

Desarrollo de un método cinético para la determinación espectrofotométrica de selenito

Jean C. Belandria, Ana Cáceres, Bélgica Bravo, Gerson Chávez, Fredy Ysambertt, Nelson Márquez y Maigualida Hernández*

Laboratorio de Petroquímica y Surfactantes, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 21-06-09 Aceptado 10-11-10

Resumen

En este estudio se desarrolló un método cinético, simple y sensible para la determinación espectrofotométrica de niveles trazas de Se (IV), basado en la reacción de oxidación del 2-(α -piridil) tioquinaldinamida (PTQA) catalizada por el Se (IV) en medio ácido. Se optimizaron los parámetros tales como: longitud de onda, tiempo de reacción, temperatura, solvente, ácido y su concentración, cantidad de PTQA y la relación molar: Se (IV)/PTQA. El curso de la reacción y la optimización de las variables, se siguió por espectroscopia de absorción en la región UV-visible. La curva de calibración para Se (IV) se estableció en el rango de 0,18-2,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un límite de detección de 0,0542 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de $r = 0,9996$. Se estudiaron las posibles interferencias producidas por especies que puedan catalizar o inhibir la reacción. La selectividad de la reacción se mejoró con el uso del citrato de sodio como agente enmascarante. El método desarrollado se aplicó a la determinación de Se (IV) en suplementos vitamínicos, los resultados se compararon con otros estudios realizados anteriormente a las mismas muestras. El método mostró una alta reproducibilidad, desviación estándar relativa menor al 5% y exactitud satisfactoria, porcentajes de recuperaciones entre el 72,8 al 99,5% y errores inferiores a 5%.

Palabras clave: selenito, espectrofotometría UV-VIS, método cinético, 2-(α -piridil) tioquinaldinamida.

Developing a kinetic method to spectrophotometric determination of selenite

Abstract

In this study a simple, sensitive and kinetic method for the spectrophotometric determination of trace levels of selenite (IV) was developed, it was based on the oxidation reaction of the 2-(α -pyridyl) thioquinaldinamide (PTQA) catalyzed by the Se (IV) in acid medium. Parameters such as: wavelength, reaction time, temperature, solvent, acid and their concentration, concentration of PTQA and molar ratio: Se (IV)/PTQA were optimized. Reaction and all variables were followed by UV-visible detection. A range of 0,18-2,16 $\mu\text{g Se (IV) mL}^{-1}$ was used, a detection limit of 0,0542 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a linear correlation coefficient of $r = 0,9996$. Interferences species that affect the reaction were studied. The selectivity of the reaction was improved with the use of so-

* Autor para la correspondencia: jbelandria7@gmail.com

dium citrate as masking agent. The developed method was applied to Se (IV) determination in nutritional supplements; the results were compared with other studies carried out previously to the same samples. High reproducibility was obtained (RSD below 5%) and satisfactory accuracy, recoveries among the 72,8 to 99,5%.

Key words: selenite, spectrophotometry uv-vis, kinetic method, 2-(α -pyridyl) thioquinaldinamide.

Introducción

El selenio (Se) es uno de los elementos trazas más importantes, en virtud de que juega un rol activo en varios sistemas biológicos [1]. Es un nutriente esencial para el organismo humano a bajas concentraciones pero tóxico a niveles ligeramente más altos con una diferencia relativamente pequeña entre estos dos niveles. Asimismo, la toxicidad del Se depende altamente del estado de oxidación [2, 3]. En general, el Se se ha determinado por técnicas de espectrometría atómica [4-6], sin embargo, existen métodos basados en técnicas moleculares como la espectrofotometría y espectrofluorimetría, las cuales presentan una alta sensibilidad comparable con los anteriores, pero su principal ventaja es que los equipos o instrumentos utilizados son simples y económicos. Algunos métodos espectrofotométricos se basan en la formación del piaszelenol que es el producto de la reacción de Se (IV) con 3,3 diaminobenzidina (DAB) o con 1,8-diaminonaftaleno (DAN). La mayoría de estas reacciones, requieren de un largo tiempo para su obtención y el control preciso del pH, además, que los reactivos utilizados son en su mayoría carcinógenos y relativamente inestables a la luz [7, 8].

Otros métodos basados en la espectrofotometría son los métodos cinéticos, los cuales se basan en el efecto catalítico del Se (IV) en oxidaciones y/o reducciones de estructuras orgánicas. Estos métodos son bastante sensibles, selectivos y sencillos, además del empleo de equipos de bajo costo; otra ventaja son los límites de detección que por lo general son bastante bajos de 0,8 ng mL⁻¹ a 7,2 µg mL⁻¹ [9-14].

En 1988, Pal y colaboradores [15] reportaron un nuevo reactivo no fluorescente 2-(α -piridil) tioquinaldinamida (PTQA) el cual se puede emplear para la determinación fluorimétrica de Se (IV). El principio del método, es la reacción de oxidación de la especie no fluorescente PTQA catalizada por el Se (IV). La especie oxidada genera un producto intensamente fluorescente o con alta absorción en la región UV-Visible. La señal generada es proporcional a la concentración de Se (IV) presente; basado en esta reacción se han desarrollado varios métodos [15-21]. Entre los trabajos más recientes con este reactivo para Se (IV), se encuentran los descritos por Ahmed y col. [20] y Cáceres [21] entre otros.

