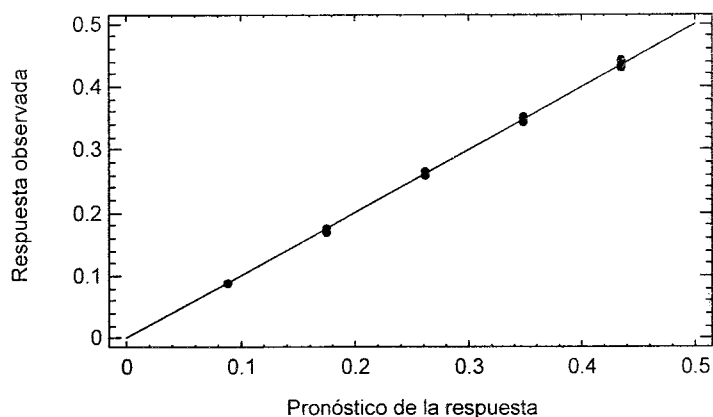
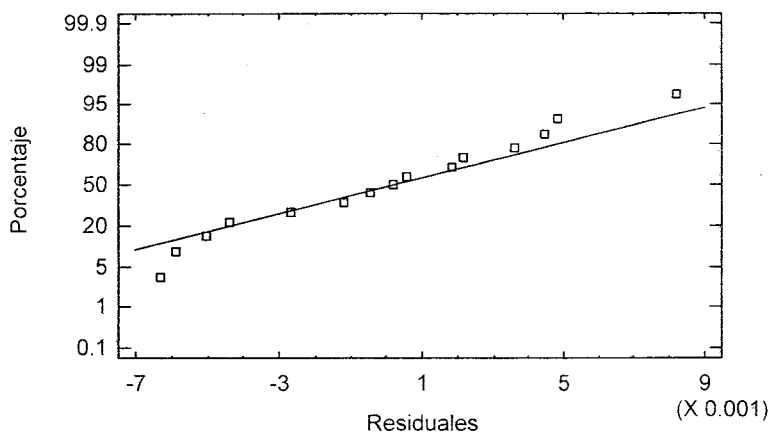


Gráfico 20 . Gráfico de la probabilidad normal del sistema de selenito de sodio.



Anexo 5. Análisis estadístico de la linealidad del sistema de levadura.

Tabla 35. Análisis de variancia de la linealidad del sistema de levadura.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Concentración	0.0193853	1	0.0193853	31276.95	0.0000
Residual	0.00000805733	13	6.19795E-7		
Total	0.0193933	14			

Coeficiente de determinación = 99.9585 %
 Coeficiente de determinación (ajustada) = 99.9553 %
 Error estándar = 0.000787271
 Valor medio de residuales = 0.000568
 Prueba estadística de Durbin-Watson = 1.47836 (P=0.0843)

Conforme a estos resultados, se puede decir que la variabilidad en la respuesta está explicada a los cambios en la concentración de selenio en un 99.95%. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales que es de 0.000787271. El valor medio de los residuales es de 0.000568. La prueba de Durbin-Watson de los residuales es 1.47936, con un P-value 0.0843, por lo tanto, no existe autocorrelación en los residuales obtenidos el la linealidad del sistema de levadura.

Gráfico 21 . Curva de regresión de la respuesta observada y el pronóstico de la respuesta del sistema de levadura.

