

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



*Acoplamiento en línea de HPLC-Microondas-
Generación de Hidruros-Espectroscopía de Absorción
Atómica para la especiación de Selenio: Certificación
de un Material de Referencia*

Directores:

**Dra. Carmen Cámara Rica
Dra M^a Antonia Palacios Corvillo**

**M^a GLORIA COBO FERNÁNDEZ
MADRID, 1996**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

CARMEN CÁMARA RICA, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

M^a ANTONIA PALACIOS CORVILLO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado "Acoplamiento en línea de HPLC-Microondas-Generación de Hidruros-Espectroscopía de Absorción Atómica para la especiación de Selenio: Certificación de un Material de Referencia", ha sido realizado en este Departamento por D^a María Gloria Cobo Fernández, bajo nuestra dirección, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 22 Noviembre de 1995.

Fdo: Carmen Cámara



Fdo: M^a Antonia Palacios

Una Tesis no representa nunca el trabajo individual de una persona. Es siempre un trabajo en equipo. Por ello, quiero agradecer, en este apartado, a todas las personas e instituciones que de un modo u otro han contribuido a la realización y presentación de esta Memoria, a todos **MUCHAS GRACIAS** en especial:

A mis directoras ("Jefas"), M^a Antonia y Carmen, por su inestimable ayuda, enseñanzas, amistad y por saber cuando es necesario un "rapapolvo", una palmadita en la espalda o por simplemente estar ahí cuando os he necesitado. Gracias, sin vosotras no hubiera sido posible la finalización de este proyecto.

Al programa "Medidas, Ensayos y Pruebas" de la Comunidad Europea (antes BCR) por la concesión de los dos proyectos (5371/1/9/385/90/06/-BCR-E(10) y M&T1- CT930006) que han financiado y becado este trabajo. Al Dr. Philippe Quevauviller agradecerle su incondicional ayuda, apoyo y amistad.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica de esta Facultad porque, cada uno desde su sitio, han puesto a mi disposición su pequeña infraestructura.

A todos los compañeros y amigos del grupo de investigación agradecerles sus consejos, ayuda, y aliento. Sin todos vosotros, esta Memoria no hubiera llegado a buen fin. En especial, a Ana Larraya que compartió conmigo una parte de este trabajo.

Mención especial en este apartado merecen Mari Cruz, María, Mila y Yolanda porque me admitieron en su despacho (y de algún modo en su vida) y han hecho con sus consejos, risas, enfados,... más fácil y agradable la realización de esta Memoria, especialmente la última parte de la misma. A Charo, Nines y Patricia, por haber compartido conmigo trabajo e histeria.

A Mariano, porque en todos los momentos buenos y malos durante la realización de este trabajo, has estado conmigo con tu cariño, aliento, ayuda y apoyo incondicional. En este tiempo has sacrificado muchas veces "nuestro tiempo". Gracias.

Por último mi más sincero agradecimiento a mi familia porque en todo momento he sentido vuestro cariño y comprensión. A mis padres, Manolo y Gloria, por haberme hecho sentir que lo que hacía era importante. A mis hermanos, Ángel, Manolo y M^a Jesús por vuestra ayuda y enseñanzas; Manolo sin ti el ordenador es una máquina infernal. A mis sobrinos, Ángel y Alejandro por haberme devuelto la alegría de la infancia. A todos muchas gracias.

A mis padres

A Mariano

ÍNDICE

I.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	1
PARTE A. INTRODUCCIÓN.....	7
CAPÍTULO I - LOS COMPUESTOS METÁLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE.....	9
I.1.- LOS COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE.....	11
I.2.- ESPECIES INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS DEL SELENIO EN EL MEDIO AMBIENTE.....	23
I.2.1.- Generalidades.....	23
I.2.2.- Selenio en el aire, agua y suelo.....	24
I.2.3.- Importancia biológica y biotransformaciones ambientales del selenio.....	28
I.2.4.- Toxicidad del selenio y sus especies.....	33
I.3.- BIBLIOGRAFÍA.....	37
CAPÍTULO II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS.....	45
II.1.- TÉCNICAS ACOPLADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES METÁLICAS EN EL MEDIO AMBIENTE.....	47
II.1.1.- Técnicas acopladas usando preconcentración en línea.....	48
II.1.2.- Generación de hidruros, atrapamiento criogénico con detectores atómicos.....	50
II.1.3.- Acoplamiento con cromatografía líquida.....	52
II.2.- MÉTODOS ANALÍTICOS Y PRINCIPALES TÉCNICAS ACOPLADAS EN LA ESPECIACIÓN DEL SELENIO.....	55
II.2.1.- Métodos fluorimétricos.....	55
II.2.2.- Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito.....	57
II.2.3.- Métodos electroquímicos.....	59
II.2.4.- Análisis por activación neutrónica.....	61
II.2.5.- Acoplamiento generación de hidruros con detectores atómicos ó másicos.....	62
II.2.6.- Cromatografía de líquidos de alta resolución	68
II.2.7.- Acoplamiento cromatografía de gases- detectores atómicos.....	73
II.3.- BIBLIOGRAFÍA.....	75

PARTE B	PARTE EXPERIMENTAL.....	81
CAPÍTULO III	- DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO.....	83
III.1.-	PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MUESTRAS.....	85
III.2.-	APARATOS Y MATERIAL UTILIZADO.....	89
III.3.-	ACOPLAMIENTOS FI-HG-AAS Y FLUJO CONTINUO HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO (SE(IV) Y SE(VI). APLICACIONES ANALÍTICAS.....	91
III.3.1.-	Antecedentes.....	91
III.3.2.-	Reducción en línea de Se(VI) a Se(IV).....	93
III.3.3.-	Optimización del sistema de generación de hidruros en continuo e inyección en flujo...	97
III.3.4.-	Características analíticas y aplicaciones....	105
III.3.5.-	Discusión de resultados.....	110
III.4.-	PRECONCENTRACIÓN DE SE(IV) Y SE(VI) EN MICROCOLUMNAS DE ALÚMINA. ACOPLAMIENTO FI-HG-AAS.....	112
III.4.1.-	Columna preconcentradora: prestaciones analíticas y estudio bibliográfico.....	112
III.4.2.-	La alúmina como soporte preconcentrador.....	113
III.4.3.-	Parámetros físico-químicos de la preconcentración-elución.....	115
III.4.4.-	Características analíticas y aplicaciones....	126
III.4.5.-	Discusión de resultados.....	130
III.5.-	BIBLIOGRAFÍA.....	131
CAPÍTULO IV.-	ACOPLAMIENTOS HPLC-HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS DE SELENIO. TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES.....	133
IV.1.-	INTRODUCCIÓN.....	135
IV.2.-	ACOPLAMIENTO HPLC-HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SE(IV) Y SE(VI).....	137
IV.2.1.-	Módulo cromatográfico: flujo y concentración del eluyente.....	137
IV.2.2.-	Parámetros analíticos óptimos y aplicaciones	142

IV.3.-	PRECONCENTRACIÓN DE SE(IV) Y SE(VI) EN MICROCOLUMNAS DE ALÚMINA Y SEPARACIÓN-DETERMINACIÓN MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO HPLC-HG-AAS.....	143
IV.3.1.-	Características analíticas y aplicaciones...	144
IV.4.-	DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES ORGANOMETÁLICAS DEL SELENIO: TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES.....	148
IV.4.1.-	Formación del H ₂ Se a partir de TMeSe....	148
IV.4.2.-	Formación del H ₂ Se a partir de SeCys y SeMet.....	154
IV.4.3.-	Características analíticas y aplicaciones....	157
IV.4.4.-	Discusión de resultados.....	158
IV.5.-	ACOPLAMIENTO DEL MÓDULO DE TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES AL SISTEMA HPLC-MO-HG-AAS. Aplicación a la determinación en línea de TMeSe, Se(IV) y Se(VI).....	159
IV.5.1.-	Características analíticas y aplicaciones....	159
IV.5.2.-	Discusión de resultados.....	163
IV.6.-	BIBLIOGRAFÍA.....	164
PARTE C.	ESTUDIOS ENCAMINADOS A LA PREPARACIÓN DE UN CRM.....	165
CAPÍTULO V.- ESTABILIDAD DE ESPECIES.....		167
V.1.-	INTRODUCCIÓN: INESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DEL SELENIO EN MEDIOS ACUOSOS.....	169
V.2.-	EFFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN LA ESTABILIDAD. INFLUENCIA DEL PH, CONTENEDOR, TEMPERATURA Y Cl ⁻	171
V.2.1.-	Preparación de muestras.....	172
V.2.2.-	Protocolo de tratamiento estadístico.....	172
V.2.3.-	Procedimientos operatorios y resultados obtenidos.....	175
V.2.4.-	Conclusiones.....	188
V.3.-	BIBLIOGRAFÍA.....	189
CAPÍTULO VI - PREPARACIÓN DE UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO.....		191
VI.1.-	EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN.....	193
VI.1.1.-	Preparación de muestras para un ejercicio de intercomparación.....	194

Índice

VI.1.2.-	Participantes y técnicas analíticas usadas.....	194
VI.1.3.-	Resultados y discusión.....	200
VI.2.-	EJERCICIO DE CERTIFICACIÓN.....	215
VI.2.A.-	Preparación de muestras para un estudio de certificación.....	215
VI.2.2.-	Participantes y técnicas analíticas usadas.....	216
VI.2.3.-	Resultados y discusión.....	222
VI.3.-	CONCLUSIONES.....	249
PARTE D.	CONCLUSIONES.....	253
ANEXO.....		257

OBJETO DEL TRABAJO

I.- OBJETIVOS DEL TRABAJO Y PLAN DESARROLLADO.

En las últimas décadas, se ha demostrado claramente que muchos elementos traza que se consideraban esenciales en la nutrición humana y animal, juegan un papel crucial en los procesos metabólicos. Al mismo tiempo, también han quedado patentes los efectos adversos producidos por la exposición acumulativa a los metales pesados, en pequeñas cantidades, y a los elementos esenciales en cantidades superiores.

Simultáneamente, los grandes avances en la tecnología analítica han ayudado a reconocer la presencia de estos elementos en los organismos vivos, en la cadena alimentaria y a entender su papel en la salud y en la enfermedad.

Uno de los elementos más estudiados desde los tres puntos de vista mencionados ha sido el selenio.

La toxicidad del selenio, elemento esencial y componente fundamental de la enzima, "glutathiona peroxidasa", que previene a las células del efecto nocivo producido por los radicales peróxido, esta fuertemente influenciada por la especie química bajo la que se encuentra. Las especies químicas más caracterizadas en los organismos vivos y en el medio ambiente son: el selenito (Se(IV)), seleniato (Se(VI)), dimetilselenio (DMeSe), dimetildiselenio (DMeDSe),

Objeto del trabajo

selenocistina (SeCys), selenometionina (SeMet) y trimetilselenio (TMeSe). Selenito y seleniato se encuentran fundamentalmente en aguas y sedimentos. Dimetilselenio y dimetildiselenio pueden encontrarse adsorbidos en sedimentos de lagos y suelos y debido a su gran volatilidad, aparecen en las atmósferas de lagos y océanos próximos a las costas.

Finalmente, la presencia de selenocisteína, selenometionina, trimetilselenio y otros compuestos orgánicos del selenio (adenosinfosfoseniato, selenoadenosil metionina, etc...) se asocia a microorganismos vivos, levaduras (*saccharomyces cerevisae*) y aunque sus posibles efectos tóxicos están en controversia, parece que algunas especies poseen una toxicidad similar a la del selenio inorgánico.

La diferente toxicidad de las especies hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación individualizada de cada una de ellas, sin embargo, existen grandes dificultades para abordar el problema de la especiación del selenio. La técnica de generación del hidruro de selenio y su posterior introducción en un detector atómico ó másico, proporciona los mejores límites de detección, por lo que es muy empleada en análisis medioambiental, sin embargo posee dos importantes limitaciones. Por una parte, sólo es posible generar el hidruro de selenio a partir de la forma química de Se(IV), lo

que implica la transformación de las distintas especies a esta forma inorgánica antes de la determinación. Otro de los inconvenientes de los detectores atómicos ó másicos es que al ser una técnica de análisis elemental, es necesario separar las distintas especies previamente a su determinación.

Un problema importante en el campo de la especiación es la falta de datos o existencia de contradicciones sobre la estabilidad de las especies en muestras medioambientales: aire, agua ó suelos. La falta de patrones certificados en las distintas especies para poder establecer métodos analíticos fiables, es otro grave inconveniente.

Con estos precedentes, el objeto del trabajo llevado a cabo ha tenido dos vertientes claramente diferenciadas. La primera de ellas consiste en la puesta a punto de métodos analíticos que permitan la determinación diferenciada de las especies más frecuentes del selenio, tanto inorgánicas como orgánicas, en matrices medioambientales. La segunda vertiente ha sido la aplicación de algunos de estos métodos establecidos a la certificación de un patrón de referencia.

Para la determinación diferenciada de las especies inorgánicas (Se(IV) y Se(VI)) se ha abordado la prereducción en línea del Se(VI) a Se(IV), para su posterior determinación por HG-AAS. La ventaja de poner a punto un sistema de prereducción en línea estriba en que se evitan los problemas

Objeto del trabajo

de la reducción en discontinuo, tales como pérdidas del elemento por volatilización y con frecuencia, condiciones no reproducibles de reducción.

Ocurre con frecuencia que los límites de detección de las técnicas más sensibles, se encuentra generalmente uno ó dos órdenes de magnitud por encima de las concentraciones reales de las especies en las muestras medioambientales, por lo que en la aplicación de los métodos analíticos se trabaja con muestras reales a las que se le adiciona la especie a determinar. Esto con frecuencia, conlleva a errores en la determinación debido al hecho que las especies adicionadas poseen un comportamiento diferente al de las especies originalmente presentes en la muestra. Para obviar esta limitación se ha abordado el problema de la preconcentración de las especies inorgánicas de selenio (Se(IV) y Se(VI)) en microcolumnas de alúmina.

Si se realiza un estudio de la bibliografía actual, se observa que la mayoría de los métodos analíticos para la determinación Se(VI), lo hacen por diferencia entre el contenido en selenio inorgánico total y el Se(IV). Este hecho se debe a la dificultad de encontrar reacciones selectivas para este grado de oxidación. La determinación diferenciada de Se(IV), Se(VI) y del catión trimetilselenio se ha abordado mediante el acoplamiento de un sistema HPLC (con columna de intercambio aniónico) con la técnica de detección atómica con

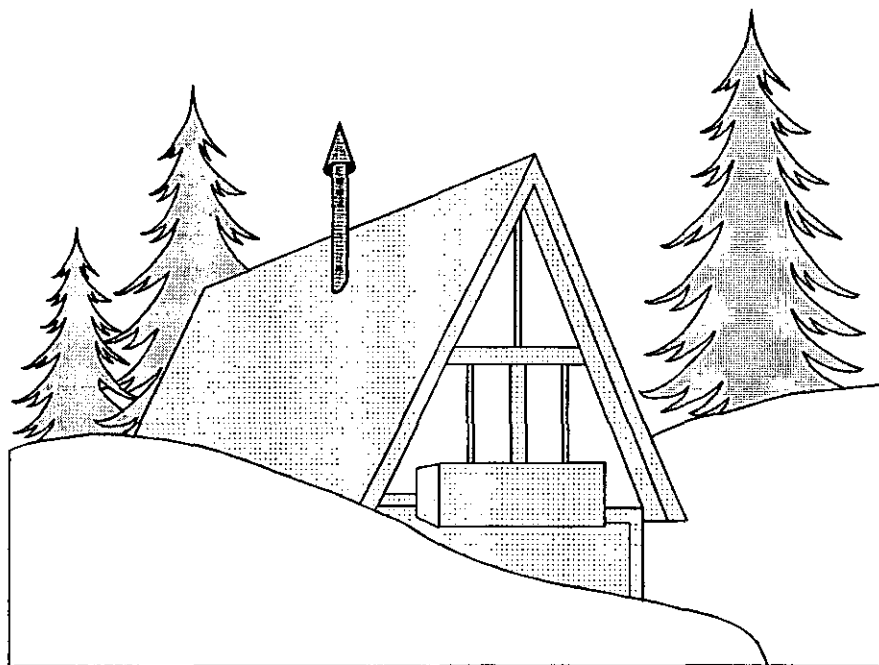
generación de hidruros (HG-AAS). La interfase entre el sistema HPLC y la generación de hidruros es un horno microondas donde se produce la oxidación y posterior reducción de las especies a la forma de Se(IV). Aparte de la determinación diferenciada del Se(VI), el método posee la ventaja de poder determinar conjuntamente formas orgánicas e inorgánicas del selenio.

Una vez establecidos los métodos analíticos, se ha abordado el problema de la preparación de dos materiales de referencia certificados en disolución acuosa que contienen Se(IV) y Se(VI). Para ello se estudió previamente el efecto de los distintos parámetros físico-químicos que pueden afectar a la estabilidad de dichas especies. Estos parámetros han sido: tipo de contenedor, pH, temperatura de almacenamiento y matriz de estabilización. La organización de un ejercicio de intercomparación entre 18 laboratorios de 8 países europeos y el posterior ejercicio de certificación entre 20 laboratorios de 8 países europeos, se han realizado con el patrocinio de "Standards, Measurements and Testing Programme (antes Community Bureau of Reference-BCR)" de la Unión Europea.



PARTE A

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO I

LOS COMPUESTOS METÁLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE

CAPÍTULO I - LOS COMPUESTOS METÁLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE.