El PTQA es una molécula orgánica que presenta numerosas insaturaciones, lo cual la hace susceptible a la oxidación de la estructura por parte de la acción de diferentes ácidos en presencia de Se (IV). En la figura 1, se muestra la reacción de oxidación del compuesto orgánico, que lleva a la formación de un equilibrio entre las estructuras I y II, este equilibrio es el responsable del cambio en el espectro de absorción o de emisión fluorescente del PTQA [15].

La molécula orgánica es oxidada a temperatura ambiente por la acción de los ácidos a una velocidad muy baja, pero la reacción es más rápida en presencia de cantidades trazas de Se (IV), ya que él mismo presenta un efecto catalítico en la oxidación del compuesto orgánico.

Se logró desarrollar un método cinético para la determinación espectrofotométrica de cantidades trazas de Se (IV) en muestras de suplementos vitamínicos, el cual resultó

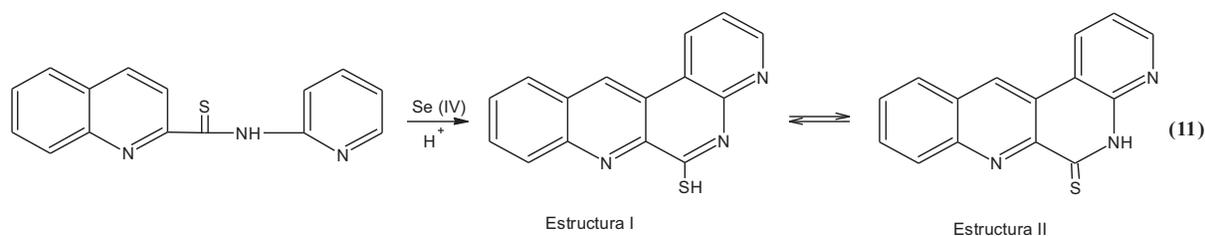


Figura 1. Proceso de oxidación del PTQA en medio ácido y en presencia de Se (IV) [11].

ser económico, rápido y simple comparado con los métodos reportados por otros autores. El método propuesto es simple, selectivo y sensible para la determinación de Se (IV), basado en la reacción de oxidación del PTQA catalizada con Se (IV) en medio ácido. El curso de la reacción y la optimización de las variables, se siguió por la detección por la espectroscopia de absorción en la región UV-Visible.

Parte experimental

Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Las soluciones madres (1000 mg L⁻¹) se prepararon a partir de sales de selenato de sodio (Na₂SeO₄) marca Fluka 98% y selenito de sodio (Na₂SeO₃) marca BDH 99% de pureza, disolviendo 0,1172 g y 0,1073 g en 50 mL de agua destilada, respectivamente.

Se preparó una solución de PTQA disolviendo 0,0133 g en 10 mL de alcohol (metanol marca B&J ACS, etanol absoluto marca Riedel de Haën, isopropanol marca J.T. Baker) para la preparación de la mezcla de reacción.

Para el medio de reacción se emplearon los siguientes ácidos: ácido nítrico (HNO₃) marca Riedel de Haën 69-71% de pureza, ácido clorhídrico (HCl) marca Fisher Scientific 37% de pureza, ácido sulfúrico (H₂SO₄) marca Riedel de Haën 95-97%, ácido fosfórico (H₃PO₄) marca Merck Schuchardt 99% y ácido acético (CH₃COOH) marca EM. Mientras que para el estudio de interferencias se prepararon soluciones de diversos iones

metálicos, disolviendo una cantidad apropiada de sus sales en agua destilada y obteniendo una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de cada uno de los metales.

Equipos

Espectrofotómetro Termo-spectronic marca Genesis modelo serie 10 equipado con una celda de cuarzo de 0,5 cm y un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 11 marca Perkin Elmer con el software UV-Winlab.

Procedimiento general

En primer lugar, se estudió el espectro de absorción en la región UV-VIS para evaluar las longitudes de onda donde se observan los cambios posteriores a la oxidación. Para ello, se prepararon soluciones madres de 1000 mg L⁻¹ de Se (IV) y Se (VI) en matriz ácida de HNO₃ de 0,1 M, posteriormente se les realizaron diluciones apropiadas para la preparación de los patrones acuosos a diferentes concentraciones entre 0,4-1,2 ppm. Luego, se tomaron alícuotas de 3 mL de cada uno de los patrones y se adicionaron a cada tubo de ensayo. Seguidamente, se preparó una solución madre de 5×10⁻³ M de PTQA la cual se diluyó a 10 mL con etanol y se tomó una alícuota de 2 mL de ésta última y se mezcló con la solución de Se (IV) ó con la solución de Se (VI). Después de 5 min de transcurrido el tiempo, se midió la intensidad de la señal de la mezcla de reacción en el espectrofotómetro, se realizó un barrido espectral de 200-700 nm. De la misma forma se preparó una mezcla de reacción pero en ausencia de Se (IV). Finalmente, se evaluaron los cambios en los espectros UV-VIS.