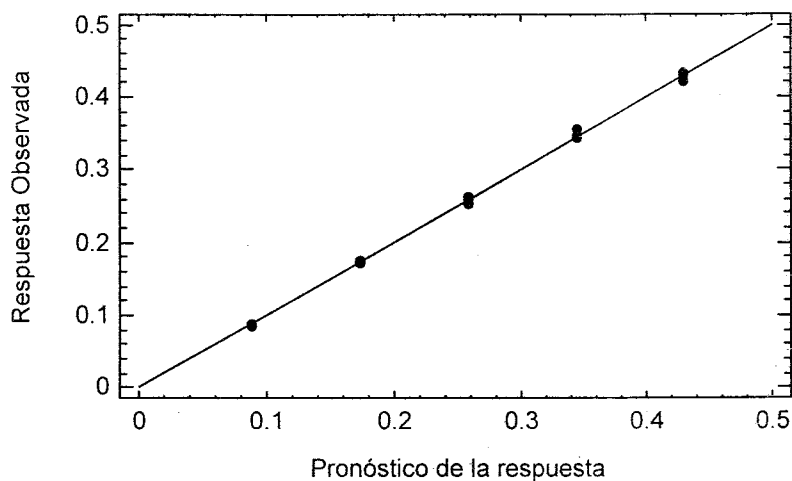
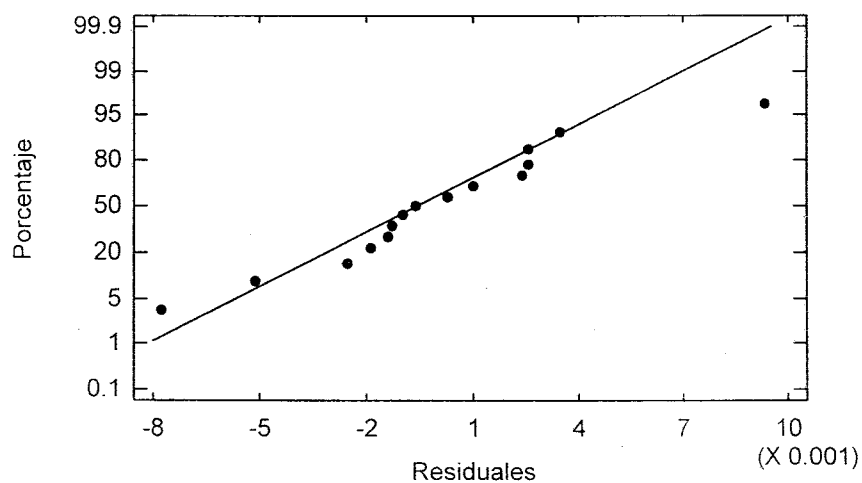


Gráfico 22 . Gráfico de la probabilidad normal del sistema de levadura.



Anexo 6. Análisis estadístico de la linealidad del sistema de fluido ruminal.

Tabla 36. Análisis de variancia de la linealidad del sistema de fluido ruminal.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Concentración	0.21941	1	0.21941	12910.14	0.0000
Residual	0.000220937	13	0.0000169952		
Total	0.219631	14			

Coefficiente de determinación = 99.8994 %

Coefficiente de determinación (ajustada) = 99.8917 %

Error estándar = 0.00412252

Valor medio de residuales = 0.00288178

Prueba estadística de Durbin-Watson = 2.49571 (P=0.0932)

Un 99.89% explica la variabilidad de la respuesta obtenida en la linealidad del sistema de fluido ruminal conforme cambia la concentración de selenio. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales que es de 0.00412252. El valor medio de los residuales es de 0.00288178. Por otro lado, la prueba de Durbin-Watson de los residuales es de 2.49571, con un P-value 0.0932, por lo tanto, no existe una seria autocorrelación en los residuales.

Gráfico 23 . Curva de regresión de la respuesta observada y el pronóstico de la respuesta del sistema de fluido ruminal.

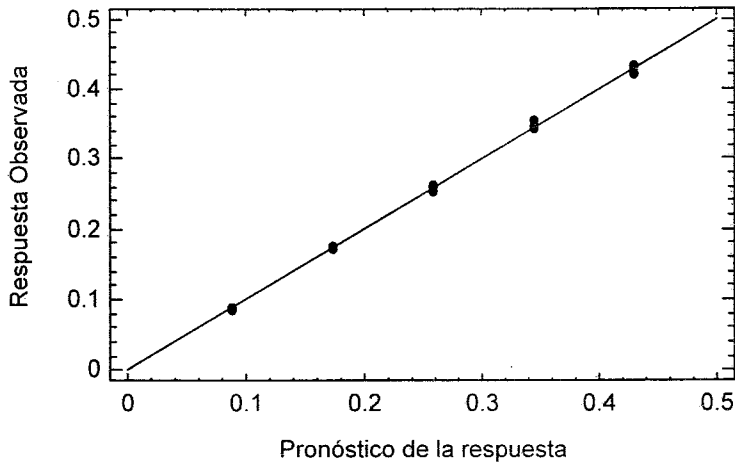
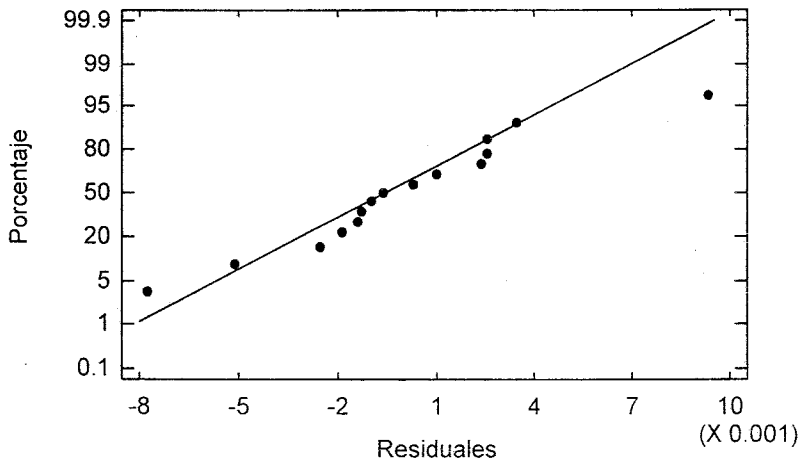