- I.1.- Los compuestos organometálicos en el medio ambiente.
- I.2.- Especies inorgánicas y orgánicas del selenio en el medio ambiente.
 - I.2.1.-Generalidades.
 - I.2.2.-Selenio en el aire, agua y suelo.
 - I.2.3.-Importancia biológica y biotransformaciones ambientales del selenio.
 - I.2.4.-Toxicidad del selenio y sus especies.
- I.3.- Bibliografía.

I.1. COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE.

Las especies organometálicas se encuentran en el medio ambiente, bien porque se forman a partir de los metales ó por la actividad agrícola ó industrial [Craig, 1986a]. En los últimos tiempos estos compuestos han sido utilizados en la industria (aditivos, catalizadores, estabilizantes...) y por tanto hoy en día su proporción en el medio ambiente ha aumentado considerablemente. Estos compuestos están presentes bien en la forma en que se han vertido al medio ambiente ó como productos de distintas transformaciones químicas o biológicas (degradaciones, alquilaciones...) llegando incluso a sus formas metálicas [Thayer, 1993]. Las formaciones y degradaciones de especies organometálicas en el medio ambiente pueden modificar tanto las propiedades físicas y químicas como las toxicológicas de los elementos.

En general, las formas organometálicas son más tóxicas que las inorgánicas, salvo para algunos compuestos de arsénico, selenio y antimonio. La mayor toxicidad de los compuestos organometálicos se debe a su mayor solubilidad en los tejidos lipídicos y a su mayor facilidad para atravesar las membranas biológicas, aumentando la posibilidad de la bioacumulación. Esto hace que la concentración de formas alquiladas aumente rápidamente a través de los diferentes eslabones de la cadena alimenticia (Tabla I) [Pinel et al,

Introducción.

1990].

En los últimos años ha aumentado el interés por conocer las transformaciones y cantidades de especies organometálicas en el medio ambiente. La correcta identificación y cuantificación de estas especies es de vital importancia para conocer los ciclos bioquímicos de los elementos metálicos en el medio ambiente, y el impacto de los mismos y de sus especies más frecuentes en los organismos vivos de los sistemas terrestres y acuáticos. Esto ha sido posible gracias a la evolución de la instrumentación analítica y los métodos analíticos que hoy día hacen posible la determinación cuantitativa de muy bajas concentraciones (ng g^{-1} , ng L^{-1}) de las diferentes especies presentes en la naturaleza.

En la actualidad no existe reglamentación para los valores límites de concentración de compuestos organometálicos en el medio ambiente; sin embargo está indicado en ciertas directivas europeas que estos compuestos deben ser controlados en el entorno marino y en las aguas potables. Los derivados orgánicos y las especies inorgánicas de Zn, Hg, Sn, Cu, Ni, Pb, Se, As, Sb, Mo, Ba, B, V y Co están mencionados en las directivas 76/464/EEC "pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment" y 80/68/EEC "protection of ground water against pollution caused by certain dangerous substances".

La reacción más simple que conduce a la formación de compuestos organometálicos es la metilación. Sin embargo algunos metales en el medio ambiente forman compuestos organometálicos más complejos; por ejemplo el Se y As forman compuestos organometálicos de elevado peso molecular en función de las condiciones químicas y biológicas del medio. Por otra parte los metales también pueden asociarse a proteínas y aminoácidos.

Los mecanismos de metilación para distintos elementos han sido estudiados por numerosos autores [Craig, 1986a; Rapsomanikis y Weber, 1986]. En el caso del estaño en el medio marino y estuarios esta reacción es muy importante ya que las formas metiladas pueden alcanzar entre el 60 y 90 % de la masa total del estaño presente en la fase disuelta. Las reacciones de metilación pueden conducir a especies di, tri ó tetrametiladas, que pueden dar lugar a especies volátiles que llegan a la atmósfera. Las reacciones de metilación se producen en el agua, sedimentos ó tejidos biológicos. Su cinética depende de numerosos factores: concentración de metales en el medio considerado [Xun et al, 1987], la carga en la materia orgánica [Jackson, 1988], la temperatura [Callister y Winfrey, 1986], la naturaleza de los microorganismos presentes y la cantidad de sulfuros [Compeau y Bartha, 1985].

Los fenómenos naturales de metilación no se producen únicamente a partir de las formas inorgánicas de los metales, sino que pueden ocurrir a partir de especies ya alquiladas. Así, el tributilestaño (Bu_3Sn^+), que es una forma muy tóxica del estaño, se introduce en el medio ambiente procedente de las pinturas que recubren los cascos de los barcos. Maguire (1984) ha detectado formas mixtas (metiladas y butiladas) de estaño, que son el resultado de la metilación de las formas butiladas o de sus productos de degradación.

Los elementos cuya metilación ó alquilación está más estudiada son el Sn, Hg, Pb, Cd, Te, Ge, Sb, As y Se.

Introducción.

Tabla I Abundancia relativa de las formas organometálicas en el medio ambiente acuático

Muestra	Concentración total	% Formas alquiladas	Forma química
Mercurio			
Aguas (*)			
Ríos	0.013	1	Me
Océanos	0.01-0.03	10	Me
Sedimentos (**)			
Naturales	200-400	0	
Industriales	1000-20000	1-3	Me
Otros (**)			
Pescados (ríos)	360-1000	70-95	Me
Pescados (océano)	10-15000	60-90	Me
Estaño			
Aguas (***)			
Lagos	0.009	53	Me
Estuarios	0.130-0.385	16-100	Me, Bu
Mar	0.004	60	Me
Sedimentos (**)			
Naturales	830-1235	65-75	Me
Polución	7700-25000	3-50	Me, Bu
Otros (**)			
Algas (estuario)	250-550	20-30	Me, Bu
Pescados (océano)	86-260	3-6	Me
Ostras (contaminadas)	3700	97	Bu
Plomo			
Aire (*)	n.d.	0.3-22	Et, EtMe, Me
Aguas (*)			
Lluvia	130-280	<1	Et, EtMe, Me
Lixiviación	8	<1	Et, EtMe, Me
Otros (**)			
Pescados	n.d	10-90	Et
Arsénico			
Aguas (*)			
Lagos	60	16	Me
Océano	1.7-1.9	7-10	Me
Otros (**)			
Algas	33000-57600	1-18	Me
Fitoplancton	2000-3400	22-37	Me

(*) $\mu\text{g L}^{-1}$
 (**) ng g^{-1}

(***) ng L^{-1}
 Me: metilo

Et: etilo
 Bu: butilo

Los compuestos del estaño han comenzado a estudiarse a raíz de distintas catástrofes ecológicas, principalmente en Francia, producidas por el uso de tributilestaño (Bu_3Sn^+) en la composición de pinturas de los barcos, que han causado la destrucción de numerosas explotaciones de ostras. Por este motivo Francia ha sido el primer país en promulgar un decreto en 1987 que prohíbe el uso de estas pinturas en los barcos costeros y en las estructuras sumergidas, en es mismo año, Gran Bretaña adoptó la misma medida seguida de Estados Unidos (1988) y Suecia (1989).

Las múltiples utilizaciones de los compuestos organoestánnicos como: agentes biocidas, agentes fungicidas en agricultura para las pinturas o para la protección de la madera, catalizadores, agentes estabilizantes de polímeros; hacen que estos compuestos entren en el medio ambiente por numerosas vías.

El tributilestaño, que se introduce fácilmente en el medio ambiente acuático, se adsorbe acumulándose en los sedimentos [Hall, 1988]. Posteriormente se degrada mediante procesos de debutilación dando dibutilestaño, monometilestaño y finalmente estaño inorgánico. La duración media del tributilestaño en los sedimentos varía entre 4 y 22 meses según sea la naturaleza de los sedimentos [Seligman et al, 1989; Maguire y Tkacz, 1985; de Mora et al, 1989].

Los compuestos del Mercurio: Los organomercúricos son los compuestos organometálicos mejor estudiados por ser los causantes de importantes catástrofes ecológicas. La toxicidad de los compuestos monoalquilados, en especial del metilmercurio, se debe a su tendencia a la bioacumulación y su débil capacidad de ser degradado. El enlace mercurio-metilo, es muy estable en la mayor parte de los organismos, y su liposolubilidad le permite atravesar las membranas

Introducción.

celulares, afectando particularmente las funciones motrices del sistema nervioso central. La biometilación del mercurio inorgánico en la bahía de Minamata (Japón), en la década de los años 50, fue la causa de la muerte de más de cien personas [Kudo y Miyahara, 1991].

La metilación del mercurio (Hg(II)) inorgánico puede producirse en los sedimentos, columnas de agua, suelos y organismos de forma aeróbica ó anaeróbico [Masson y Fitzgerald, 1990]. El metilmercurio se forma en medio neutro ó ácido mientras que el dimetilmercurio se forma en medio más básico [Craig, 1986b].

Los usos más importantes del mercurio inorgánico son en la fabricación de baterías eléctricas, pinturas y síntesis orgánica. Las formas organometálicas del mercurio (C_2H_5HgX , CH_3HgX , C_6H_5HgX) se emplean en el tratamiento de granos de cereales, fungicidas, bactericidas o catalizadores en la síntesis de productos químicos [Craig, 1986b].

Los compuestos del plomo: Los primeros compuestos organoplúmbicos se prepararon en el siglo XIX por la reacción del yoduro de etilo sobre el plomo metálico [Lowig, 1853 y Cahours, 1853]. Posteriormente, se descubriría la propiedad antidetonante de los compuestos tetraalquilados y en especial del tetraetilplomo, usándose como aditivo a la gasolina. En la actualidad, este uso está reduciéndose por la contaminación medioambiental que supone esta práctica, ya que el 98% de este plomo se convierte en plomo inorgánico durante la combustión de la gasolina, emitiéndose el resto sin modificación al medio ambiente [Hewitt y Rashed, 1988]. Otros usos que también han sido restringidos, para la protección del medio ambiente y la salud pública, son el de conservador de la madera y del algodón, agentes antisuciedad, catalizadores, etc [Shapiro H. y Frey, 1968].

El tetraalquilplomo se degrada fotolíticamente en el medio ambiente dando lugar a la formación de especies tri, di y monoalquiladas de plomo. Esto parece confirmar las hipótesis que sostienen las posibles transformaciones químicas y biológicas (hidrólisis, fotólisis,...) de las especies organoplúmbicas introducidas en el medio ambiente por la actividad industrial [Grandjean y Nielsen, 1979] [Hewitt y Rashed, 1988].

La metilación del plomo en sedimentos biológicamente activos fue demostrada por Walton y col en 1988. Thayer 1987, obtuvo, en el laboratorio, la metilación del dióxido de plomo con la metilcobalamina.

Los compuestos del Cadmio: El estudio sobre los compuestos organometálicos del cadmio en el medio ambiente es bastante reciente, ya que su impacto se prevé mínimo debido a la inestabilidad de los organocádmicos en el agua y el aire. Estos compuestos se han sintetizado y caracterizado en el laboratorio [Craig, 1986c] y se ha observado que la metilcobalamina metila, con muy bajo rendimiento, el cadmio formando el dimetilcadmio, volátil [Robinson y Kiesel, 1981].

Los compuestos del Teluro: Al tener el teluro un comportamiento químico parecido al del selenio, cabría esperar que sus efectos biológicos fuesen similares a los del selenio; sin embargo, el teluro se considera hoy día únicamente como un elemento esencial para los organismos vivientes [Karlson y Frakenbergen, 1993]. La toxicidad de los compuestos orgánicos del teluro, es poco conocida y contrariamente al selenio, la alquilación del teluro no disminuye su toxicidad, ya que la especie $(C_2H_5)_2Te$ es más tóxica que la de $(CH_3)_2Se$. Aunque la metilación del teluro ha sido poco estudiada poco, se sabe que las bacterias y microorganismos, capaces de metilar el selenio forman el

Introducción.

dimetilteluro, el dimetilditeluro y otro compuesto no identificado [Fleming y Alexander, 1972; Chasteen y col, 1990].

Los compuestos de Germanio: En aguas naturales se ha detectado: germanio inorgánico, monometilgermanio (MMeGe) y dimetilgermanio (DMeGe), constituyendo estas dos últimas el 70% de la concentración total de germanio. El trimetilgermanio (TMeGe), existente en los sedimentos no se detecta en aguas marinas ó dulces, lo que demuestra su inestabilidad, volatilidad y facilidad de desmetilación [Lewis y Mayer, 1993].

La metilación del germanio en el laboratorio utilizando la metilcobalamina ó el yoduro de metilo, se produce sólo a pH=1 y pH=7 respectivamente, siendo el monometilgermanio el único producto de estas metilaciones.

Los compuestos del Antimonio: El comportamiento químico del antimonio es parecido al del arsénico. En el medio ambiente se encuentran principalmente dos especies inorgánicas de antimonio: Sb(V) y Sb(III) en sus formas hidroxiladas. Si el medio es oxidante predomina el Sb(V) frente al Sb(III) [Andrae y col, 1981; Andrae, 1983]. El ácido monometilestibónico ($\text{CH}_3\text{SbO}(\text{OH})_2$) y dimetilestibínico ($(\text{CH}_3)_2\text{SbO}(\text{OH})$), como especies orgánicas también pueden encontrarse, pero son las especies inorgánicas las más abundantes en las aguas naturales.

Al igual que el arsénico los compuestos orgánicos del antimonio son menos tóxicos que sus homólogos inorgánicos; siendo la alquilación biológica un mecanismo de detoxificación para los organismos.

Challenger y Barnard en 1947 han demostrado la formación

de compuestos volátiles del antimonio a partir de cultivos de "penicilium notatum"; los rendimientos eran muy bajos y no fue posible determinar con exactitud, por la falta de métodos analíticos adecuados, la concentración de los compuestos producidos.

En el agua de mar se han determinado compuestos metilados del antimonio; sin embargo no hay evidencia de alquilación de antimonio en los mamíferos. Estudios realizados sobre la administración de antimonio tri y pentavalente a animales de laboratorio han demostrado que este analito se elimina en sus formas inorgánicas [Vahter y Marafonte, 1993].

Los compuestos del Arsénico: Como ya se ha mencionado, las formas inorgánicas del arsénico son las más tóxicas. La toxicidad de los principales compuestos de arsénico varía de mayor a menor en el orden: As(III) > As(V) > monometilarsónico (MMA) > dimetilarsínico (DMA) > arsenobetaína (AsBet) > y arsenocolina (AsCol).

Los principales usos de los compuestos organoarsenicales se deben a la medicina y la agricultura por sus propiedades como pesticidas ó biocidas. Sin embargo, la producción y uso de estos compuestos está decreciendo por su impacto negativo en el medio ambiente. Los compuestos del arsénico en el medio biológico son moléculas complejas, como la arsenobetaína, arsenocolina y los azúcares arsenicales [Howard y Comber, 1989].

Las transformaciones químicas y biológicas que este elemento sufre en el medio natural, reacciones de oxidación, reducción y metilación, modifican el comportamiento y toxicidad de las especies consideradas. La biometilación se ha observado en bacterias, algas, invertebrados, vertebrados

Introducción.

e incluso en el hombre.

Para los organismos terrestres la biometilación del arsénico conduce a compuestos volátiles [metilarsina (CH_3AsH_2), dimetilarsina ($(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$) ó trimetilarsina ($(\text{CH}_3)_3\text{As}$)] ó compuestos no volátiles tales como los ácidos monometilarsónico ($\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$) ó dimetilarsínico ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$). Los organismos marinos eliminan el arsénico bajo formas solubles en el agua ó por incorporación directa en sus azúcares ó sus lípidos. [Thayer, 1993].

Las principales especies organometálicas presentes en el medio ambiente, se resumen en la Tabla II (donde R=grupo orgánico y X=halógeno), según su procedencia antropogénica ó natural. A excepción del selenio y el arsénico las especies antrópicas contienen grupos orgánicos mayores que las especies producidas naturalmente en el medio ambiente.

Agentes metilantes

La metilcobalamina (Figura 1), metilcoenzima de la vitamina B_{12} encontrada en los animales y bacterias, es una molécula muy activa bioquímicamente y ha sido estudiada como agente metilante [Craig, 1986a; Rapsomanikis y Weber, 1986]. El enlace metilo-cobalto en la metilcobalamina es estable pero permite la transferencia del grupo metilo a algunas especies metálicas, bajo tres grados de oxidación: como carbocatión (CH_3^+), como carbanión (CH_3^-) y como radical metilo ($\text{CH}_3\cdot$); siendo los dos últimos los más usuales.

La S-adenosilmetionina (Figura 2) es una forma activada de la metionina que transfiere grupos metilo como carbocatión (CH_3^+) a una especie nucleófila. Este mecanismo estudiado por

Tabla II.- Formas organometálicas encontradas en el medio ambiente.