Reducción del Se (VI) a Se (IV) para la determinación de selenio total

Para la reducción de Se (VI) a Se (IV) por calentamiento con HCl, se preparó una solución de concentración conocida de Se (VI) a partir de la solución madre de 1000 mg L^{-1} , posteriormente, se adicionó una cantidad apropiada de HCl concentrado y se aforó hasta 10 mL con agua destilada, para obtener una solución final de HCl de 6 M. Seguidamente, se transfirió a un vial de reacción para colocarlo en un baño de calentamiento, por un período de 60 min a 85°C . Luego del tratamiento de reducción, se diluyó 100 veces la solución, de modo que la alta concentración de HCl (0,06 M) no interfiera en la reacción de oxidación del PTQA. Estas soluciones diluidas, se llevaron a la concentración óptima de H_2SO_4 (0,01 M), y se midieron en el espectrofotómetro. La solución de referencia fue una solución de Se (IV) de concentración conocida, la cual se trató bajo las mismas condiciones de la solución reducida de Se (VI) y finalmente estas se les midió el espectro de absorción siguiendo el procedimiento general.

Análisis de las muestras reales

Para la determinación de Se en las muestras de suplementos vitamínicos, se tomaron tres tabletas con un contenido de

Se entre 50-200 μg (tabla 1), se trituraron finamente y se adicionó a cada una 5 mL de HNO_3 . Posteriormente, las muestras se colocaron en una plancha de calentamiento para la digestión por calentamiento convencional, en donde las mismas se evaporaron hasta casi sequedad. El residuo se lavó con 5 mL de 0,5 M de H_2SO_4 . Seguidamente, las mezclas se centrifugaron para remover algún precipitado y el sobrenadante se diluyó a 50 mL con agua destilada. Una cantidad apropiada de cada una de las soluciones se midieron por UV-VIS siguiendo el procedimiento general.

Los resultados se compararon con un trabajo anterior [21] en el cual se analizaron las mismas muestras.

Resultados y discusión

Estudio del cambio espectral del PTQA oxidado

A diferencia de los estudios reportados previamente con PTQA (15-20), este método se basa en la medición de la absorbancia en la región UV-Visible en lugar de la fluorescencia. Inicialmente se llevó a cabo un estudio preliminar que permitió seleccionar las longitudes de onda a estudiar, es decir, puntos en una región del espectro de absorción que permitieron evidenciar la formación del

Tabla 1
Contenido de selenio y composición mineral de los suplementos vitamínicos analizados por el método propuesto

Muestra	Composición	Concentración de Se esperada en 50 mL
1	Celulosa microcristalina, fosfato de calcio, sulfato de calcio, levadura de selenio (fuente de Se) 50 μg , ácido esteárico (fuente vegetal), dióxido de silicón coloidal	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$
2	Fosfato de calcio, celulosa microcristalina, L-selenometionina (200 $\mu\text{g Se}$), estereato de magnesio (fuente vegetal), ácido esteárico (fuente vegetal).	4000 $\mu\text{g L}^{-1}$
3	Se 50 μg , Fosfato de calcio, celulosa (origen vegetal), ácido esteárico (origen vegetal), sílica, estereato de magnesio (origen vegetal).	500 $\mu\text{g L}^{-1}$

producto de la reacción catalizada por el Se (IV). En la figura 2 se compara el espectro del PTQA en medio ácido (C), con las soluciones en las cuales están presente $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ Se (IV) (A) y $0,72 \text{ mg L}^{-1}$ Se (IV) (B). Puede verse claramente que en presencia de Se (IV) se da un desplazamiento del máximo observado a 325 nm para el PTQA, pues la especie oxidada tiene una banda con un máximo a 344 nm y dos inflexiones a 353 nm y 361 nm , por lo que se consideraron estas longitudes de onda antes mencionadas como los puntos adecuados para los estudios siguientes en el desarrollo del método de cuantificación de Se (IV). Por otro lado, para verificar si el Se (VI) cataliza la reacción se realizó un barrido espectral a las mismas condiciones anteriores pero con el cambio del Se (IV) por Se (VI) y en este caso no se observó cambio alguno en el espectro original de la solución de PTQA con lo que se comprueba que el Se (VI) no tiene influencia en la reacción de oxidación, lo que implica que el método desarrollado es selectivo al Se (IV) en presencia del Se (VI).

Optimización de las variables de reacción

Se optimizaron las condiciones de reacción para la determinación espectrofotométrica en donde se midió el producto de oxidación del PTQA catalizada por Se (IV) en medio ácido, variando diversos parámetros tales como: tiempo de reacción, temperatura, solventes, ácidos, concentración de PTQA y Se (IV) y su relación molar. Para este fin se empleó el método univariante.

Tiempo de reacción. Para este estudio se trabajó con una solución de $0,72 \text{ mg L}^{-1}$ Se (IV) en $0,1 \text{ M HNO}_3$ con una solución de PTQA de $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ en isopropanol. La señal se midió a 344 nm a intervalos de 5 minutos hasta completar los 100 minutos. En la figura 3, se observó un incremento en la absorción por parte de la mezcla de reacción catalizada con Se (IV) (A) durante los primeros 5 minutos, luego se mantuvo prácticamente constante hasta los 100 minutos. Mientras

