



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“VALIDACION DE LOS METODOS DE DIGESTION ACIDA
EN HORNO DE MICROONDAS PARA LA DETERMINACION
DE SELENIO EN LECHE Y PLASMA.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ELIVET SANDRA HERNANDEZ CRUZ

ASESORA DE TESIS:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
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 los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas para la
Determinación de Selenio en Leche y Plasma.

que presenta la pasante: Elivet Sandra Hernández Cruz
con número de cuenta: 9308984-1 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 1 de Junio de 2005.

PRESIDENTE	QFB. Elia Granados Enriquez	
VOCAL	QFB. Virginia Oliva Arellano	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Virginia Benítez Solís	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	

Agradecimientos

A Dios por dárles la bendición a mis padres de tenerme, por lo que de mi ser hiciste, por iluminar mi camino, por los sueños logrados y sobre todo por permitirme demostrar hasta donde puedo llegar.

A mi Mami Guadalupe por estar siempre apoyándome en mis ratos de dolor y alegría, por tantas desveladas juntas que pasamos, por alentarme a seguirme superando, por la paciencia que tuviste y tienes para seguirme formando y sobre todo por ser mi graaaaaa amiga.

A mi Papi Jesús gracias por aceptar mi decisión de estudiar esta carrera, apoyarme y estar siempre conmigo y alentarme a seguir con mis anhelos.

Mil gracias papis por tan grandiosa herencia, mi educación.

A mis hermanas Juana Inés y Ruth Noemi por soportarme como hermana, por su apoyo ilimitado, su cariño y comprensión este logro también es de ustedes.

A mis sobrinos Alexa Ahitziri, Carlos Giovanni, Itzell Aceret y Luis Alberto por todo su cariño y llenarme de alegría, que este trabajo sea un estímulo de superación para ustedes.

A Humberto por caminar conmigo, por tú cariño, amor, paciencia y todo el apoyo que me has dado.

A mis cuñados Martín Rigoberto y José Luis.

A Ceci y Maru por estar conmigo en los momentos de dolor y alegría, por sus consejos, regaños, enojos y sobre todo por brindarme su amistad y confianza incondicionalmente, gracias por ser mis amigas. Las quiero mucho.

A Irma por brindarme tu confianza, amistad, por todos los consejos que me has dado y creer en mí, gracias por ser mi amiga. Te quiero mucho.

A Alejandra, Angeles, Claudia, Esperanza, Juanita, Judith, Luz María, Minerva, Nancy, por brindarme su amistad, cariño y confianza por compartir sueños e ilusiones, por creer en mi y sobre todo gracias a las que formamos "al equipo estrella", y ser mis amigas. Las quiero mucho.

A Gaby y Erika por darme la oportunidad de conocerlas, por su amistad, confianza por sus consejos y enseñanzas, gracias por ser mis amigas. Las quiero mucho.

A Agustín, Aldo, Arturo, Edgar, Gregorio, Hammurabi, José Luis, Rafael, por confiar en mi, por su amistad y por apoyarme siempre.

A mi asesora Dra. Alma Luisa gracias por su confianza, por todo el apoyo y tiempo brindado para la realización de este trabajo, por sus consejos, paciencia y sobre todo por brindarme su amistad.

A la Dra. Raquel López Arellano por su apoyo, consejos y tiempo para la elaboración de este trabajo y por su amistad.

Al Dr. Juan Manuel Aceves Hernández por brindarme su amistad y darme la oportunidad de trabajar con usted.

A mis sinodales por el tiempo que dedicaron en revisar este trabajo, por todas sus recomendaciones.

A todos los de la NAVE 3000 en especial al Q. Porfirio García, Rpsy, Juanita (□), Santiago, Isaías.

A la UNAM (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán) por ser parte de ella y en especial a todos mis profesores durante mi formación profesional.

Un agradecimiento al proyecto PAPIIT IN212903 por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	Contenido	Pág.
I.	Introducción	xi
II.	Objetivos	xv
III.	Hipótesis	xv
IV.	Generalidades	
	4.1 Selenio	17
	4.1.1 Introducción	17
	4.1.2 Propiedades	17
	4.1.3 Aplicaciones	18
	4.1.4 Farmacocinética y Farmacodinamia	18
	4.1.5 Toxicología	19
	4.1.6 Importancia del Selenio en la Salud Humana	20
	4.2 Características de las Muestras Biológicas.	23
	4.2.1 Leche	23
	4.2.1 Plasma	24
	4.3. Digestión Ácida en Horno de Microondas	25
	4.3.1 Antecedentes	25
	4.3.2 Conceptos Teóricos de Microondas	26
	4.3.3 Componentes de un sistema de Microondas	33
	4.3.4 Ventajas de la Digestión Ácida en Horno de Microondas	36
	4.4 Espectrofotometría de Absorción Atómica	36
	4.4.1 Generalidades	36
	4.4.2 Sistemas de Atomización	38
	4.5 Validación	43
	4.5.1 Generalidades de Validación	43
	4.5.2 Determinaciones y Criterios de Aceptación	45
	4.5.2.1 Linealidad del Sistema	45
	4.5.2.2 Precisión del Sistema	45
	4.5.2.3 Linealidad del Método	46
	4.5.2.4 Exactitud y Repetibilidad del Método	46

4.5.2.5	Precisión y Reproducibilidad del Método	47
V.	Parte Experimental	
5.1	Reactivos, Muestras Biológicas y Estándares	49
5.2	Material	49
5.3	Equipos y Gases	50
5.4	Tratamiento de las muestras	51
5.5	Condiciones de los Métodos	53
5.6	Medición de la Absorbancia	54
VI.	Resultados y Discusión	
6.1	Criterios de Aceptación	56
6.2	Linealidad del Sistema	57
6.2.1	Precisión del Sistema	61
6.3	Linealidad del Método de Leche	61
6.3.1	Exactitud y repetibilidad del método	66
6.3.2	Precisión y reproducibilidad del método	67
6.4	Linealidad del Método de Plasma	70
6.4.1	Exactitud y repetibilidad del método	74
6.4.2	Precisión y reproducibilidad del método	76
VII.	Conclusiones	80
VIII.	Perspectivas	81
IX	Anexos	82
X.	Referencias	97

ÍNDICE DE TABLAS

	Título	Pág.
4.1	Recomendaciones para Antioxidantes	23
6.1	Parámetros analíticos para la evaluación de los métodos de digestión ácida	56
6.2	Concentración-Propiedad medida	57
6.3	Parámetros estadísticos de la regresión del sistema	58
6.4	Análisis de Variancia del sistema	60
6.5	Análisis de regresión –Modelo lineal: $Y=a+b*Y$	60
6.6	Parámetros estadísticos de la propiedad medida de la solución de referencia de Selenio	61
6.7	Concentración Adicionada-Concentración Recuperada-Porcentaje de Recobro	62
6.8	Análisis de Variancia para Selenio Recuperado del método de leche	63
6.9	Parámetros estadísticos de la regresión del método de leche	63
6.10	Análisis de regresión para el modelo lineal del método de leche	65
6.11	Parámetros estadísticos del Porcentaje de Selenio Recuperado del método de leche	66
6.12	Concentración Adicionada-Porcentaje de Selenio Recuperado del método de Leche	66
6.13	Resultados obtenidos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de leche	67
6.14	Porcentaje de recuperación de Selenio para determinar la precisión y reproducibilidad del método de leche	68
6.15	Análisis de Variancia para el Porcentaje de Selenio Recuperado del método de leche	69
6.16	Concentración Adicionada-Concentración Recuperada-Porcentaje de Recobro	70
6.17	Análisis de Variancia para Selenio Recuperado del método de plasma	71
6.18	Parámetros estadísticos de la regresión del método de plasma	72
6.19	Análisis de regresión para el modelo lineal del método de plasma	74
6.20	Parámetros estadísticos del Porcentaje de Selenio Recuperado del método de Plasma	74
6.21	Concentración Adicionada-Porcentaje de Selenio Recuperado del método de Plasma	75

6.22	Resultados obtenidos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de plasma	75
6.23	Porcentaje de recuperación de Selenio para determinar la precisión y reproducibilidad del método de plasma	76
6.24	Análisis de Variancia para el Porcentaje de Selenio recuperado del método de plasma	77
9.1	Resumen estadístico para CestentreCr	90
9.2	Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Analista para el método de leche	94
9.3	Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Día para el método de leche	94
9.4	Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Analista para el método de plasma	96
9.5	Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Día para el método de plasma	96

ÍNDICE DE FIGURAS

	Título	Pág.
4.1	Esquema de una Microonda	27
4.2	Espectro Electromagnético	28
4.3	Esquema del calentamiento por microondas	30
4.4	A Esquema de la Rotación Dipolar	31
4.4	B Esquema de la Rotación Dipolar	31
4.4	C Esquema de la Rotación Dipolar	32
4.5	Esquema del Horno de Microondas	33
4.6	Esquema del magnetrón	34
4.7	Cavidad y Control del ciclo del trabajo del Horno de Microondas	35
4.8	Partes básicas de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica	37
4.9	Lámpara de cátodo hueco	38
4.10	Esquema del Generador de Hidruros	40
6.1	Gráfica de regresión lineal del sistema	58
6.2	Gráfica de residuales del sistema	59
6.3	Gráfica de Absorbancia del sistema	59
6.4	Gráfica de regresión para el modelo lineal del método de leche	62
6.5	Gráfica de residuales del método de leche	64
6.6	Gráfica de Selenio Recuperado del método de leche	65
6.7	Intervalos de las Medias del Porcentaje de Recobro de Selenio al 95% con DMS del método de leche	69
6.8	Gráfica de regresión para el modelo lineal del método de plasma	71
6.9	Gráfica de residuales del método de plasma	73
6.10	Gráfica de Selenio Recuperado del método de plasma	73
6.11	Intervalos de las Medias del Porcentaje de Recobro de Selenio al 95% con DMS del método de plasma	77
9.1	Gráfica de Box y Whisker	91
9.2	Histograma	91
9.3	Gráfica de probabilidad Normal	92
9.4	Gráfica de residuales para el método de leche	93
9.5	Gráfica de residuales para el método de plasma	93

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
[O]	Oxidación
[Se]	concentración de Selenio
°C	grados centígrados
α	nivel de significancia
Ar	Argón
As	Arsénico
b	ordenada al origen ó intercepto
Bi	Bismuto
cal	Calorías
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de variación
CV _{Y/X}	Coefficiente de variación para la regresión
Δ	Calentamiento
DW	Durbin-Watson
E.U.	Estados Unidos
F _{cal}	F _{calculada}
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
G.L.	grados de libertad
GLP's	Good Laboratory Procedures
GMP's	Good Manufacturing Procedures
H ⁻	hidronio
H ⁺	ácido
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrógeno
H ₂ SeO ₃	Ácido Selenioso
H ² SeO ₄	Ácido Selénico
H ² SO ₄	Ácido Sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
Ha	hipótesis alterna
HCl	Ácido Clorhídrico
HNO ₃	Ácido Nítrico
Ho	hipótesis nula
ICb	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
ICm	Intervalo de confianza para la pendiente
ICH	International Cooperation on Harmonization
Kcal.	Kilocalorías

L	Litro
LCI	Límite de confianza inferior
LCS	Límite de confianza superior
M	Molar
m	pendiente
Máx.	máximo
µg	microgramos
µL	microlitro
MHz	Megahertz
Min.	mínimo
min.	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
N	Nitrógeno
NaBH ₄	Borhidruro de Sodio
Ne	Neón
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
P-Valor	Valor de Probabilidad
R.A.	reactivo analítico
r ²	coeficiente de determinación
RDA	Referencia de Ingesta Diaria
R-M	Radical-Metal
s	desviación estándar
Sb	Antimonio
Se	Selenio
Se Adic	Selenio Adicionado
Se Rec	Selenio Recuperado
Sn	Estaño
SSA	Secretaría de Salud
t _{cal}	t _{calculada}
Te	Telurio
USA	Estados Unidos Americanos
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
VGA	Generador de Hidruros
W	Watts

INTRODUCCIÓN

Cuando se cuantifica un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología. Por ello, se debe dedicar tiempo para el desarrollo de un método analítico o bien usar metodologías farmacopéicas que permitan cuantificar el producto ya sea en forma de materia prima, como activo de formulación o en muestras biológicas, con un alto grado de confiabilidad. La adecuada estandarización de un método analítico, seguido de la validación del método a lo largo de los diferentes estudios, son elementos imprescindibles para alcanzar óptimos resultados [1,2].

La parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo. La validación del método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, es decir, el método debe probarse para determinar su capacidad. La capacidad se fundamenta en la determinación de diversos parámetros analíticos, que proporcionan una medida del comportamiento del método analítico. La evaluación de estos parámetros permite conocer exactamente la confiabilidad que proporciona el método analítico, para ser usado en el análisis de rutina [3-5].

El Selenio ha recibido mucha atención en las últimas décadas siendo éste necesario para algunas funciones corporales de animales y humanos, pero con un rango de concentraciones estrecho entre lo requerido y lo tóxico [6,7].

La determinación del Selenio se realiza frecuentemente por Espectrofotometría de Absorción Atómica con el sistema de Generador de Hidruros, siendo un método muy sensible que puede analizar concentraciones pequeñas de Selenio [8-10].

El presente trabajo tiene como finalidad la validación de dos métodos de digestión ácida en horno de microondas para la determinación de Selenio en leche y plasma previamente desarrollados [11], teniendo como característica la destrucción química de los compuestos orgánicos y la liberación de nuestro analito de interés.

OBJETIVO GENERAL

- ◆ Realizar la Validación de los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas previamente desarrollados para la cuantificación de Selenio en leche y plasma.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Determinar el porcentaje de recuperación de Selenio total empleando los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas previamente desarrollados para demostrar la eficiencia de dichas metodologías.
- ◆ Evaluar los parámetros estadísticos establecidos por la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, para los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas previamente desarrollados para la cuantificación de Selenio en leche y plasma.
- ◆ Analizar los resultados de los parámetros estadísticos evaluados a fin de determinar la confiabilidad de los métodos de digestión propuestos.

HIPÓTESIS

Si los métodos de digestión ácida empleados son eficientes y confiables para la recuperación de Selenio en las muestras biológicas, entonces al realizarse la validación de los métodos se cumplirá con los parámetros estadísticos establecidos por la Guía de Validación de Métodos Analíticos.



GENERALIDADES

4.1 SELENIO

4.1.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años el interés por los oligoelementos y en particular por el Selenio ha ido aumentando en forma considerable. El Selenio (del griego *selénion*, “resplandor de la luna”) forma parte del subgrupo VI-B de la tabla periódica y su número atómico es 34 [12].

Fue descubierto en 1817 cuando un científico sueco encontró un residuo rojo en el material de desecho que se forma durante la producción de Ácido Sulfúrico en una mina de Sulfuro de Cobre de Falun (Suecia), debido a que sus propiedades químicas eran similares al Telurio se describió como tal hasta que poco después Jöns Jakob Berzelius descubrió que se trataba de un elemento con propiedades únicas [13].

4.1.2 PROPIEDADES

Químicamente se asemeja al Azufre y está relacionado con el Telurio. Al igual que el Azufre se presenta en varias formas alotrópicas diferentes: como polvo rojo ladrillo; como masa amorfa vidriosa, de color castaño oscuro, llamada Selenio vitroso; como cristales monocíclicos rojos con una densidad relativa de 4.5; gris metálico (hexagonal) y el Selenio negro, que es la variedad metálica, en estado muy fino de subdivisión. Al calentarlo desprende un olor característico, parecido al de las coles podridas. Forma Ácido Selenioso (H_2SeO_3) y Ácido Selénico (H_2SeO_4), cuyas sales respectivas se denominan Selenitos y Selenatos, Hidrógeno Seleniado, Anhídrido Selenioso y Oxiclورو de Selenio. El Selenio metálico tiene un punto de fusión de 217 °C, un punto de ebullición de 685 °C y una densidad relativa de 4.81. La masa atómica del Selenio es de 78.96 [13-15].

En el orden de abundancia de los elementos, ocupa el sexagésimo noveno lugar, es pues un elemento bastante escaso ya que su contenido en la corteza terrestre es de 0.09 ppm. Se encuentra en cantidades muy pequeñas pero detectables en todos los suelos, tanto forestales como agrícolas. El elemento Selenio aparece en unos pocos minerales como Seleniuro, siendo el más común de ellos el Seleniuro de Plomo. También se da combinado con Azufre en

numerosas menas¹ de este elemento. Se obtiene generalmente como subproducto en el refinado de menas de Sulfuro de Cobre, aunque esta última fuente de obtención es insuficiente para satisfacer la creciente demanda del elemento en la industria. El mayor depósito destinado a explotación comercial se descubrió en 1955 en Wyoming (E.U.) [12,14].

4.1.3 APLICACIONES

El Selenio metálico es conductor de la electricidad; esta conductividad aumenta con la luz y disminuye en la oscuridad. Esta propiedad se aprovecha en el funcionamiento de diversos aparatos fotoeléctricos. En forma de Selenio rojo o Seleniuro de Sodio, se utiliza para colorear de rojo escarlata vidrios, barnices y esmaltes. También se emplea a gran escala para eliminar colores en el vidrio, ya que neutraliza el tinte verdoso producido por compuestos de Hierro (ferrosos). A menudo se añaden pequeñas cantidades de Selenio al caucho vulcanizado para aumentar su resistencia a la abrasión. El Seleniato de Sodio se usa como insecticida para las plantas, especialmente para crisantemos y claveles, esparciéndose alrededor de las raíces para alcanzar toda la planta a través de la savia. El Sulfuro de Selenio se emplea en el tratamiento de la caspa, acné, acemias, dermatitis seborreica y otras enfermedades de la piel [12,16].

4.1.4 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

El Selenio es rápidamente absorbido por el organismo a través de intestino y los pulmones, bajo la forma de humos. Sin embargo no se absorbe por la piel. Circula por el torrente circulatorio ligado a la proteína plasmática. Las sales inorgánicas son transformadas, en parte, en compuestos orgánicos que se fijan a las proteínas, localizándose preferentemente en el hígado, bazo, riñones, músculos y hemoglobina, pero nunca se acumula en la grasa corporal. En la administración prolongada, el Selenio se encuentra en el pelo y pezuñas, así como en la leche, fijado a la caseína.

Los compuestos de Selenio atraviesan la barrera placentaria, localizándose en el feto y provocando malformaciones congénitas. También se encuentran en el huevo, influyendo en su tasa de eclosión.

¹ Menas: lugar subterráneo de donde se sustraen minerales metalíferos

La eliminación del Selenio del organismo es bastante rápida y se realiza preferentemente por orina, bilis, heces, leche, sudor y aire exhalado. Puede, por tanto, constituir un peligro para las personas ingerir la leche de los animales intoxicados e incluso la carne de los animales con alto contenido en Selenio. Se considera que concentraciones de 5% en la carne y de 0.5% en la leche son tóxicas para el hombre [15].

4.1.5 TOXICOLOGÍA

✓ EN HUMANOS

El Selenio tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. El Selenio es necesario en dosis bajas para mantener buena salud. Sin embargo, la exposición a altos niveles puede producir efectos adversos sobre la salud. La exposición breve a altas concentraciones de Selenio puede producir náusea, vómitos y diarrea. La exposición crónica a altas concentraciones de compuestos de Selenio puede producir una enfermedad llamada selenosis. Los signos y síntomas principales de la selenosis son pérdida de cabello uñas quebradizas y anomalías neurológicas (por ejemplo adormecimiento y otras sensaciones extrañas en las extremidades).

Las exposiciones breves a altos niveles de Selenio elemental o de Dióxido de Selenio en el aire pueden producir irritaciones en las vías respiratorias, bronquitis, dificultad para respirar y dolores de estómago. La exposición más prolongada a cualquiera de estas formas en el aire puede producir irritación de las vías respiratorias, espasmos bronquiales y tos. Los niveles de estas formas de Selenio necesarios para producir estos efectos normalmente no ocurren fuera del trabajo.