Gráfico 24 . Gráfico de la probabilidad normal del sistema de fluido ruminal.



Anexo 7. Análisis estadístico de la linealidad del método de selenito.

Tabla 37. Análisis de variancia de la linealidad del método de selenito.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Adicionado	14504.3	1	14504.3	228935.30	0.0000
Residual	0.443488	7	0.0633554		
Total	14504.7	8			

Coeficiente de determinación = 99.9969 %
 Coeficiente de determinación (ajustada) = 99.9965 %
 Error estándar = 0.251705
 Valor medio de residuales = 0.192119
 Prueba estadística de Durbin-Watson = 1.4667 (P=0.0903)

De acuerdo a los resultados anteriores, existe evidencia estadística de que la variabilidad en la cantidad recuperada en la linealidad del método de selenito está explicada en un 99.99%. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales que, en este caso es de 0.251705. El valor medio de los residuales es de 0.192119. Por otro lado, la prueba de Durbin-Watson de los residuales es de 1.4667, con un P-value 0.0903, por lo tanto, no existe una seria autocorrelación en los residuales.

Gráfico 25 . Curva de regresión de la respuesta observada y el pronóstico de la respuesta de la linealidad del método de selenito de sodio.

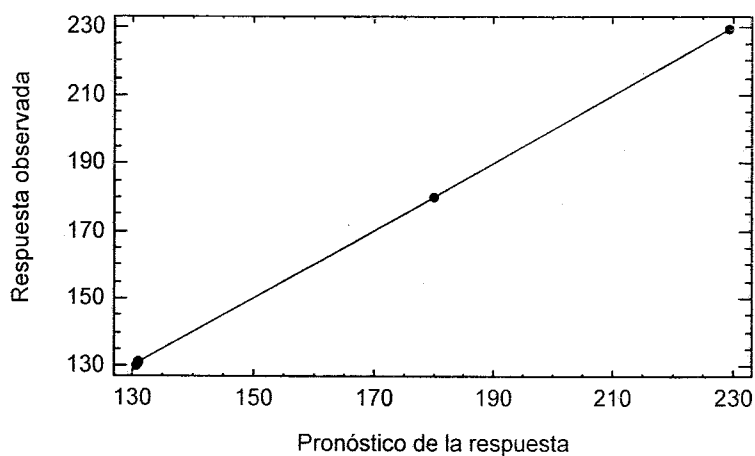
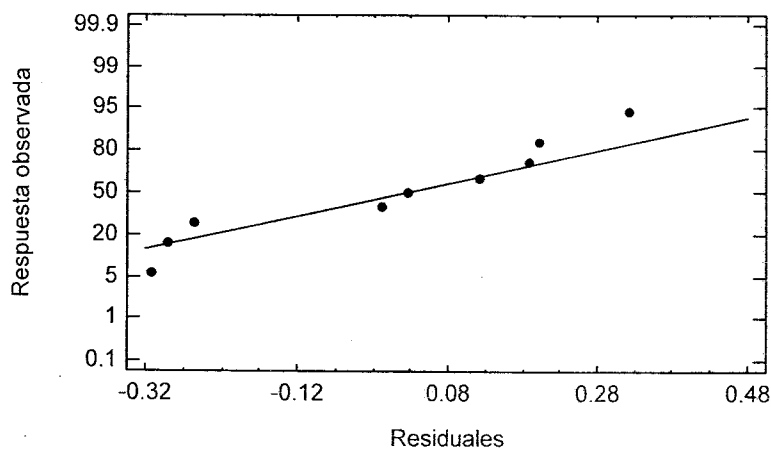


Gráfico 26 . Gráfico de la probabilidad normal de la linealidad del método de selenito de sodio.