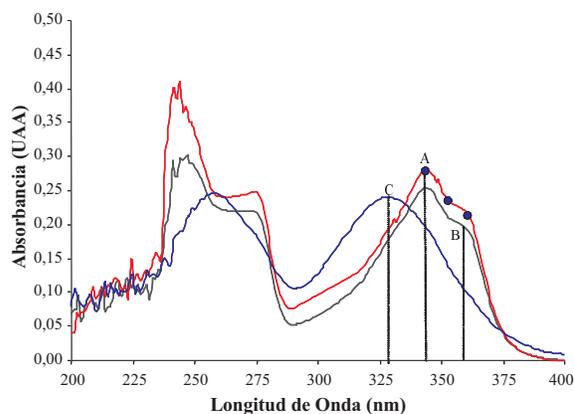


Figura 2. Espectro de absorción de la mezcla de reacción. A) En presencia $0,24 \text{ mg Se (IV) L}^{-1}$ en ácido nítrico, B) $0,72 \text{ mg Se (IV) L}^{-1}$ en ácido nítrico y C) En ausencia de Se (IV) en ácido nítrico. Condiciones de reacción: tiempo de reacción 30 minutos; temperatura 25°C ; concentración de la solución de PTQA $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ en Isopropanol, $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,72 \text{ mg L}^{-1}$ Se (IV) en ácido nítrico $0,1 \text{ M}$.

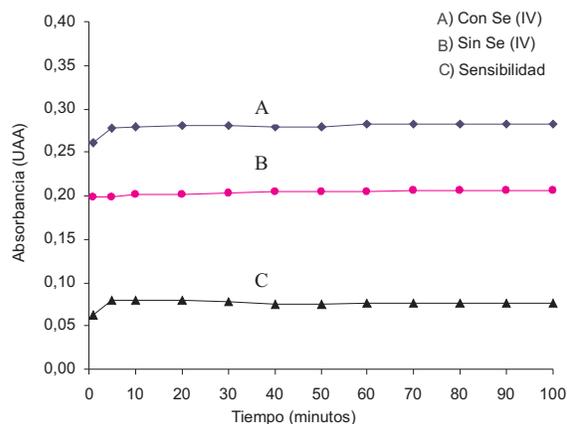


Figura 3. Efecto del tiempo de reacción en la oxidación del PTQA a 344 nm . A) Mezcla de reacción en presencia de Se (IV), B) Mezcla de reacción en ausencia de Se (IV) y C) Sensibilidad. Condiciones de reacción: temperatura 25°C ; [PTQA] $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ en Isopropanol; Concentración de Se (IV) $0,72 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{HNO}_3]$ $0,1 \text{ M}$.

que en la mezcla de reacción en ausencia de Se (IV) (B), el aumento de la intensidad de la señal es muy pequeño, de hecho, después de 70 minutos existe un diferencial entre la intensidad inicial y la registrada (ΔI) de 0,207 UAA, lo que corrobora el efecto catalítico de Se (IV) sobre esta reacción. Según Gurkan y colaboradores [22] establece que la sensibilidad (C en la figura 3), se define como la diferencia en la intensidad de absorción entre la reacción catalizada con Se (IV) y el blanco (A-B). En la curva C se ve con claridad que la mayor sensibilidad se encuentra a los 5 min. Es por ello, que se seleccionó como el tiempo óptimo para el resto de los estudios. La mezcla de reacción mostró ser estable por 22 horas.

Influencia de la temperatura. El efecto del incremento de la temperatura sobre la reacción en presencia y/o ausencia de Se (IV) es inverso, pues mientras que en la solución sin Se (IV) se observó un ligero incremento con la temperatura, contrariamente para la solución con Se (IV) se da una pequeña disminución de la señal, este efecto puede deberse a que en presencia de Se (IV) se completa la reacción a temperatura ambiente y el incremento de la temperatura puede dar lugar a la descomposición del producto de oxidación esperado. Por ello 25°C se seleccionó para los siguientes estudios.

Selección del solvente. Para la preparación de la disolución del PTQA y debido a su insolubilidad en agua, los alcoholes se presentaron como una alternativa para disolver este compuesto. Al estudiar la solubilidad (S) del PTQA en tres alcoholes, la misma mostró ser $S_{\text{etanol}} = S_{2\text{-propanol}} \gg S_{\text{metanol}}$. Seguidamente se prepararon soluciones de PTQA 5×10^{-5} M en metanol (MeOH), etanol (EtOH) y 2-propanol (IsOH); al comparar los ΔI entre el blanco y la reacción con Se (IV) se obtuvieron los siguientes valores de señal neta (ΔI) 0,055, 0,062 y 0,061, en MeOH, EtOH, y IsOH, respectivamente. Ya que ΔI es ligeramente mayor en el EtOH, se escogió como el solvente adecuado para el método desarrollado.