Es probable que los efectos del Selenio sobre la salud de niños sean similares a los observados en adultos. Sin embargo, un estudio encontró que los niños pueden ser menos susceptibles a los efectos del Selenio que los adultos. No hay evidencia de que los compuestos de Selenio causen defectos de nacimiento en seres humanos [16,17].

✓ EN ANIMALES

Es conocida desde muy antiguo. Ya Marco Polo (siglos XIII-XIV) en el relato de sus viajes describe a caballos sin pelos. A principios de este siglo, miles de reses, caballos y ovejas en varias zonas de Estados Unidos como Wyoming, Utah, Nebraska y Dakota del Sur fueron

azotadas por dos males aparentemente no relacionados: *Álcali disease* la "enfermedad de álcali" y la forma subaguda, *blind staggers* la "modorra ciega" (como reflejo de la sintomatología). En ambos casos se encontró que las causas eran exceso de Selenio. Los animales habían comido forraje y granos abundantes del mineral. La forma más frecuente en los animales se encuentra ligada al suelo, por la ingestión de plantas que han acumulado este elemento, es decir, las denominadas seléníferas o indicadoras de Selenio, que viven sobre terrenos alcalinos, arcillosos y secos, puesto que el Selenio es arrastrado a la profundidad por la lluvia.

La enfermedad del músculo blanco en rumiantes se considera relacionada con la deficiencia de Selenio de igual manera es relacionada las enfermedades de los cerdos: la hepatosis dietética y el síndrome de estrés porcino. En 1969, varios estudios desarrollados con ratas de laboratorio encontraron que esos animales, cuando eran privados de Selenio en la dieta, sufrían de pérdida de pelo, cataratas y problemas de crecimiento [14,15].

Los estudios en animales han demostrado que niveles muy altos de Selenio pueden afectar la producción de espermatozoides y el ciclo reproductivo de las hembras [14,17].

4.1.6 IMPORTANCIA DEL SELENIO EN LA SALUD HUMANA

Pero la importancia del Selenio en la dieta no fue reconocida hasta 1957, cuando un grupo de investigadores de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos encontró que el Selenio podía prevenir enfermedades hepáticas en animales de laboratorio que presentaban deficiencia de vitamina E.

De una larga lista de 40 alimentos esenciales para la salud humana, el Selenio es actualmente el tema de estudios tanto en humanos como en animales. El Azufre y el Selenio están íntimamente relacionados; la analogía química entre estos dos elementos es de gran importancia desde el punto de vista biológico, ya que el Selenio puede reemplazar al Azufre en los aminoácidos, glucósidos, glutatona, tiamina y otros compuestos a los que da carácter tóxico [13,14,16].

Como constituyente de las Selenio-proteínas, el Selenio tiene papeles estructurales y enzimáticos, El Selenio forma parte de una enzima, la Glutacion Peroxidasa, que es la

encargada de asegurar la destrucción del Peróxido de Hidrógeno y Lípidos dañinos e Hidroperóxidos Fosfolípidos para convertirlos en productos inofensivos (agua y alcoholes) que se forma en las reacciones redox. Esta función del Selenio ayuda a mantener la integridad de la membrana y reduce la probabilidad de propagación de posteriores daños oxidativos para biomoléculas tales como Lípidos, Lipoproteínas y ADN (ya que ayuda a proteger el material genético contra los radicales libres). Es mejor conocido como un antioxidante y un catalizador para la producción de la Hormona Tiroidea Activa, con el incremento asociado de riesgo de condiciones tales como arteriosclerosis y cáncer.

Su relación con la prevención del cáncer está muy bien documentada. Diversos estudios epidemiológicos han establecido que existe una relación clara y directa entre un bajo nivel de Selenio en sangre y cáncer.

En 1996 se publicaría el que podría ser el estudio de prevención del cáncer de mayor éxito en Estados Unidos, realizado por el Instituto Nacional del Cáncer entre 1,312 voluntarios. Fueron administrados 200µg de Selenio diarios y el resultado fue la disminución de un 49% en el índice de mortalidad de los tres tipos de cánceres más frecuentes: pulmón, próstata y colorrectal. Lo que demuestra que necesitamos más Selenio del que nos proporciona la dieta.

Por otra parte, según un estudio de la Universidad de Stanford los niveles bajos de Selenio aumentan significativamente el riesgo de cáncer de próstata. Y según investigadores americanos y chinos, una buena parte de los casos de cáncer de esófago y de estómago en Linxian (China) son de carácter epidémico y pueden ser atribuidos a bajos niveles de Selenio en la población.

Colaboradores de los Institutos Nacionales de Salud de Maryland (E.U.), por su parte examinaron la asociación entre los niveles séricos de Selenio y el desarrollo de cáncer escamoso de esófago y adenocarcinoma gástrico. De acuerdo con los resultados obtenidos los investigadores calcularon que el 26.4% de los cánceres de corazón pueden ser atribuidos a bajos niveles de Selenio en sangre.

También se está estudiando la aplicación del Selenio en los cánceres de piel inducidos por radiación ultravioleta B ya que podría mediar en la mutación del material genético, la lesión oxidativa y la inmunodepresión [13,18,19].

El Selenio es también necesario para el apropiado funcionamiento del sistema inmune y parece ser un nutriente clave en la neutralización del desarrollo de virulencia y en la inhibición de la progresión del VIH a SIDA ya que mantener un nivel óptimo de Selenio implica algo más que reabastecer esta pérdida y fortalecer el sistema inmunológico. Su eficacia se basa en la inhibición de una sustancia relacionada con el virus llamada transcriptasa inversa. Los virus dependen de Selenio para crecer y duplicarse pero una deficiencia del mineral hace a los virus más activos. De hecho, se ha demostrado en laboratorio que cuando a determinados virus incluyendo el de la hepatitis B y el virus influenza (resfriado común) se les priva de Selenio pueden mutar a formas más peligrosas.

La deficiencia de Selenio ha sido ligada a riesgo de enfermedades cardiovasculares vía tensión oxidativa. Ya en 1988 Michelson constató que existía relación entre las enfermedades cardíacas y la carencia en el organismo de Selenio. También se ha podido demostrar su eficacia a la hora de prevenir y controlar las arritmias cardíacas así como la muerte cardíaca súbita. Pero no sólo protege el corazón a través de la producción de Peróxido de Glutacion si no que también es capaz de limitar la carga corporal de metales tóxicos como el Mercurio, el Plomo, el Cadmio y otros que son capaces de dañar el tejido cardíaco [13,18]. Es además necesario para mantener los niveles de la Coenzima Q10, sustancia indispensable para el corazón.

La Glutation Peroxidasa combate la oxidación de los Lípidos en las arterias y reduce la agregación plaquetaria. Su carencia repercute de forma directa en la inhibición de la enzima prostaciclina sintetasa, fundamental para la producción de un vasodilatador elaborado por el endotelio vascular. La condición que implica inflamación donde los niveles de Selenio son bajos en las personas afectadas por artritis reumatoide y, unido a la vitamina E y otros antioxidantes han ayudado a aliviar los síntomas de la enfermedad. Debido a que la Glutation Peroxidasa tiene conocida acción antiinflamatoria el Selenio resulta también eficaz para el tratamiento de afecciones como el asma, la colitis o la psoriasis, un nivel alto de Selenio sería un nutriente benéfico al ingerirse [13,18,19].

Tabla 4.1 Recomendaciones para Antioxidantes			
Nutriente	*RDA Anterior	RDA nuevo	Limite Superior
Vitamina C	60 mg	75 mg para mujeres	2000 mg
Vitamina E	8 mg para mujeres 10 mg para hombres	15 mg	1000mg
Selenio	55 µg para mujeres 70 µg para hombres	55 µg	400 µg

*Referencia de ingesta para vitaminas C, E y selenio.

El Selenio es un micronutriente esencial para plantas y animales. Se sabe que previene ciertas miodistrofias del ganado vacuno, ovino y equino, la diátesis hemorrágica exudativa de los pollos, alteraciones hepáticas en rata y cerdo y el síndrome lipohepático de los pollos [15].

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.2.1 LECHE

Complejidad: La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica (pH) cercana a la neutralidad.

La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido, y no puede ser sustituida por otros alimentos. La gran complejidad de la leche responde a que debe cubrir todas las necesidades alimenticias del recién nacido.

Heterogeneidad: La leche es una emulsión del tipo de aceite en agua, de materia grasa, en forma globular, en un líquido que presenta analogías con el plasma sanguíneo. Es asimismo, una suspensión estabilizada por proteínas y fosfolípidos complejos absorbidos sobre la superficie de los glóbulos grasos y que contiene proteínas (se encuentran tres proteínas: la caseína, la albúmina y la globulina) en forma de dispersión coloidal, lactosa en solución

verdadera, numerosos minerales, especialmente calcio y fósforo , vitaminas liposolubles e hidrosolubles, enzimas y otros varios compuestos orgánicos.

Variabilidad de la composición: En la época del nacimiento, la mama segrega el calostro, líquido que se diferencia principalmente de la leche en sus pares proteica y salina. La composición de la leche completa varía sensiblemente de una especie animal a otra.

Alterabilidad: La leche es un producto que se altera muy fácilmente, especialmente bajo la acción de calor. Numerosos microorganismos pueden proliferar en ella, en especial aquellos que degradan la lactosa con producción de ácido, ocasionando, como consecuencia, la floculación de una parte de las proteínas [20-22].

4.2.2 PLASMA

El plasma es la parte del líquido extracelular del cuerpo que presenta caracteres físicos y químicos muy poco variables y casi constantes. Contiene aproximadamente 7% de proteína, las proteínas plasmáticas se filtran muy poco a través de los poros capilares hacia los espacios intersticiales. En consecuencia, la mayor parte de las proteínas plasmáticas quedan en el sistema circulatorio y las que escapan son devueltas a la circulación por los vasos linfáticos. Por ello, la concentración de proteínas en el plasma es tres y media veces mayor que la del líquido fuera de los capilares.

Las proteínas plasmáticas se dividen en tres grupos principales:

	Gramos (%)
Albúmina	4.5
Globulinas	2.5
Fibrinógeno	0.3

La función primaria de la albúmina (y demás proteínas en menor grado) es producir presión osmótica a nivel de la membrana capilar. Esa presión, llamada presión coloidosmótica, impide que el líquido del plasma escape de los capilares hacia los espacios intersticiales.

Las globulinas se dividen en tres grupos principales: globulinas *alfa*, *beta* y *gamma*. Las globulinas *alfa* y *beta* ejercen diversas funciones en la circulación, como transporte de otras sustancias combinándose con ellas, actúan como substratos para formar otras sustancias, y transportan proteína de una a otra parte del cuerpo. Las globulinas *gamma*, y en menor grado las globulinas *beta*, desempeñan papel principal protegiendo el cuerpo contra la infección, pues estas globulinas son las que constituyen principalmente los anticuerpos que resisten a infección e intoxicación, proporcionando al cuerpo lo que llamamos inmunidad. El fibrinógeno del plasma tiene importancia fundamental para la coagulación de la sangre [23-25].

4.3 DIGESTIÓN ÁCIDA EN HORNO DE MICROONDAS

4.3.1 ANTECEDENTES

El análisis elemental de la mayoría de las matrices orgánicas e inorgánicas requieren de una parcial o total disolución previa de la muestra para su posterior análisis. Solo algunos métodos directos permiten la introducción de la muestra sin ninguna preparación [26,27].

Las muestras biológicas no son completamente solubles en agua y en solventes orgánicos. Así, el análisis de metales involucra la descomposición de la materia orgánica como paso en el tratamiento de la muestra [27].

La preparación de la muestra se puede realizar por una disolución simple, o una disolución con calentamiento para una preconcentración parcial o total. Sin embargo para lograr la preparación de la muestra, es necesario adicionar reactivos a la muestra y aplicar suficiente energía para romper algunas cadenas y estructuras cristalinas de sólidos si es necesario; esto es posible usando reactivos complementarios para obtener a los analitos en solución. Dos procedimientos básicos son normalmente usados para la preparación de una muestra para la posterior determinación de elementos metálicos: descomposición vía seca (horno) y vía húmeda (digestión ácida) [26,34].

En 1860 G.L. Carius introdujo el concepto de disolución de muestras en vasos cerrados, descubriendo la oxidación con Ácido Nítrico en un vaso de vidrio grueso sellado.

El desarrollo del radar en la Segunda Guerra Mundial estimula el crecimiento de la tecnología de microondas. Las primeras aplicaciones del calentamiento de microondas fueron en alimentos.

En 1940 comenzaron las aplicaciones industriales del calentamiento en microondas. Las aplicaciones industriales de la tecnología de microondas incluye el tratamiento del Carbón con microondas para remover el Azufre orgánico y otros contaminantes potenciales.

En 1975 fue demostrado el uso de la energía de microondas como una fuente de calor en el procedimiento de calcinación. La mayoría de los artículos describen específicamente las aplicaciones usando vasos abiertos o cerrados para la disolución ácida de hueso, tejidos biológicos, aceros, especies geológicas tales como minerales, zirconias, muestras ambientales, y fluidos biológicos.

Varios estudios comparan la técnica con diferentes procedimientos de digestión, y dan ejemplos de la adecuada aplicación a muestras biológicas de esta exitosa técnica para su posterior uso en espectrofotometría de absorción y emisión atómica [28].

4.3.2 CONCEPTOS TEORICOS DE MICROONDAS

Los procedimientos convencionales de digestión ácida utilizando vasos abiertos en una campana de gases involucra el calentamiento de una muestra en ácido generando una atmósfera de vapores ácidos, por periodos prolongados de tiempo haciendo que sea una operación muy tediosa, con un alto riesgo de contaminación mayor. En general ácidos minerales, tales como HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄, a temperaturas y presiones elevadas digieren más rápidamente la muestra reduciendo significativamente el tiempo necesario para la preparación. La digestión realizada en vaso cerrado y calentada con microondas es usada en este trabajo ya que destruye la matriz orgánica de las muestras biológicas (plasma y leche). El sistema controla uniformemente la aplicación del poder de la microonda y monitoreando la temperatura y presión permite que las condiciones sean reproducibles y no excedan los límites del vaso cerrado. La interacción de la radiación de microondas con la muestra y reactivos

causa en ambos migración iónica y rotación dipolar, resultando un rápido calentamiento de la muestra con la descomposición consecuente [26,28,34].

Una microonda (Figura 4.1) es una forma de energía electromagnética. Su energía tiene por componentes un campo eléctrico y un campo magnético. Estos dos componentes tienen la misma longitud de onda y frecuencia, como en consecuencia la misma velocidad; pero viajan en planos mutuamente perpendiculares; aunque solo el campo eléctrico transfiere energía para el calentamiento de la sustancia. La interacción del campo magnético es insignificante [28-31].

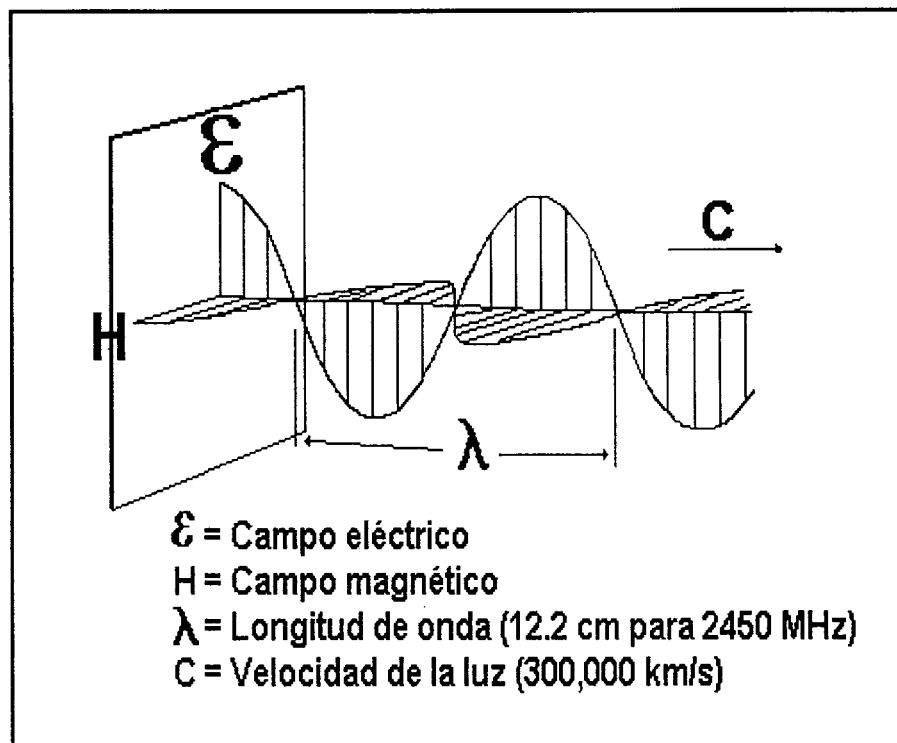


Figura 4.1 Esquema de una Microonda [29].

La energía de microonda es una radiación no ionizada que causa un movimiento molecular por la migración de iones y la rotación de dipolos; la energía en los fotones de microondas (0.03 kcal/mol) es muy baja concerniente a las energías típicas de 80-120 kcal/mol. Así las microondas no afectarían directamente la estructura molecular [28,29].

La energía de microondas tiene un intervalo de frecuencia de 300–300,000 MHz (Figura 4.2). Cuatro frecuencias son usadas para el calentamiento y secado en microondas: 915 ± 25 , 2450 ± 13 , 5800 ± 75 y $22,125 \pm 125$ MHz por industrias, científicos y médicos. De estas frecuencias, 2450 MHz es la más comúnmente usada, y es la frecuencia usada en todas las unidades de microondas de casa. La energía típica producida en un sistema de microonda es de 600–700 W. Así en 5 min. aproximadamente, suministra 43,000 cal a la cavidad del microondas para el calentamiento de la muestra [28].

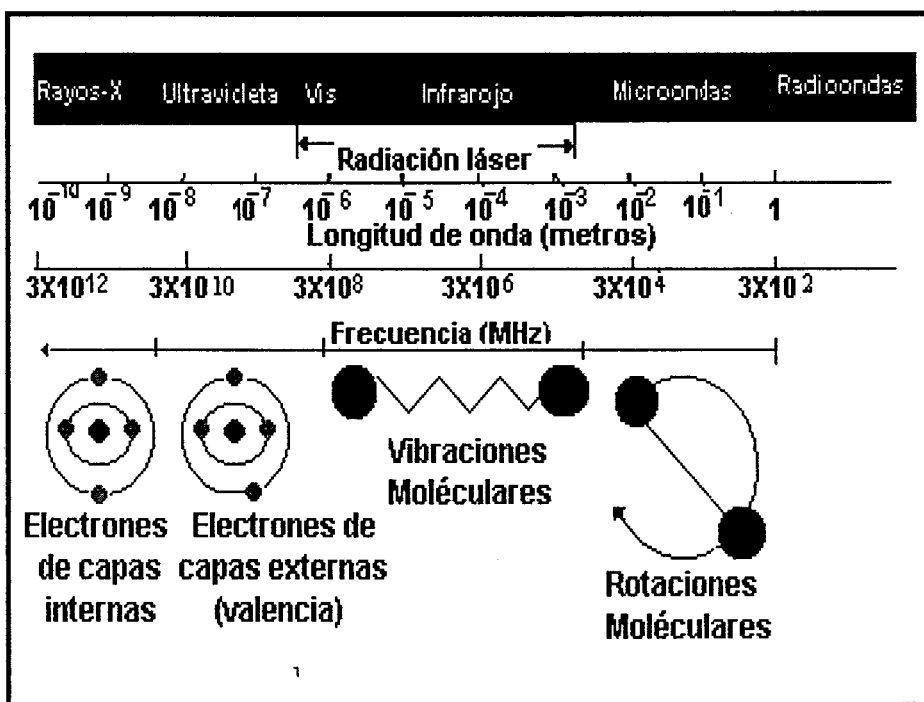


Figura 4.2 Espectro Electromagnético [29].