Anexo 8. Análisis estadístico de la linealidad del método de levadura.

Tabla 38. Análisis de variancia de la linealidad del método de levadura.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Conc. Adic.	154.027	1	154.027	2299.45	0.0000
Residual	0.468889	7	0.0669841		
Total	154.496	8			

Coeficiente de determinación = 99.6965 %
 Coeficiente de determinación (ajustada) = 99.6531 %
 Error estándar. = 0.258813
 Valor medio de residuales = 0.202469
 Prueba estadística de Durbin-Watson = 2.35782 (P=0.1513)

Los resultados obtenidos en la linealidad del método de levadura indican que un 99.69% explica la variabilidad de la respuesta conforme a la cantidad adicionada de selenio. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales de 0.258813. El valor medio de los residuales es de 0.202469. No obstante, la prueba de Durbin-Watson de los residuales es de 2.35725, con un P-value del 0.1513, por lo tanto, no existe una seria autocorrelación en los residuales de la linealidad.

Gráfico 27 . Curva de regresión de la respuesta observada y el pronóstico de la respuesta de la linealidad del método de levadura.

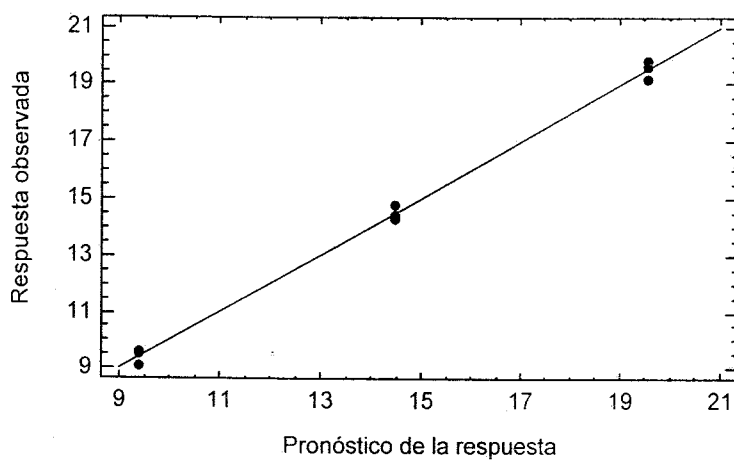
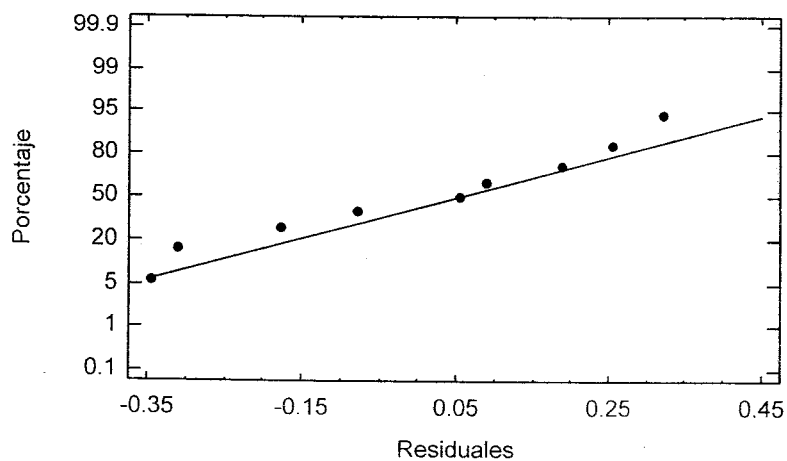


Gráfico 28 . Gráfico de la probabilidad normal de la linealidad del método de levadura.



Anexo 9. Análisis estadístico de la linealidad del método de fluido ruminal.