Influencia del ácido. Debido que la oxidación del PTQA es causada por la presencia del ácido y catalizada por el Se (IV), se procedió a comparar el efecto de diferentes ácidos en el sistema de reacción. Los ácidos: nítrico (HNO_3), sulfúrico (H_2SO_4), fosfórico (H_3PO_4), clorhídrico (HCl) y acético (CH_3COOH) se emplearon para estudiar el efecto de los mismos en la oxidación, el cual se midió por el incremento de la absorción en la región del espectro UV-Vis seleccionada previamente. El orden en el incremento de la intensidad de absorción para los cinco ácidos es el siguiente: $\text{HNO}_3 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{HCl} > \text{H}_3\text{PO}_4 \gg \text{CH}_3\text{COOH}$. Este orden puede atribuirse al alto poder oxidante del ácido nítrico y del sulfúrico. No obstante, el uso de un agente oxidante poderoso como el HNO_3 es de esperarse que genere una gran conversión a la forma oxidada del PTQA y por ende una mayor intensidad en la absorción. A pesar que el HNO_3 presentó una mayor señal comparado con el H_2SO_4 , el HNO_3 generó un rango dinámico lineal más estrecho lo cual no es adecuado al momento de realizar la cuantificación. Por esta razón, se seleccionó el H_2SO_4 como el agente oxidante más adecuado. Una vez seleccionado el agente oxidante se procedió a la optimización de la concentración de H_2SO_4 para la generación de la señal. Los resultados obtenidos se representan en la figura 4, se observa que la señal se incrementa a 0,2 M de H_2SO_4 . A partir de este punto, el comportamiento para ambas reacciones se hace relativamente constante, lo cual se atribuye a que todo el PTQA ha reaccionado completamente. Sin embargo, a esta concentración se presentó una baja sensibilidad (C en la figura 4). Es por ello, que se necesitó estudiar concentraciones más bajas para observar una mayor diferencia entre la reacción de oxidación catalizada con Se (IV) y el blanco. En este caso, la curva de sensibilidad mostró un máximo a 0,01 M de H_2SO_4 , por ello se seleccionó como la concentración óptima del ácido.

Concentración de PTQA. En función de incrementar la sensibilidad, se emplea-

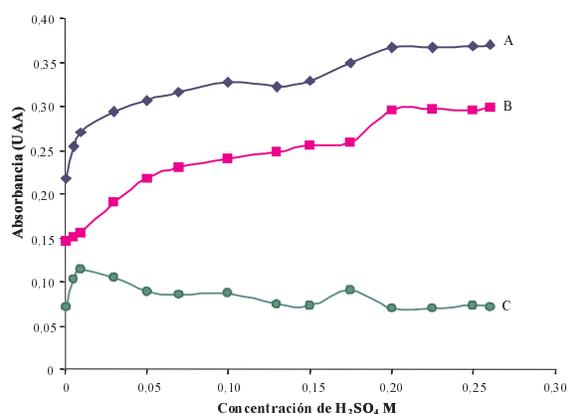


Figura 4. Optimización de la concentración de ácido sulfúrico a 344 nm. A) En presencia de Se (IV), B) En ausencia de Se (IV) y C) Sensibilidad. Condiciones de reacción tiempo de reacción: 5 min; temperatura: 25°C; Concentración de la solución de PTQA 2×10^{-5} M en etanol; 0,72 mg Se (IV) L⁻¹ en H₂SO₄.

ron diferentes concentraciones de la solución de PTQA en el rango de 6×10^{-6} - $1,2 \times 10^{-4}$ M, los resultados mostraron que ambas reacciones se incrementan rápidamente a medida que aumenta la concentración de PTQA. Sin embargo, a concentraciones más altas de aproximadamente 8×10^{-5} M, la sensibilidad comienza a reducirse lentamente. Asimismo, las diferencias en absorción para ambas reacciones disminuyen debido a que la absorción del compuesto orgánico presenta un alto coeficiente de absorción molar. Por esta razón, se seleccionó 8×10^{-5} M como la concentración adecuada para el método propuesto.

Por otro lado, se evaluó la relación molar del PTQA y el Se (IV), para ello se mantuvo constante la concentración de PTQA a 8×10^{-5} M y se varió la concentración de Se (IV). La relación que mostró mayor intensidad fue $2,13 \times 10^2$ [Se (IV)]/ [PTQA], después la señal se mantuvo constante, lo cual puede atribuirse a la completa oxidación del PTQA.

Estudio de iones interferentes en la reacción de oxidación del PTQA en presencia de Se (IV)

Se estudió la influencia en la reacción, de una variedad de especies catiónicas y aniónicas bajo las condiciones óptimas. Diferentes concentraciones de cada uno de los iones interferentes como: SO₄⁻², Cl⁻, Br⁻, I⁻, NH₄⁺, Ca (II), Ba (II), Cu (II), Co (II), V (V), Fe (III), Fe (II), Cr (VI), Ni (II), Zn (II), Mg (II), Al (III), Citrato y EDTA cada una de estas especies se adicionó separadamente a la mezcla de reacción. La concentración de los iones interferentes se redujeron hasta alcanzar un error por debajo de $\pm 5\%$ en la determinación de $0,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se (IV). El límite de tolerancia (LT), se define como la concentración máxima en donde los iones metálicos no interfieren en la reacción. Los efectos de interferencias primeramente se evaluaron empleando una solución madre de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada una de las especies interferentes. Al observar interferencias, la concentración de la especie interferente, se redujo al límite de tolerancia o concentración máxima permisible. El LT se estableció como la relación $C_{\text{ion}}/C_{\text{Se (IV)}}$, en donde C_{ion} es la concentración del ion y $C_{\text{Se (IV)}}$ es la concentración del selenito. En el caso del citrato el límite de tolerancia fue mayor a los arrojados por los otros iones con $1389 \mu\text{g mL}^{-1}$, por lo cual se puede decir que su efecto interferente es muy bajo o prácticamente nulo; en la tabla 2 se muestran los resultados encontrados en este estudio. Se observó que la mayoría de las interferencias significativas se debieron a cationes de metales como Fe (II) y especies oxidantes como CrO₄⁻², MnO₄⁻¹. Los efectos de las interferencias de los cationes de metales como Fe (II) se eliminaron agregando 0,1 mL de la solución de citrato al 5% (p/v) como un reactivo enmascarante, ya que este no enmascara al Se (IV) a diferencia del EDTA. Aplicando el agente enmascarante adecuado los límites de tolerancia para los cationes individuales son considerablemente mejorados, a excepción de las especies oxidantes como: Cr (VI) y Mn (VII), donde no se logró el enmascaramiento, es decir, que al