Perdida Dieléctrica.

El modelo de calentamiento de una muestra que es calentada con energía de microondas depende, del factor de disipación de la muestra denominado $\tan \delta$. El factor de disipación es un intervalo de pérdida dieléctrica de la muestra o factor de pérdida (ϵ'') y la constante dieléctrica (ϵ')

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

La constante dieléctrica es una medida de la capacidad de la muestra para obstruir la energía de microondas que pasa por ella, la medida del factor de la muestra es la capacidad que tiene para disipar esta energía. La palabra “perdida” es usada para indicar la cantidad de energía de microondas de entrada que es perdida al ser dispersada como calor en la muestra [28].

Calentamiento con microondas.

Tradicionalmente, la síntesis química se ha alcanzado con el calentamiento conductor con un calor externo de superficie, donde se eleva la temperatura y el calor se conduce en la sustancia, pasando primero por la pared del vaso para alcanzar los solventes y reactivos. Esto es un método lento e ineficaz para transferir energía dentro del sistema, por que depende de la conductividad térmica de los materiales que deben ser penetrados. También da lugar a una temperatura externa más alta que la temperatura interna final, que es problemática pues la temperatura interna requerida puede ser alcanzada solamente aumentando suficientemente la temperatura superficial del excedente del material a la temperatura deseada.

El calentamiento con microondas (Figura 4.3) es muy diferente: las microondas se juntan directamente con las moléculas que están calentando y hay una subida rápida de la temperatura, el resultado es un calentamiento instantáneo de cualquier cosa que reaccione a la rotación dipolar o a la conducción iónica, los dos mecanismos fundamentales para la energía de transferencia de microondas a la sustancia que es calentada [29].

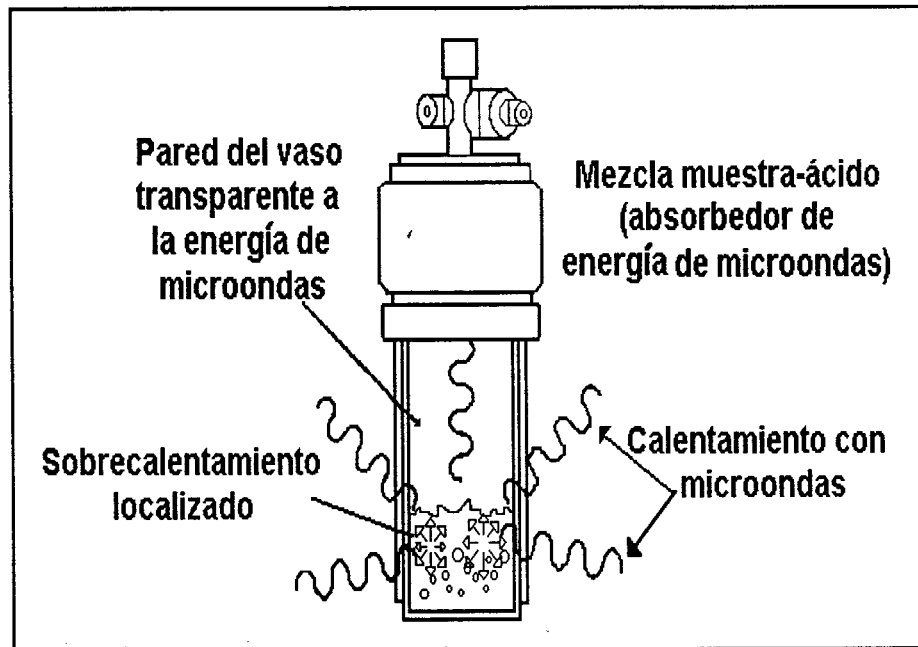


Figura 4.3 Esquema del calentamiento con microondas [30].

Rotación Dipolar

La rotación dipolar (Figura 4.4 A, B, C) se refiere a una interacción en la cual las moléculas se alinean con el campo eléctrico en la muestra que tiene momentos dipolares permanentes o inducidos rápidamente. El movimiento de la molécula orienta al campo y da lugar a una transferencia de energía. La habilidad de acoplamiento de este mecanismo es relacionado con la polaridad de las moléculas y con la habilidad que tengan para alinearse al campo y relajarse a su estado inicial.

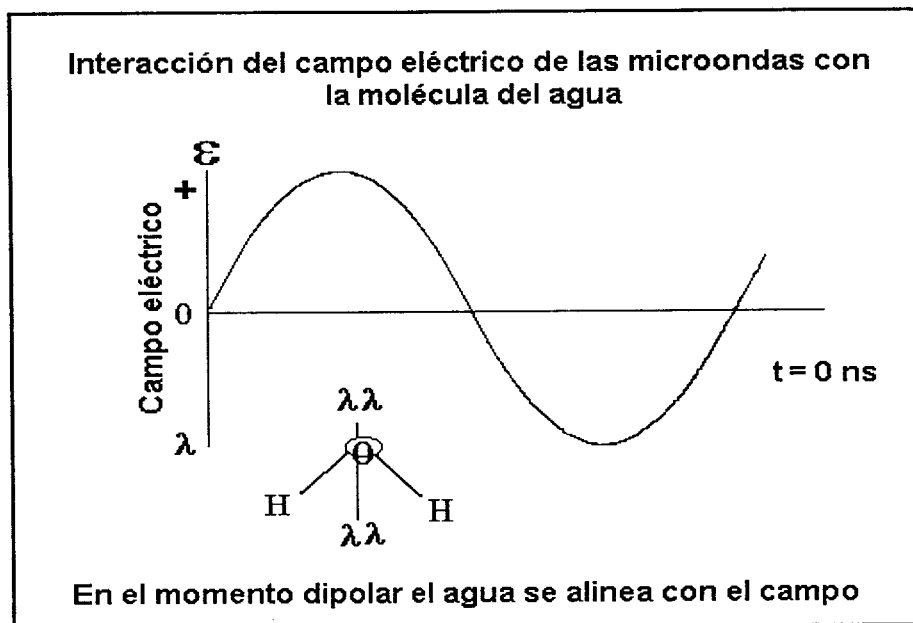


Figura 4.4 A Esquema de la Rotación Dipolar [30].

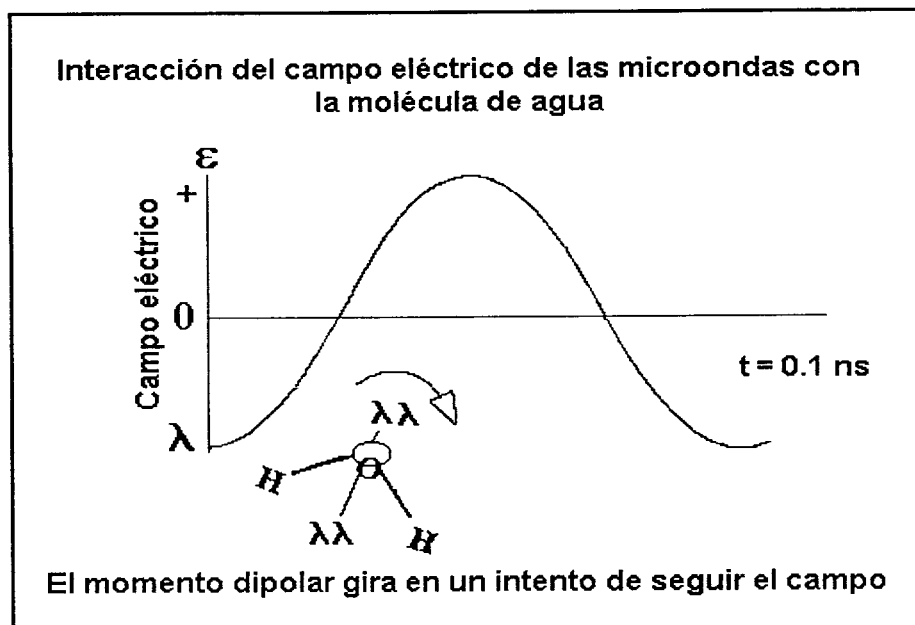


Figura 4.4 B Esquema de la Rotación Dipolar [30].

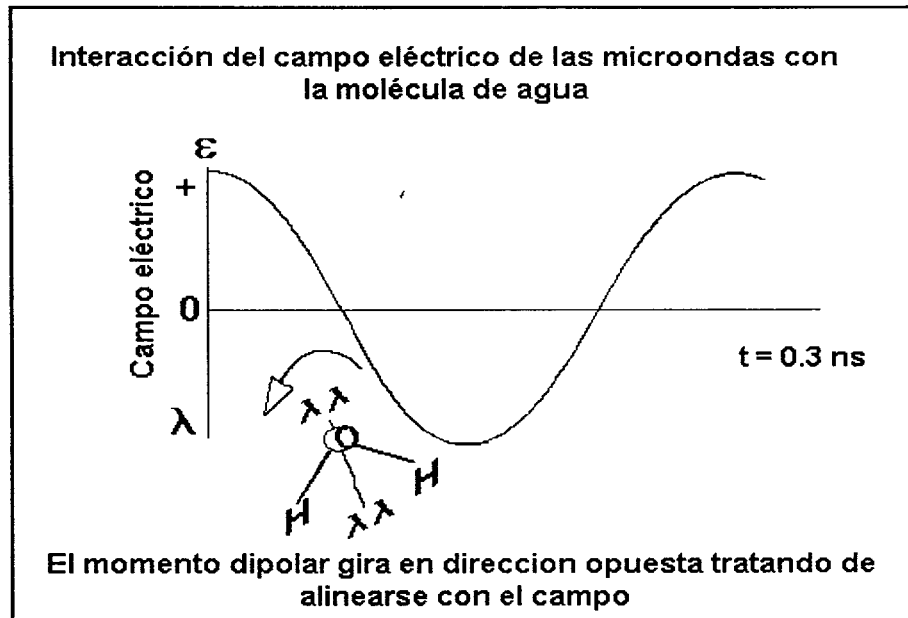


Figura 4.4 C Esquema de la Rotación Dipolar [30].

Conducción Iónica

La conducción iónica es un conductor de migración de iones disueltos en un campo electromagnético aplicado. Esta migración iónica es una corriente de flujo que resulta de la pérdida de la producción de calor debido a la resistencia del flujo del ión [28,29].

4.3.3 COMPONENTES DE UN SISTEMA DE MICROONDAS

El típico instrumento de microondas (Figura 4.5) usado para el calentamiento de muestras analíticas consta de:

- ✧ Magnetron
- ✧ Guía de onda
- ✧ Cavity
- ✧ Agitador
- ✧ Extractor
- ✧ Carrusel
- ✧ Atenuador o Aislador
- ✧ Control del ciclo de trabajo

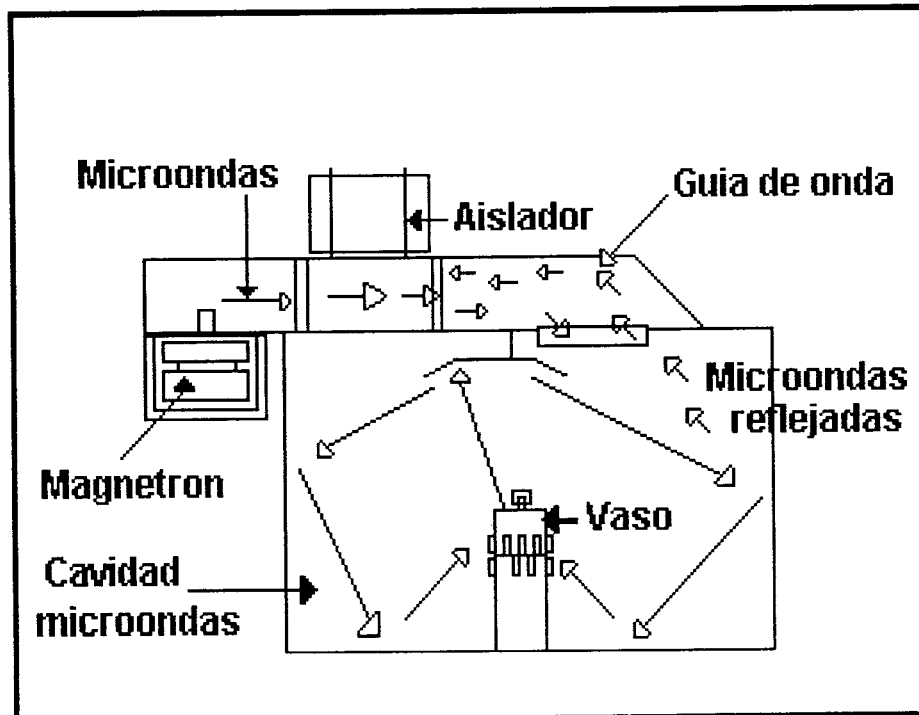


Figura 4.5 Esquema del Horno de Microondas [30].

☺ El **magnetron** es la fuente, constituido por un diodo cilíndrico con un ánodo y cátodo. Sobrepuesto en el diodo está el campo magnético que es alineado con el cátodo. Un anillo de cavidades resonantes mutuamente acopladas están en el ánodo, el cual posee energía de varios miles de volts es alcanzado por diodo, los electrones son alcanzados, bajo la influencia del campo magnético, resuena, y oscila el magnetron (Figura 4.6) las oscilaciones son diseñadas para alcanzar la energía de microondas a una frecuencia de 2450 ± 13 MHz. El magnetron recibe aproximadamente 1200 W de la línea de poder eléctrica que es convertida a 600 W de energía electromagnética. La energía restante es convertida en calor que es disipada por un flujo de aire frío.

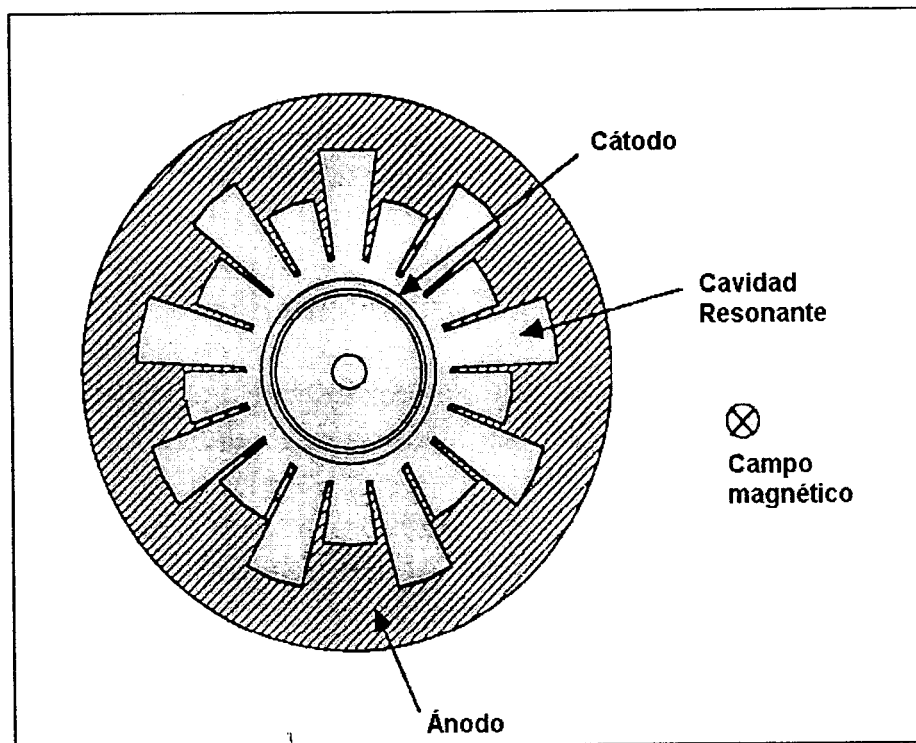


Figura 4.6 Esquema del magnetron [28].

- ☺ La **guía de onda** sirve para guiar a la cavidad central del horno de microondas las ondas generadas por el magnetrón; esta guía es construida por materiales reflexivos.
- ☺ La **cavidad** (Figura 4.7) es el espacio donde entran las microondas y son reflejadas repetidamente de pared a pared.
- ☺ El **agitador** ayuda a distribuir la energía que entra por la guía de onda para que el calentamiento de la muestra sea más independiente de la posición.
- ☺ El **extractor** es el dispositivo de remoción de los vapores de la cavidad.
- ☺ El **carrusel** es el dispositivo que se usa para colocar los vasos durante la digestión, y gira, lo que hace que sea homogénea la energía de microondas para todos los vasos.
- ☺ El **atenuador** es el que protege al magnetrón de las microondas que no son absorbidas.
- ☺ El **control del ciclo de trabajo** (Figura 4.7) es la pantalla donde se registran las condiciones de trabajo [28,30].

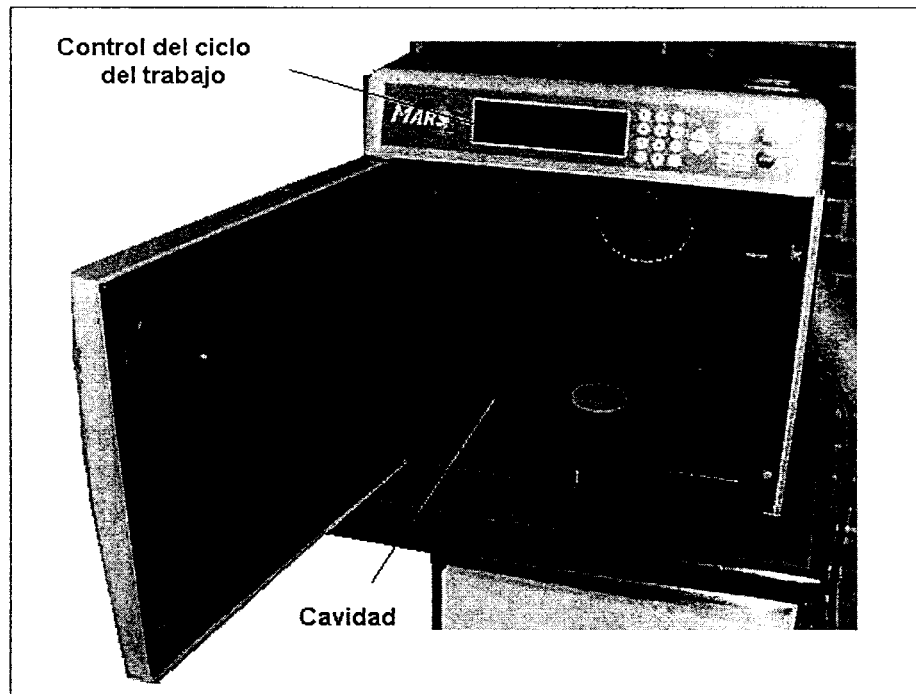


Figura 4.7 Cavidad y Control del ciclo del trabajo del Horno de Microondas [30].

4.3.4 VENTAJAS DE LA DIGESTIÓN ÁCIDA EN HORNO DE MICROONDAS

Las ventajas de la digestión ácida son:

- ✦ Menor cantidad de muestra
- ✦ Menor consumo de reactivos
- ✦ Mínima contaminación
- ✦ Reducción de tiempo
- ✦ Mínima generación de residuos

4.4 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

4.4.1 GENERALIDADES

La espectrofotometría de absorción atómica debido a su alta sensibilidad y a la facilidad con la cual muchas muestras pueden analizarse, ha llegado a ser una de las principales herramientas de la química analítica. Permite determinar uno o varios elementos de un total de aproximadamente 70 (metales y no metales). Las aplicaciones son muy numerosas considerando que es común determinar concentraciones del analito en niveles de $\mu\text{g/mL}$ (ppm), y para ciertos elementos, pueden determinarse concentraciones de $\mu\text{g/L}$ (ppb) [34-36].