Elementos	Formas antropogénicas	Formación natural de organometálicos			
		Precusores	Agente metilante	Productos de la reacción	Mecanismos
Mercurio	RHgX	Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ Hg ²⁺	Metilcobalamina (CH ₃) ₃ Sn ⁺ (CH ₃) ₃ Pb ⁺	(CH ₃)Hg ⁺ (CH ₃) ₂ Hg (CH ₃) ₂ Hg (CH ₃)Hg (CH ₃)Hg	Sustitución directa Dismutación Transmetilación
Estaño	Bu ₃ SnX Bu ₂ SnX (Bu ₃ Sn) ₂ O Peniles Sn	Sn(II) Sn(II)(acac) ₂ Sn ⁴⁺ Sn [•]	Metilcobalamina CH ₃ I (CH ₃) ₃ Pb ⁺ CH ₃ I	(CH ₃)Sn ²⁺ (CH ₃)Sn(IV)(acac) ₂ I (CH ₃)Sn ³⁺ (CH ₃)SnI ₃ (CH ₃) ₂ SnI ₂ (CH ₃) ₃ SnI (CH ₃) ₄ Sn (CH ₃) ₂ SnI ₂ (CH ₃) ₂ SnI ₂ (CH ₃) ₃ SnI	Radical Oxidante Transmetilación Adición oxidante seguida de dismutación. Adición oxidante seguida de dismutación.
Plomo	(CH ₃) ₄ Pb Et ₄ Pb Me _x Et _(4-x) Pb	Controversia			
Arsénico	Sales ácidas de arsénico inorgánico	As(III)-As(V) (CH ₃) ₂ AsOH	SAM SAM	(CH ₃)AsO(OH) ₂ (CH ₃) ₂ AsO(OH) (CH ₃) ₃ As Azúcares arseniados Arsenobetaina	Sucesivas adiciones de CH ₃ ⁺ y reducciones Adenosilación oxidante, glucosidación Degradación metilación/oxidación
Selenio	Se inorgánico Organo Se complejos	Se(IV)-Se(VI) Se(IV)-Se(VI)	microorganismos Plantas	(CH ₃) ₂ Se (CH ₃) ₂ Se ₂ (CH ₃) ₂ SeO ₂ selenometionina metil-Secisteína (CH ₃) ₂ Se (CH ₃) ₂ Se ₂	Sucesivas adiciones de CH ₃ ⁺ y reducciones Asimilación reducción Se(-II) seguido de degradación
Teluro		Te inorgánico	(CH ₃) ₂ Se Bacterias o microorganismos	(CH ₃) ₂ Te (CH ₃) ₂ Te (CH ₃) ₂ Te ₂	Transmetilación Adición CH ₃ ⁺
Germanio	Ge inorg.	Ge(II)	metilcobalamina CH ₃ I	(CH ₃)Ge ³⁺ (CH ₃)Ge ³⁺	Adición CH ₃ ⁺

Introducción.

Challenger, en 1945, se propone como un método de biodestoxificación en el caso del selenio y arsénico, ya que forma especies menos tóxicas que las formas inorgánicas.

Otros agentes metilantes existentes en el medio ambiente son el yoduro de metilo (ICH_3) [Craig, 1986a], los productos de degradación de los ácidos húmicos y fúlvicos [Nagase et al, 1982] y el propionato de 3-dimetilsulfónico (DMSP). Paralelamente, algunos metales metilados pueden también considerarse agentes metilantes, por proceso de transmetilación, [Chau et al, 1987].

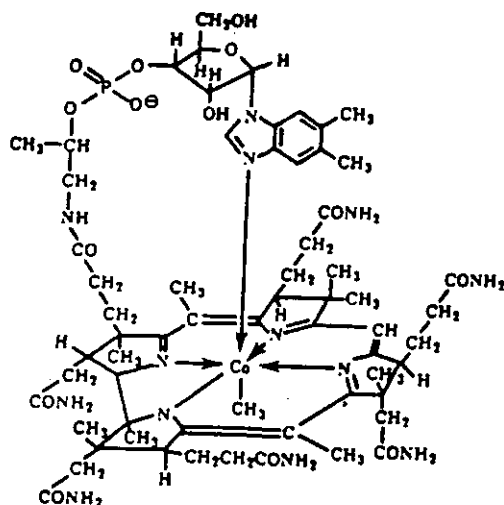


Figura 1.- Metilcobalamina

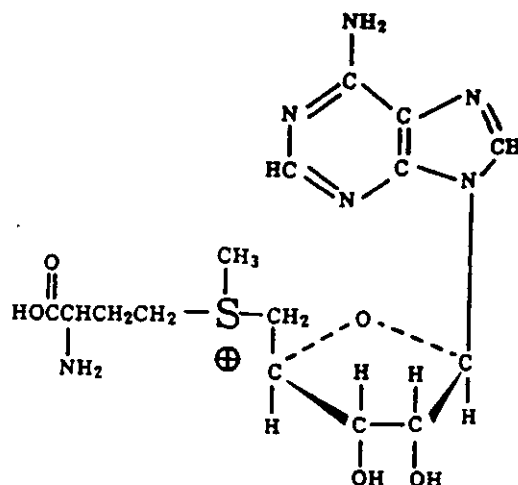


Figura 2.- S-adenosilmetionina.

I. 2. ESPECIES INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS DEL SELENIO EN EL MEDIO AMBIENTE

I.2.1. GENERALIDADES.

El selenio fue descubierto por Berzelius y Gahn en 1817 [Berzelius J.J. 1818], pertenece al grupo VIA de la tabla periódica, está situado entre el azufre y el telurio, siendo sus propiedades físico-químicas intermedias entre metal y no metal. Su número atómico es 34 y su masa atómica 78,96, resultado de 6 isótopos naturales (Tabla III). Existen además 10 isótopos artificiales de corta vida tales como ^{75}Se , ^{77}Se que son utilizados en análisis por activación neutrónica (NAA) y radiología [Newland, 1982]

Tabla III.- Abundancia, en %, de los distintos isótopos del selenio.

Isótopo	^{74}Se	^{76}Se	^{77}Se	^{78}Se	^{80}Se	^{82}Se
Abundancia (%)	0.87	9.02	7.58	23.52	49.82	9.19

El selenio existe en dos formas alotrópicas, Se rojo ó amorfo y Se gris. Del primero se conocen las formas "alfa" y "beta" mientras que del segundo sólo se conoce una forma alotrópica. El selenio rojo está formado por moléculas de Se_8 , monoclinicas (solubles en disolventes orgánicos) y no conductores de la electricidad. Es metaestable, se transforma en Se gris, en mayor medida cuanto más alta sea la temperatura.

El selenio gris es la forma estable. Está formado por

Introducción.

cadena helicoidales de selenio, situadas paralelamente en el cristal; cada una rodeada de otras seis. Los enlaces en la cadena son covalentes y moleculares entre las láminas. Es poco conductor de la electricidad, pero el efecto de la luz hace que la conductividad aumente unas 1000 veces, disminuyendo de nuevo en ausencia de éste.

El selenio puede actuar con 4 estados de oxidación -2, 0, 4 y 6.

El selenio se encuentra principalmente asociado a los sulfuros metálicos de Cu, Zn, Ag, Hg, Pb y se obtiene industrialmente como un subproducto en el proceso de obtención de estos elementos. Se usa mayoritariamente en electrónica (23%), gomas, plásticos y lubricantes (13%) cerámica y vidrio (27%) y otras industrias químicas (37%) [Fishein, L. 1984]. La relación Se:S en las rocas magmáticas es del orden de 1:10. Una gran mayoría de la producción de selenio en el mundo procede del refinado electrolítico del cobre. Los procesos comerciales para la producción de selenio son modificaciones o combinaciones de 4 métodos fundamentales: - fundido con cenizas de sosa, - calcinado con cenizas de sosa, - oxidación directa ó - calcinado con H₂SO₄. La producción de selenio en el mundo es del orden de 1300-1500 toneladas [Högberg y Alexander, 1986; Newland, 1982; Merian, 1985; Alexander et al, 1988). La Tabla IV resume algunos compuestos de selenio y su aplicación.

I.2.2. SELENIO EN AIRE, AGUA Y SUELO

Aire: el intervalo de concentración de selenio total en el aire es 0.006-5 ng m⁻³ [Mosher y Duce, 1983], en su mayoría se encuentra en forma particulada [Nas, 1976]. Los compuestos de selenio encontrados son fundamentalmente dimetilselenio, dióxido de selenio o selenio elemental. El dióxido de selenio

puede hidratarse, reducirse (en presencia de SO_2) u oxidarse (por el aire). Así en el agua de lluvia de Japón [Suzuki et al, 1981] y California [Cutter, 1978] el selenito es la especie mayoritaria, mientras que en ciudades de Bélgica el agua de lluvia y la nieve contienen indistintamente selenito y seleniato [Robberecht y van Grieken, 1980].

Tabla IV.- Principales compuestos del selenio y sus aplicaciones.

Compuesto	Uso
Selenio	Rectificadores, células fotoeléctricas, en xerografía, deshidrogenadores catalíticos.
Seleniato sódico	Insecticida, fabricación de vidrios, medicamentos veterinarios.
Selenito sódico	Fabricación del vidrio, abono agrícola.
Selenio dietilditiocarbamato	Fungicida, agente vulcanizante.
Monosulfuro de selenio	Tratamientos veterinarios y anticapa.
Disulfuro de selenio	Tratamientos veterinarios y anticapa.
Hexafluoruro de selenio	Aislante eléctrico gaseoso.
Oxícloruro de Selenio	Disolvente para azufre, selenio, telurio, gomas, baquelitas, resinas, adhesivos asfálticos y otros materiales.
Seleniuro aluminico	Preparación de hidruro de selenio para semiconductores.
Selenito amónico	Fabricación del vidrio rojo.
Seleniuro de cadmio	Fotoconductores, células fotoeléctricas y rectificadores.
Seleniato de cobre	Aleaciones de cobre y colorante de cobre.
Seleniuro de tungsteno	Lubricantes.

La principal fuente de emisión de selenio a la atmósfera es producida por las fundiciones de zinc y cadmio, quemado de combustibles, fabricación de cerámicas y vidrios. Las fuentes de selenio de origen natural tales como las emisiones volcánicas y procedentes de animales, sedimentos y plantas son de menor importancia. La concentración de dimetilselenio

Introducción.

en el aire es de 1 ng m^{-3} [Jiang, 1983]. Dimetilselenio y dimetildiselenio son los principales compuestos procedentes de suelos, sedimentos de lago, lodos y aguas residuales con actividad microbiológica [Reamer y Zoller, 1980; Peterson, 1987].

Agua: la mayor fuente de contaminación de selenio en el agua, incluyendo los océanos son los desechos urbanos, productos de la combustión de carbón vegetal y de fundición de metales no férricos. El aporte antropogénico de selenio a la biosfera se estima en 79000 toneladas por año [Nriagu y Pacyna, 1988]. La concentración de selenio en aguas suele ser siempre inferior a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Recientemente se ha visto el impacto que puede producir en las especies presentes la lluvia ácida [Mushak, 1985], ya que una alteración en la acidez puede producir un cambio en los procesos de biotransformación. Valores bajos de pH en suelos producen una disminución de la disponibilidad de selenio. En presencia de hierro, el selenio precipita como selenito férrico insoluble en agua a pH inferior a 7, mientras que a altos pH los selenitos pueden oxidarse a seleniats solubles, incrementando la concentración de éste en agua de 10 a $400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [Glover, et al, 1979; Newland, 1982].

La concentración de selenio, en aguas procedentes de la industria en procesos relacionados con el selenio, es de $14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [Newland, 1982]. Los niveles en agua potable oscilan entre $0.02\text{-}1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [Bennet, 1983; Einbrodt y Michaels, 1984]. La concentración de selenio en agua de mar es generalmente baja ($4\text{-}30 \text{ ng L}^{-1}$ en la superficie y $60\text{-}120 \text{ ng L}^{-1}$ en la profundidad para selenito y seleniato respectivamente) [Bruland, 1983]. Alrededor de unas 8000 toneladas de selenio se vierten anualmente en el mar [Newland, 1982; Merian, 1985].

Se ha comprobado que la adición de selenito sódico a aguas de lagos interacciona en el metabolismo del mercurio, limitando la disponibilidad de éste sobre organismos marinos.

Suelo: La distribución de selenio en el suelo es muy variable oscila de $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$, en zonas deficitarias de selenio, a 1 mg g^{-1} en zonas seleníferas. El selenio, en suelos ácidos, se encuentra en forma de selenito férrico de muy baja solubilidad, lo que disminuye la disponibilidad del elemento para la vegetación [Shamberger, 1986]. Por el contrario en suelos alcalinos, el selenio se encuentra en forma de seleniatos solubles, que puede ser absorbido por las plantas [Bennet, 1983, EPA 1986]. La Tabla V resume la distribución de las distintas especies de selenio en el suelo. La Tabla VI muestra alguno de los contenidos en muestras medioambientales y de alimentos.

Tabla V. Distribución de especies de selenio en los suelos.

Alta densidad electrónica----- Baja densidad electrónica

Elevada acidez----- Elevada alcalinidad

Se^{2-}	Se^0	Se(IV)	Se(VI)
seleniuros, H_2Se , CuSe , $\text{pKs}=49$	formas alotrópicas de selenio elemental, insoluble en agua	selenitos, H_2SeO_3 $\text{pK}_1=2,5$ $\text{pK}_2=8$, se adsorbe en $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	seleniatos. H_2SeO_4 $\text{pK}_2=2$, CaSeO_4 $\text{pKs}=3$, no se adsorbe en $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

Compuestos orgánicos de selenio		
$-\text{H}_2\text{C}-\text{Se}-\text{CH}_2-$	$-\text{H}_2\text{C}-\text{S}-\text{Se}-\text{CH}_2-$	$-\text{H}_2\text{C}-\text{S}-\text{SeO}-\text{CH}_2-$

Introducción.

I.2.3.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y BIOTRANSFORMACIONES AMBIENTALES DEL SELENIO.

El selenio se considera esencial desde 1957 para muchas especies, incluyendo la humana. La deficiencia en la dieta, puede ocasionar graves enfermedades, ya que juega un importante papel en la actividad de la enzima glutatióna peroxidasa, y en otras selenoproteínas.

Tabla VI.- Distribución de selenio en muestras medioambientales y alimentos.

Aguas	0.1 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$. subterráneas alcanzan concentraciones $> 6000 \mu\text{g L}^{-1}$. de bebida: 0.1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. [Fishein, 1984]
Atmósfera	1 ng L^{-1} aumentando con el consumo de combustibles [Harkin, J.H., 1976] en las proximidades de las fábricas de Cu puede llegar a 500 ng L^{-1} .
Suelos	0.1-0.4 mg Kg^{-1} , dependiendo mucho del país [Frost; Duchaigne, 1978; Ivengar et al, 1978] 40-80 mg Kg^{-1} en suelos seleníferos.
Minerales	30-900 mg Kg^{-1} en rocas seleníferas [Naft, 1989] 1-13 mg Kg^{-1} en carbón 3-30000 mg Kg^{-1} en piritas
Alimentos	Leche materna 0.007-0.0033 mg L^{-1} [Morris et al, 1970] Té $< 0.07 \text{mg Kg}^{-1}$. Café $< 0.09 \text{mg Kg}^{-1}$. Cereales 0.01-0.26 mg Kg^{-1} . Harina 0.007-1.3 mg Kg^{-1} [Souci et al, 1986]. Arroz 0.13-0.71 mg Kg^{-1} [Souci et al, 1986]. Patatas $< 0.05 \text{mg Kg}^{-1}$. Champiñones 0.01-0.02 mg Kg^{-1} $< 20 \text{mg Kg}^{-1}$ en materia seca. Fruta y verdura $< 0.01 \text{mg Kg}^{-1}$. Carne: 0.1 mg Kg^{-1} (pollo) y 1.9 mg Kg^{-1} (cerdo) Pescado 0.4-0.7 mg Kg^{-1}
Combustibles fósiles	carbón 0.47-8.1 mg Kg^{-1} [Raptis, S.E., 1983] petróleo 2,4-7,5 mg Kg^{-1} [Wilber, 1980; Ivengar et al, 1978; Kut, 1981; Turekian et al, 1961].

A bajas concentraciones el selenio es antioxidante. Esta propiedad es la que le hace protector de la membrana citoplasmática de las lipoproteínas en los procesos carcinogénicos.

La necesidad de selenio en la dieta humana depende del contenido en vitamina E del organismo ya que suple la actividad de esta vitamina [Haguenor, J.M. 1982]. En general, el contenido necesario está en el intervalo de 0.1 a 0.3 mg Kg⁻¹. En 1972, se propusieron algunos niveles recomendables en el suero humano (10-40 mg L⁻¹.) [Lakin, H.W. et al, 1973] y en la orina (0,1 µg L⁻¹.) [Rotruck, J.t. et al, 1973]. La deficiencia de selenio produce degeneración en el hígado, páncreas, corazón, estómago y riñón, esclerosis múltiple, cistitis, hepatitis, cáncer, etc.

El mecanismo de protección de las membranas celulares ante la oxidación tiene lugar mediante la formación de la enzima glutatióna peroxidasa que destruye los peróxidos. Esta enzima juega un papel parecido al de la vitamina E, la cual puede compensar la deficiencia de Se y viceversa. Ambos antioxidantes retardan los procesos degradativos como la carcinogénesis [Rotruck et al, 1973; Hafeman, 1974]. El selenio interacciona con otros metales, como por ejemplo el Hg y Cd, disminuyendo la toxicidad de los mismos en los animales [Allaway, 1973; Gauther et al, 1972]. En forma de selenotionina, actúa como dador de metilo al DNA, RNA, y proteínas [Craddock, 1972].

En los últimos años se ha barajado la posibilidad de relacionar el selenio con la inhibición del cáncer, ya que los niveles de éste en los tejidos humanos es mayor en las personas sanas que en las que padecen cáncer [Raie, R.M. y Smith, H, 1979]. Estudios recientes sugieren que la

Introducción.

mortalidad por cáncer decrece cuando los contenidos de selenio en la dieta aumentan al doble de la cantidad normal (150-350 mg Kg⁻¹.).