Tabla 39. Análisis de variancia de la linealidad del método de fluido ruminal.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Conc. Adic.	610.243	1	610.243	32998.87	0.0000
Residual	0.12945	7	0.0184929		
Total	610.373	8			

Coefficiente de determinación = 99.9788 %

Coefficiente de determinación (ajustada) = 99.9758 %

Error estándar = 0.135988

Valor medio de residuales = 0.107778

Prueba estadística de Durbin-Watson = 2.4832 (P=0.1057)

Finalmente en la linealidad del método de fluido ruminal, la variabilidad en la concentración recuperada está explicada en un 99.97%. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales de 0.135988. El valor medio de los residuales es de 0.107778. No obstante, la prueba de Durbin-Watson de los residuales es de 2.4832, con un P-value del 0.1513, demostrando que no existe una autocorrelación en los residuales de la linealidad.

Gráfico 29 . Curva de regresión de la respuesta observada y el pronóstico de la respuesta de la linealidad del método de fluido ruminal.

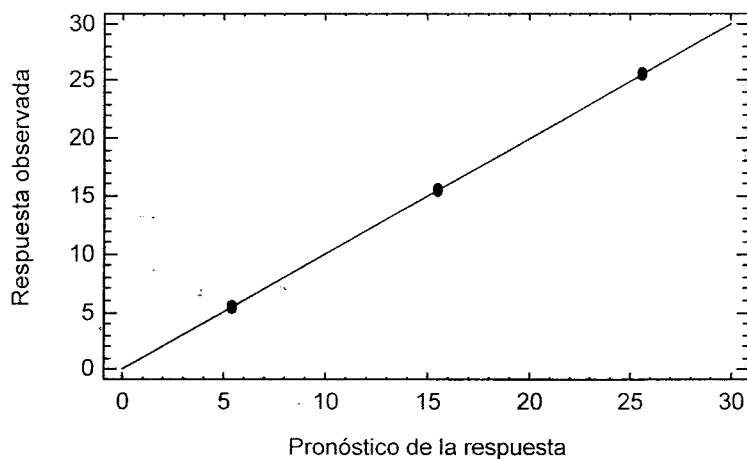
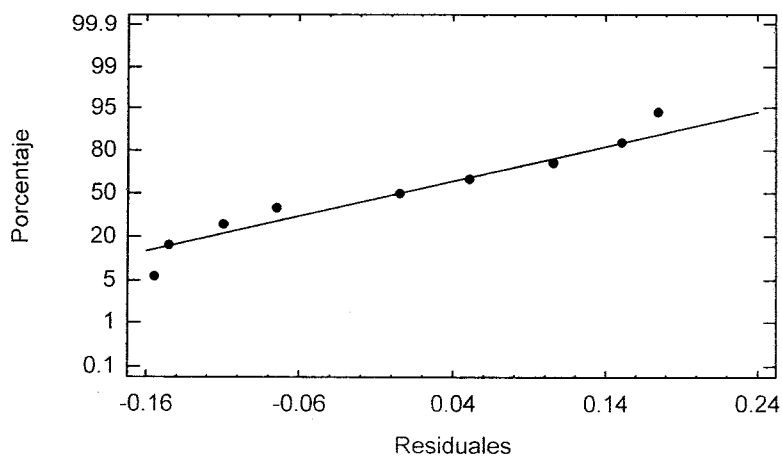


Gráfico 30 . Gráfico de la probabilidad normal de la linealidad del método de fluido ruminal.



Anexo 10. Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de selenito de sodio.

Tabla 40. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de selenito de sodio.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Modelo	2.64116	3	0.880386	3.04	0.0927
Residual	2.31687	8	0.289608		
Total	4.95803	11			

Tabla 41. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de selenito de sodio. (Analista anidado en el día).

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
analista	1.03841	1	1.03841	1.30	0.3730
día(analista)	1.60275	2	0.801375	2.77	0.1221
Residual	2.31687	8	0.289608		
Total	4.95803	11			

Tabla 42. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de selenito de sodio. (Día anidado en el analista)

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
analista(día)	2.44608	2	1.22304	4.22	0.0560
día	0.195075	1	0.195075	0.16	0.7282
Residual	2.31687	8	0.289608		
Total	4.95803	11			

Error estándar = 0.5382

Valor medio de residuales = 0.3483

Prueba estadística de Durbin-Watson = 3.078 (P=0.002)

Tabla 43. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de selenito de sodio por analista con diferencia mínima significativa al 95%.

Método: 95.0 % LSD				
ANALISTA	Cantidad	LS Promedio	LS Desv. Estándar	Grupos homogéneos
1	6	98.6983	0.365462	X
2	6	99.2867	0.365462	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	0.588333	2.22379

* Diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 44. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de selenito de sodio por día con diferencia mínima significativa al 95%.