Las técnicas espectroscópicas de análisis se basan en la excitación del analito a un estado de energía superior mediante la absorción de energía de una muestra que se coloca en el haz de luz [32,33,37].

Las muestras para su análisis se tienen que descomponer en átomos en fase gaseosa a muy altas temperaturas, y las concentraciones de átomos seleccionados se determinan midiendo la absorción. El equipo utilizado para medir la absorbancia de los átomos libres se conoce como espectro de absorción atómica, el cual consta de las partes ilustradas en la Figura 4.8 [33,36,37].

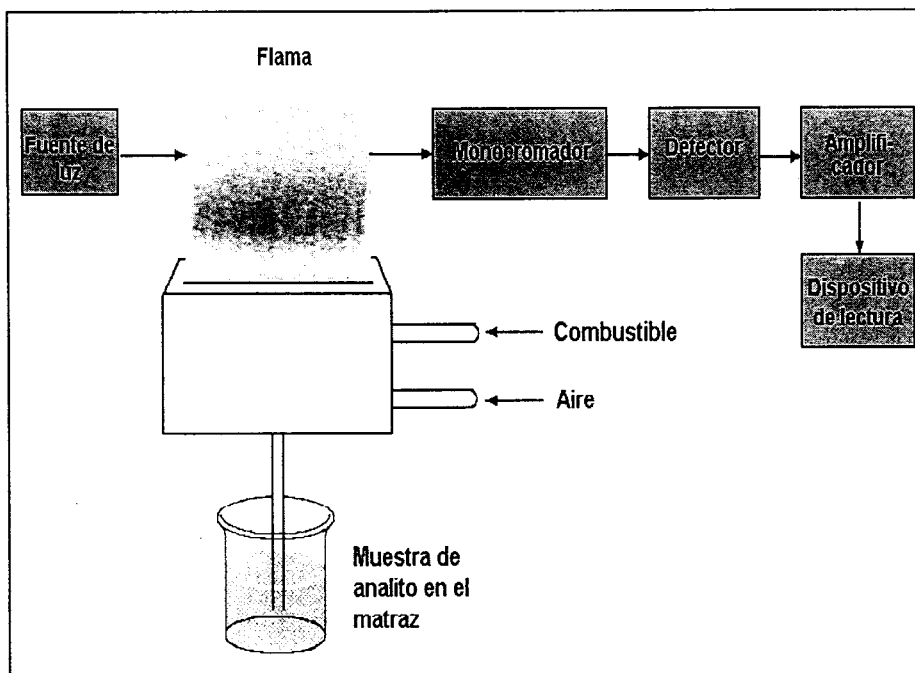


Figura 4.8 Partes básicas de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica [36].

Los átomos absorben luz en bandas de longitudes de onda, tan estrechas que se denominan de “línea”. Debido a que las bandas de absorción son tan estrechas, que la fuente luminosa debe dar también bandas muy estrechas, ya que si diera bandas amplias o radiación continua, la mayor parte de la luz pasaría por la flama sin ser absorbida. Por las razones anteriores, el equipo de absorción atómica utiliza **lámparas de cátodo hueco** (Figura 4.9); el cátodo hueco (constituido por elementos puros) y el filamento anódico (es de Zirconio o de Wolframio) va montado uno junto al otro en el interior del tubo en cuyo extremo terminal está soldada una ventana de vidrio Pirex o de sílice, según las longitudes de onda emitidas por el cátodo. El tubo está lleno de Argón o de Neón a presión reducida.

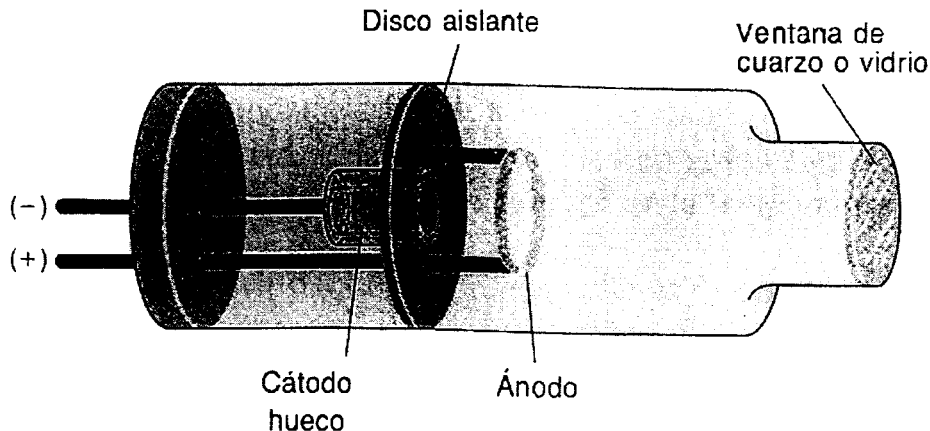


Figura 4.9 Lámpara de cátodo hueco [36].

Cuando se aplica una tensión de 300 volts entre los electrodos, los electrones provocan ionización del gas inerte. Estos iones (Ar^+ o Ne^+), arrancan átomos del cátodo y los convierte en iones positivos que adquieren bastante energía cinética y chocan contra la superficie metálica del mismo, dando lugar a la vaporización de algo de metal. Los átomos de éste en el estado de vapor son excitados, esto es, sus electrones son promovidos desde sus orbitales normales a otros orbitales de mayor energía emitiendo un haz de luz con las longitudes de onda específicas del elemento. Las lámparas de cátodo hueco son específicas para cada elemento, requieren de poco mantenimiento, son estables, simples, durables y relativamente económicas.

4.4.2 SISTEMAS DE ATOMIZACIÓN

La característica esencial que diferencia la espectrofotometría atómica de la espectrofotometría ordinaria es que la muestra debe atomizarse. Los dispositivos de atomización son:

Atomización por Flama: El quemador, un conjunto mecánico robusto para resistir a posibles explosiones de gas; se alimenta comúnmente por una mezcla de acetileno en aire. Se obtiene

una llama cuya base se inscribe en un rectángulo de 10 cm de longitud y 1 mm de anchura, alineado en su mayor dimensión con el eje óptico del equipo. La corriente de aire o de otro gas soporte que se dirige hacia la llama aspira la solución de la muestra por un fino tubo capilar, produciendo su nebulización (formación de gotitas finas); a continuación se mezcla con el combustible y la mezcla es conducida conjuntamente a la llama, las gotitas finas se evaporan y luego se disocian en átomos. Los átomos libres absorben la luz emitida por la lámpara de cátodo hueco.

Atomización por Horno de Grafito: Tiene una mayor sensibilidad de la que es posible con los métodos de flama, y requieren un menor volumen de muestra, se inyecta entre 1 μ L y 100 μ L de muestra. En cada extremo del horno se encuentra una ventana transparente para el haz de luz. La temperatura máxima para el horno de grafito es de unos 3000 °C. En éste sistema la solución del analito es atomizada de una sola vez en un tubo de grafito, donde se seca y luego se calcina por el incremento de la temperatura permitiendo eliminar, tanto como sea posible, el material de la matriz sin pérdida del analito. La posterior vaporización de los residuos provenientes del periodo de calcinado genera átomos libres, los cuales permanecen en el paso óptico por un periodo de tiempo menor al de flama [32-36,38].

Vaporización Química: Este sistema es extremadamente sensible para determinar elementos formadores de hidruros estables, tales como Arsénico, Antimonio, Bismuto, Estaño, Telurio y Selenio.

A continuación se describe detalladamente este sistema ya que es el utilizado en este trabajo.

Los generadores de flujo continuo (Figura 4.10) son instrumentos que cuentan con un sistema de mangueras y un separador gas/líquido, a través de los cuales son proporcionados en forma continua reactivos y gas de arrastre, obteniéndose así una producción constante de vapor atómico o hidruros a través del haz de luz.

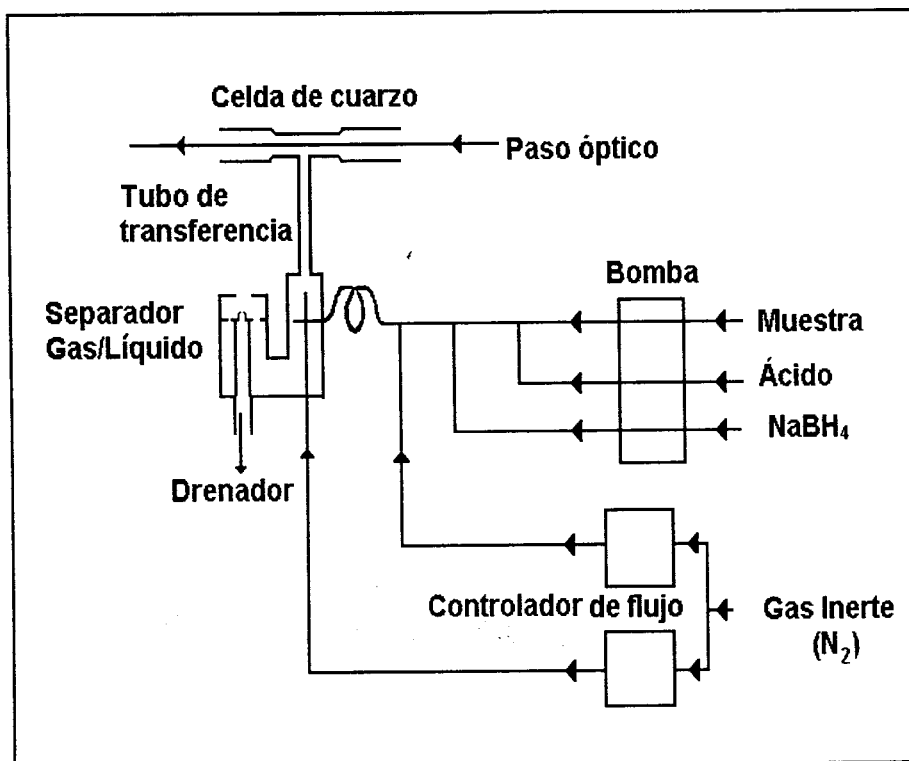


Figura 4.10 Esquema del Generador de Hidruros [39].

En este sistema, la señal de absorbancia es obtenida en forma sostenida y puede ser interpretada por integración en periodos previamente establecidos.

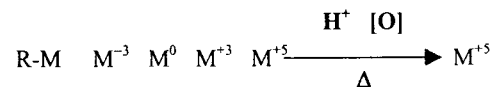
El flujo de los reactivos (ácido, reductor y muestra) son establecidos mediante una bomba peristáltica y el gas de arrastre (N_2 o Ar) es fijado por el instrumento. Una vez tomados los reactivos, se mezclan en el serpentín de reacción donde el vapor o los hidruros son generados en forma gaseosa. Posteriormente son llevados hacia el separador gas/líquido donde la fase líquida es drenada y el gas es arrastrado hacia la celda de cuarzo.

La técnica de generación de hidruros se basa en la reacción de formación de hidruros mediante uniones covalentes entre el analito y el ion hidronio (H^+) en medio ácido y posteriormente la disociación al estado elemental por efecto de la temperatura.

Para la formación de hidruros es de vital importancia el estado de oxidación del analito, ya que cada uno tiene un estado de oxidación óptimo para la formación de su hidruro correspondiente. Por tal motivo se requiere de una apropiada preparación de la muestra y atención a la reacción química.

La preparación de la muestra consiste de una oxidación total del elemento a su máximo estado de oxidación con posterior reducción a su estado de oxidación óptimo, asegurando así el éxito de la formación de los hidruros.

El objetivo de la oxidación es llevar el analito a su máximo estado de oxidación a partir de cualquier estado en que se encuentre en la muestra para su posterior reducción al estado óptimo. La oxidación generalmente se lleva a cabo mediante una digestión utilizando ácidos fuertemente oxidantes.

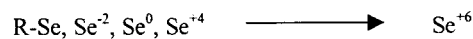


Donde: M = As, Bi, Sb, Se, Sn, o Te

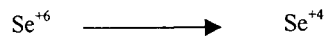
La reducción es esencial ya que mediante ésta el analito es llevado de su máximo estado de oxidación a su estado óptimo de oxidación para la formación de los hidruros. La reducción se lleva a cabo por la acción de un agente reductor y/o el pH del medio de reacción.

Para el Selenio se tiene:

1. Oxidación



2. Reducción en HCl 6–7M

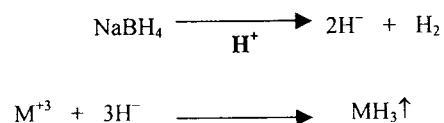


Una vez el analito (Selenio) está en su estado óptimo de oxidación, es llevado al sistema generador donde se llevará a cabo la reacción de formación de hidruros.

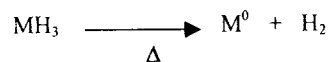
Los agentes que han sido utilizados para llevar a cabo la formación de los hidruros son:

- I. Borohidruro de sodio (NaBH₄)
- II. Zinc / ácido
- III. Magnesio-Zinc / ácido
- IV. Cloruro de Titanio III / HCl

El reactivo comúnmente utilizado es el borohidruro de sodio con el cual son analizados As, Bi, Sb, Se, Sn y Te en niveles de concentración de partes por billón (ppb). El medio de reacción debe ser ácido para que la reacción sea completa:



Una vez formados los hidruros, extremadamente volátiles a temperatura ambiente, son arrastrados por un flujo de gas hacia el haz de luz del instrumento el cual pasa a través de la celda de cuarzo, la celda es calentada para disociar los hidruros, obteniendo así al metal libre y en estado basal.



El calentamiento de la celda puede realizarse de dos formas:

- ◇ Calentamiento con flama
- ◇ Calentamiento eléctrico

La forma más común de calentamiento es mediante una flama aire/acetileno, aunque el uso de un controlador eléctrico de la temperatura para la celda, mejora significativamente la sensibilidad y precisión de los resultados [39]. Para las condiciones de análisis para el generador de hidruros véase el Anexo I.

4.5 VALIDACIÓN

4.5.1 GENERALIDADES DE VALIDACIÓN

Una de las características más importantes de toda empresa es la calidad de sus productos, ya que de ésta dependerán tanto el prestigio como el desarrollo económico y el crecimiento de la misma. Atendiendo a esta necesidad se han venido formulando diferentes programas y parámetros por varias instituciones para lograr el aseguramiento de la calidad de los distintos productos.

Entre los instrumentos regulatorios más importantes se tiene en el ámbito nacional la Secretaría de Salud (SSA); en el ámbito internacional la Food and Drug Administration (FDA), ISO 9000, las Good Manufacturing Procedures (GMP's), Good Laboratory Procedures (GLP's) e International Cooperation on Harmonisation (ICH) [40,41].

Así pues una de las herramientas con las que cuentan para asegurar la calidad de los productos y procedimientos es la validación de los mismos, por lo cual la industria centra sus esfuerzos en la validación de métodos analíticos. Para el desarrollo de un nuevo producto es necesario la utilización de métodos analíticos que permitan cuantificar el analito de interés con un alto grado de confiabilidad y seguridad [40,42,43].

Por este motivo es necesario el uso de la estadística puesto que la necesidad de tecnificar el proceso de validación exige el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios con criterio que llevan a una correcta evaluación. Existen varias definiciones de validación de un método analítico, a continuación se mencionarán algunas que explican el contexto de validación:

- De acuerdo a la USP, es el proceso que proporciona la evidencia documentada que el método cumple para el propósito que fue hecho [44].
- Es el proceso que permite demostrar si los resultados producidos por el mismo son fiables, reproducibles y si el método es utilizable para la aplicación pretendida [45].

- Es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto [41].
- Evaluación sistemática de un procedimiento analítico, mediante el cual se documentan pruebas de que el método de análisis cumple con un propósito [40].
- Proceso que establece por medio de estudios de laboratorio que las características de funcionamiento y de comportamiento de un procedimiento cumplen los requisitos, siendo adecuadas para la aplicación analítica [41].
- Procedimiento mediante el cual se prueba la exactitud y confianza de un método analítico y se demuestra que se puede aplicar en un laboratorio [45].

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Todas las operaciones de un procedimiento de medida suponen introducir errores aleatorios y pueden también sistemáticos, debido a defectos en la instrumentación, defectos en el operador y defectos en el método de análisis.

Por ello es necesario llevar a cabo la comprobación de que el resultado final obtenido representa el contenido real del analito en las muestras, es decir, es necesario validar el método.

Un método de análisis debe validarse en los siguientes casos:

- Aun siendo un método normalizado, debe verificarse que reúne las características descritas, al aplicarlo en el laboratorio. Es lo que se denomina validación *in house*.
- Si se ha desarrollado en el laboratorio completamente o parcialmente, es decir, es un método propio.
- Si aun siendo un método estándar u oficial, se aplica a una muestra o analito(s) diferentes para los que ha sido establecido.
- Si siendo un método oficial, se ha modificado alguna etapa para adaptarlo a un problema analítico diferente o a una nueva situación, como puede ser su automatización.

— Si mediante algún procedimiento de control interno se detecta que se ha producido una situación fuera de control.

La validación se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer. Todos los métodos de análisis, aunque validados, deben someterse temporalmente a sistemas de control que permitan al químico estudiar la evolución de la propiedad medida en función del tiempo. De esta forma, se podrá detectar rápidamente la presencia de errores y se pondrán aplicar medidas correctoras en el caso que sea necesario revalidar el método [45].

4.5.2 DETERMINACIONES Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

La capacidad se expresa en estos casos en términos de parámetros analíticos, que son los siguientes: Linealidad (del sistema y método), Exactitud, Precisión, Repetibilidad, Reproducibilidad (ver Anexo II).

4.5.2.1 Linealidad del sistema: Se debe de preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes (cuando no sea posible prepararlas por dilución). Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs respuesta analítica. Calcular la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (ICm)

Criterio: $r^2 \geq 0.98$

ICm no debe incluir al cero

4.5.2.2 Precisión del sistema: Se debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada, o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

Criterio: C.V. \leq 1.5% para métodos físico – químicos.
C.V. \leq 3% para métodos biológicos.

4.5.2.3 *Linealidad del método*: Se adiciona cantidades conocidas del analito de interés a la matriz biológica. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito. Preparar la muestra adicionada al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de la muestra en los tres niveles.

Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito. Reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

Criterio : $r^2 \geq 0.98$

El ICm debe incluir la unidad

El ICb debe incluir al cero

El C.V._{y/x} del porcentaje de recobro

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,

no mayor de 5% si es biológico

4.5.2.4 *Exactitud y repetibilidad del método*: Se debe preparar por lo menos seis muestras adicionadas del analito con concentraciones conocidas. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Criterio: El CV del porcentaje de recobro:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,

no mayor de 5% si es biológico

4.5.2.5. *Precisión y reproducibilidad del método:* Se analiza por triplicado una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad del método, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos. Calcular la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

Criterio: $CV \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.
 $CV \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos.
 $CV \leq 5\%$ para métodos biológicos.

Los resultados pueden ser analizados, utilizando métodos estadísticos apropiados, que permitan sustentar que el método es reproducible, utilizando un modelo considerando como factores al analista y al día anidado en el analista o considerando al analista como un factor jerárquico respecto al día [1,5].

Cabe mencionar que se realizó la prueba estadística de Durbin-Watson (DW) para los residuales, tanto para la linealidad del sistema como para los métodos de leche y plasma esta prueba ayuda a determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que ocurren. Si DW es mayor que 1.4 y P-Valor es mayor que 0.05 entonces no hay indicación de una autocorrelación en serie de los residuales.