Tabla 2
Efectos de iones interferentes en la determinación de 0,72 $\mu\text{g Se (IV) mL}^{-1}$ bajo las condiciones óptimas

Iones Interferentes [C ⁺ o A ⁻]	Límites de Tolerancia $C_{\text{ion}} / C_{\text{Se (IV)}}$	Concentraciones máximas permisibles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Citrato	1389	1000
EDTA	694	500
SO ₄ ⁻²	139	100
Ca (II), Ba (II)	139	100
Cl ⁻ , Br ⁻	139	100
Cu (II), Co (II), I ⁻	69	50
NH ₄ ⁺	139	100
V (V)	278	200
Fe (III)	69	50
Fe (II)	< 139	< 100 ^a
Cr (VI) Mn (VII)	0,28	< 0,2
Ni (II), Zn (II), Mg (II)	69	50
Al (III)	139	100

^a Después del enmascarado con citrato (0,1 mL de 5% solución de citrato trisódico) a las condiciones óptimas.

estar presentes en la solución interfieren en la determinación. Estos resultados concuerdan en gran medida por lo reportado por Pal y col. [15]

Obtención de la curva de calibración. Escogidas las condiciones óptimas para el método se procedió a la preparación de las curvas de calibración las cuales se midieron a cada una de las tres longitudes de onda seleccionadas previamente. La concentración de Se (IV) se varió en un rango de 0,18 hasta 2,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En las curvas se observaron dos aspectos importantes, primero la pendiente de la recta en la ecuación de cada curva de calibración, la cual varía considerablemente de una longitud de onda a otra y está relacionada directamente a la sensibilidad del método. Segundo, el coeficiente de correlación lineal para las tres longitudes de onda fue muy cercano a la unidad, lo cual es adecuado a la hora de la cuantificación de la especie en estudio. Al comparar las curvas de calibración a las tres

longitudes de onda seleccionadas y tomando en cuenta consideraciones tales como: la mayor diferencia entre el máximo de la mezcla de reacción sin catalizador y el incremento de la sensibilidad, la longitud de onda óptima para la cuantificación del analito de interés según los criterios expuestos anteriormente fue 361 nm, ya que esta mostró buenos resultados en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad, permitiendo observar una mayor diferenciación ΔI entre la mezcla de reacción catalizada con Se (IV) y el blanco.

El límite de detección (LD), establecido como la concentración mínima detectada por el instrumento y definido como tres veces la desviación estándar del blanco (con $n = 10$) entre la pendiente de la curva de calibración, arrojó un valor de 0,0542 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el cual puede compararse con otros estudios reportados para la determinación de Se (IV) [21]. Además, se estableció el límite de cuantificación como la mínima cantidad de anali-

to capaz de ser determinada por un método analítico con una precisión y exactitud aceptable, definido como 10 veces la desviación estándar del blanco (con $n = 10$) entre la pendiente de la curva de calibración, que se observó a través del valor más bajo del rango dinámico lineal que es lo suficientemente amplio para la cuantificación de las muestras de suplementos vitamínicos ($0,18-2,16 \mu\text{g Se (IV) mL}^{-1}$), con una sensibilidad de $0,1868$.

Aplicación del método desarrollado a muestras reales

Estudios para la reducción del Se (VI) por efecto del HCl con calentamiento convencional. Para la aplicación del método a las muestras reales se requiere de un pre-tratamiento, una primera etapa de oxidación para transformar todo el Se (-II) a Se (VI) y finalmente la reducción a Se (IV), ya que el Se (VI) como se discutió previamente no cataliza la reacción de oxidación, es por ello, que la especie requiere una reducción previa para la aplicación del método propuesto. Previo al análisis de las muestras reales, se realizaron estudios preliminares para la reducción del Se (VI) a Se (IV) por calentamiento con ácido clorhídrico empleando diferentes temperaturas entre 70 a 90°C . Se observó que cuando aumenta la temperatura el porcentaje de conversión se incrementa de manera considerable, alcanzando un máximo de 77% de conversión a 85°C al calentar por 30 minutos. A temperaturas superiores se mantuvo constante la conversión. Seguidamente, se evaluó el tiempo y al calentar por 60 minutos a la misma temperatura se logró la completa conversión del Se (VI) a Se (IV).

En tal sentido, buenos porcentajes de reducción se obtienen cuando una solución de $120 \mu\text{g Se (VI) mL}^{-1}$ es calentada en HCl 6 M por 1 hora a 85°C . Cuando se emplea HCl para la reducción de Se (VI) el ión cloruro al oxidarse genera un par de electrones que provoca la reducción del selenato a selenito [4, 23]. En tal sentido, las muestras requie-

ren de un pre-tratamiento normalmente una etapa de oxidación para transformar el Se (-II) a Se (VI) y finalmente reducirlo a Se (IV). Es por ello, que el proceso de tratamiento de la muestra es determinante en la exactitud del método.