Las formas más elementales de selenio orgánico que se han encontrado en los organismos vivos y plantas, análogamente a las de los compuestos biológicos de azufre, forman parte de las proteínas y acompañan a numerosos compuestos orgánicos. Son fundamentalmente, la selenocoenzima A, el trimetilselenio (TMeSe), la selenocistina (SeCys), la selenocisteína, la selenometionina (SeMet), la Selenometil-Selenocisteína, y la selenometil-selenometionina (SeMe-SeMET).

La mayoría de los compuestos de selenio son metabolizados por dos vías principales: reducción seguida de metilación y directa incorporación a proteínas. La vía reducción-metilación, cuyo mecanismo fue propuesto por Challenger en 1951 puede verse en la Figura 3, esta reducción-metilación es la responsable de la producción de dimetilselenio (DMeSe), el cual se considera como un metabolito intermedio en su transformación a trimetilselenio (TMeSe), metabolito de la orina de baja actividad biológica, tanto nutricional como toxicológica [Kobayashi, I, 1992].

Hoy día se han propuesto diferentes mecanismos para la obtención de dimetilselenio y dimetildiselenio en plantas tanto de especies no acumuladoras como acumuladoras [Lewis, 1971, 1974, 1976]. Las Figuras 4 y 5 muestran estos mecanismos.

La selenometionina (SeMET) es un selenoaminoácido sintetizado a partir de compuestos de selenio inorgánico. Hoy día se sabe que los animales no rumiantes aparentemente no pueden sintetizarlo. Químicamente es similar a la metionina,

por lo que puede ser incorporado a las proteínas en lugar de ésta [Dauchy, X et al, 1994].

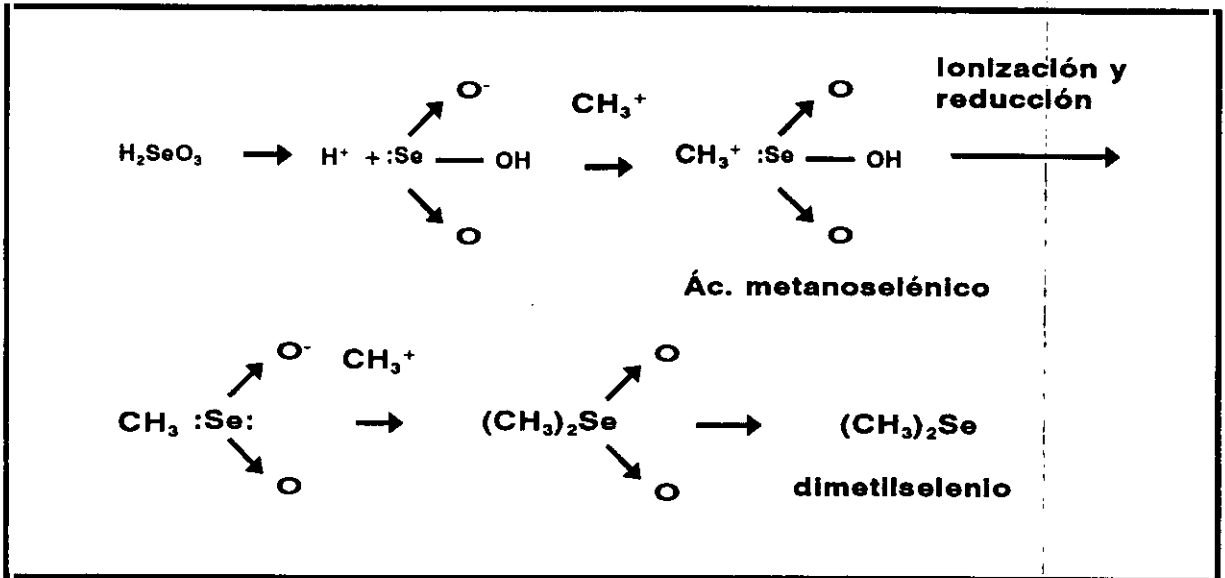


Figura 3.- Mecanismo de metilación del selenio por reducción-metilación [Challenger, 1951].

La selenocisteína puede identificarse como la especie de selenio presente en la enzima glutatona peroxidasa, a pesar de que también puede aparecer en otras proteínas animales, y puede proceder de la transformación de la selenometionina. En la selenocisteína el grupo selenol ($-\text{SeH}$), tiene un pKa de 5.2, lo que hace que esté en forma disociada (aniónica) a pH fisiológico. Varias proteínas contienen selenocisteína, como resultado de una conversión de la selenometionina, que es la forma química esencial de selenio en animales [Kobayashi, I, 1992).

Corrientemente, el seleniuro (H_2Se a pH fisiológico), se considera como una especie intermedia común en la transformación de selenito a selenometionina y

Introducción.

selenocisteína, dimetilselenio o trimetilselenio (producto final de detoxificación, ya que la mayoría de las especies inorgánicas son más tóxicas que la mayor parte de las especies orgánicas).

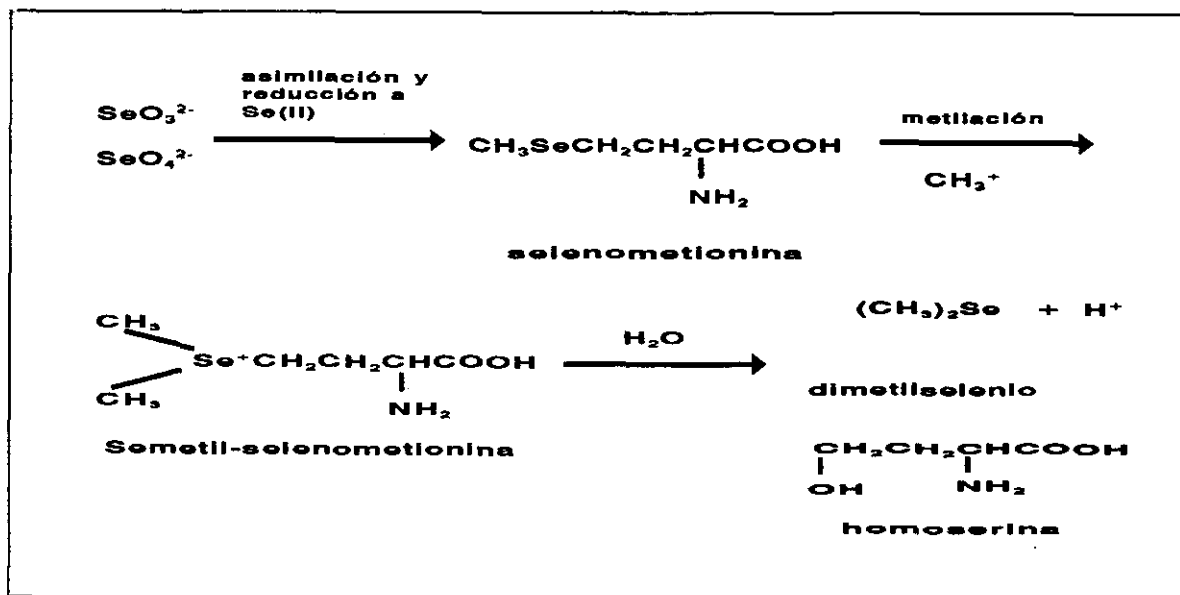


Figura 4.- Transformación en plantas de selenio inorgánico en dimetilselenio.

En el ser humano, el selenio se transporta fundamentalmente a través del tracto intestinal, sangre, hígado y otros tejidos. Los procesos de transformación y distribución, dependen de la presencia y ausencia de promotores e inhibidores tales como ácido ascórbico, azúcares, proteínas, fibra, tipo y grado de procesamiento alimenticio, así como la ingestión de ciertas drogas.

Las especies orgánicas de selenio también se encuentran presentes en plantas, siendo la selenometionina la forma orgánica predominante. El mecanismo se cree que consiste en la reducción de los sulfatos, previamente absorbidos del

suelo, a sulfito, incorporación a la cisteína y posterior metabolización a la metionina, reemplazando al azufre. En muchos casos, los compuestos de selenio son transformados por plantas y algas a formas volátiles (DMeSe, DMeDSe, y DESe), como mecanismo de defensa frente a la toxicidad [Dauchy, X et al. 1994].

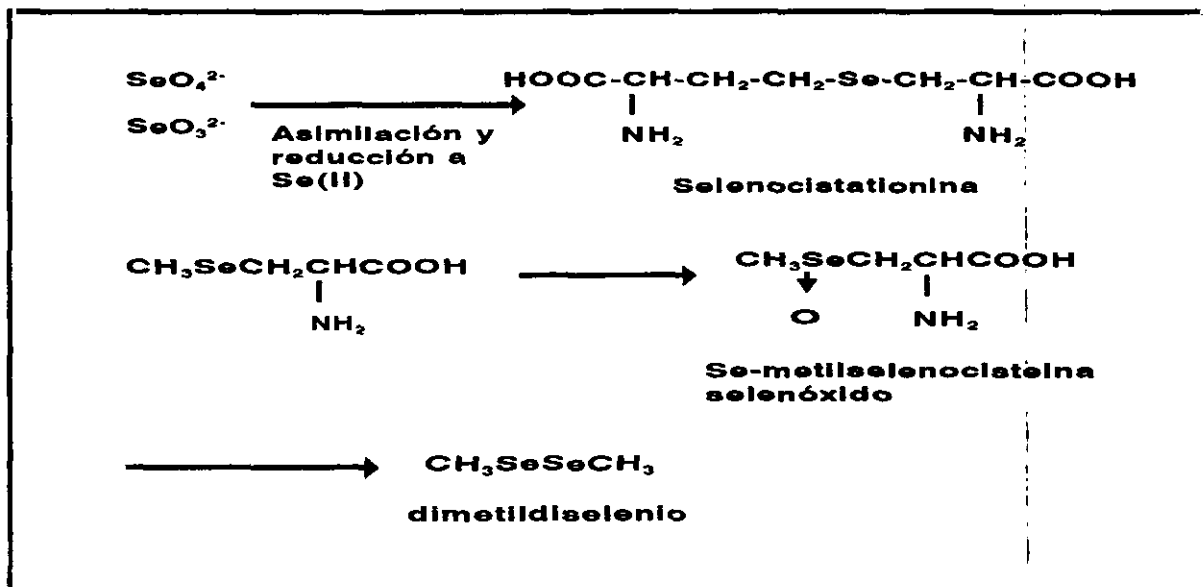


Figura 5.- Transformación de selenio en especies acumuladoras.

I.2.4. TOXICIDAD DEL SELENIO Y SUS ESPECIES.

Alguno de los efectos mutagénicos debidos al selenio son los siguientes:

- En 1856 se observó en caballos, la aparición de una enfermedad desconocida, la cual se atribuyó en 1934 a la alta concentración de selenio en el forraje [Dickson y Tomlinson, 1967].
- En los años 60, en China, se detectó en la población humana una enfermedad endémica manifestada por pérdida de pelo y

Introducción.

uñas, irritación de la piel y los ojos, y debilidad de los dientes. Este mal se atribuyó a un alto contenido de selenio en el maíz.

La toxicidad del selenio depende de muchos factores, como por ejemplo: forma química, especie animal de que se trate, edad, sexo, forma de entrada en el organismo, pH, etc.

La toxicidad del selenio soluble depende de la forma de transporte de los iones y moléculas a través de las membranas biológicas, por ejemplo, las especies lipofílicas son muy tóxicas porque pueden difundir muy rápidamente a través de las biomembranas [Morrison et al, 1989], por ello en general puede decirse que las formas orgánicas del selenio son mucho más tóxicas que las inorgánicas (unas 500 veces), y dentro de éstas últimas, son más tóxicos los selenitos que los seleniatos. Se observa que en ocasiones la protección contra las especies tóxicas de selenio se consigue sustituyendo éstas por las correspondientes de azufre.

Si bien ya hemos visto que el selenio previene la toxicidad de otros metales tales como Hg ó Cd, mediante un efecto análogo, algunos metales previenen la toxicidad del selenio. Por ejemplo la plata o el cobre, en cantidad de 1000 mg g⁻¹ en la comida previene la mortalidad debida a altos contenidos de selenio [Measures y Burton, 1978]. Frost publicó que el As (arsenito y arseniato) modifica la toxicidad del selenio por formación de un complejo de As⁺-Se⁻.

La composición global de la dieta juega un papel muy importante, ya que el selenio es menos tóxico en matrices lipoprotéicas que junto con carbohidratos [Masse, et al, 1977].

Los síntomas típicos de intoxicación de selenio son:

infección o irritación ocular y nasal, irritabilidad, vómitos y mareos, problemas respiratorios y pulmonares, daños oculares y cutáneos, caries, aumento en la frecuencia de abortos, problemas cardiovasculares y cáncer [Morison et al, 1989].

Los signos de toxicidad intracelulares [Morison et al, 1989] son: deformaciones estructurales, reducción de la división celular, alteraciones de la fotosíntesis, alteraciones del transporte electrónico en la célula y en la producción de ATP; inhibición de actuación de los sistemas enzimáticos. Tanto el selenito como el seleniato son agentes mutágenicos [Noda et al, 1979],. Así por ejemplo está demostrado que el selenito causa daños en el DNA [Nakamuro, et al, 1976].

Las células pueden prevenir la toxicidad de los metales por formación de uniones metal-proteína. En el caso del selenio, la detoxificación proteínica mejor documentada es selenio-cisteína [Nevo et al, 1984; Rainbow, 1985]. La producción de este complejo da idea del grado de exposición a la toxicidad del metal.

Se ha visto que tanto el seleniato sódico como la vitamina E reducen el número de tumores en ratones [Shamberger, 1970]. Además el selenio puede inhibir tanto la fase de iniciación como la de progreso de las carcinogénesis, hasta tal punto que la máxima inhibición de los tumores se logra con ingestiones continuas de selenio [C. Ip, "Cancer Res", 1981].

El selenio en el hombre tiene efectos carcinogénicos en piel, hígado, pecho y colon, siendo los de pecho y colon los de mayor relevancia por ser causados por la peroxidación de las grasas.

Introducción.

Algunos de los límites de concentración de selenio establecidos son los siguientes [Wilber, 1980]: los niveles esenciales en forrajes animales son de 3-4 ng g⁻¹ y en dietas humanas de 0,01-0,1 ng g⁻¹. Los niveles máximos son 4-35 mg día⁻¹ para niños y 60-300 mg día⁻¹ para adultos, siendo el agua la que aporta del 1-6% de la dosis diaria. Las normas legales para los niveles de selenio en algunas muestras son las siguientes:

- Aire: compuestos de selenio <0,1-0,2 mg L⁻¹.
H₂Se <0,05 mL L⁻¹. [Wilber, 1980]
- Agua de bebida <8-10 mg L⁻¹
- Orina < 100 μg L⁻¹.
- Suero < 91± 7 μg L⁻¹.

I.3.- BIBLIOGRAFÍA.

ALEXANDER, J., HÖGBERG, J., THOMASSEN, Y. Y AASETH, J.
Chapter 53 Selenium, in: Seiler, H.G., Sigel, H., y Sigel, A.
(eds.), Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds, 581-595;
Marcel Dekker, New York-Basel, (1988).

ANDREAE, M.O., ASMODE, J.F., FOSTER, P Y VAN'T DACK, L.
Anal. Chem. 53, 1766 (1981).

ANDREAE, M.O.
Trace metals in sea water (eds. Wong C.S., Boule, E.,
Bruland, K.W., Burton; J.L. y Golberg, E.). Plenum Press,
New York and London. (1983).

ALLAWAY, W.H.
Cornell Vet. 63, 151. (1973)

BARNARD, P.
PhD Thesis, University of Leeds, UK (1947).

BENNETT, B.G.
Exposure of Man to Environmental Selenium-An Exposure
Commitment Assesment. Sci. Total Environ. 31,
117-127 (1983).

BERZELIUS, J.J.
Acad. Handbl. Stockolm. 39, 13 (1818).

BRULAND, K.W.
Trace Elements in Sea-Water, Chem. Oceanogr. 8, 188-190,
(1983).

CAHOURS, C.
Compt. Rend, 60, 304, (1853).

CALLISTER, S.M. Y WINFREY, M.R.
Water Air Soil Pollut., 29, 453 (1986).

CHALLENGER, F.
Chem. Reviews, 36, 315 (1945)

CHALLENGER, F.
Adv. Enzimol., 12, 429, (1951).

CHASTERN, T.G., SILVER, G.M., BIRKS, J.W. Y FALL, R.
Chromatographia, 30, 181 (1990).

CHAU, Y.K., WONG, P.T.S., MOJESKY, C.A. Y CARTY, A.J.
Appl. Organomet. Chem., 1, 235, (1987).

Introducción.

COMPEAU, G.C. Y BARTHA, R.

Appl. Environ. Microbiol., 50, 498 (1985)

CUTTER, G.A.

Anal. Chim. Acta, 98, 59-66, (1978).

CRAIG, P.J.

Ocurrence and pathways of organometallic compounds in the environment-General considerations. Organometallic compounds in the environment, Principles and reactions, (P.J. Craig ed), Longman Group, Harlow, 364pp (1986a).

CRAIG, P.J.

Organomercury compounds in the environment.

Organometallic compounds in the environment, (P.J. Craig ed.), Longman Group, Harlow, pp 65-110. (1986b).

CRAIG, P.J.

Other organometallic compounds in the environment. Organometallic compounds in the environment, (P.J. Craig ed) Longman Group, Harlow, 345-364 (1986c).

CRADDOCK, V.M.