PARTE EXPERIMENTAL

5.1 REACTIVOS, MUESTRAS BIOLÓGICAS Y ESTÁNDARES

- ✓ Ácido Nítrico R.A. 65% de pureza Técnica Química de México.
- ✓ Ácido Clorhídrico R.A. 36.5–38% de pureza J.T. Baker de México.
- ✓ Peroxido de Hidrógeno en solución al 30% J.T. Baker de México.
- ✓ Estándar de Selenio High-Purity 1000±3 µg/mL en 2% de Ácido Nítrico con 99.999% de pureza .
- ✓ Material de Referencia Certificado Milk Powder High-Purity.
- ✓ Plasma de vaca Holsteing no tratada.
- ✓ Hidróxido de Sodio perlas 98.4% bajo en carbonatos J.T. Baker de México.
- ✓ Borohidruro de Sodio 99% de pureza Aldrich Alemania.
- ✓ Agua desionizada 18.2 Ωcm.

5.2 MATERIAL

- ✓ Vasos de Teflón para Horno de Microondas HP-500 Plus CEM Temperatura máxima 210 °C y presión máxima 350 psi (Falcon USA).
- ✓ Tapas de Teflón para los vasos HP-500 Plus CEM (Falcon USA).
- ✓ Disco para los vasos HP-500 Plus CEM (Falcon USA).
- ✓ Membranas de seguridad para los vasos HP-500 Plus CEM 140 piezas. (Falcon USA).
- ✓ Tapones de Teflón de seguridad colores azul y blanco para los vasos HP-500 Plus CEM (Falcon USA).
- ✓ Thermowell de Zafiro para el sensor de temperatura (Falcon USA).
- ✓ Sensor de temperatura de fibra óptica CEM modelo RTP-300 Plus rango -40 a 250 °C (Falcon USA).
- ✓ Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 1–5 mL.
- ✓ Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 100–1000 µL.
- ✓ Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 20–200 µL.
- ✓ Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 5–50 µL.
- ✓ Matraz volumétrico de 1000 mL BLAU BRAND Alemania.

- ✓ Matraz volumétrico de 100 mL Kimax de México, tipo "A".
- ✓ Matraz volumétrico de 50 mL Kimax de México, tipo "A".
- ✓ Matraz volumétrico de 25 mL Kimax de México, tipo "A".
- ✓ Matraz volumétrico de 10 mL Pyrex de México, tipo "A".
- ✓ Vasos de precipitados de 150 mL Kimax de México.
- ✓ Vasos de precipitados de 50 mL Kimax de México.
- ✓ Probeta de 1000 mL IVA Argentina vidrio borosilicato.
- ✓ Probeta de 10 mL Kimax de México.
- ✓ Lámpara de cátodo hueco de Selenio HC Lamp-Se (Varian Australia).
- ✓ Celda de cuarzo VGA-76 (Varian Australia).
- ✓ Tubos de bomba morado / negro VGA (Varian Australia).
- ✓ Tubos de bomba negro / negro VGA (Varian Australia).

5.3 EQUIPOS Y GASES

- ✓ Balanza Analítica BOECO Máx. 120g Min. 0.01g Alemania.
- ✓ Horno de Microondas MARS5 CEM Corporation (Falcon USA).
- ✓ Espectrofotómetro de Absorción Atómica SpectrAA-800 (Varian Australia).
- ✓ Generador de Hidruros modelo VGA-77 (Varian Australia).
- ✓ Acetileno 99.5% de pureza AGA de México.
- ✓ Nitrógeno 99.995% de pureza AGA de México.
- ✓ Aire Comprimido.

5.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS (DIGESTIÓN ÁCIDA EN HORNO DE MICROONDAS)

La etapa de desarrollo de los métodos comprende la revisión bibliográfica de la referencia [11] en la que se establecen las preparaciones y condiciones adecuadas para las digestiones ácidas de leche y plasma en la cuantificación del Selenio por Espectrometría de Absorción Atómica con el sistema de atomización de Generador de Hidruros. De acuerdo a estos antecedentes se validaron dichos métodos.

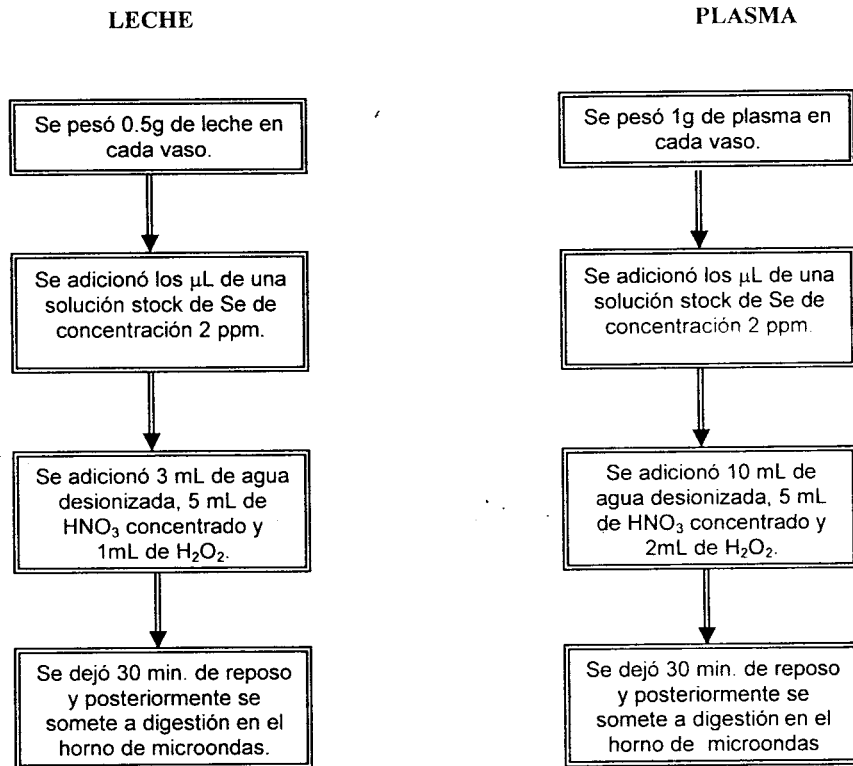
Se prepararon los sistemas para la evaluación de los parámetros analíticos de linealidad del sistema y precisión de la siguiente forma:

- a) Linealidad del sistema: Se trabajó en el intervalo lineal de concentraciones 5, 10, 15, 20, 25 ppb ($\mu\text{g/L}$) de un estándar de Se propuestos en la referencia [11], cada nivel por triplicado.
- b) Precisión del sistema: Se preparó un sextuplicado de soluciones a una concentración del intervalo de linealidad.

Para la determinación de los parámetros analíticos del método de Leche se utilizó el material de referencia certificado de leche y usándose plasma de vaca Holsteing sin tratar en el método de Plasma evaluándose para los dos métodos:

- a) Linealidad del método: Se prepararon tres muestras adicionando un estándar de referencia de Selenio a las muestras de leche y plasma en concentraciones inferior, media y superior del intervalo de linealidad cada concentración por triplicado aplicando el procedimiento y método a validar.
- b) Exactitud y Repetibilidad: Se preparó un sextuplicado de muestras de leche y plasma, adicionando un estándar de Selenio de concentración conocida, en el intervalo lineal, manteniendo constante la cantidad de muestra.
- c) Precisión y Reproducibilidad: Se prepara por triplicado una muestra de leche y plasma homogéneas adicionando un estándar de referencia de Selenio de concentración conocida, en el intervalo lineal manteniendo constante la cantidad de la muestra, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes.

Procedimientos a validar de cada método denominados por los nombres de las muestras:



5.5 CONDICIONES DE LOS MÉTODOS

Método: Leche

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

Método : Plasma

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

Al terminar la digestión en el horno de microondas para los dos métodos se:

- Dejan enfriar a temperatura ambiente.
- El contenido de los vasos de teflón se colocan en matraces volumétricos de 50 mL (enjuagándose 3 veces cada vaso con HCl 7M) y llevando a la marca de aforo con HCl 7M.
- Por último las muestras se trasvasan en frascos de polietileno previamente etiquetados para su posterior análisis

5.6 MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA

Para la medición se utilizó el Espectrofotómetro de Absorción Atómica con el sistema de atomización Generador de hidruros.

Pasos:

1. Abrir los tanques de gas a utilizar verificando que la presión de los gases sea la adecuada para el equipo, luego se abren las llaves de paso.
2. Encender el equipo y la computadora, una vez que se ingresa al programa SpectrAA se edita el método, indicando el sistema de atomización, el elemento a determinar en este caso el Selenio, así como el número de muestras que se van a leer.
3. Alinear el quemador con el paso óptico y se monta el Generador de Hidruros (VGA-77) se conecta la celda de cuarzo al separador de gas-líquido del generador y se coloca la celda sobre el quemador.
4. Optimizar la lámpara de cátodo hueco de Selenio y se calibra a cero el equipo conectando los reactivos en las mangueras correspondientes.
5. Leer la Absorbancia de cada sistema y de las muestras.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Los criterios para la evaluación de los parámetros analíticos de los métodos de digestión ácida para que sean confiables se presentan en la Tabla 6.1 (de acuerdo a los parámetros del Marco Teórico: 4.5.2.1, 4.5.2.2, 4.5.2.3, 4.5.2.4,4.5.2.5)

Tabla 6.1 Parámetros analíticos para la evaluación de los métodos de digestión ácida [1]

PARÁMETRO ANALÍTICO A EVALUAR	CRITERIO DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Linealidad del Sistema	C.V. (coeficiente de variación) r^2 (coeficiente de determinación) r (coeficiente de correlación)	C.V. $\leq 2.00\%$ $r^2 \geq 0.98$ $r \geq 0.99$ $b \approx 0$
Precisión del sistema	C.V.	C.V. $\leq 2.00\%$
Linealidad del Método	C.V. (coeficiente de variación) r^2 (coeficiente de determinación) r (coeficiente de correlación)	C.V. $\leq 5.00\%$ $r^2 \geq 0.98$ $r \geq 0.99$ $m \approx 1$ $b \approx 0$
Exactitud y Repetibilidad	C.V. Prueba de "t de student"	C.V. $\leq 5\%$ $t_{cal} < t_{critica} (\alpha, gl)$ $t_{critica} (0.001,5) = 6.8685$
Precisión y Reproducibilidad	C.V. Modelo factorial jerárquico	C.V. $\leq 5\%$ Analista $F_{cal} < F_{critica} (\alpha, GL\ analista, GL\ error)$ ó P-valor > 0.05 $F_{critica} (0.05,1,8) = 5.3176$ Día $F_{cal} < F_{critica} (\alpha, GL\ día, GL\ error)$ ó P-valor > 0.05 $F_{critica} (0.05,2,8) = 4.4590$

6.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

En la Tabla 6.2 se encuentran los resultados de la propiedad medida para las diferentes concentraciones del intervalo lineal del trabajo para evaluar la linealidad del sistema.

Tabla 6.2 Concentración - Propiedad Medida

SOLUCION	[Se] ppb	ABSORBANCIA	Asb/[ppb]
1	5	0.0857	0.017140
2	5	0.0855	0.017100
3	5	0.0869	0.017380
4	10	0.1748	0.017480
5	10	0.1720	0.017200
6	10	0.1775	0.017750
7	15	0.2524	0.016827
8	15	0.2587	0.017247
9	15	0.2633	0.017553
10	20	0.3483	0.017415
11	20	0.3463	0.017315
12	20	0.3543	0.017715
13	25	0.4376	0.017504
14	25	0.4247	0.016988
15	25	0.4311	0.017244

El análisis estadístico se realizó aplicando el software Statgraphics plus 5.0.

El modelo lineal que describe la relación entre la absorbancia y la concentración es la ecuación obtenida a partir de un análisis de regresión (Tabla 6.3). A continuación se muestra dicha ecuación:

$$\text{Absorbancia} = 0.00042 + 0.0173013 * (\text{Cadic})$$

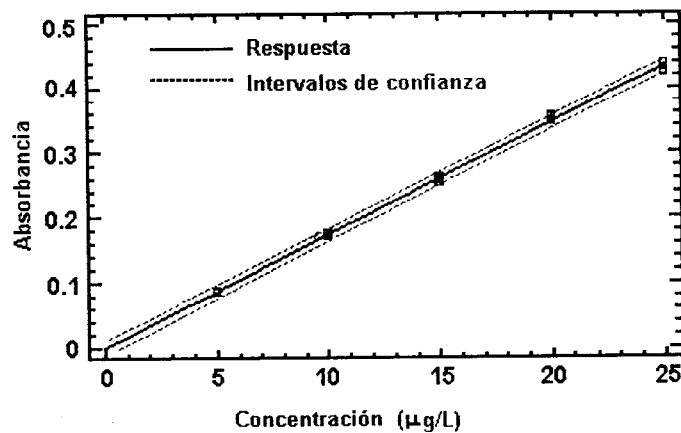


Figura 6.1 Gráfica de regresión lineal del sistema

Tabla 6.3 Parámetros estadísticos de la regresión del sistema

Pendiente (m)	0.0173013
Intercepto (b)	0.00042
Coefficiente de correlación (r)	0.99943
Coefficiente de determinación (r^2)	0.99887
Coefficiente de variación (C.V. %)	1.49

De acuerdo a los datos de regresión observamos que el coeficiente de determinación para el modelo propuesto explica el 99.887% de la variabilidad en la absorbancia por los cambios en la concentración de Selenio. El coeficiente de correlación nos indica una relación fuerte entre las variables. Por otro lado el C.V. está dentro del criterio de aceptación (ver Tabla 6.1).

El valor de DW es de 2.08577 teniendo una $P=0.3172$ por lo que no hay ninguna autocorrelación entre los residuales. Se puede observar dicha relación en el gráfico de residuales (Figura 6.2) cabe mencionar si existiera una tendencia (hipérbola, triángulo) entre los valores experimentales, nos permite detectar rápidamente la presencia de errores. Siendo en la concentración de 25 µg/L donde se presenta una mayor desviación con un residuo de 0.0083 correspondiente a un error relativo de 2.47%

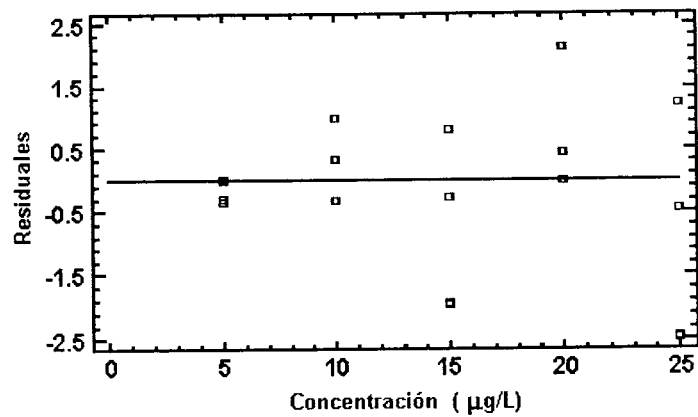


Figura 6.2 Gráfica de residuos del sistema

Con el fin de estudiar el comportamiento de los valores observados con los estimados se graficaron (Figura 6.3) y observamos que estos valores tienden a tener igual comportamiento siendo homogéneos.

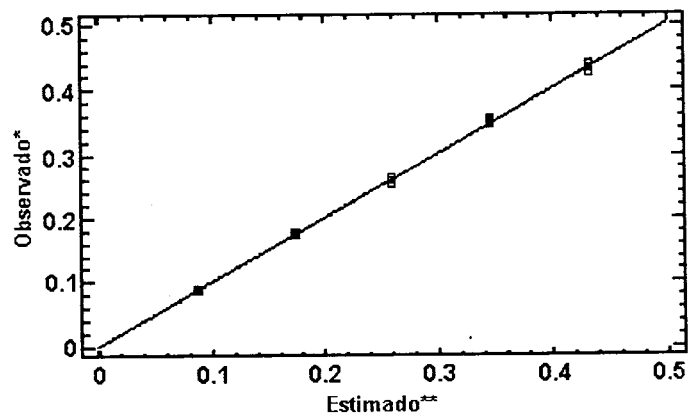


Figura 6.3 Gráfica de Absorbancia del sistema

*Observado: Son los resultados obtenidos experimentalmente.

**Estimado: Son los resultados obtenidos estadísticamente.

Con el objetivo de demostrar que existe una relación entre las variables en estudio se realizó un análisis de variancia se estableció la siguiente hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

Criterio de aceptación
 Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho.
 Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho.

De acuerdo a los resultados del análisis de variancia (Tabla 6.4) y a la hipótesis establecida, se rechaza Ho por lo tanto existe evidencia estadística con un nivel de confianza del 97.5 % que la variación de la propiedad medida es debido a la variación de la concentración.

Tabla 6.4 Análisis de Variancia del sistema

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	0.224502	1	0.224502	11583.54	1.4432E-20
Residuos	0.000251955	13	0.00001938		
Total (Corr.)	0.224754	14			

Así que se prosigue a la prueba del intercepto (b) evaluada para la recta, se establece la hipótesis:

Ho: $b = 0$ La ordenada al origen es cero

Ha: $b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero

Criterio de aceptación
 Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza Ho.
 Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza Ho.

Tabla 6.5 Análisis de regresión – Modelo lineal: $Y = a + b \cdot X$

Parámetro	Estimado	Error Estándar	t_{cal}	$t_{crítica}$	P-Valor	LCI al 97.5%	LCS al 97.5%
Intercepto	0.00042	0.00266579	0.157552	2.5095	0.8772	-0.0063	0.0072
Pendiente	0.0173013	0.000160753	107.627		0.0000	0.0169	0.0177

LCI = Límite de confianza inferior.
 LCS = Límite de confianza superior.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de regresión (Tabla 6.5), H_0 no se rechaza, cabe mencionar que el P-Valor también es un indicativo de que exista una diferencia significativa para la evaluación debe ser mayor que 0.05, por lo tanto la ordenada al origen no es estadísticamente diferente de cero y el intervalo de confianza para la b incluye al cero.

Así que existe una relación lineal altamente significativa entre la concentración y la absorbancia, (ver Anexo V).

6.2.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para evaluar si la propiedad medida del sistema dentro del intervalo de trabajo es precisa se analizó un sextuplicado de soluciones a una concentración de Selenio y se trató estadísticamente. La Tabla 6.6 muestra los datos estadísticos obtenidos a partir de los ensayos realizados.

Tabla 6.6 Parámetros estadísticos de la propiedad medida de la solución de referencia de Selenio

[Se] ppb	15
Promedio de la Absorbancia	0.24936667
s	0.0025129
C.V (%)	1.01

Como podemos observar el coeficiente de variación es menor de 2, por lo tanto el sistema es preciso.

6.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO DE LECHE

Para evaluar la linealidad del método leche se utilizaron, las concentraciones adicionadas y concentraciones recuperadas de Selenio. Mostradas en la Tabla 6.7 con el porcentaje de recobro respectivamente para determinar la linealidad del método de leche.

Tabla 6.7 Concentración Adicionada-Concentración Recuperada- Porcentaje de Recobro

Sistema	[Se] Adic.	[Se] Rec.	% Se recobro
1	16.215	15.20	93.7404
2	16.215	15.30	94.3571
3	16.215	15.23	93.9254
4	26.215	24.53	93.5724
5	26.215	24.57	93.7250
6	26.215	24.61	93.8776
7	36.215	33.80	93.3315
8	36.215	33.85	93.4696
9	36.215	33.90	93.6076

Se determinó el modelo que explica la variación de la concentración recuperada en función de la concentración adicionada por medio del análisis de regresión lineal siendo:

$$[\text{Se}] \text{ Rec} = 0.165756 + 0.930333 * [\text{Se}] \text{ Adic}$$

En la Figura 6.4 podemos observar la relación lineal entre la concentración recuperada vs. concentración adicionada de Selenio, siendo proporcional entre las concentraciones.