Método: 95.0 % LSD				
DIA	Cantidad	LS Promedio	LS Desv. Estándar	Grupos homogéneos
2	6	98.8650	0.451487	X
1	6	99.1200	0.451487	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	-0.255	2.7473

* Diferencia estadísticamente significativa.

En la reproducibilidad del método de selenito de sodio se analizaron los valores de P en el factor día y en el factor analista, observándose que son mayores a 0.05 (tabla 41 y 42, pág 100), con un nivel de confianza del 95%, indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa y que por lo tanto, el método es reproducible. El error estándar del estimado muestra la desviación estándar de los residuales de 0.5382 con un valor medio de 0.3483.

Por otro lado, las tablas 43 y 44 (pág 101) muestran la homogeneidad de grupos de la reproducibilidad del método de selenito de sodio por día y analista, respectivamente; con esto se tiene la evidencia que el método es reproducible no habiendo diferencia significativa entre el factor día y el factor analista.

Anexo 11. Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de levadura.

Tabla 45. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de levadura.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Modelo	9.4214	3	3.14047	1.80	0.2245
Residual	13.9345	8	1.74181		
Total	23.3559	11			

Tabla 46. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de levadura (analista anidado en el día).

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
analista	6.10613	1	6.10613	3.68	0.1949
día(analista)	3.31527	2	1.65763	0.95	0.4258
Residual	13.9345	8	1.74181		
Total	23.3559	11			

Tabla 47. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de levadura (día anidado en el analista).

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
analista(día)	7.76377	2	3.88188	2.23	0.1701
día	1.65763	1	1.65763	0.43	0.5805
Residual	13.9345	8	1.74181		
Total	23.3559	11			

Error estándar = 1.31978

Valor medio de residuales = 0.907222

Prueba estadística de Durbin-Watson = 2.29886 (P=0.0416)

Tabla 48. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de levadura por analista con diferencia mínima significativa al 95%.

Método: 95.0 % LSD				
ANALISTA	Cantidad	LS Promedio	LS Desv. Estándar	Grupos homogéneos
1	6	98.7433	0.525616	X
2	6	100.1700	0.525616	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites	
1 - 2		-1.42667	3.19831	

* Diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 49. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de levadura por día con diferencia mínima significativa al 95%.

Método: 95.0 % LSD				
DIA	Cantidad	LS Promedio	LS Desv. Estándar	Grupos homogéneos
1	6	99.0850	0.804351	X
2	6	99.8283	0.804351	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites	
1 - 2		-0.743333	4.8944	

* Diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de P de las tablas 46 y 47 (pág 103) son mayores a 0.05, con un nivel de confianza del 95%, por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el factor día y el factor analista. El error estándar del estimado es de 1.31978 con un valor medio de 0.907222. Finalmente, la prueba de Durbin-Watson es de 2.29886, con un P-value del 0.0416, demostrando que no existe una seria autocorrelación en la reproducibilidad del método.

Por otro lado, las tablas 48 y 49 (pág 104), muestran que los grupos son homogéneos en la reproducibilidad del método de levadura, y por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el factor día y en el factor analista.

Anexo 12. Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de fluido ruminal.

Tabla 50. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de fluido ruminal.

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
Modelo	4.0295	3	1.34317	0.21	0.8871
Residual	51.3069	8	6.41336		
Total	55.3364	11			

Tabla 51. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de fluido ruminal (analista anidado en el día)

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
analista	1.36013	1	1.36013	1.02	0.4190
día(analista)	2.66937	2	1.33468	0.21	0.8164
Residual	51.3069	8	6.41336		
Total	55.3364	11			

Tabla 52. Análisis de variancia de la reproducibilidad del método de fluido ruminal (día anidado en el analista)

Parámetro	SS	gl	MC	F	P-Value
analista(día)	2.90097	2	1.45048	0.23	0.8025
día	1.12853	1	1.12853	0.78	0.4708
Residual	51.3069	8	6.41336		
Total	55.3364	11			

Error estándar = 2.53246

Valor medio de residuales = 1.85778

Prueba estadística de Durbin-Watson = 1.97214 (P=0.1233)

Tabla 53. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de fluido ruminal por analista con diferencia mínima significativa al 95%.