Chem. Biol. Interact. 5, 3, 207, (1972).

DAUCHY, X., POTIN-GAUTIER, M., ASTRUC, A., ASTRUC, M.

Fresenius J. Anal. Chem., 348, 792, (1994).

deMORA, S.J., KING, N.G. Y MILLER, M.C.

Environ. Technol. Lett. 10, 901, (1989)

DICKSON, R.C., TOMLINSON, R.H.

Clin. Chim. Acta, 16, 311. (1967).

DUCHAIGNE, A., ARVY, M.P.

Anal. Biol. 17, 529. (1978).

EINBRODT, H.J. Y MICHELS, S.

Selenium in: Merian, E (ed), Metalle in der Umwelt, 541-554 Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach/Florida-Basel, (1984).

EPA

Health Effects Assesment for Selenium and Compounds. Environmental Criteria and Assesmente Office, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. (1986).

FISHEIN, L.

Int. J. Env. and Anal. Chem. 17, 113. (1984)

FLEMING, R.W. Y ALEXANDER, M.

Appl. Microbiol., 24, 424 (1972).

FROST, D.V.

Critical Reviews in toxicology, 467.

GAUTHER, H., GOUDIE, C., SUNDE, L., KOPECKY, M., HOEKSTRA, W.
Science, 175, 122, (1972).

GRANDJEAN, P. Y NIELSEN, T.

J. Am. Chem. Soc., 96, 94 (1979).

GLOVER, J., LEVANDER, O., PARIZEK, J. Y VOUK, V.

Selenium in: Fridberg, L., Nordberg, G.F. y Vouk, V.B. (eds),
Handbook on the Toxicology of Metals, 555-577. Elsevier/North
Holland Biochemical Press, Amsterdam. (1979).

HAFEMAN, D.G., SUNDE, R.A., HOEKSTRA, W.G.

Nutritional, 104, 5, 580. (1974).

HAGUENOR, J.M. FUROW, D.

Toxicologie et hygiene industrielles, Ed. Technique and
Documentation, Paris, 353, (1982).

HALL, L.W.

Mar. Pollut. Bull., 19, 431 (1988).

HARKIN, J.M., DONG, A., CHESTER, G.

Nature 259, 5540, 204, (1976).

HARRISON, R.M., RAPSOMANIKS, S.

Environmental Analysis usin Chromatographic Interfaced with
Atomic Spectrometry. Ed. Ellis Horwood Limited. Publishers
Chichester, 318-341, (1989)

HEWITT, C.N. Y RASHED, M.

Appl. Organomet. Chem., 2, 95 (1988).

HÖGBERG, J. Y ALEXANDER, J.

Chapter 19 Selenium in: Fridberg, L., Nordberg, G.F. y Vouk,
V.B. (eds), Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd Ed, Vol
II 482-520, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. (1986).

HOWARD, A.G. Y COMBER, S.D.W.

Appl. Organomet. Chem., 3, 509, (1989).

IHNAT, M. VALYNEZT, M. THOMASSEN, Y. VERLINDER, M.

Pure Appl. Chem.

IP, C.

Cancer Res., 41, 4380. (1981).

Introducción.

IVENGAR, G.V., KOLLMER, W.E., BOWEN, H.J.M.

The elemental composition of human tissues and body fluids", Verlag Chemie, Weinheim, (1978).

JIANG, S., ROBBERECHT, H., ADAMS, F.

Atmos. Environ. 17 111-114, (1983).

JACKSON, T.A.

Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45, 97 (1988).

KARLSON, U. Y FRAKENBERBERG, W.T.J.

Biological alkylation of selenium and tellurium. In Metals ions in biological systems, (H. Sigel y A. Sigel eds.), Marcel Dekker, Inc, 185-228. (1993).

KOBAYASHI, I.

Adv. Biophys, 28, 81. (1992)

KUDO, A. Y MIYAHARA, S.

Wat. Sci. Technol., 23, 283 (1991).

KUT, D.

J. Radioanal. Chem., 62, 161. (1981).

LAKIN, H.W., KOTHNY, E.L.

Trace elements in the environment, American Chemical Society, 86, (1973)

LEWIS, B.A.G.

Ph D dissertation, Universidad de California, Berkeley, (1971).

LEWIS, B.A.G., JOHNSON, C.M., BOYER, T.C.

Plant and soil, 40, 107, (1974).

LEWIS B.A.G.

Selenium in biological systems and pathways for its volatilization in higher plants. in Environmental biochemistry, Vol 1. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur and selenium Cycles (ed. Nriagu J.O.). Ann Arbor Sci, Michigan, 389-409. (1976)

LEWIS, B.L. Y MAYER, H.P.

Biogeochemistry of methylgermanium species in natural waters. In Metals ions in biological systems, (H. Sigel y A. Sigel eds.) Marcel Dekker, Inc, 79-100, (1993).

LÖWIG, C.

Anal. Chem. 88, 318 (1853).

MADRID, Y., PEREZ-CORONA, M.T., CABRERA, C. Y CÁMARA, C.

Anal. Chem, 67, 750 (1995).

- MAGUIRE, R.J.**
Environ. Sci. Technol., 18, 291 (1984).
- MAGUIRE, R.J. Y TKACZ, R.J.**
J. Agric. Food Chem., 33, 947 (1985)
- MASSEE, R., VAN DER SLOOT. H.A.**
J. Radioanal. Chem. 35, 157. (1977).
- MASSON, R.P. Y FITZGERALD, W.F.**
Nature, 347, 457. (1990).
- MEASURES, G.D., BURTON, J.D.**
Nature, 273, 293, (1978)
- MERIAN, E.**
Introduction on Environmental Chemistry and Global Cycles of Chromium, Nickel, Cobalt, Beryllium, Arsenic, Cadmium and Selenium, in: Merian, E., Frei, R.W., Härdi, W. y Schalatter, C. (eds), Carcinogenic and Mutagenic Compounds, 25-32, Gordon & Breach, London. (1985).
- MORISON, G.M.P., BATLEY, G.E., FLORENCE, T.M.**
"Chemistry in Britain", August, 791. (1989).
- MORRIS, V.C., LEVANDER, O.A.**
J. Nutr. 100, 12, 1383. (1970).
- MUSHAK, P.**
Potential Impact of Acid Precipitation on Arsenic and Selenium. Environ. Health Perspect. 63, 105-113, (1985)
- NADKARNI, R.A.**
Anal. Chim. Acta, 135, 363, (1982).
- NAFTZ, L.D., RICE, J.A.**
Appl. Geochem. 4, 565. (1989).
- NAGASE, H., OSE, Y., SATO, T. Y ISHIKAWA, T.**
Sci. Total Environ., 24, 133 (1982).
- NAKUMURO, K., TOSHIKAWA, Y., SAYATO, Y., KURATA, H. TONOMURA, M., TONOMURA, A.**
Mut. Res., 40, 177, (1976).
- NEVO, E., BEN-SHLOMO, R., LAVIE, B.**
Proc. Nah. Acad. Sci. USA", 81, 1258. (1984).
- NEWLAND, L.W.**
in: Hutzinger, O. (ed), The Handbook of Environmental Chemistry 3, Part B, Anthropogenic Compounds, 45-57, Springer Verlag, Heidelberg. (1982).
-

Introducción.

NODA, M., TOKANO, T, SAKURAI, H.,
Mut. Res. 66, 175. (1979).

NRIAGU, J.O., Y PACYNA, J.M.
Quantitative Assesment of Worlwide Contamination: Air, Water
and Soils by Trace Metals. Nature 333, 134-139. (1988).

PETERSON, P.J.
Selenium Biogeochemistry: Local, Regional and Global
Processes Problems. Trace Subst. Environ. Health 21, 353-360,
(1987).

PINEL, R. ASTRUC, M. Y DONARD, O
Les organométalliques en traces dans l`environnement
aquatique.
L`Actualité chimique, May-Juin 110 (1990)

RAIE, R.M., SMITH, H.
J. Radioanal. Chem., 48, 185. (1979).

RAINBOW, P.S.
Int. J. Envir. Stud., 25, 195. (1985).

RAPTIS, S.E., KAISER, G., TÖLG, G.
Fresenius J. Anal. Chem. 316, 105 (1983).

RAPSOMANIKIS, S. Y WEBER, J.H.
Appl. Organomet. Chem., 1, 115 (1986).

REAMER, D.C. Y ZOLLER, W.H.
Selenium Biomethylation Products from Soils and Sewage
Sludge, Science 208, 500-502, (1980).

ROBBERECHT, H. Y VAN GRIEKEN, R.
In: Hempjill, D.D. (ed): Trace Substances in Environmental
Health. Vol 14, University of Missouri, Columbia. (1980).

ROBINSON, J.W. Y KIESEL, E.L.
J. Environ. Sci. Health., A16, 341 (1981).

**ROTRUCK, J.T, POPE, A.L., GAUTHER, H.A.. SWANSON, A.B.,
HAFEMAN, D.G., HOEKSTRA, W.G.,**
Science, 179, 588, (1973).

**SELIGMAN, P.F., GROVHOUG, J.G., VALKIRS, A.O., STANG, P.M.
FRANSHAM, R., STALLARD, M.O., DAVIDSON, B. Y LEE, R.F.**
Appl. Organomet. Chem., 3, 31 (1989).

SHAMBERGER, R.J.
J. Ntl. Cancer Inst. 44, 931. (1970).

SHAMBERGER, R.J.

In Abstracts of International Workshop Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology. Abstract No. 19, April 21-23. Gsf-Bericht, Neuherberg, FRG. (1986).

SHAPIRO, H. Y FREY, F.W.

The organic compounds of lead. Wiley, New York, 407-426. (1968).

SOUCI-FACHMANN-KRAUT.

Die Zusammensetzung der lebensmittel Nährwert-Tabellen 1986/1987, 3rd Ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. (1986).

SUZUKI, Y. SUGIMURA, Y. Y MIYAKE, Y.

J. Metall. Soc. Jpn. 59, 405-409. (1981).

THAYER, J.S.

Appl. Organomet. Chem., 1, 545 (1987).

THAYER, J.S.

Global Bioalkilation of the Heavy Elements. In Metals ions in biological systems, (H. Sigel and A. Sigel eds). Marcel Dekker, Inc 1-36 (1993).

TUREKIAN, K.K., WEDEPOLH, K.H.

Bull. Geol. Soc. Am. 72, 175. (1961).

VAHTER, M. Y MARAFANTE, E.

Metabolism of alkyl arsenic and antimony compounds. In metals ions in biological systems, vol 20 biological properties of metal alkyl derivatives, (Sigel, H. y A. Sigel, Eds.), Marcel Dekker, INC, 161-184. (1993).

WALTON, A.P., EBDON, L. Y MILLWARD, G.E.

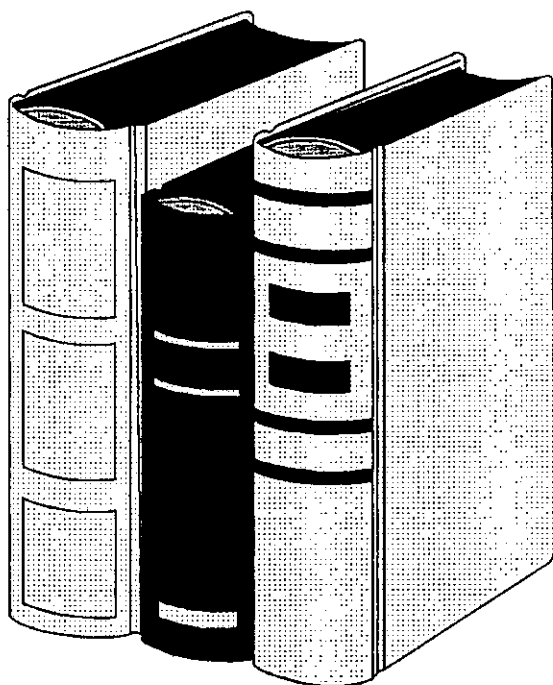
Appl. Organomet. Chem., 23, 87 (1988).

WILBER, CH.G..

Chem. Toxicol., 17, 171. (1980).

XUN, L., CAMPBELL, N.E.R. Y RODD, J.W.M.

Can. J. Fish. Sci., 44, 750, (1987)



CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ESPECIES METÁLICAS DEL SELENIO EN MUESTRAS MEDIO AMBIENTALES.

II.1.-TÉCNICAS ACOPLADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES METÁLICAS EN EL MEDIO AMBIENTE.

- II.1.1.-Técnicas acopladas usando preconcentración en línea.
- II.1.2.-Generación de hidruros, atrapamiento criogénico con detectores atómicos.
- II.1.3.-Acoplamiento con cromatografía líquida.

II.2.-MÉTODOS ANALÍTICOS Y PRINCIPALES TÉCNICAS ACOPLADAS EN LA ESPECIACIÓN DEL SELENIO.

- II.2.1.-Métodos fluorimétricos.
- II.2.2.-Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito.
- II.2.3.-Métodos electroquímicos.
- II.2.4.-Análisis por activación neutrónica.
- II.2.5.-Acoplamiento generación de hidruros con detectores atómicos ó másicos.
- II.2.6.-Cromatografía de líquidos de alta resolución.
- II.2.7. Acoplamiento cromatografía de gases-detectores atómicos.

II.3.-BIBLIOGRAFÍA.

II.1.- LAS TÉCNICAS ACOPLADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES METÁLICAS EN EL MEDIO AMBIENTE.

El concepto de especiación se utilizó por primera vez en 1945 para el estudio de los ciclos biogeoquímicos de los elementos traza en el agua de mar [Golberg, 1954]. Florence en 1982 definió especiación como: "la determinación de la concentración de las formas físico-químicas individuales de un elemento en una muestra, que todas juntas constituyen su concentración total". En la actualidad en lugar de especiación, se recomienda el uso de "determinación de especies" para referirse a este concepto.

La determinación de especies químicas a nivel de ultra-traza en muestras medioambientales, requiere además del uso de técnicas de separación acopladas a detectores adecuados, un protocolo de tratamiento de muestra que garantice los siguientes aspectos: - Muestreo libre de contaminación.

Revisión bibliográfica

- Estabilidad de las distintas especies químicas durante la conservación de la muestra evitando metilaciones, degradaciones, contaminaciones ó pérdidas por volatilidad de algunas especies organometálicas de interés. - Finalmente el tratamiento de la muestra debe asegurar la inalterabilidad de las especies metálicas u organometálicas de la muestra.

El acoplamiento de técnicas de separación con detectores de alta sensibilidad, como los atómicos, se inició para dar respuesta a la necesidad de determinar y cuantificar las distintas especies organometálicas existentes en el medio ambiente. En 1966 se conectó por primera vez la salida de un cromatógrafo de gases al nebulizador de un espectrofotómetro de absorción atómica para la determinación de especies alquiladas de plomo en la gasolina [Kolb y col, 1966]; desde entonces, el empleo de estos acoplamientos para la determinación de especies metálicas ha crecido de forma espectacular.

Actualmente los acoplamientos más usuales para el análisis de muestras medioambientales utilizan como sistema detector la espectroscopía atómica. Los sistemas FI, la generación de hidruros con acoplamiento criogénico y los tándem cromatógrafos-detectores atómicos han contribuido extraordinariamente al desarrollo de la especiación en este tipo de muestras (Figura 6).

II.1.1 TÉCNICAS ACOPLADAS USANDO PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA.

La técnica de generación de hidruros constituye una forma útil de separar el analito de la matriz a la vez que proporciona una posible preconcentración del analito, disminuyendo considerablemente los límites de detección, bien en su forma discontinua ("batch"), continua ó utilizando un sistema de inyección en flujo (FI).

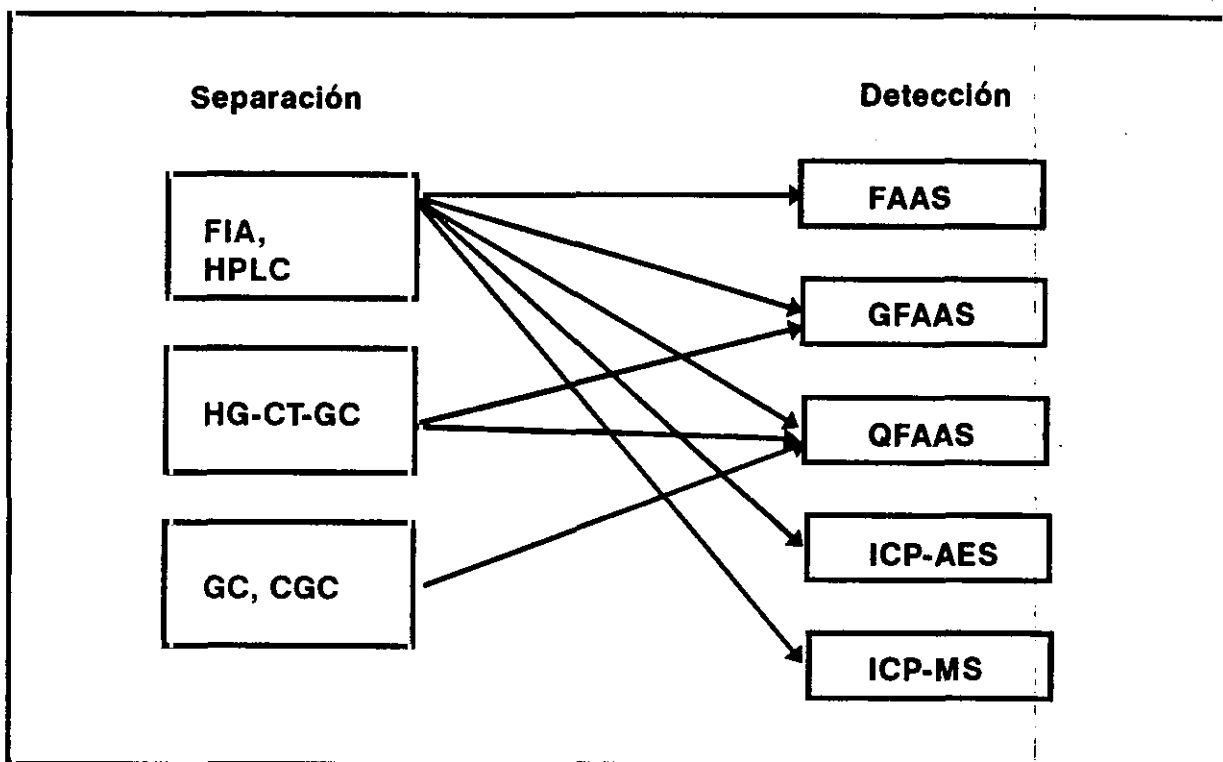


Figura 6.- Combinación de diversa técnicas de separación con distintas técnicas de determinación.