Digestión de la muestra. Para evaluar la efectividad del método propuesto, en primer lugar se necesitó seleccionar el sistema de digestión adecuado que permita la completa mineralización de las muestras. El procedimiento de digestión es mostrado en la parte experimental. Estudios preliminares mostraron que antes del proceso de digestión es conveniente la pulverización completa de la tableta, para generar una homogeneidad total de la solución durante el proceso de digestión, de lo contrario se tendrían bajos porcentajes de recuperación. Una vez pulverizadas las tabletas (muestra 1, 2, y 3) se digirieron en HNO_3 y en una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. Para las muestras 1 y 3 se lograron altos rendimientos $97,50 \pm 1,20$ y $99,20 \pm 4,52$, respectivamente, al emplear HNO_3 ; estos valores son mayores que los encontrados con la mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, donde el porcentaje fue de $87,20 \pm 1,10$ y $98,00 \pm 8,90$, para las muestras 1 y 3, respectivamente. Sin embargo, para la muestra 2, en las mismas condiciones, se obtuvo un bajo rendimiento ($72,80 \pm 0,90$) empleando HNO_3 pero contrariamente a las dos muestras anteriores el valor que se obtuvo en la mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ fue mayor ($92,00 \pm 2,50$). Este resultado podría explicarse debido a la composición de la muestra, la cual presenta un alto contenido de Se en la forma de L-selenometionina, este compuesto orgánico produce una reacción fuerte bajo las condiciones de digestión, en donde, parte del Se puede perderse a causa de la volatilización o por proyectarse durante su digestión. Sin embargo, cuando se empleó la mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (en la muestra 2), el porcentaje de recuperación se incrementa como consecuencia del alto poder oxidante-residual de la mezcla. Los resultados muestran que el Se orgánico (-II) puede transformarse

y reducirse cuantitativamente a Se (IV), a causa del posible efecto oxidante-residual de la mezcla que puede eliminar la matriz orgánica [10].

Por consiguiente, los porcentajes de recuperación más altos se obtienen con el tratamiento de digestión con HNO_3 para las muestras 1 y 3; además de lograr una mejor reproducibilidad de los resultados. Es por ello, que se seleccionó como la solución de digestión para el estudio de exactitud del método propuesto.

Los resultados se resumen en la tabla 3, el valor es la media de la concentración encontrada para cada muestra por triplicado y la desviación estándar de los mismos, así como el coeficiente de variación, los errores absolutos y relativos, esto con la finalidad de verificar la precisión del método propuesto.

Las muestras de suplementos vitamínicos presentaron una buena precisión, ya que la desviación estándar, el coeficiente de variación y los errores absolutos y relativos no son superiores al 5%, a excepción de la muestra 2, la cual es mayor a este valor. Esto se atribuye como se mencionó anteriormente, a la composición de la muestra, la cual posee un alto contenido de Se orgánico que produce una reacción fuerte durante el proceso de digestión generando pérdidas del analito por volatilización.

Para validar los resultados arrojados por el método cinético desarrollado, los valores obtenidos se compararon con los valores encontrados para las mismas muestras empleando la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [21]. El valor reportado por la técnica de ICP-MS para la muestra 1 fue de $50,51 \pm 1,60 \mu\text{g Se/tableta}$ mientras que con el método cinético fue de $48,80 \pm 0,60 \mu\text{g Se/tableta}$ y el valor reportado por el fabricante fue de $50,00 \mu\text{g Se/tableta}$. Los resultados muestran la similitud de los valores obtenidos con los reportados previamente. Para observar si existen diferencias significativas entre el método desarrollado y el de referencia, se realizaron las pruebas estadísticas para comprobar la veracidad de los resultados. Los resultados arrojados de las pruebas de significancia aplicando el paquete estadístico statistix [24] para **t** y **F** son de 1,45 y 3,98, respectivamente. En primer lugar, se realizó una prueba F en donde se compararon las varianzas de los resultados arrojados. Como el método de referencia presenta una varianza significativamente mayor a la encontrada por el método propuesto y debido a que el valor estadístico F está asociado a un valor de probabilidad mayor a 0,05, indica que no existen diferencias significativas entre las dos varianzas a este nivel de probabilidad, por lo tanto, la hipótesis nula es aceptada.

Tabla 3

Media, desviación estándar, coeficiente de variación y errores de los resultados obtenidos de las tres muestras de suplementos vitamínicos

Muestra	$\mu\text{g Se}$ esperado ¹	$\mu\text{g Se}$ encontrado ² $X \pm \text{DS}$	$\mu\text{g Se}$ reportado ³ $X \pm \text{DS}$	% CV	Ea	Er
1	50	$48,80 \pm 0,59^a$	$50,51 \pm 1,60^a$	1,21	1,24	2,48
2	200	$147,70 \pm 1,73^b$	$152,30 \pm 4,20^b$	1,17	52,66	26,33
3	50	$49,63 \pm 2,26$	-	4,56	0,36	0,76

¹ $\mu\text{g Se}$ establecido por el fabricante.