Método: 95.0 % LSD				
ANALISTA	Cantidad	LS Promedio	LS Desv. Estándar	Grupos homogéneos
1	6	94.0617	0.471643	X
2	6	94.735	0.471643	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites	
1 - 2		0.673333	2.8699	

* Diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 54. Tabla de comparación múltiple del porcentaje de recuperación de fluido ruminal por día con diferencia mínima significativa al 95%.

Método: 95.0 % LSD				
DIA	Cantidad	LS Promedio	LS Desv. Estándar	Grupos homogéneos
2	6	94.0917	0.491678	X
1	6	94.705	0.491678	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites	
1 - 2		-0.613333	2.9918	

* Diferencia estadísticamente significativa.

En las tablas 51 y 52 (pág 106), se puede observar que los valores de P son mayores a 0.05, con un nivel de confianza del 95%, por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el factor día y el factor analista en el método de fluido ruminal. El error estándar del estimado es de 2.53246 con un valor medio de 1.85778. Finalmente, la prueba de Durbin-Watson es de 1.97214, con un P-value de 0.1236. Por lo tanto, no existe una seria autocorrelación en los datos.

En base a los resultados obtenidos en las tablas 53 y 54 (pág 107), los grupos son homogéneos y por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el factor día y entre el factor analista. Concluyendo que el método de fluido ruminal es reproducible y repetible entre día y analista.

Anexo 13. Certificado de análisis del Estándar de Selenio Cientific Company.

Standar Selenium Powder
Cientific Company
Certificate of Analysis

Selenium

Lot: # 783273

Purity	99.58%
Residue on Ignition	0.10%
Nitrogen (N)	0.004%
Sulfur (S)	0.00%
Heavy Metals (Pb)	0.02%
Iron (Fe)	0.01%

Anexo 14. Certificado de Análisis del Estándar de Selenio High Purity.



P.O. Box 41727
Charleston, SC 29423
TEL: (843) 767-7900
FAX: (843) 767-7906

CAT. NO. 100649-1

Certificate of Analysis

Selenium

Lot # 406509

Source	Source Purity	Matrix	Density g/mL @ 22.2°C	Standard Concentration
Selenium Metal	99.999%	HNO ₃ , 2%	1.0139	1000 ± 1 µg/mL

This spectrometric standard solution has been prepared from high-purity reference materials. Subboiled high-purity acid has been used to place the materials in solution and to stabilize the standard. The matrix is as noted above in 18 megohm deionized water. The reference materials have been assayed by optical emission spectrometry and atomic absorption spectrometry.

The Selenium was analyzed by ICP-MS for trace impurities. The less than values are detection limits for the method. M = Major element.

Concentrations as µg/L (ppb)

Li	<0.02	Be	<0.02	B	<1.0	Na	<1.0	Mg	<0.02	Al	<0.5	Si	<1.0	K	<1.0
Ca	<1.0	Sc	<0.02	Ti	<0.02	V	<0.02	Cr	<0.02	Mn	0.05	Fe	<1.0	Co	<0.02
Ni	<0.02	Ce	<0.02	Zn	<0.02	Ga	<0.02	Ge	<0.02	As	1.0	Se	M	Sb	<0.02
Sr	<0.02	Y	<0.02	Zr	<0.02	Nb	0.05	Mo	<0.02	Ru	<0.02	Rh	<0.02	Pb	<0.02
Ag	<0.02	Cd	<0.02	In	<0.02	Sn	0.1	Sb	<0.5	Te	<0.02	Cs	<0.02	Ba	<0.02
La	<0.02	Ce	<0.02	Pr	<0.02	Nd	<0.02	Sr	<0.02	Eu	<0.02	Gd	<0.02	Tb	<0.02
Dy	<0.02	Ho	<0.02	Er	<0.02	Tm	<0.02	Yb	<0.02	Lu	<0.02	Hf	<0.02	Y	<0.02
W	<0.02	Re	<0.02	Os	<0.02	Ir	<0.02	Pt	<0.02	Au	<0.02	Hg	<0.02	Th	<0.02
Pb	0.2	Bi	<0.02	Th	<0.02	U	<0.02								

The Standard Concentration has been certified by spectrometric analysis against an independent source which is directly traceable to National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Material No. 3149.

This standard is valid for eighteen months from the shipping date provided the solution is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.

Theresa C. Rains
Theresa C. Rains, Ph.D.
President

Exp. Date **JAN 06**
MSDS ATTACHED