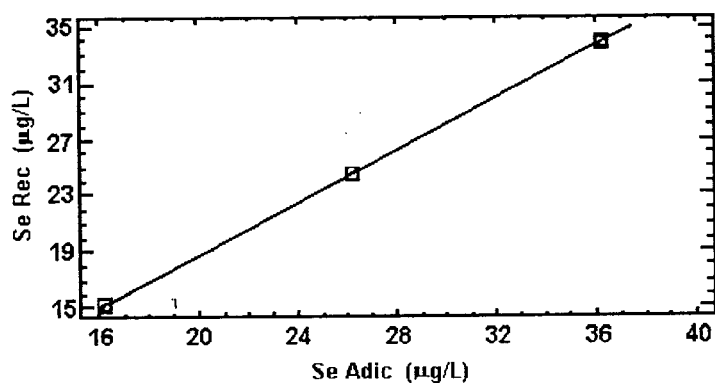


Figura 6.4 Gráfica de regresión para el modelo lineal del método de leche

Para comprobar si existe una relación lineal entre las variables de estudio se establece 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 $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza Ho.
 Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza Ho.

Tabla 6.8 Análisis de Variancia para Selenio Recuperado del método de leche

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	519.3121	1	519.3121	249745.498	3.3923E-17
Residuos	0.014556	7	0.00207937		
Total (Corr.)	519.327	8			

Tabla 6.9 Parámetros estadísticos de la regresión del método de leche

Pendiente (m)	0.9303
Intercepto (b)	0.1658
Coefficiente de correlación (r)	0.999986
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999972
Coefficiente de variación (C.V. %)	0.7163
Intervalo de confianza para b al 97.5%	-0.0131 a 0.3446
Intervalo de confianza para m al 97.5%	0.9238 a 0.9368

En los resultados de análisis de variancia (Tabla 6.8) Ho se rechaza. Así que con un nivel de significancia (α) de 0.025 que la variación de la concentración recuperada está relacionada linealmente con la variación de la concentración adicionada a un 97.5% de nivel de confianza.

De acuerdo al coeficiente de determinación (Tabla 6.9), la regresión explica el 99.9972% de la variación de la concentración recuperada en función del cambio en la concentración adicionada.

El coeficiente de variación para la recta de regresión tiene un valor menor al criterio de aceptación recomendado para los métodos biológicos ($\leq 5\%$) por lo tanto el método tiene una precisión adecuada para los fines de su aplicación.

En la prueba estadística de los residuales de DW el valor es 2.47023 teniendo una $P=0.1100$ para los datos del método leche, por lo tanto es probable que no hay una autocorrelación serial en los residuales como lo podemos observar en la Figura 6.5. Además nos permite observar cuánto se desvían los datos experimentales con respecto a los valores estimados y observamos que a la concentración 25 $\mu\text{g/L}$ se presenta una mayor desviación con un residuo de 0.0577 correspondiente a un error relativo de 1.7%.

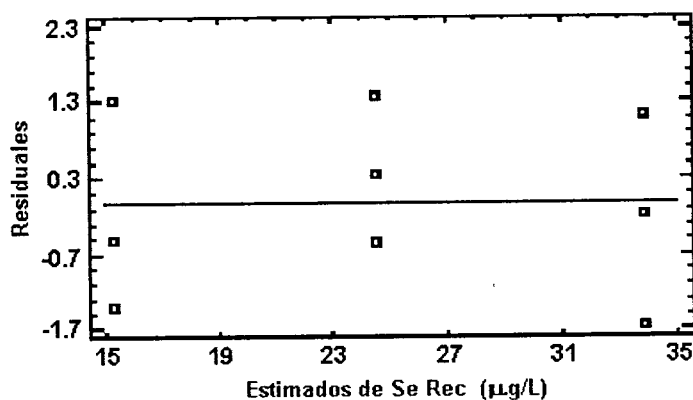


Figura 6.5 Gráfica de residuales del método de leche

Para observar el comportamiento de los valores observados con los estimados se graficaron (Figura 6.6) y se observa que el comportamiento es homogéneo.

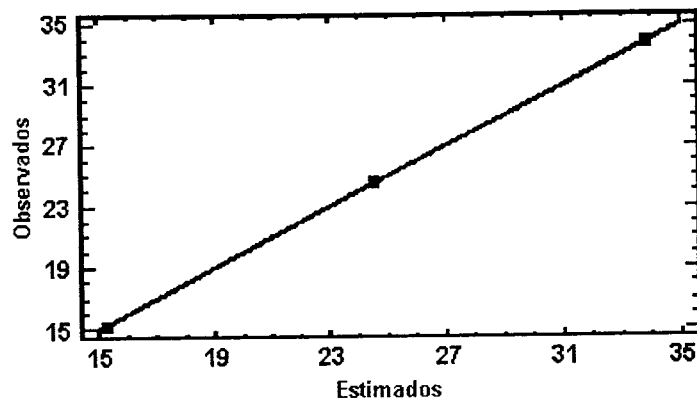


Figura 6.6 Gráfica de Selenio Recuperado del método de leche

Se realizó el análisis estadístico para el intercepto evaluado para la recta, se establece la hipótesis:

$H_0: b = 0$ La ordenada al origen es cero
 $H_a: b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero
 Criterio de aceptación
 Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza H_0 .
 Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza H_0 .

Tabla 6.10 Análisis de regresión para el modelo lineal del método de leche

Parámetro	Estimado	Error Estándar	$t_{calculada}$	$t_{critica}$	P-Valor
Intercepto	0.165756	0.0511146	3.24284	2.7515	0.0142
Pendiente	0.930333	0.00186161	499.745		0.0000

De acuerdo a la hipótesis establecida y el análisis obtenido (Tabla 6.10) existe la probabilidad de que al 97.5% de nivel de confianza que la ordenada al origen no pase por el origen, pero el intervalo de confianza para la ordenada si incluye al cero y la pendiente es aproximadamente de 1.

Para el porcentaje de recobro se tienen los parámetros estadísticos de la Tabla 6.11 en donde el C.V. no excede el criterio de aceptación siendo menor del 5% y el intervalo de confianza para μ incluye el promedio del porcentaje de Selenio recuperado.

Tabla 6.11 Parámetros estadísticos del Porcentaje de Selenio Recuperado del método de leche

Promedio % Se recobro	93.7340
s	0.2999
C.V. (%)	0.3200
Intervalo de confianza para la media poblacional (μ) en %	93.50 a 93.96

6.3.1 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

La exactitud y repetibilidad fueron evaluados a un nivel de concentración del intervalo de trabajo de Selenio. El porcentaje de recobro fue determinado. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 6.12.

Tabla 6.12 Concentración Adicionada- Porcentaje de Selenio Recuperado del método de leche

[Se] Adic	% Se Recobro
5	95.2497
5	90.5603
5	93.1790
5	89.0378
5	95.3106
5	95.7369

Se calculó el promedio, la desviación estándar el coeficiente de variación, la $t_{calculada}$ e intervalos de confianza para el porcentaje de recobro (Tabla 6.13) de los porcentajes de recobro de Selenio. El C.V. es menor al criterio de aceptación para los métodos biológicos.

Por medio de la prueba de “t” se determinó que las variaciones corresponden al porcentaje adicionado y el porcentaje de recobro siendo diferentes a un nivel de significancia α 0.001 estableciéndose la siguiente hipótesis:

Ho: % recobro = 100% El porcentaje de recobro es igual al 100%
 Ha: % recobro \neq 100% El porcentaje de recobro es diferente al 100%

Criterio de aceptación
 Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza Ho.
 Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza Ho.

Tabla 6.13 Resultados obtenidos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de leche

Promedio % Se recobro	93.1790
s	2.8065
C.V. (%)	3.0119
t_{cal}	5.9533
Intervalo de confianza al 99.99%	85.31 a 101.05 %

De acuerdo a los resultados obtenidos el método es exacto y repetible a un nivel de confianza del 99.99% debido a que la t_{cal} es menor que la $t_{critica}$ (6.8685), además el intervalo de confianza incluye al promedio del porcentaje de recobro por lo tanto el método es apto para determinar el Selenio en la leche.

6.3.2 PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Para estos parámetros estadísticos se evaluó por medio de los resultados obtenidos de los porcentajes de recobro de Selenio (Tabla 6.14) en una concentración del intervalo de trabajo (5 $\mu\text{g/L}$), siendo estos analizados por dos días y analistas diferentes.

Tabla 6.14 Porcentaje de recuperación de Selenio para determinar la precisión y reproducibilidad del método de leche

		ANALISTA	
		1	2
DÍA	1	94.7751	91.1917
		91.4021	88.8601
		91.1376	96.8912
2		93.1113	93.3125
		89.2589	92.0625
		91.2831	93.5000
		Promedio 92.2322	
		C.V. (%) 2.44	

Por medio de un análisis de variancia jerárquico se realizó para evaluar si existe diferencia entre los porcentajes de Selenio de recobro obtenidos entre los días y analistas estableciendo la siguiente hipótesis:

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

Ha: Existe efecto del analista y el día en el % de recobro.

Criterio de aceptación

Si $F_{cal} < F_{tab}$ ó P-Valor > 0.05 no se rechaza Ho.

Si $F_{cal} > F_{tab}$ ó P-Valor < 0.05 se rechaza Ho.

Con los resultados de la Tabla 6.15 no se rechaza Ho por lo tanto no hay diferencia significativa en las determinaciones realizadas entre diferentes analistas y distintos días. La variación en la propiedad medida esta explicada sólo por el cambio en la concentración de Selenio. Así el método es reproducible y exacto ya que el coeficiente de variación es menor (5%) al criterio de aceptación para los métodos biológicos.

Tabla 6.15 Análisis de Variancia para el Porcentaje de Selenio Recuperado del método de leche

Fuente	G.L.	SC	CM	F-Ratio	P-Valor
Analista	1	1.96013	1.96013	1.37	0.3621
Día (Analista)	2	2.85653	1.42827	0.22	0.8042
Error	8	51.0141	6.37677		
Total	11	55.8308			

Se realizó la comparación del recobro tanto por analista como por día y podemos observar en la Figura 6.7 A y B que los rangos en los recobros se traslapan por lo que no hay una diferencia significativa indicándonos que los recobros obtenidos son grupos homogéneos (ver Anexo VI).

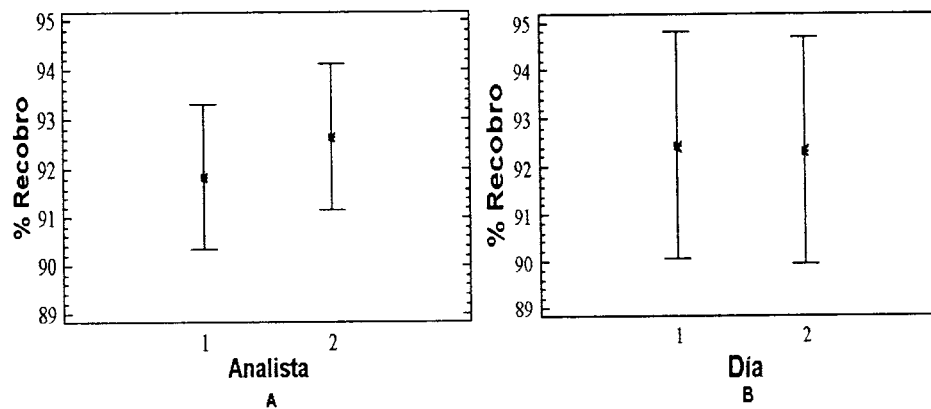


Figura 6.7 Intervalos de las Medias del Porcentaje de Recobro de Selenio al 95% con DMS del método de leche

6.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO DE PLASMA

De igual manera se utilizaron, las concentraciones adicionadas y concentraciones recuperadas de Selenio mostradas en la Tabla 6.16 con el porcentaje de recobro respectivamente para determinar la linealidad del método de plasma.

Tabla 6.16 Concentración Adicionada-Concentración Recuperada-Porcentaje de Recobro

Sistema	[Se] Adic.	[Se] Rec.	% Se recobro
1	6.27	5.80	92.5040
2	6.27	5.77	92.0255
3	6.27	5.74	91.5470
4	16.27	15.23	93.6079
5	16.27	15.18	93.3006
6	16.27	15.21	93.4849
7	26.27	24.64	93.7952
8	26.27	24.67	93.9094
9	26.27	24.61	93.6810

El modelo determinado que explica la variación de la concentración recuperada en función de la concentración adicionada por medio del análisis de regresión lineal es:

$$[\text{Se}] \text{ Rec} = -0.14518 + 0.9435 * [\text{Se}] \text{ Adic}$$

En la Figura 6.8 podemos observar la relación lineal entre la concentración recuperada vs concentración adicionada de Selenio, la cual es directamente proporcional entre estas concentraciones.

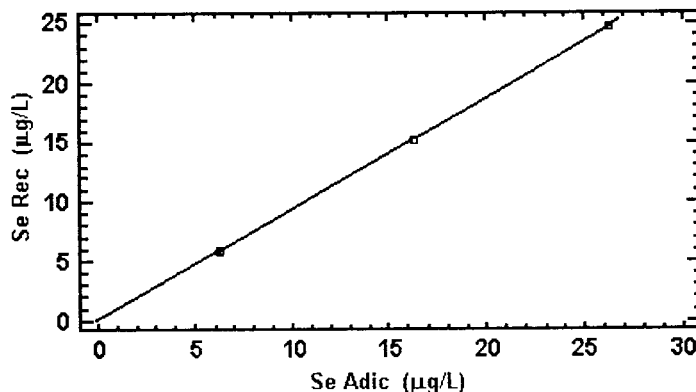


Figura 6.8 Gráfica de regresión para el modelo lineal del método plasma.

Para demostrar si existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada se establece 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 $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza Ho.
 Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza Ho.

Tabla 6.17 Análisis de Variancia para Selenio Recuperado del método de plasma

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	$F_{calculada}$	$F_{critica}$
Regresión	534.115	1	534.115	767372.11	6.6718E-19
Residuos	0.00487222	7	0.000696032		
Total (Corr.)	534.12	8			

Tabla 6.18 Parámetros estadísticos de la regresión del método de plasma

Pendiente (m)	0.9435
Intercepto (b)	-0.1452
Coefficiente de correlación (r)	0.999995
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999991
Coefficiente de variación (C.V. %)	0.1976
Intervalo de confianza para b al 97.5%	-0.2138 a 0.0766
Intervalo de confianza para m al 97.5%	0.9397 a 0.9473

En los resultados de análisis de variancia (Tabla 6.17) F_{cal} es mayor que $F_{critica}$ por lo que se rechaza H_0 . Así que con un nivel de significancia (α) de 0.025 existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración recuperada y la concentración adicionada a un nivel de confianza del 97.5%.

De acuerdo al coeficiente de determinación (Tabla 6.18), la regresión explica el 99.999% de la variación de la concentración recuperada en función del cambio en la concentración adicionada.

El coeficiente de variación para la recta de regresión tiene un valor menor al criterio de aceptación recomendado para los métodos biológicos ($\leq 5\%$) por lo tanto el método tiene una precisión adecuada para los fines de su aplicación.

En la prueba estadística de los residuales de DW su valor es 2.18586 teniendo una $P=0.2306$ para los datos del método plasma, por lo tanto es probable que no hay una autocorrelación serial en los residuales como lo podemos observar en la Figura 6.9. Además se puede observar que aquí no se presenta una desviación de los datos experimentales con respecto a los valores estimados.

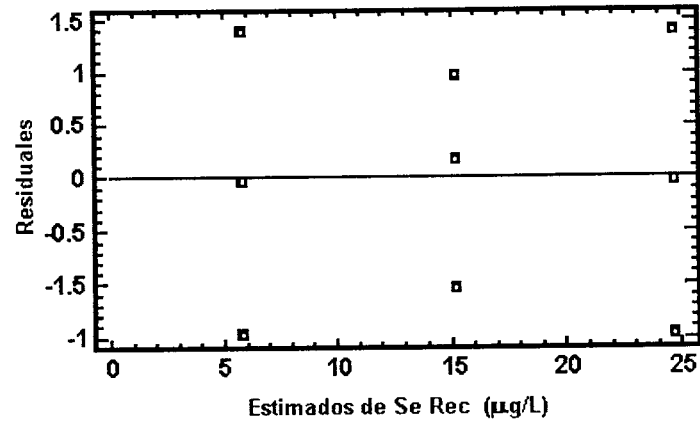


Figura 6.9 Gráfica de residuos del método de plasma

Para observar el comportamiento de los valores observados con los estimados se graficaron (Figura 6.10) y se observa que el comportamiento es homogéneo.

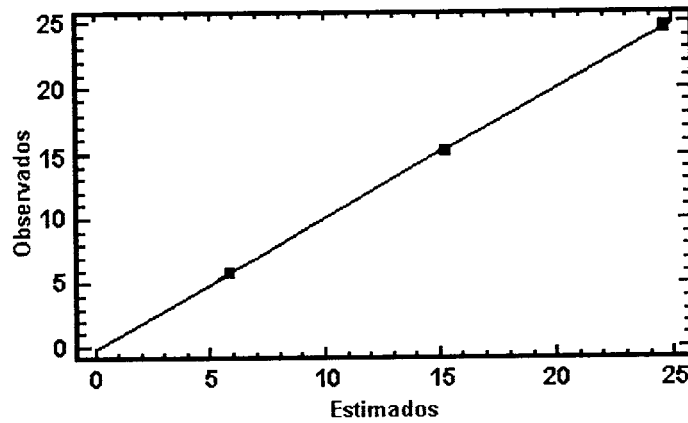


Figura 6.10 Gráfica de Selenio Recuperado del método de plasma

Se hizo el análisis estadístico para el intercepto evaluado para la recta, se establece la siguiente hipótesis:

Ho: $b = 0$ La ordenada al origen es cero
Ha: $b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero
<p> Criterio de aceptación Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza Ho. Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza Ho. </p>

Tabla 6.19 Análisis de regresión para el modelo lineal del método de plasma

Parámetro	Estimado	Error Estándar	t _{calculada}	t _{critica}	P-Valor
Intercepto	-0.145189	0.0196066	-7.40514	2.7515	0.0001
Pendiente	0.9435	0.00107706	875.998		0.0000

De acuerdo a la hipótesis establecida y el análisis obtenido (Tabla 6.9) existe la probabilidad de que al 97.5% de nivel de confianza que la ordenada al origen no pase por el origen, pero el intervalo de confianza para la ordenada si incluye al cero y la pendiente es aproximadamente de 1.

Para el porcentaje de recobro se tienen los parámetros estadísticos de la Tabla 6.20 en donde el C.V. no excede el criterio de aceptación siendo menor del 5% y el intervalo de confianza para μ incluye el promedio del porcentaje de Selenio recuperado.

Tabla 6.20 Parámetros estadísticos del Porcentaje de Selenio Recuperado del método de plasma

Promedio % Se recobro	93.0951
s	0.8547
C.V. (%)	0.9180
Intervalo de confianza para la media poblacional (μ) en %	92.44 a 93.75

5.4.1 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

La exactitud y repetibilidad fueron evaluados a un nivel de concentración del intervalo de trabajo de Selenio. Se determino el porcentaje de recobro. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 6.21.

Tabla 6.21 Concentración Adicionada- Porcentaje de Selenio Recuperado del método de plasma

[Se] Adic	% Se Recobro
15	91.0213
15	94.4153
15	95.5261
15	87.1953
15	94.9707
15	95.0941

Se calculó el promedio, la desviación estándar el coeficiente de variación, la $t_{calculada}$ e intervalos de confianza para el porcentaje de recobro (Tabla 6.22) de los porcentajes de recobro obtenidos del Selenio. El C.V. es menor al criterio de aceptación para los métodos biológicos (5%).