El empleo de soportes sólidos acoplados en línea mediante el sistema FI al sistema detector, permite rebajar extraordinariamente los límites de detección y por tanto abordar la especiación de elementos en muestras medioambientales. La gran afinidad de la alúmina por especies tanto catiónicas como aniónicas la hace apta para la preconcentración y separación de aniones y cationes metálicos tales como Cr(III)/ Cr(VI) [Cox y col, 1985], Sb(V) y Sb(III) [Smichowski y col, 1994a y b], Pt [Cantarero y col, 1994; Hidalgo y col, 1995]. El acoplamiento de la preconcentración en línea en soportes quelatantes con la espectroscopía de absorción atómica e ICP-MS ha proporcionado límites de detección adecuados para la determinación de aluminio en suero sanguíneo de enfermos renales [Martín y col, 1995]. El

Revisión bibliográfica

empleo de aliquat 336 y disodio-1-nitroso-2 hidroxynaftaleno-3,6-disulfonato inmovilizado sobre sílica gel ha proporcionado límites de detección de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ para la determinación de Pb por espectroscopía de absorción atómica lo que ha posibilitado su determinación en aguas naturales (río, mar...) [Rodríguez y col, 1994]. El empleo de una microcolumna de algodón sulfhidrilo, permite la preconcentración y diferenciación de mercurio inorgánico y metilmercurio [Cox y col, 1992] y Ag [Gómez y col, 1995].

Una de las ventajas que ofrece la preconcentración en columnas, y que se está estudiando en la actualidad, es la posibilidad del muestreo "in situ" con posterior elución y determinación en el laboratorio, obviando así los problemas de falta de estabilidad, contaminación y pérdidas de analito, al mismo tiempo que se facilita el transporte y almacenamiento de las muestras. La muestra se fija en su origen en el soporte sólido que con frecuencia es una pequeña columna de dimensiones entre los 5-10 cm de longitud y 1-2 mm de diámetro interno. La columna se inserta posteriormente en línea con la técnica de detección y se eluyen selectivamente los analitos.

II.1.2 GENERACIÓN DE HIDRUROS CON ATRAPAMIENTO CRIOGÉNICO Y DETECCIÓN CON TÉCNICAS ATÓMICAS.

Debido a la simplicidad y alta sensibilidad que ofrece, esta forma de acoplamiento, utilizada por primera vez en 1975 para la determinación de las formas metiladas de selenio en aguas medioambientales, está siendo utilizada para la determinación de elementos metálicos, capaces de formar con NaBH_4 los hidruros tanto de sus formas inorgánicas como de sus formas alquiladas (As, Bi, Sb, Se, Sn, Hg, Ge y Te) [Chau, y col, 1975].

El esquema básico que se sigue en este acoplamiento es el siguiente: - Separación del analito de interés de la matriz que le acompaña mediante generación de hidruros (en las condiciones propias de cada elemento); preconcentración (50-100 veces) sobre una pequeña columna cromatográfica (no polar, metilsilicona) sumergida en nitrógeno líquido; separación de las distintas especies según su punto de ebullición por calentamiento controlado de la columna; y finalmente detección de las distintas especies, utilizando como sistema final de detección la espectroscopía de absorción atómica (AAS), la fotometría de llama (FPD) ó la espectroscopía de fluorescencia atómica (AFS). Esta última es la preferida por su alta sensibilidad para la determinación de mercurio inorgánico y mercurio metilado a nivel de picogramos en muestras medioambientales [Bloom, 1989; Donard, y Martín, 1992].

La cromatografía de gases ha sido principalmente utilizada para la determinación de compuestos organoplúmbicos y organoestánicos, los cuales reaccionan con los reactivos de Grignard formando compuestos tetraalquilados volátiles, aptos para ser separados por cromatografía de gases (GC). Posteriormente, los compuestos volátiles formados se concentran mediante una corriente de nitrógeno, se disuelven en la menor cantidad posible de disolvente y se inyectan en el cromatógrafo de gases.

Con el fin de evitar errores por pérdida ó contaminación de la muestra en el pretratamiento, algunos autores proponen realizar la derivatización (reacción con NaBH_4 ó NaBEt_2), en el extremo superior de la columna cromatográfica formándose el hidruro ó el derivado etilado que posteriormente es separado en la columna cromatográfica. La muestra antes de ser inyectada se pasa por una microcolumna que contiene NaBH_4 ó NaBEt_2 [Clark y col, 1987; Ashby y col, 1988].

II.1.3 ACOPLAMIENTO CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-DETECTORES ATÓMICOS.

La cromatografía de líquidos permite la separación de un gran número de especies organometálicas, debido a la gran variedad de columnas que existen en el mercado (adsorción, intercambio iónico-catiónico y aniónico-, permeación gel, fase reversa); sin embargo, es necesario acoplar el cromatógrafo a detectores suficientemente sensibles que hagan posible la determinación de los compuestos a las concentraciones presentes en las muestras medioambientales ($\mu\text{g L}^{-1}$, o ng L^{-1}).

El acoplamiento de la cromatografía líquida con detectores atómicos presenta dificultades debido a: i)- Las diferencias entre los flujos de elución cromatográfica y de nebulización del sistema atómico. Si el flujo de elución es menor al de nebulización, es preciso el uso de un flujo auxiliar lo que proporciona una dilución de la muestra; el caso inverso, flujo de elución mayor al de nebulización, proporciona un enfriamiento de la llama ó extinción del plasma en su caso. ii)- Las fases móviles orgánicas presentan grandes interferencias en los sistemas de detección atómicos (altos fondos, inestabilidad de llamas o plasma...), lo que obliga al uso de correctores de deuterio o Zeeman en el caso de la espectroscopía de absorción atómica.

Los compuestos organoestánnicos y organomercúricos pueden ser separados por HPLC, convertidos en volátiles mediante la generación de hidruros y posteriormente detectados por absorción atómica [Burns y col, 1981].

Los diferentes compuestos organoarsenicales (arsenocolina (AC), arsenobetaína (AB), arsenito (As(III))),

ácido dimetilarsínico (DMA), ácido monometilarsónico (MMA) y arseniato (As(V))), se separan en una columna aniónica (Hamilton PRP-X-100) y posteriormente se detectan por ICP-MS al nivel de $\mu\text{g L}^{-1}$ [Lamotte y col, 1992]. La determinación de estas especies mediante HG-AAS requiere la transformación de la arsenobetaina y arsenocolina en especies formadoras de hidruros, mediante una fotooxidación, utilizando una lámpara de ultra-violeta y persulfato potásico como medio oxidante. Esta fotooxidación se acopla en línea post-columna en el sistema HPLC-UV-HG-ICP-AES [Rubio y col, 1993a; Rubio y col, 1993b]. La termooxidación de la AB y AC puede asimismo realizarse con persulfato potásico en medio básico como oxidante en un baño de grafito a 140°C como fuente de calor ó bien un horno microondas [López y col, 1993, 1994]. Este método se ha aplicado a la determinación de las seis especies mencionadas de arsénico en extractos de pescado, sedimentos, agua mineral, agua de mar y agua residual; alcanzando para todas las especies límites de detección inferiores a 1 ng (volumen de inyección 100 μL)

El acoplamiento de la cromatografía líquida con la espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito (GFAAS) es complicada debido a que esta última es una técnica de detección discontinua, mientras que la primera es continua. Esta dificultad puede obviarse utilizando un recolector de fracciones que de forma automática las inyecta en la cámara de grafito. Este acoplamiento se empleó en la determinación de compuestos de arsénico y estaño [Brinckman y col, 1980; Pinel y col, 1984].

II.2- MÉTODOS ANALÍTICOS Y PRINCIPALES TÉCNICAS ACOPLADAS EN LA ESPECIACIÓN DEL SELENIO.

En los últimos años ha habido un gran auge en la búsqueda de métodos que permitan la determinación de las distintas especies de selenio presentes en muestras medioambientales. Sin embargo, hoy por hoy la gran parte de los métodos desarrollados se basan en la determinación del contenido total de este analito.

El escaso número de publicaciones referidas a la determinación de especies de selenio, se debe a la falta de métodos que permitan la separación y detección de estas especies a bajas concentraciones. Paralelamente, la ausencia de materiales de referencia, con valores certificados de las distintas especies de selenio ha hecho muy difícil la validación de los métodos existentes.

II.2.1.- MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

El Se(IV) es la única especie de selenio capaz de formar especies fluorescentes y por tanto de ser detectada por métodos fluorimétricos; sin embargo, la determinación de las otras especies de selenio mediante esta técnica ha sido ampliamente estudiada y se basa en la transformación de las diferentes especies en Se(IV).

El Se(IV) se compleja con 2,3 diaminonaftaleno (DAN) formando el complejo fluorescente, 4,5 benzopiazoselenol, el se extrae en ciclohexano. Con el fin de rebajar el límite de detección puede realizarse en primer lugar, una preconcentración del analito por formación del complejo de Se(IV) con 1-pirrolidinditio-carbamato amónico a pH= 4.2, y posterior extracción en cloroformo. El Se(IV) se reextrae en

Revisión bibliográfica

ácido nítrico y se hace reaccionar con el 2,3 diaminonaftaleno, formando el complejo fluorescente anteriormente citado [Parker y Harvey, 1962; Cukor y Lott, 1965; Sugimura y Suzuki, 1976; 1977].

Takayanagi aplicó esta técnica a la determinación de las distintas especies de selenio (Se(IV), Se(VI), selenio orgánico, selenio coloidal (orgánico e inorgánico)), en muestras marinas [Takayanagi, y col, 1983; 1984; 1985a; 1985b; 1989]. La separación del selenio coloidal (inorgánico y orgánico) y del selenio disuelto (inorgánico y orgánico) se realiza filtrando la muestra a través de un filtro de 1,2 nm de tamaño de poro. En una alícuota de cada una de las dos porciones resultantes se determina Se(IV) por adición de 1-pirrolidinditiocarbamato amónico y DAN, como se mencionó anteriormente. Otras dos alícuotas de selenio coloidal y no coloidal se tratan individualmente con HCl 6 mol L⁻² y se mantienen 20 minutos en un baño de agua caliente para reducir el Se(VI) a Se(IV); cuando el selenio de la muestra ha sido reducido, se realiza el proceso anteriormente explicado. Se determina el Se inorgánico (total) pudiendo evaluar el contenido en Se(VI) por diferencia.

$$\text{Se(VI)} = \text{Se(total)} - \text{Se(IV)}.$$

El Se orgánico se determinará por diferencia entre el Se total y el selenio inorgánico. Para determinar Se total se someten las dos alícuotas (coloidal y no coloidal) a una radiación UV (lámpara de Hg 1200 W) durante 5 horas utilizando peróxido de hidrógeno, como oxidante. Posteriormente el selenio inorgánico (formado) se reduce a Se(IV), el cual reacciona con 1-pirrolidinditiocarbamato amónico y posteriormente con el DAN. De esta forma se obtiene el contenido en selenio orgánico por diferencia:
 $\text{Se(orgánico)} = \text{Se(total, después de la radiación)} - \text{Se(inor)}.$

II.2.2.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON CÁMARA DE GRAFITO.

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica ó cámara de grafito (ETAAS ó GFAAS) es una técnica muy utilizada en la determinación de Se en muestras medio-ambientales debido a su gran sensibilidad y a la pequeña cantidad de muestra requerida. Sin embargo, no es una técnica adecuada para la determinación de especies, debido a que esta técnica determina la cantidad total de selenio. Para la cuantificación de las distintas especies, se hace necesario un tratamiento previo a la muestra que permita la separación de las mismas ya sea mediante una reacción selectiva de las especies seguido de extracción, retención específica de las especies sobre soportes sólidos, etc.

El pirrolidinditiocarbamato amónico (APDC), el dietilditio-carbamato (DDTC) y la ditizona en disolventes orgánicos tales como cloroformo (Cl_3CH), tetracloruro de carbono (Cl_4C), ó metil-isobutilcetona (MIBK) son los reactivos más frecuentes para la extracción de Se(IV) [Kamada y col, 1978; 1980; Chan-Huan y col, 1984; Kunnath y col, 1981; Kyohisa y Suzuki, 1980]. La mezcla APDC- Cl_3CH - Cl_4C permite la extracción selectiva de Se(IV) en un intervalo de acidez grande (HCl 5 mol L^{-1} - $\text{pH}=7$) [Chan-Huan, 1984]. La mezcla APDC-MIBK extrae selectivamente el Se(IV) en un intervalo de $\text{pH}= 3.5-5$ [Kunnath y col, 1981]. Otro reactivo que se utiliza para la reacción específica del Se(IV) es el 4-cloro-1,2-diaminobenceno [Nève y col, 1980].

El Se(IV), así extraído, se determina por inyección directa del extracto en la cámara de grafito. El Se(VI) se reduce previamente a Se(IV) con 4% TiCl_3 [Chan-Huan y col, 1984], peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [Nève y col, 1980] ó HCl ,

Revisión bibliográfica

siendo este último el reductor más utilizado. La reducción cuantitativa de Se(VI) a Se(IV) con HCl, se realiza por calentamiento en un baño de agua caliente durante 15-20 minutos en HCl 4-6 mol L⁻¹ [Kunnath y col, 1981; Nève y col, 1980]. El selenio total, convertido en Se(IV), se extrae con los reactivos apropiados y se introduce en la cámara de grafito para su determinación. El Se(VI) se calcula por diferencia entre Se(total) y Se(IV). El error asociado a la determinación indirecta del Se(VI) es usualmente grande.

Los modificadores de matriz más utilizados en horno de grafito (GFAAS) son Cu, Mg, Ni, Pd, Pt, o mezclas de estos elementos, que reducen la volatilidad del selenio en la etapa de mineralización, por formación de complejos como CuSe, NiSe, etc. Los límites de detección obtenidos en todos los casos son inferiores a 1 µg L⁻¹ y la precisión del 5% [Kunnath y col, 1981]. Estos modificadores se han aplicado a la determinación de Se(IV) y Se(VI) en aguas de río, mar y residuales.

El empleo de soportes sólidos que permitan eluir selectivamente el Se(IV) y/o el Se(VI) es otro procedimiento para la especiación de ambos grados de oxidación [Muangnocharoen y col, 1988]. El Se(VI) se retiene en una resina de intercambio aniónico (Ag-1X8) en medio HCl 0.05 mol L⁻¹ mientras que el Se(IV) se eluye. Posteriormente, el Se(VI) se eluye de la columna con 30 mL de HCl 0.3 mol L⁻¹. Las distintas fracciones son analizadas por GFAAS y se determina independientemente Se(IV) y Se(VI). Este método se ha aplicado a muestras de aire, adsorbiéndose el selenio sobre una columna que contiene bolitas de cuarzo recubiertas de oro (gold-coated quartz beads). El selenio adsorbido se desorbe con ácido nítrico 3 mol L⁻¹. El límite de detección es 0.03 ng m⁻³.

II.2.3.- MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.

Los métodos electroquímicos más utilizados en la determinación de especies de selenio en aguas son: la polarografía diferencial de impulsos (DPP) y la polarografía de redisolución catódica por diferencia de impulsos (DPCSV). Al igual que los métodos fluorimétricos y la generación de hidruros, la única especie de selenio capaz de reducirse en el electrodo es el Se(IV); por tanto la aplicación del método a otras especies, requiere una etapa previa de transformación a Se(IV), de todas las especies de selenio presente en la muestra. La reacción electroquímica de reducción es:



Esta reacción es irreversible, apareciendo una película de HgSe sobre la superficie del electrodo. El HgSe formado puede redisolverse catódicamente por un proceso reversible:



Alam y col en 1976, determinaron Se(IV) en medio HCl y HClO₄, de esta forma, con un límite de detección de 10 µg L⁻¹. Si sobre el electrodo se acumula el analito entre 2-12 min, los límites de detección se rebajan a 2 y 0.1 µg L⁻¹ respectivamente. La interferencia de Pb(II) se puede eliminar por adición de EDTA.

En 1980, Howard y col aplicaron la polarografía diferencial de impulsos (DPP) a la determinación de Se(IV) en aguas naturales de estuario y de mar. El límite de detección alcanzado fue 0.4 µg L⁻¹; las interferencias debidas a la presencia de Cr(VI), Cu(II), Mo(VI), Ni(II), Zn(II), Te(IV) y V(V) se eliminaron pasando la muestra por una resina

Chelex-100.