² $\mu\text{g Se (IV)}$ determinados experimentalmente con el método desarrollado. Medidas de desviaciones estándar para $n=3$.

³ $\mu\text{g Se (IV)}$ determinados por el método reportado ICP-MS (21). Medidas de desviaciones estándar para $n=3$.

^{a, b} Letras iguales en la misma línea indican que no existen diferencias significativas.

Se aplicó la prueba t con la finalidad de comprobar si existen diferencias entre las medias arrojadas por el método propuesto y el método de referencia. En donde se compararon las cantidades de Se (IV) encontradas por ambos métodos. En este caso, se necesitó demostrar si las cantidades encontradas de Se (IV) difieren de forma significativa. Los resultados mostraron que el valor crítico de t para un nivel de probabilidad 0,05 es superior a 1,45. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, comprobándose con ello que no existen diferencias significativas entre las medias encontradas por ambos métodos.

Conclusión

Se logró desarrollar un método cinético para la determinación espectrofotométrica de cantidades trazas de Se (IV) en muestras de suplementos vitamínicos, el cual resultó ser económico, rápido y simple. El efecto catalítico del Se (IV) en la reacción de oxidación del PTQA es muy sensible y selectivo, sin la necesidad de extracción o calentamiento del compuesto que produce la señal a diferencia de los métodos basados en DAN. Además, el método basado en la reacción de oxidación presentó un rango dinámico lineal de 0,18-2,16 mg L⁻¹ Se (IV), el cual no involucra condiciones de reacción fuerte y es comparable a otros métodos reportados.

Las pruebas t y F comprobaron que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de referencia.

La aplicación del método desarrollado a muestras de suplementos vitamínicos permitió establecer la efectividad del mismo, las desviaciones estándar relativas son adecuadas para todos los casos, se obtuvieron DESR menores al 5 por ciento.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento otorgado a través de los pro-

yectos N° CC-926-04 y N° CC-927-04; y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) del Ministerio de Ciencia y Tecnología por el financiamiento a través del proyecto N° G-2005000428.

Referencias bibliográficas

1. BOSTA M., BLOUINC E. *J Trace Elem Med and Biol* 23: 36-42. 2009.
2. VIÑAS P., LÓPEZI., MERINO B., CAMPILLO N., HERNÁNDEZ M. *Anal Chim Acta* 535: 49-56. 2005.
3. LIANG L., MO S., ZHANG P., CAI Y., MOU S., JIANG G., WEN M. *J Chromatogr A* 1118: 139-143. 2006.
4. GALLIGNANI M., VALERO M., BRUNETTO M., BURGUERA J., BURGUERA M., PETIT DE PEÑA Y. *Talanta* 52: 1015-1024. 2000.
5. STRIPEIKIS J., PEDRO J., BONIVARDI A., TUDINO M. *Anal Chim Acta* 502: 99-105. 2004.
6. VASSILEVA E., BECKER A., BROEKAERT J. *Anal Chim Acta* 441: 135-146. 2001.
7. PEDRERO Z., MADRID Y. *Anal Chim Acta* 634: 135-152. 2009.
8. RODRÍGUEZ E., SANZ M., DIAZ C. *Anal Chem* 18: 191-195. 1999.
9. ARIKAN B., TURÇAY M., APAK R. *Anal Chim Acta* 335: 155-167. 1996.
10. ABSALAN G., SAFAVI A., MAESUM S. *Talanta* 53: 1227-1233. 2001.
11. REVANASIDDAPPA H., KIRAN T. *Anal Sci* 17: 1309-1312. 2001.
12. AFKHAMI A., MADRAKIAN T. *Talanta* 58: 311-317. 2002.
13. ENSAFI A., LEMRASKI M. *Anal Lett* 37 (12): 2469-2483. 2004.
14. GUDZENKO L., PANTALER R., BLANK A. *J Anal Chem* 59 (10): 935-938. 2004.
15. PAL B., CHAKRABARTI A., AHMED J. *Anal Chim Acta* 206: 345-349. 1988.
16. PALEOLOGOS E., LAFIS S., TZOUWARAKARAYANNI S., KARAYANNIS M. *Analyst* 123: 1005-1009. 1998.

17. PAL B., AHMED J., CHAKRABARTI K., CHAKRABORTY D. *Indian J Chem Technol* 4: 191-195. 1997.
18. PAL B., RAHMAN M. *Talanta* 48: 1075-1084. 1999.
19. PALEOLOGOS E., GIOKAS, S., TZOUWARA-KARAYANNI, S., KARAYANNIS, M. *Anal Chem* 74: 100-106. 2002.
20. AHMED M., STALIKAS C., VELTSISTAS P., TZOUWARA-KARAYANNI S. KARAYANNIS M. *Analyst* 122: 221-226. 1997.
21. CÁCERES A. The Development of Methods for determination of selenium using spectrophotometric and ICP-MS techniques. (Para obtener el título de tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Basicas (Inglaterra). 40-50. 2002.
22. GURKAN, R., AKCAY, M. *Microchim J* 75: 39-49. 2003.
23. BURGUERA J., CARRERO P., BURGUERA M., RONDON C., BRUNETTO M., GALLIGNANI M. *Spectrochim Acta B* 51: 1837-1847. 1996.
24. PAQUETE STADISTICO STATISTIX 8.0. User's statistics. Versión 2.0. USA, 2002.