Por medio de la prueba de “t” se determinó que las variaciones corresponden al porcentaje adicionado y el porcentaje de recobro siendo diferentes a un nivel de significancia α 0.001 estableciéndose la siguiente hipótesis:

H_0 : % recobro = 100% El porcentaje de recobro es igual al 100%

H_a : % recobro \neq 100% El porcentaje de recobro es diferente al 100%

Criterio de aceptación

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

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

Tabla 6.22 Resultados obtenidos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de plasma

Promedio % Se recobro	93.0371
s	3.2941
C.V. (%)	3.5406
t_{cal}	5.1776
Intervalo de confianza al 99.99%	83.00 a 102.27 %

De acuerdo a los resultados obtenidos el método es exacto y repetible a un nivel de confianza del 99.99% debido a que la t_{cal} es menor que la $t_{critica}$, además el intervalo de confianza incluye al promedio del porcentaje de recobro por lo tanto el método es capaz de determinar al Selenio en el plasma.

5.4.2 PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

De igual manera se evaluaron por medio de los resultados obtenidos de los porcentajes de recobro de Selenio (Tabla 6.23) en una concentración del intervalo de trabajo (15 $\mu\text{g/L}$), siendo estos analizados por dos días y analistas diferentes.

Tabla 6.23 Porcentaje de recuperación de Selenio para determinar la precisión y reproducibilidad del método de plasma

		ANALISTA	
		1	2
DÍA	1	96.3642	89.2163
		92.0798	95.3446
		92.2007	90.3948
	2	93.7122	90.5716
		92.9262	92.6341
		89.6614	95.8142
		Promedio 92.5767	
		C.V. (%) 2.58	

A través de un análisis de variancia jerárquico se evaluó si existe diferencia entre los porcentajes de Selenio de recobro obtenidos entre los días y analistas estableciendo la siguiente hipótesis:

H_0 : No existe efecto del analista y el día en el % de recobro.

H_a : Existe efecto del analista y el día en el % de recobro.

Criterio de aceptación

Si $F_{cal} < F_{tab}$ ó P-Valor > 0.05 no se rechaza H_0 .

Si $F_{cal} > F_{tab}$ ó P-Valor < 0.05 se rechaza H_0 .

Con los resultados de la Tabla 6.24 no se rechaza H_0 por lo tanto no hay diferencia significativa en las determinaciones realizadas entre diferentes analistas y distintos días. La variación en la propiedad medida esta explicada sólo por el cambio en la concentración de Selenio. Así el método es reproducible y exacto ya que el coeficiente de variación es menor (5%) al criterio de aceptación para los métodos biológicos.

Tabla 6.24 Análisis de Variancia para el Porcentaje de Selenio Recuperado del método de plasma

Fuente	G.L.	SC	CM	F-Ratio	P-Valor
Analista	1	0.73453	0.73453	0.25	0.6672
Día(Analista)	2	5.89930	2.94965	0.42	0.6709
Error	8	56.2295	7.02869		
Total	11	62.8633			

Se realizó la comparación del recobro tanto por analista como por día y podemos observar en la figura 6.11 C y D que los rangos en los recobros se traslapan por lo que no hay una diferencia significativa indicándonos que los recobros obtenidos son grupos homogéneos (ver Anexo VII).

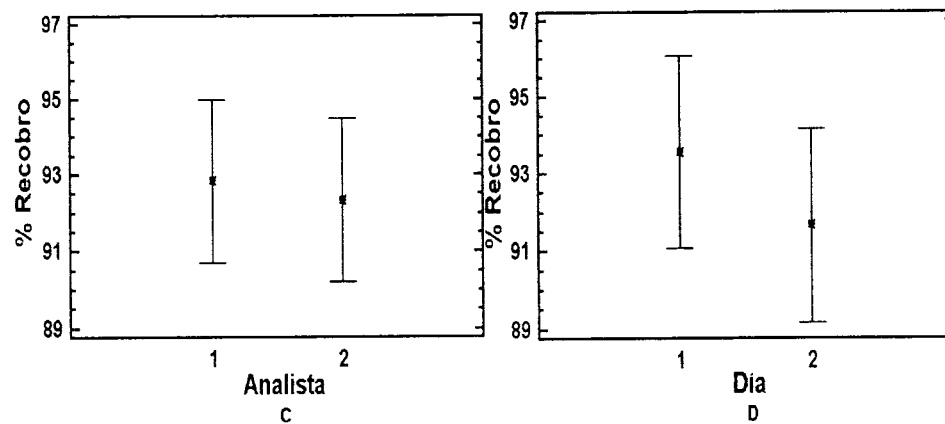


Figura 6.11 Intervalos de las Medias del Porcentaje de Recobro de Selenio al 95% con DMS del método de plasma

Al evaluar estadísticamente el sistema se comprobó el cumplimiento de la linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado, por los elevados coeficientes de correlación y de determinación obtenidos, el valor del coeficiente de variación muestra que existe la confiabilidad para determinar al Selenio y para corroborar que dicha regresión es lineal se aplicaron diferentes pruebas estadísticas considerando el análisis de variancia, y de residuales DW comprobándose que la propiedad medida es proporcional a la concentración.

De igual forma se comprobó que cada método de digestión ácida (leche y plasma) en horno de microondas cumplen con el requisito de linealidad ya que las curvas de recuperación mostraron un comportamiento lineal debido al valor de los coeficientes de correlación y de determinación cercanos a la unidad que demuestra que existe regresión entre las concentraciones adicionadas y las concentraciones recuperadas, al confirmar dichas regresiones con el análisis de variancia y la prueba de residuales DW. Por otra parte los estudios de exactitud y linealidad se comprobaron mediante las pruebas estadísticas realizadas, ya que los valores de la pendiente son aproximadamente a 1 y los valores del intercepto no difieren significativamente de cero.

En cuanto la precisión y reproducibilidad los coeficientes de variación resultaron menores al criterio de aceptación los cuales muestran una buena repetibilidad y reproducibilidad de los métodos. No se observaron diferencias significativas entre las medias de ambos analistas por lo que son reproducibles por ambos analistas. De igual forma, no se detectaron diferencias significativas entre días, y los métodos fueron reproducibles en distintos días por ambos analistas. Las recuperaciones medias cumplieron con el criterio de aceptación para esta validación.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo a las pruebas estadísticas para la validación de los métodos de digestión ácida se establece:

- ❖ El método de digestión ácida de leche es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas (5–25 $\mu\text{g/L}$) para el Selenio obteniéndose un 93.73% de recobro con un C.V. de 0.32%; es exacto y repetible obteniendo un 93.18% de recobro de Selenio con un C.V. de 3.012% a un nivel de confianza del 99.99%, además, es preciso y reproducible obteniéndose un 92.23% con dos analistas diferentes en dos días diferentes con un C.V. de 2.44% a un nivel de confianza del 97.5%.

- ❖ Con respecto al método de digestión ácida de plasma es lineal en las concentraciones de estudio obteniendo un 93.10% de recobro con un C.V. 0.92%, también es exacto y repetible al obtenerse un 93.04% con un C.V. 3.54% a un nivel de confianza del 99.99% siendo preciso y reproducible determinándose un 92.58% de Selenio recobrado con un C.V. de 2.58% en dos días distintos por dos analistas distintos.

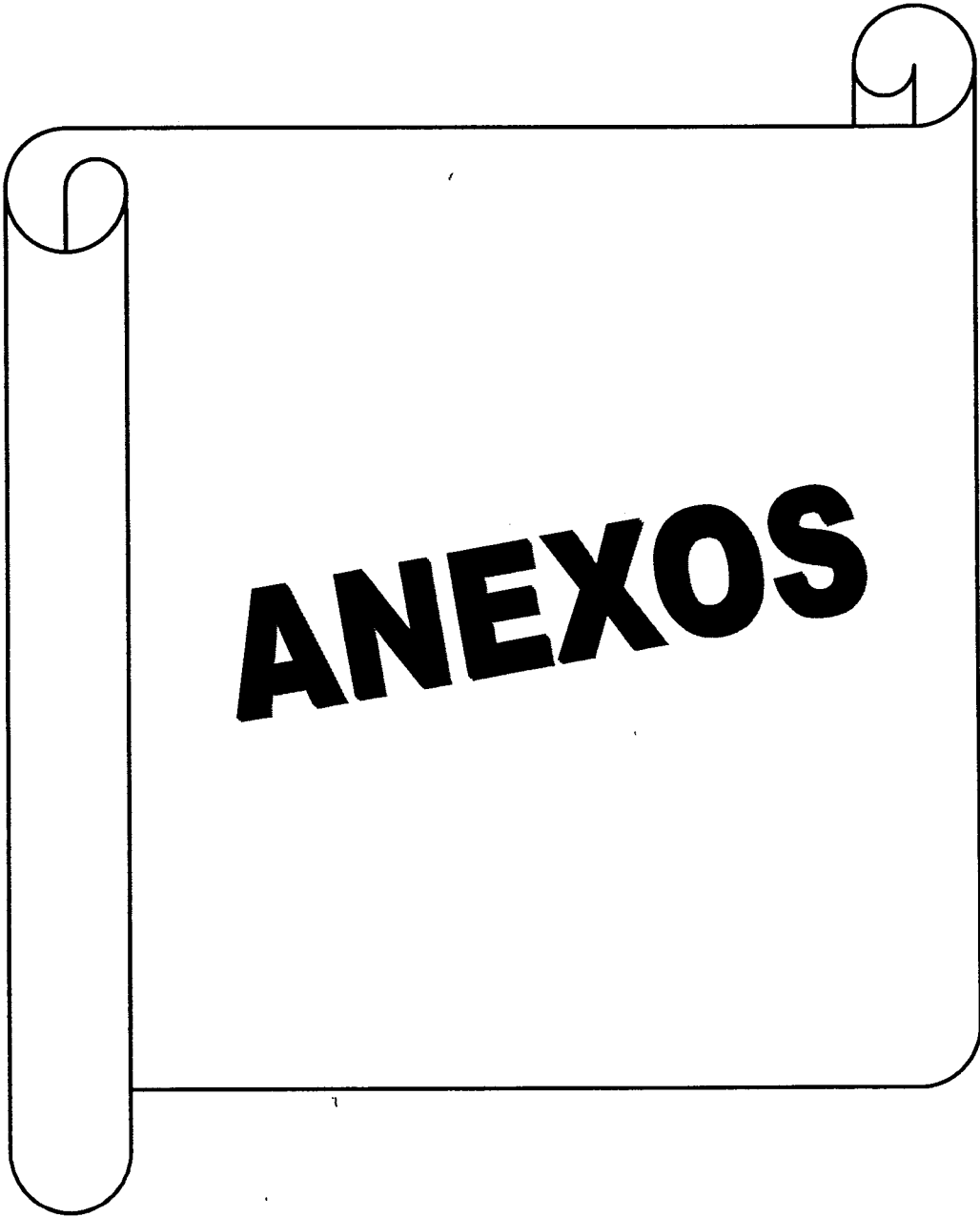
- ❖ Se concluye que los dos métodos de digestión ácida son confiables para determinar el Selenio en las muestras biológicas de leche y plasma.

PERSPECTIVAS

- ★ El desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas en bolos e inyectables para la complementación alimenticia de Selenio en rumiantes y ovinos, bajo proyectos de investigación biofarmacéuticos permite la aplicación de los métodos validados ya que la importancia de este trabajo es de tener métodos confiables para la preparación de muestras biológicas con el propósito de proveer información a futuro acerca de la biodisponibilidad del Selenio.

- ★ Las condiciones de los métodos permite determinar al Selenio tanto en materia prima como en Selenito de Sodio.

- ★ Además estos métodos le ayudaran a los Médicos Veterinarios a cuantificar al Selenio para detectar la deficiencia de este elemento y así evitar, controlar la muerte de crías, mejorar la reproducción, la enfermedad del músculo blanco y sus derivados obtenidos que sean de una mejor calidad.



ANEXOS

ANEXO I

CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA EL GENERADOR DE HIDRUROS

Para llevar a cabo una buena determinación del elemento a analizar por este sistema se tienen que seguir los siguientes pasos en el equipo:

1. Abrir el tanque de Acetileno verificando que la presión del gas sea la indicada y el contenido de gas sea mayor de 100 psi si el manómetro marca debajo es necesario cambiar el tanque por uno nuevo y abrir el tanque de Nitrógeno de igual manera revisar que la presión sea la indicada es importante remarcar que no se debe de mover la llave del manómetro que regulan las líneas de abastecimiento al equipo.
2. Abrir las llaves de paso del Acetileno, Nitrógeno y Aire.
3. Montar la chimenea y colocar la puerta de seguridad.
4. Encender el regulador y el multicontactos.
5. Encender el equipo de Absorción Atómica y posteriormente la computadora.
6. Colocar la lámpara de cátodo hueco del elemento a analizar (Selenio).
7. Montar el Generador de Hidruros.
8. Colocar las mangueras en el Generador de Hidruros.
9. Entrar al software SpectrAA-220.
10. Entrar a worksheet y presionar en nuevo.
11. Nombrar el archivo, el analista, algún comentario y seleccionar el número de muestras.
12. Se activa la ventana desarrollo y presionar en adicionar método.
13. Seleccionar el sistema de vapor, el elemento de análisis (Selenio).
14. Posteriormente se edita el método.
15. En la ventana de tipo/modo: Aparece que el tipo de método es vapor el elemento es el Selenio las unidades de trabajo son $\mu\text{g/L}$, la flama que se utiliza es Aire/Acetileno teniendo un flujo de Aire de 13.50 y Acetileno 2.10 (L/min), selecciona "manual" en el modo de muestreado.
16. En la ventana de medidas selecciona en la sección de medidas "integración" y el modo de calibración en nuestro caso es por "concentración".

17. En la ventana óptica tendrás que introducir el número de posición en que se encuentre la lámpara del analito y en la sección de monocromador automáticamente te aparece la longitud de onda en que vas a trabajar en nuestro caso fue de 196 nm.
18. En la ventana Estándares tendrás que introducir las concentraciones de la curva de calibración y da un click en OK
19. Una vez editado el método pasa a la ventana de etiquetas y puedes nombrar a las muestras.
20. Por último entra en la ventana de instrumento, aquí es el paso importante ya que en esta ventana se calibra el equipo para iniciar a trabajar.
21. Se da click en seleccionar y selecciona el número de muestras que vas a analizar.
22. Una vez seleccionadas las muestras, da click en optimizar y selecciona el método a optimizar.
23. Aparecerá un recuadro de que si esta listo el equipo
24. Deja que la lámpara se encienda y en la barra HC lamp aparezca la barra de color verde.
25. Con la tarjeta de alineación, alinea al quemador con el haz de luz verificando que pase el haz en el centro, puedes mover el quemador de un lado a otro, subir y bajar aquí seleccionas la altura del quemador nuestra altura de trabajo fue de "6.1 mm".
26. Deja que se caliente la lámpara de 10 a 15 minutos.
27. Mientras que transcurre el tiempo de calentamiento de la lámpara introduce los capilares del ácido reductor y la muestra en agua desionizada y enciende el Generador de Hidruros, durante 5 minutos debe circular el agua desionizada.
28. En este tiempo se revisan que los flujos de cada capilar sean los indicados. El flujo de la muestra debe de estar entre 7-8 mL por minuto, el del ácido y reductor de 1 mL por minuto.
29. A continuación introduce los capilares a las soluciones correspondientes, solo el de la muestra se coloca en el HCl 7M hasta estabilizar el equipo.
30. Ya que haya transcurrido el tiempo de calentamiento de la lámpara da un click en "rescale" y ese será los volts sin celda.
31. Monta la celda de cuarzo en su base y conecta la trampa a la celda.
32. Conecta la trampa en el separador de gas-líquido y la celda móntala en el quemador.

33. Deja que se estabilice la barra verde y da un click en “rescale” aquí la barra debe de llegar casi al 1 y el voltaje que aparece es el de trabajo. Cabe mencionar que si el voltaje es muy alto se tiene que minimizar de la siguiente manera: En donde se encuentra la lámpara se tienen dos tornillos primero se tiene que mover uno de tal manera que lo máximo que aumenta en HC-lamp es hasta 1.316 se da “rescale” y automáticamente los volts disminuyen y la barra verde baja aproximadamente a 1 así se realiza de tal manera de que el voltaje no cambien, posteriormente se repite lo mismo con el otro tornillo y el voltaje que permanezca estable es el de trabajo.
34. Con el dedo índice se levanta la celda de cuarzo teniendo cuidado de no abrir la puerta de seguridad, se enciende la flama, y se baja lentamente la celda teniendo cuidado de no moverla de posición, se enciende el extractor y se da un click en optimización de la señal.
35. Posteriormente cambia el agua por el que será tu blanco y da click en Inz cero.
36. Aquí la señal debe de estar entre $-0.009, 0.009$.
37. Introduce tu estándar medio de tu curva de calibración para corroborar que realmente este detectando tu analito. Una vez detectado cambia el capilar a agua desionizada y da click en OK.
38. Te aparecerá la ventana que si deseas optimizar otro método da click en cancel, y da click iniciar (start).
39. Ahora tu equipo ya esta listo para comenzar a trabajar.
40. Aparecerá la ventana preparar Inz Zero antes de dar click en OK tendrás de nuevo que colocar tu solución blanco.
41. Aparecerá la ventana de solución de calibración y darás click en OK.
42. Posteriormente te pedirá los estándares de la curva y una vez aceptada la curva te pedirá las muestras.
43. Se recomienda que selecciones de 2 a 3 muestras más para que enjuagues con HCl 7M el capilar.
44. Una vez finalizado el análisis salva tu archivo en la ventana “filing”, ciérralo y salte del software.
45. Apaga el extractor, apaga el equipo de Absorción Atómica
46. Deja el Generador de Hidruros encendido saca los capilares del ácido y reductor y colócalos en el HCl donde esta el capilar de la muestra por 5 minutos.

47. Posteriormente pásalos a agua desionizada los tres capilares y déjalos que se enjuaguen por otros 5 minutos.
48. Se saca el agua que queda dentro de las mangueras, se apaga el Generador de Hidruros, se desconecta y desmonta.
49. Se cierran las llaves de paso y también las llaves de los tanques.

ANEXO II

DEFINICIONES

Análito es el componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Exactitud es la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Linealidad es la capacidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito. La relación proporcional debe ser expresada como una función lineal.

Muestra es la porción del material a evaluar.

Precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a diferentes alícuotas de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Recobro es la cantidad del analito determinada en la muestra adicionada, empleando el método a validar.

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 método.

Reproducibilidad es la precisión del método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días.

ANEXO III

CERTIFICADO DEL ESTÁNDAR DE SELENIO

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



CAT. NO. 100049-1

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 ± 3 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 megaohm 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	Cu	<0.02	Zn	<0.02	Ga	<0.02	Ge	<0.02	As	1.0	Se	M	Rb	<0.02		
Sr	<0.02	Y	<0.02	Zr	<0.02	Nb	0.05	Mo	<0.02	Ru	<0.02	Rh	<0.02	Pd	<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	Sm	<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	Ta	<0.02		
W	<0.02	Re	<0.02	Os	<0.02	Ir	<0.02	Pt	<0.02	Au	<0.02	Hg	<0.02	Tl	<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.

Theodore C. Rains
 Theodore C. Rains, Ph.D.
 President

Exp. Date JAN 06

MSDS ATTACHED

ANEXO IV

CERTIFICADO DEL MATERIAL DEL REFERENCIA

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

**HIGH-PURITY
STANDARDS**

CAT. NO. CRM-MP-A

Certificate of Analysis

HPS Certified Reference Material

Milk Powder

Lot # 202919

This Certified Reference Material is milk powder obtained from a commercial source. The certified values are based on at least two independent analytical techniques for major, minor and trace elements after total digestion procedure.