Campanella y col en 1987, utilizaron dos métodos electroquímicos (DPP y DPCSV) para la determinación de especies de selenio. La muestra se filtra para separar dos fases (soluble e insoluble) y la parte insoluble se mineralizó por vía húmeda. Posteriormente, la muestra se somete a una radiación UV para descomponer la selenourea presente en la muestra, y posteriormente se pasa por una resina Chelex-100 con el fin de eliminar posibles interferencias. El Se(IV) se determinó directamente por DPP y DPCSV. Otra alícuota de la muestra se trata con HCl y calor para reducir el Se(VI) a Se(IV), y se analiza por DPP y DPCSV. El Se(VI) se calcula como diferencia entre Se(total) y Se(IV). Los límites de detección alcanzados fueron de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para DPP y $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ para DPCSV.

Recientemente, Bryce y col (1995) han propuesto un método de polarografía de redisolución catódica con inyección en flujo (FICSV), para la determinación de Se(IV), Se(total) y Se(VI). En el sistema de inyección en flujo (FI) se introduce una fina película de mercurio sobre carbón vitrificado como electrodo de trabajo, donde se deposita el Se(IV) para detectarse posteriormente. El Se(VI) se reduce a Se(IV) por calentamiento en medio HCl. Por ser un método de inyección en flujo (FI) las interferencias debidas a Fe(III), Zn(II), Cd(II), Pb(II) y Cu(II) disminuyen. El límite de detección obtenido, $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, permite la aplicación del método a la determinación de Se(IV) y Se(VI) en aguas.

Potin-Gautier y col (1995), han estudiado la interferencia de los ácidos fúlvicos en la determinación de Se(IV), Se(total) y Se(VI) en suelos y aguas naturales por DPCSV. Esta interferencia se debe a que los ácidos fúlvicos compiten con el Se(IV) en la formación de compuestos

mercúricos que se depositan en el electrodo. En ausencia de ácidos fúlvicos el límite de detección del método es de 25 ng L^{-1} ; aumentando hasta 250 mg L^{-1} en presencia de 1 mg L^{-1} de dichos ácidos. Los resultados obtenidos del presente método se compararon con HG-QFAAS.

II.2.4. ANÁLISIS POR ACTIVACIÓN NEUTRÓNICA.

La activación neutrónica (NAA) no es una técnica muy sensible para la determinación de especies de selenio en muestras medioambientales, por lo que su aplicación a este analito requiere una preconcentración previa de la muestra. Al igual que la mayoría de los métodos atómicos, fluorimétricos ó eléctricos, las especies de selenio deben ser separadas y reducidas a Se(IV) antes de su determinación. Los isótopos más utilizados son ^{77}Se y ^{75}Se . El primero proporciona mayor sensibilidad pero tiene una vida media muy corta (17,5 s). El ^{75}Se se utiliza más frecuentemente por su larga vida media (120,4 días) que permite la separación química.

Massèe y col, 1977 y 1981 determinaron Se(IV) y Se(VI) en agua natural y de mar, obteniendo límites de detección $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Las principales etapas del método son: 1. reducción de Se(VI) a Se(IV) por calentamiento a reflujo de la muestra en medio clorhídrico, 2. reducción a selenio elemental con ácido ascórbico, 3. adsorción del selenio elemental sobre carbón activo y determinación por NAA. En el caso de querer determinar únicamente Se(IV) la etapa 1 se omite.

En 1981, Orvini y col emplean un método similar al anterior para la determinación de selenio, disuelto y coloidal, en aguas contaminadas de río. La ventaja del método estriba en la separación de Se(IV) y Se(VI) en una resina de intercambio aniónico, hecho que permite la determinación

diferenciada de ambos grados de oxidación. Las concentraciones de selenio encontradas fueron más altas en la fracción coloidal.

II.2.5.- ACOPLAMIENTO GENERACIÓN DE HIDRUIROS CON DETECTORES ATÓMICOS O MÁSCOS.

La generación de hidruros acoplada a AAS ó ICP como detectores, es la técnica más usada para la determinación de selenio en muestras medioambientales debido a su alta sensibilidad y selectividad.

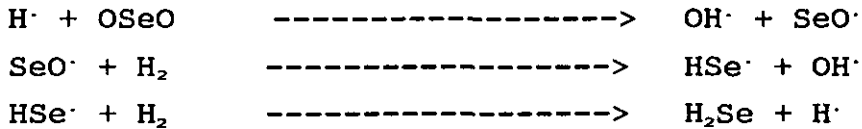
El Se(IV) reacciona con NaBH₄ como reductor, en medio ácido formando el H₂Se volátil; según la reacción global:



El borohidruro sódico (NaBH₄), debe ser estabilizado con hidróxido sódico, para prevenir la hidrólisis de éste. Las soluciones de borohidruro sódico estabilizadas con hidróxido sódico al 2% (m/v) se mantienen estables sin perder su actividad reductora al menos durante 8 semanas [Verlinden y col, 1980]. La concentración óptima del borohidruro sódico en sistemas discontinuos ("Batch") oscila entre 3.5-5% (m/v) y entre 0.2-0.4% (m/v) en sistemas en continuo [Buckley y col, 1992]. Tanto en sistemas continuos como en discontinuos se utiliza como gas transportador auxiliar helio ó argón. El uso de un gas inerte es de gran importancia para la determinación de selenio, debido a la necesidad de desalojar el oxígeno existente en el camino óptico ya que absorbe a la longitud de onda del selenio, 196 nm, interfiriendo en la determinación de éste.

El hidruro de selenio (H₂Se) puede también generarse de forma termoquímica. En una célula de cuarzo calentada bien

electrotérmicamente ó por una llama, se produce la reacción exotérmica entre el H₂ y el O₂ introducidos en la célula. El selenio de la muestra, que previamente ha sido vaporizado mediante un "thermospray", se introduce en la célula de cuarzo libre de la matriz. La reacción que tiene lugar en la célula es: [Blais y col, 1991]:



El hidrógeno (H₂) generado a la vez que lo hace el hidruro de selenio, actúa como gas transportador del mismo; sin embargo, un exceso en la formación de hidrógeno produce irreproducibilidad en la formación del hidruro [Verlinden y col, 1980].

El hidruro así formado puede atomizarse en:

- una llama de aire-acetileno.
- una célula de cuarzo calentada electrotérmicamente ó mediante una llama aire-acetileno.
- una cámara de grafito, que ofrece una buena atomización de Se y elimina las interferencias de matriz.
- un ICP ó ICP-MS.

La técnica se ha empleado principalmente para la determinación de selenio total en muy distintos tipo de muestras (fluidos biológicos, alimentos, aguas...). El hecho que sólo el Se(IV) es capaz de generar el hidruro hace necesario una mineralización de la muestra, seguida de una reducción del analito a Se(IV).

En las mineralizaciones realizadas en fluidos biológicos se observa una gran dificultad para la descomposición

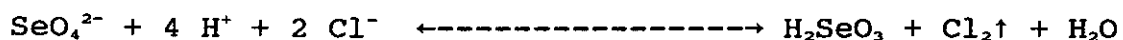
Revisión bibliográfica

cuantitativa de especies como trimetilselenio (TMeSe) y selenometionina (SeMet). Verlinden en 1982, propuso como método más idóneo la mineralización con ácido nítrico y ácido perclórico en bloque de aluminio con una temperatura final de 210°C y un tiempo total 2 horas. La reducción a Se(IV) se realiza con HCl 6 mol L⁻¹ a 95°C durante 5 minutos.

Welz y Melcher en 1984a propusieron la descomposición cuantitativa de TMeSe, y SeMet en sangre, suero, eritrocitos y plasma usando una mezcla de tres ácidos (nítrico, sulfúrico y perclórico) a 310°C en bloques de aluminio. La reducción posterior se realiza con HCl 5 mol L⁻¹ a 90°C durante 20 minutos. Este método fue propuesto para un estudio de intercomparación promovido por la IUPAC (1987) en el que 13 laboratorios determinaron selenio en suero, sangre y orina con una desviación típica entre laboratorios inferior al 7%).

Chris y col en 1992 propusieron para la determinación de Se(total) el empleo de la mezcla de HNO₃:H₂SO₄:HClO₄ (6:3:1) a 200°C durante toda la noche para la mineralización de sedimentos, hojas de árboles, langosta, hígado y aguas. Los resultados obtenidos en los análisis estaban en buena concordancia con los valores certificados de las muestras.

El Se(VI) se reduce cuantitativamente a Se(IV) con mezclas como: Cloruro estannoso - ioduro potásico, cloruro amónico-ácido clorhídrico; ó - ácido clorhídrico; ácido sulfúrico. El procedimiento más empleado y estudiado actualmente, consiste en calentar una disolución conteniendo Se(VI) en un medio de HCl entre 4 y 6 mol L⁻¹ durante 10-20 minutos. [Cutter, G.A.; 1978]. La reacción de reducción es:



La entalpía de formación es de 116 KJ mol⁻¹, indicando

que la reacción es endotérmica [Bye y Lund, 1988].

La generación del hidruro de selenio (H_2Se) puede realizarse en discontinuo ("batch"), inyección en flujo (FI) ó de forma continua. La inyección en flujo ofrece las ventajas de facilitar la automatización del proceso, rapidez, gasto menor de reactivos y muestras, conocimiento del volumen exacto de muestra, ausencia de contaminación en el sistema. Este acoplamiento FI-HG-AAS, fue empleado en 1985 por Nakata y col para la determinación de Se(IV) y Se(VI), (por diferencia entre Se (total) y Se(IV)) en materiales biológicos de referencia. Estos autores proponen así mismo la reducción en línea del Se(VI) a Se(IV) utilizando HCl concentrado. La muestra acidificada, se calienta en un baño de agua a $95^\circ C$ y posteriormente se hace reaccionar con el $NaBH_4$, separándose el H_2Se mediante 2 separadores de fases (gas-líquido). La frecuencia de muestreo es de 30 muestras por hora.

El análisis por inyección en flujo se ha empleado para la determinación conjunta de Se(IV), As(III y V), Sb(III y V) Bi(III) y Te(IV) en muestras certificadas de harina, arroz, hojas [Yamamoto y col, 1985] así como para la reducción en línea de las interferencias que presentan otros elementos (Pd, Pt;...), por adición de telurio, en la determinación de arsénico y selenio [Marshall y van Staden, 1990a y b] .

Recientemente, Örnemark y Olin (1994a y b) propusieron la preconcentración de Se(IV) y Se(VI) en una resina Dowex 1X8 ó en una mezcla de Dowex 1X8 y XAD-8 antes de la formación del hidruro correspondiente. Los factores de preconcentración obtenidos fueron 13 y 20 respectivamente. El método se aplicó a la determinación de selenio en aguas naturales (de bebida, de lago, río...) consiguiendo límites de detección del orden de $ng L^{-1}$.

Revisión bibliográfica

La introducción del hidruro generado en un sistema con detección ICP-MS, permite rebajar el límite de detección a 35 ng L⁻¹ y por tanto su aplicación a sueros y aguas [Quijano y col, 1995]

Muñoz y col en 1995, han propuesto el uso de disolventes orgánicos (metanol, etanol, propanol, acetona y acetonitrilo) para mejorar la señal de selenio en FI-HG-ICP-MS. La adición de estos disolventes reduce la interferencia del ⁷⁷ArCl, ⁷⁸Ar₂, ⁸²Ar₂H₂ que solapan con los isótopos de selenio. El método se ha aplicado a aguas de mar y los límites de detección están en el intervalo de ng L⁻¹.

El atrapamiento criogénico (CT), es una técnica de preconcentración que con frecuencia va asociada a la técnica de generación de hidruros así como para la determinación de otras especies volátiles del selenio, como DMSe y DMDSe [Örnemark y col, 1992]. El hidruro de selenio (o las especies volátiles) previamente desecadas bien sea mediante el uso de reactivos (NaOH, CaSO₄, CaCl₂, Mg(ClO₄)₂ ó H₂SO₄) [Vien y Fry, 1988] o con la ayuda de un baño de hielo seco e isopropanol [Cutter, 1978], se condensan en un tubo sumergido en nitrógeno líquido. Una vez finalizado el atrapamiento, el calentamiento progresivo de la trampa fría produce la volatilidad selectiva (de acuerdo con sus puntos de ebullición) de las diferentes especies que llegan al detector de absorción atómica ó ICP arrastrado por el gas inerte (argón, helio...) [Brooks y col, 1983].

El atrapamiento criogénico puede acoplarse a un cromatógrafo de gases. Los hidruros de Se, As, Sn y Sb se condensan en nitrógeno líquido; posteriormente los hidruros volatilizados son separados por cromatografía de gases y posteriormente detectados. El límite de detección es de 1-2 ng L⁻¹.

INTERFERENCIAS.

Las interferencias que presenta la generación del hidruro de selenio pueden agruparse en tres etapas:

- 1- Durante la generación del hidruro, por la presencia de metales de transición (Cu, Ni, Pt, Pd, Ag,...) ó de otros elementos formadores de hidruros (Sb, Pb, Hg, Te, As,...)
- 2- Después de la generación del hidruro, debido a procesos de adsorción ó formación de complejos.
- 3- Durante la etapa de atomización, debido a la presencia de radicales H ó a un exceso de H₂.

Algunos de los elementos de transición que más interfieren en la generación del hidruro de selenio son: Co(II), Cu(II), Ni (II), Pt(IV), Pd(II) y Ag(I), siendo el Cu(II) el que presenta un efecto más acusado. Esta interferencia se debe a la formación de compuestos estables entre el Se y el metal de transición (estos elementos, retienen el selenio en la etapa de mineralización cuando se utiliza GFAAS, haciéndolos muy útil como modificadores de matriz) [Narasaki e Ikeda, 1984; Welz y Melcher, 1984b]. Agterdenbos y Bax (1986) sugirieron que los elementos de transición descomponen el NaBH₄, antes que se forme el hidruro de selenio. Esta interferencia se puede disminuir por adición de ioduro que cataliza la formación del SeH₂ en presencia de estos metales.

En 1985, Ikeda redujo la interferencia de Ni(II) y Cu(II) pasando la muestra por una resina quelatante (copolímero de estireno-divinilbenceno conteniendo grupos imino-diacetatos). La columna (5 cm de longitud y 0.8 cm de diámetro externo) se coloca en línea en el sistema FI de generación del hidruro; obteniendo en el caso del Ni(II) y

del Cu(II) una tolerancia 5000 y 1000 veces mayor a la que presenta el selenio con estos metales de transición. Bye y col en 1983 disminuyeron la interferencia del cobre añadiendo tiourea como agente complejante del cobre, con un razonamiento análogo, la adición de ácido cítrico reduce la interferencia del níquel [Bye y col, 1985].

El nitrito y nitrato interfieren en la determinación de selenio en muestras medioambientales. El nitrito reacciona con el hidruro de selenio y el nitrato compite en la reducción del Se(VI) a Se(IV) reduciéndose a nitrito. Estas interferencias se minimizan mediante la adición de sulfanilamida [Cutter, 1983].

Los compuestos orgánicos también anulan la señal del selenio, probablemente debido a la formación de un aducto entre el SeH_2 y algún compuesto orgánico que esté en la muestra. Roden y Tallman en 1982 utilizaron una columna conteniendo XAD-8 para eliminar la interferencia de los compuestos orgánicos que están en la muestra.

II.2.6.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

Los métodos cromatográficos especialmente la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detectores atómicos son los acoplamientos más utilizados para la determinación de especies de selenio; sin embargo, también pueden acoplarse otros detectores tales como los conductimétricos, si bien generalmente no alcanzan la sensibilidad requerida.

Karlson y Frakenberg en 1986, consiguieron límites de detección bajos ($3 \mu\text{g L}^{-1}$ para SeO_3^{2-}) utilizando detección conductimétrica. La muestra, sedimentos, se pasa por una resina conteniendo plata para eliminar la interferencia del

Cl^- ; posteriormente se preconcentra en la precolumna (Wescan 269-003) y finalmente los aniones de interés SeO_3^{2-} , NO_3^- y SO_4^{2-} se separan en una columna aniónica utilizando como fase móvil ácido ftálico $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $\text{pH}=2.7$.

Mehra y Frakenberg desarrollaron en 1988 un método para la determinación de Se(IV) y Se(VI) con detección conductimétrica. Las especies se retienen en una columna de intercambio aniónico y se eluyen selectivamente con ácido p-hidróxibenzoico $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $\text{pH}=8$ como eluyente. Los límites de detección para Se(IV) y Se(VI) son 60 y $110 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente cuando el volumen inyectado es de 2 mL . El inconveniente que presenta en general la detección conductimétrica es la interferencia de Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , presentes a altas concentraciones en muestras medioambientales. Estos aniones pueden incluso llegar a anular la señal del Se(VI) [Hoover y Yager, 1990].

Mucho más empleada que la detección conductimétrica es el empleo de técnicas atómicas acopladas al cromatógrafo. La ventaja de este acoplamiento frente a la detección conductimétrica, aparte del aumento de sensibilidad, es que se minimizan las interferencias de otros aniones presentes en la muestra, así Chakraborti y col en 1982 determinaron Se(IV) y Se(VI) en agua de río sin que el NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} y PO_4^{3-} interfiriesen en la determinación. Inicialmente se preconcentran los analitos en una precolumna (Dionex 30008) y posteriormente se separan Se(IV) y Se(VI) en una columna aniónica (Dionex 30589), utilizando Na_2CO_3 $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como eluyente. La detección selectiva de selenio se efectuó por espectroscopía de absorción atómica con vaporización electrotérmica (GFAAS). El límite de detección alcanzado fue de 20 ng para Se(IV) y Se(VI) .