The milk powder was sieved and only particles that passed a 100 mesh sieve were saved. The saved material was transferred to a 10-gal polyethylene mixing-drum and blended for several hours. Then the material was bottled into 40-g units in a Class 100 area under UV lamps. Randomly selected bottles were used for the final homogeneity testing and analysis.

Instructions for drying: Sample should be determined as received. If the sample has been exposed to a significant amount of moisture, it should be dried as follows: vacuum-dry the material at approximately 60°C for 24 hours at a pressure not greater than 70 Pa (0.5 mm Hg) with a cold trap at a temperature of -20°C or below.

Preparation of Sample for Analysis: Transfer 2.000g of the material to a clean 100 mL Teflon beaker. Add 10 mL of H₂O and 10 mL of HNO₃. Cover beaker with a Teflon lid and digest on a hot plate for 8 hours at a temperature of 120-130°C. Remove the lid and add 10 mL of HClO₄. (NOTE: If the sample has gone dry contains less than 5 mL of acid, add an additional 5 mL of HNO₃). EXERCISE CAUTION when digesting with HClO₄. Continue the digestion on a hot plate at a 160°C to strong fumes of perchlorate. Wash down the sides of the beaker with a stream of water and continue the digestion until the sample volume is about 1 mL. Add 2 mL of HNO₃ and 10 mL of water. Warm the sample on hot plate until all solids are dissolved and then transfer the solution to a 100 mL volumetric flask. Dilute to calibrated volume with 18 megaohm high purity water. Mix and transfer solution into a clean LDPE Nalgene bottle. Proceed with the analysis of the analytes.

ANEXO V

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS EVALUADOS PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

**Tabla 9.1 Resumen estadístico para
CestentreCr**

Contable = 15
Promedio = 0.999084
Varianza = 0.000230034
Desviación estándar = 0.0151669
Mínimo = 0.970946
Máximo = 1.0235
Rango = 0.0525586
Std. Asimetría = -0.0735921
Std. Curtosis = -0.421425

En la Tabla 9.1 muestra el resumen estadístico para CestentreCr. Incluye las medidas de tendencia central, medidas de dispersión, y medidas de la forma. De interés particular aquí está la asimetría estandarizada y la curtosis estandarizada que puede usarse para determinar si la muestra viene de una distribución normal. Los valores de estas estadísticas fuera del rango de -2 a +2 indican las salidas significantes de normalidad. Las cuales pueden tender a invalidar cualquier prueba estadística con respecto a la desviación estándar. En este caso, el valor de asimetría estandarizada está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal. El valor de la curtosis estandarizado está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

En cuanto al gráfico de Box y Whisker (Figura 9.1) observamos que este es simétrico lo cual nos indica que hay una menor variabilidad con respecto a la concentración estimada entre la concentración real de Selenio lo cual hace que los datos sean homogéneos presentando una tendencia a agruparse por encima de la mediana, además se observa muy bien el rango esto quiere decir que no hay tanta variabilidad en los datos.

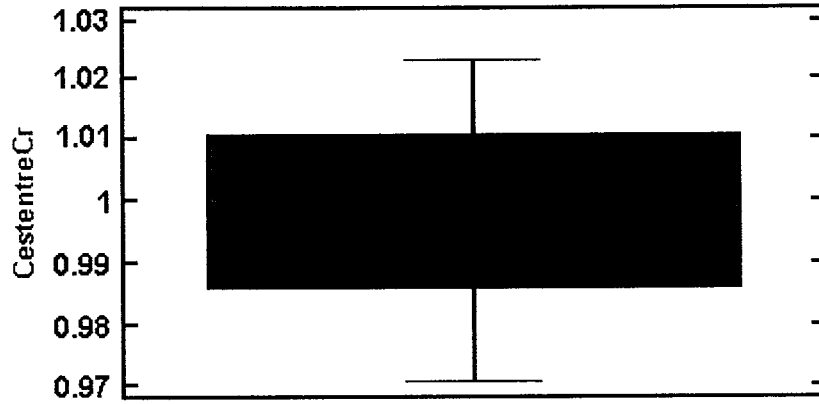


Figura 9.1 Gráfica de Box y Whisker

Así que se prosigue a realizar un histograma (Figura 9.2) en donde se realiza una tabulación de frecuencia dividiendo el rango de CestentreCr en iguales intervalos de anchura y contando el número de valores de datos en cada intervalo. Las frecuencias muestran el número de valores de datos en cada intervalo mientras las frecuencias relativas muestran la proporción en cada intervalo.

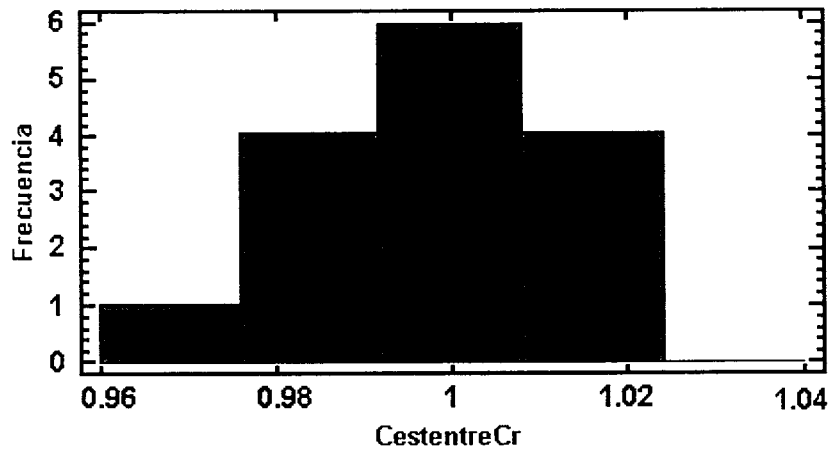


Figura 9.2 Histograma

Con respecto a la distribución normal (Figura 9.3) podemos observar que los valores de los porcentajes con respecto a CestentreCr todos están cerca de la línea de tendencia donde solo se

aleja un dato este no influye para el comportamiento de todos los datos así que se corrobora que los datos presentan una distribución normal.

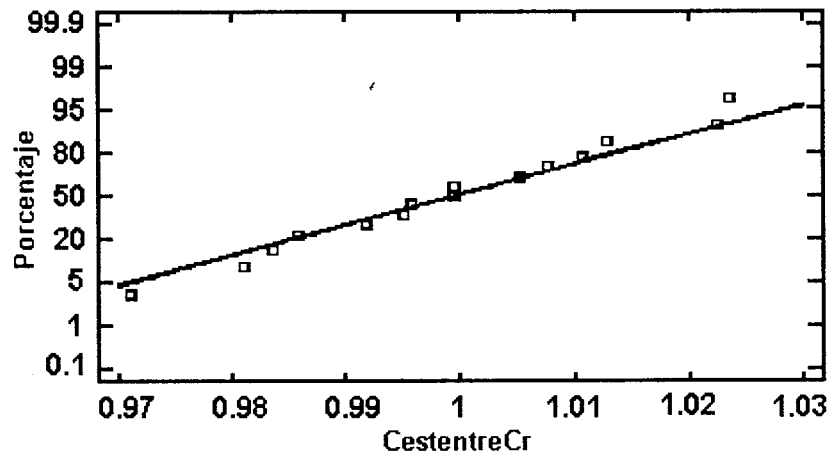


Figura 9.3 Gráfica de probabilidad Normal

ANEXO VI

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO DE LECHE

Se realizó la prueba estadística de los residuales de DW a los porcentajes de recobro para los diferentes días y analistas en la precisión del método de leche siendo el valor de $DW=2.18106$ teniendo una $P=0.0692$, siendo el valor de P mayor que 0.05 por lo tanto no hay una autocorrelación serial en los residuales observándose en la Figura 9.4.

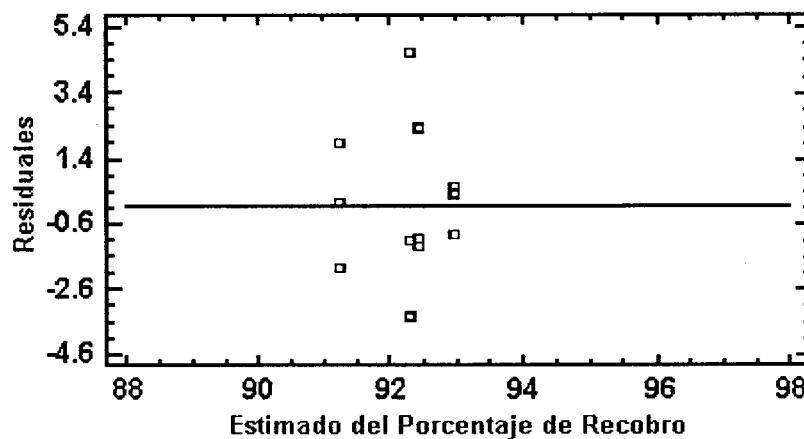


Figura 9.4. Gráfica de residuales para el método de leche

Se realizó una comparación múltiple para el % de recobro por día y analista en donde se determina cual de un par de medias es significativamente diferente una de la otra. En las Tablas 9.2 y 9.3 observamos que no hay diferencia significativa entre el par de medias a un 95 % de nivel de confianza y además en la columna de grupos homogéneos cuando la X no está alineada indica que los grupos no son homogéneos y que existe una diferencia estadísticamente significativa entre algún

par de medias, en nuestro caso nos reafirma que los porcentajes de recobro tanto para los días como los analistas se tratan de grupos homogéneos que no presentan una diferencia estadísticamente significativa por lo que nuestro método es exacto y reproducible.

Tabla 9.2 Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Analista para el método de leche				
Analista	Contable	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	6	91.828	0.487898	X
2	6	92.6363	0.487898	X
Contraste			Diferencia	Limites + / -
1 - 2			-0.808317	2.9688

Tabla 9.3 Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Día para el método de leche				
Día	Contable	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	6	92.088	0.616941	X
1	6	92.3763	0.616941	X
Contraste			Diferencia	Limites + / -
1 - 2			0.28825	3.75401

ANEXO VII

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO DE PLASMA

De igual manera se realizó la prueba estadística de los residuales de DW a los porcentajes de recobro para los diferentes días y analistas en la precisión del método de plasma siendo el valor de $DW=2.05387$ teniendo una $P=0.1125$, siendo el valor de P mayor que 0.05 y DW mayor que 1.4 por lo tanto no hay una autocorrelación serial en los residuales observándose en la Figura 9.5.

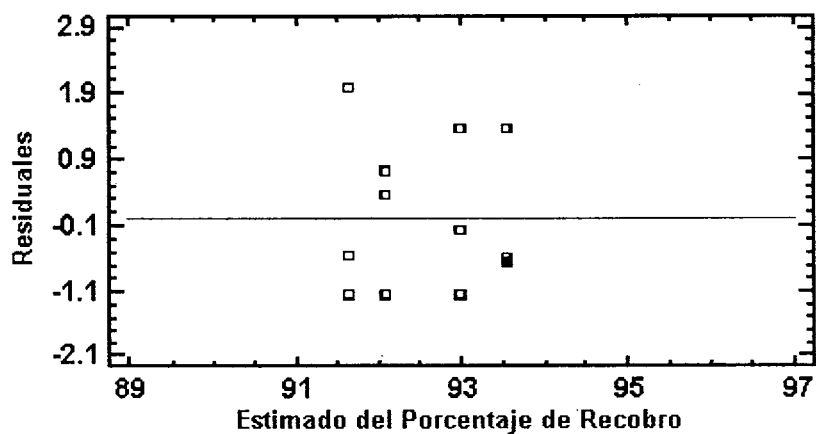


Figura 9.5 Gráfica de residuales para el método de plasma

Se realizó la comparación múltiple para el porcentaje de recobro por día y analista. En la Tabla 9.4 y 9.5 observamos que no hay diferencia significativa entre el par de medias a un 95 % de nivel confianza y además en la columna de grupos homogéneos la X está alineada así los porcentajes de recobro tanto de los días como los analistas se tratan de grupos homogéneos que no presentan una diferencia estadísticamente significativa por lo que nuestro método es reproducible y exacto.

Tabla 9.4 Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Analista para el método de plasma				
Analista	Contable	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	6	92.8241	0.701149	X
2	6	92.3293	0.701149	X
Contraste			Diferencia	Limites + / -
1 - 2			0.494817	4.2664

Tabla 9.5 Comparación múltiple para el Porcentaje de Recobro de Selenio por Día para el método de plasma				
Día	Contable	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	6	92.5533	0.743151	X
1	6	92.6001	0.743151	X
Contraste			Diferencia	Limites + / -
1 - 2			0.0467833	4.52198



REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C.. 2002.
2. Soto C., Cuello M., Alfonso Y., Cabrera O., Sierra G.. Validación de una técnica colorimétrica para la determinación de carbohidratos. *VacciMonitor*, Año II. Núm. 3. Julio-Septiembre.2002. pp. 11-14.
3. Castillo Aguilar Beatriz, González Hernández Rolando. Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev. Cubana Farm.* 1997; 30(1). pp. 1-9.
4. H. Weed Donald JR. Una aproximación estadísticamente integrada a la validación del método analítico. *Pharmaceutical Technology*. Vol. 4, Núm. 1. pp. 10-19.
5. International Cooperation on Harmonization. "Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology". October. 1998. pp. 1-10.
6. McDowell L. R., J. H. Conrad, G. L. Ellis, F. F. Loosly. Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones Tropicales. Departamento de Ciencia Animal. Centro de Agricultura tropical. Universidad de Florida Gainesville, La Agencia de los estados Unidos para el desarrollo Internacional. USA. 1984. pp. 37-42.
7. Gallignani M., Valero M., Brunetto M. R., Burguera J. L., Burguera M., Petit de Peña Y.. Sequential determination of Se(IV) and Se (VI) by flow injection-hydride generation–atomic absorption spectrometry with HCl/HBr microwave aided pre-reduction of Se (VI) to Se (IV).*Talanta* 52(2000); pp. 1015-1024.
8. Varian Instruments at work. Determination of selenium in Human Serum by Hydride Generation. Varian Atomic. Absorption. Number AA-82

9. Martins Patricia, Pozeban Dirce, Dresster Valderi L., Kemiccili Gisele A.. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Analytical Chemical Acta*. 470 (2002); pp. 195-204.
10. Skoog Douglas A. *Análisis Instrumental*. Editorial McGraw-Hill. 4ta. Edición. Madrid, España. 1994. pp. 245,246,258.
11. Gleason Huerta Maria Eugenia. *Métodos de separación para el Análisis Químico y el Desarrollo Tecnológico: Desarrollo y Optimización de los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas para la cuantificación de Selenio en Muestras Biológicas*. FES-Cuautitlán, UNAM. 2004.
12. Biblioteca de consulta Microsoft @Encarta@2004. 1993-2003. Microsoft Corporation.
13. http://www.dsalud.com/medicinaorto_munero55.htm. 29/02/04
14. http://www.encolombia.com.acovez24284_algunas14.htm. 29/02/04
15. Jurado Couto Rafael. *Toxicología Veterinaria*. Salvat Editores. 2da. Edición. Barcelona, España. 1989. pp. 131-135, 390-393.
16. <http://e-dialectika.com.ar/redartox/documentos/ToxicologiaLaboral.pdf>. 30/07/04
17. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Selenio (Selenium). División de Toxicología. Septiembre. 2003. pp. 1,2.
18. Chaudhari Ram. La importancia del Selenio en la Salud Humana. Fortihechos. Marzo. 2001. pp. 4.
19. Ramírez M. Jaime, Mata R. Norberto, Zarate M. Flora, Mason C. Thomas. Micronutrimientos en México. *Acta Pediatr Méx*. 2002: 23(6). Pp. 359-362.
20. Alais, Charles. *Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera*. Editorial Continental. México. 1984. pp. 15-20.

21. Church. Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes. Editorial Acriba. Vol. 3. Zaragoza, España. 1974. pp. 343-345.
22. Reaves, Paul M. Paul. La Vaca Lechera. Alimentación y Crianza. Editorial Hispanoamericana. 5ta. Edición. México. 1969. pp. 236-238.
23. Wilson James A. Fundamentos de Fisiología Animal. Editorial Limusa. 2da. Edición. Vol. 3. México, D.F..1991.pp. 635.
24. Guyton Arthur E. Tratado de Fisiología Medicina. Editorial Interamericana. 6ta. Edición. México, D.F.. 1984.pp. 249.
25. Domarus A. V. Medicina Interna. Editorial Marín. Tomo II. México, D.F.. 1978. pp. 280-283.
26. De Oliveira Elisabeth. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. J. Braz. Chem. Soc.. Vol. 14. Núm. 2 (2003). 174 182.
27. Burguera J. L., Burguera M., De Abel de la Cruz A. Matousek. Anez N., Alarcón O. M.. Microwave-Aided Micro-Dissolution of Biological Samples Prior to Flow - Injection-Atomic Absorption Spectrometry. Atomic Spectroscopy. March/April. Vol. 13. Núm. 2. (1992). pp. 67-71.
28. Kingston H. M.. introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice. ACS Professional Reference Book. 4ta. Edición. Washington, D.C. 1996. pp. 1-30, 155-165.
29. <http://www.organic-chemistry.org/pdf/Art/Mûtheo.pdf>. 21/03/04
30. Instrumentos y equipos Falcón. Curso Teórico-Practico: 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. México, D. F.. 2004.
31. Chang Raymond. Química. McGraw-Hill Interamericana. México.1995. pp. 259-265.
32. Willard Hobart H.. Métodos Instrumentales de Análisis. Editorial Iberoamericana. E.U.A.. 1991.pp. 95-99, 219-247.
33. Guiteras Jacinto, Rubio Roser, Fonrodona Gemma. Curso Experimental en Química Analítica. Editorial Síntesis. Madrid, España. 2003. pp. 65-67, 79-90.
34. Rovessac Francis, Rocessac Annick. Análisis Químico Métodos, Técnicas Instrumentales Modernas Teoría y ejercicios resueltos. McGraw-Hill/Interamericana. España, Madrid. 2003. pp. 229-248, 402-416.
35. Walton Harold F., Reyes Jorge. Análisis Químico e Instrumental Moderno. Editorial Reverté. Barcelona, España. 1983. pp. 243-260.
36. Harris Daniel C. Análisis Instrumental. Editorial McCraww Hill 4ta.Edición. Madrid, España. 1994 pp. 579-600.
37. Rubinson Judith F., Rubinson A. Kenneth. Química Analítica Contemporánea. Editorial Pearson Education, Prentice Hall. Hispanoamericana. 1era. Edición. México. 2000. pp. 29-66.
38. <http://www.infoleg.gov.ar/txtnormal/dto202-2003-51.htm>. 20/03/04
39. Varian. Curso de Generador de Vapor e Hidruros. Varian S.A. México, D.F.
40. <http://es.melma.com./mag/94/m00002234/index-bn.html>. 14/03/04
41. <http://www.infoleg.mecon.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-95htm>. 20/03/04

42. Bettencourt da Silva Ricardo, F.G.C. M. Filomena. Seabra e Barros Joao. Validation and quality control schemes based on the expression of results with uncertainty. *Analytica Chimica Acta* 393 (1999). pp. 167-175.
43. Fernández S. Alfredo, Aguilera C. Yeni, Morales L. Ivan. Alonso J. Esther. Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe. *Rev Cubana Farm* 2002; 36(1); 28-34.
44. Swartz Michael, Krull Ira S. *Analytical Method Development and Validation*. Marcel Dekker, INC. NY. USA. 1997.
45. Cámara Carmen, Fernández H. Pilar, Antonio Martín, Pérez Concepción. *Toma y Tratamiento de muestras*. Editorial Síntesis. Madrid, España. 2002. pp. 38-70.