Revisión bibliográfica

Roden y Tallman en 1982, acoplaron la cromatografía iónica-generación de hidruros-atrapamiento criogénico y espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito (IC-HG-CT-GFAAS) para la determinación de Se(IV) y Se(VI) en aguas subterráneas. Las interferencias orgánicas se eliminaron pasando las muestras por una resina de amberlita XAD-8.

En 1985, se empleó la cromatografía iónica con detección espectrofluorimétrica para la determinación de Se(IV) y Se(VI) en agua de grifo [Sibata y col, 1985]. El Se(IV) a la salida de la columna reacciona con 0.2% (m/v) 2,3 diminonaftaleno (DAN), formando un compuesto fluorescente. La determinación de Se(VI) se lleva a cabo previa reducción a Se(IV) con HBr 6 mol L⁻¹ como agente reductor y calentando un bucle de reducción a 100°C. Los límites de detección son 0.17 y 0.5 µg L⁻¹ para Se(VI) y Se(IV) respectivamente cuando el volumen de inyección es de 200 µL.

En 1983, McCarthy y col separaron Se(IV), Se(VI), As(III) y As(V) en una columna aniónica (Nucleosil-NH(CH₃)₂ sobre sílice como soporte). La elución se efectuó en gradiente en medios reguladores a pH= 4.6 y pH=6.9. El eluato se introduce en un nebulizador de flujo cruzado de un ICP-AES. Pese a ser una técnica de detección sensible, el alto límite de detección alcanzado (140 y 91 ng para Se(IV) y Se(VI) respectivamente) no permite la aplicación del método a muestras medioambientales.

Laborda y col en 1991, probaron distintas interfases entre el HPLC y el ICP-AES para la separación de (CH₃)₃Se⁺, SeO₃²⁻ y SeO₄²⁻. El vaporizador térmico (thermospray) ofrece una sensibilidad tres veces superior a la que ofrece el nebulizador de flujo cruzado; además la primera interfase permite la introducción de porcentajes de metanol de hasta un

75% frente al 25% como máximo que permite un nebulizador de flujo cruzado. La separación se lleva a cabo con una columna aniónica (IC-PAK-AC) y utilizando como fase móvil citrato amónico 0.08 mol L^{-1} a $\text{pH}=3.3$. Los límites de detección fueron de 14, 27 y 54 ng para TMeSe, Se(IV) y Se(VI), cuando el volumen de inyección es de $100 \mu\text{L}$ y la interfase utilizada es el vaporizador térmico. Dos años más tarde, estos autores determinan las mismas especies en agua y orina empleando como sistema detector el horno de grafito (con Ni y Mg como modificadores de matriz) y previa separación en una columna aniónica (Nucleosil 100SB). Los límites de detección se rebajaron considerablemente a 1.67, 1.27 y 0.76 ng para TMeSe, Se(IV) y Se(VI) respectivamente [Laborda y col, 1993].

Blais y col propusieron en 1991 un método para la determinación de trimetilselenio y selenocolina en orina humana. La separación se realiza sobre una columna de cianopropil, utilizando como fase móvil metanol 70% v/v, dietil éter 29% v/v y ácido acético glacial 1% v/v conteniendo trietilamina 0.01% m/v y ioduro de trimetilazufre $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Los límites de detección alcanzados fueron 5 y 7 ng para selenocolina y TMeSe respectivamente cuando el volumen de inyección es de $100 \mu\text{L}$. Antes de la introducción de la orina en el cromatógrafo se la somete a un proceso de limpieza ("clean-up"). La detección se realiza mediante espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros termoquímica (THG-AAS).

El acoplamiento directo del cromatógrafo líquido con el espectrómetro de absorción atómica con llama ó con cámara de grafito, ha sido utilizado para la determinación de Se(IV) y Se(VI) en diferentes muestras líquidas, utilizadas como aporte vitamínico y selénico para los animales [Kölb y col, 1993]. La separación se realiza sobre una columna aniónica (Hamilton PRPX-100) utilizando como eluyente el ftalato ácido

Revisión bibliográfica

de potasio (KHP) $3 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ saturado con hidróxido de níquel, cuando el sistema de atomización es la cámara de grafito. Cuando la llama se utiliza como sistema de atomización la fase móvil es el ftalato ácido de potasio 10^{-2} mol L⁻¹ a pH=7. Los límites de detección son 1 ng para Se(IV) 0.6 ng para Se(VI), cuando el sistema atomizador es la cámara de grafito y 8 y 11 ng respectivamente cuando la llama es utilizada.

Un método para la determinación de selenoaminoácidos (selenometionina y selenocistina) en presencia de selenito y seleniato se propone por acoplamiento de HPLC-GFAAS [Potin-Gautier y col, 1993]. La columna (Hamilton PRP1, estireno divinil-benceno) se estabiliza con una mezcla de agua:acetonitrilo (99:1) conteniendo 0.01 mol L⁻¹ bromuro de tetraetilamonio a pH=4 con el fin de formar en la columna un par-iónico. El eluido de la columna se mezcla en una interfase con una solución de nitrato de níquel 0.8% (m/v), que actúa como modificador de matriz para la posterior detección en la cámara de grafito. Los límites de detección alcanzados son de 10, 8, 10 y 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para selenocistina, selenometionina, Se(IV) y Se(VI) respectivamente. Este método se aplicó a un extracto de trébol blanco con valor certificado en selenio total.

Gilson y col, en 1995 han propuesto una hidrólisis enzimática con proteasa para la extracción de los selenoaminoácidos (selenometionina y selenocistina) y selenio inorgánico en muestras de levadura. La separación se realiza utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua (10:90) conteniendo heptano sulfonato sódico a pH=2.4. El eluido de la columna cromatográfica se mezcla con una disolución de paladio(II), modificador de matriz, antes de ser introducido en la cámara de grafito mediante una interfase. Los límites de detección para selenometionina y selenocistina son 50 y 34

$\mu\text{g Kg}^{-1}$ respectivamente.

II.2.7. ACOPLAMIENTO CROMATOGRAFÍA DE GASES- DETECTORES ATÓMICOS.

La cromatografía de gases se ha aplicado a la determinación de: compuestos volátiles de selenio, como dimetilselenio y dimetildiselenio ó compuestos inorgánicos de selenio, convertidos en especies volátiles, por reacción de éstos con tetraetilborato ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) [Clark y Craig, 1992].

Existe una gran variedad de acoplamientos de cromatografía de gases y detectores como GC-AAS, GC-GFAAS, GC-FPD,...

Las rellenos utilizados en la columnas cromatográficas son: 20% carbowax, 10% OV-101 ó 10% polimetafeniléter, como fase estacionaria y chomosorb W 60/80 mesh como soporte. Los gases de arrastre normalmente utilizados son argón o nitrógeno. El hidrógeno en concentración del 10% mejora la eficiencia de la atomización de los compuestos de selenio.

Jiang y col en 1982, acoplaron la cromatografía de gases y la absorción atómica a la determinación de dimetilselenio, dimetildiselenio y dietilselenio en muestras de aire; obteniéndose límites de detección de $0.2-0.3 \text{ ng m}^{-3}$. Los compuestos volátiles de selenio, presentes en el aire, se recogen en una trampa criogénica, consistente en un tubo sumergido en nitrógeno líquido. A continuación se desorben termicamente y se transfieren a un tubo en U relleno con fase estacionaria y sumergido en nitrógeno líquido. Posteriormente el tubo se calienta gradualmente y las especies se conducen al inyector del cromatógrafo de gases el cual está a 100°C , temperatura que asegura la estabilidad de las especies.

La cromatografía de gases acoplada a la espectroscopía

Revisión bibliográfica

de absorción atómica, se aplicó en 1983 para el estudio de las metilaciones de selenio inorgánico, en ratones de laboratorio [Jiang y col, 1983]. Cuando en el agua de bebida se suministra selenito y selenocistina la especie predominantemente exhalada es el dimetilselenio; sin embargo, cuando el agua de bebida contiene selenometionina, son el dimetilselenio, dimetildiselenio y un compuesto de selenio no identificado los productos de la degradación. Este compuesto, no identificado, indica la existencia de una etapa no conocida en el metabolismo y biotransformación de estos compuestos.

La incubación a 30°C durante tres días de muestras de suelo a la que se le ha añadido Se(IV) produce compuestos volátiles orgánicos de selenio. Las especies volátiles producidas por biometilación, se recogen en hexano y se analizan por GC-GFAAS. Los límites de detección obtenidos son de 5 pg para Me₂Se y Et₂Se y 20 ng para Me₂Se₂.

II.3.- BIBLIOGRAFÍA

ALAM, A.M.S.; VITTORI, O. Y PORTHAULT, M.
Anal. Chim. Acta. 87, 437 (1976).

ASHBY, J.; CLARK, S. Y CRAIG, P.J.
J. Anal. At. Spectrom., 3, 735, (1988).

BLAIS, J.S.; HUYGHES-DESPOINTES, A.; MOMPLAISIR, G.M. Y
MARSHALL, W.D.
J. Anal. Atom. Spectrom. 6, 225, (1991).

BLOOM, N.
Can. J. Fish. Aquat. Sel., 46, 1131 (1989)

BRINCKMAN, F.E.; JEWETT, K.L.; IVERSON, W.P. E IRGOLIC, K.J.
J. Chromatogr 191, 31 (1980)

BRYCE, D.W.; IZQUIERDO, A. Y LUQUE DE CASTRO, M.D.
Fresenius, J. Anal. Chem. 351, 433, (1995).

BUCKLEY, W.T.; BERDAC, J.J. Y GODFREY, D.V.
Anal. Chem. 64, 724 (1992).

BURNS, D.T.; GLOCKLING, F. Y HARRIOT, M.
Analyst, 106, 921 (1981).

BROOKS, R.R.; WILLIS, J.A. Y LIDDLE, J.R.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1, 130, (1983).

BYE, R.; ENGVIK, I. Y LUND, W.
Anal. Chem. 55, 2457, (1983).

BYE, R.
Analyst, 110, 85, (1985).

BYE R. Y LUND, W.
Fresenius, Z. Anal. Chem. 332, 242 (1988).

CAMPANELLA, L.; FERRI, T.; MORABITO, R. Y PADETTI, A.M.
La chimica e l'industria 69, 10, 90 (1987).

CANTARERO, A.; GÓMEZ, M.M.; CÁMARA, C. Y PALACIOS, M.A.
Anal. Chim. Acta. 296, 205 (1994).

CHAKRABORTI, D.; HILLMAN, D.C.J.; IRGOLIC, K.J. Y ZINGARO,
R.A.
Journal Chromatograph. 249,81 (1982).

Revisión bibliográfica

CHAU, Y.K.; WONG, P.T.S. Y GOULDEN, P.D.
Anal. Chem. 47, 2279, (1975).

CLARK, S.; ASHBY, J. Y CRAIG, P.J.
Analyst, 112, 1781 (1987).

CLARK, S. Y CRAIG, P.J.
Mikrochim. Acta. 109, 141 (1992).

COX, A.G.; COOK, A.J. Y McLEOD, C.W.
Analyst, 110, 331 (1985)

COX, A.G.; COOK, A.J. Y McLEOD, C.W.
Microchim. Acta. (1992)

CHRIS, C.Y. Y SADANA R.S.
Anal. Chim. Acta. 270, 231 (1992)

CUKOR, P. Y LOTT, P.F.
J. Phis. Chem. 69, 3232 (1965).

CUTTER, G.A.
Anal. Chim. Acta. 98, 59 (1978).

CUTTER, G.A.
Anal. Chim. Acta. 149, 391 (1983).

DONARD, O.F.X. Y MARTIN, F.M.
Trends in Anal. Chem. 11, 55 (1992)

FLORENCE, T.M.
Talanta, 29, 345 (1982)

GILSON, N.; ASTRUC, A.; ASTRUC, M. Y POTIN-GAUTIER, M.
(1995).

GÓMEZ, M.M.; HIDALGO, M.M. Y PALACIOS, M.A.
Fresenius J. Anal. Chem. 352 (1995).

GOLDBERG, E.D.
J. Geol. 62, 249 (1954).

HIDALGO, M.M.; GÓMEZ, M.M. Y PALACIOS, M.A.
Analyst, 120, 1911 (1995)

HOOVER, T.B.; YAGER, D.
Env. Protec. Agency. Washington DC., 11 (1990).

HOWARD, A.G. GRAY, M.R. WATERS, A.J. Y OROMIEHIE, A.R.
Anal. Chim. Acta. 118, 87 (1980).

IKEDA, M.
Anal. Chim. Acta. 170, 217 (1985).

JIANG, S.; JONGHE, W. DE Y ADAMS, F.
Anal. Chim. Acta. 136, 183, (1982).

JIANG, S.; ROBBERECHT, H.; ADAMS, F. Y VAUDEN BERGHE, D.
Toxicological and Environmental Chemistry, 6, 191 (1983).

JIANG, G.; ZHE-MING, N.; ZHANG LI, ANG LI, HAN HENG-BIN, XIA-
QUAN, SHEN.
J. Anal. Atom. Spectrom. 7, 447, (1992).

QUIJANO, M.A.; GUTIERREZ, A.M.; PÉREZ-CONDE, C. Y CÁMARA, C.
J. Anal. Atom. Spectrom. (en prensa) (1995).

KARLSON, U. Y FRAKENBERG, W.T. JR.
Anal. Chem. 58, 2704 (1986).

KOLB, B. KEMNER, G. SCHESLER, F.H. Y WIEDEKING, E.
Fresenius' Z Anal. Chem. , 221, 166 (1966).

KOLB, G.; KALCHER, K. E IRGOLIC, K.J.
Anal. Chim. Acta. 284, 301 (1993).

LABORDA, F.; LOOS VOLLEBREGHT, M.C.T. Y GALAN, L.
Spectrochim. Acta, 46b, 1089, (1991).

LABORDA, F.; CHAKRABORTI, D.; MIR, J. Y CASTILLO, J.R.
J. Anal. Atom. Spectrom. 8, 643 (1993).

LÓPEZ, A.; TORRALBA, R.; PALACIOS, M.A. Y CÁMARA, C.
Talanta, 39, 1343 (1992).

LÓPEZ, M.A.; GÓMEZ, M.M.; PALACIOS, M.A. Y CÁMARA, C.
Fresenius, J. Anal. Chem. 346, 643 (1993)

LÓPEZ-GONZÁLVEZ, M.A.; GÓMEZ, M.M.; CÁMARA, C. Y PALACIOS,
M.A.
J. Anal. Atom. Spectrom. 9, 291 (1994).

MASÈE, R.; VAN DER SLOOT, H.A.; Y DAS, H.A.
J. Radioanal. Chem. 38, 157 (1977).

MASÈE, R.; MAESSEN, F.J. Y GOEIJ, J.M. DE
Anal. Chim. Acta. 127, 181 (1981).

MARSHALL, G.D. Y VAN STADEN J.F.
J. Anal. Atom. Spectrom. 5, 675, (1990a).

MARSHALL, G.D. Y VAN STADEN J.F.
J. Anal. Atom. Spectrom. 5, 681, (1990b).

Mc CARTHY, J.P.; CARUSO, J.A. Y FRICKE, F.L.
Journal of Chromatograph. Science. 21, 389 (1983)

Revisión bibliográfica

MEHRA, H.C. Y FRAKENBERG, W.T.
Chromatographia, 25, 585 (1988).

MUANGNOCHAROEN, S.; KEITHA, O.M. Y CHIOU, K.Y.
Talanta, 35, 679 (1988).

MUÑOZ OLIVAS, R.; QUÉTEL, C.R. Y DONARD, O.F.X.
Química Analítica (en prensa) (1995).

NAKATA, F.; YASUI, Y.; MATSUO, H. Y KUMAMARU, t.
Analytical Sciences, 1, 417 (1985).

NARASAKI, H E IKEDA, M.
Anal. Chem. 56, 2059 (1984).

ÖRNEMARK, U.; PETERSON, J. Y OLIN, A.
Talanta, 39, 1, 1089 (1992).

ÖRNEMARK, U Y OLIN, A.
Talanta, 41, 1, 67 (1994a).

ÖRNEMARK, U Y OLIN, A.
Talanta, 41, 10, 1675 (1994b).

ORVINI, E.; LODOLA, L.; GALLORINI, M. Y ZERLIA, T.
Heavy Metals in the Environment. Amsterdam 657, (1981).

PARKER, C.A. Y HARVEY, L.G.
Analyst, 87, 558 (1973).

PINEL, R. BENABDALLAH, M.Z.; ASTRUC, A.; PAUTIN-GAUTIER, M.
Y ASTRUC, M.
Analisis, 12, 344 (1984).

POTIN-GAUTIER, M.; BOUCHARAT, C.; ASTRUC, A. Y ASTRUC, M.
Applied Organometal. Chem. 7, 593 (1993)

POTIN-GAUTIER, M.; SÉBY, F Y ASTRUC, M.
Fresenius. J. Anal. Chem. 351, 443 (1995).

RODEN, D.R. Y TALLMAN, D.E.
Anal. Chem. 54, 307 (1982).

RODRÍGUEZ, D.; FERNÁNDEZ, P.; PÉREZ-CONDE, C.; GUTIÉRREZ, A.
Y CÁMARA, C.
Fresenius J. Anal. Chem. 349, 442 (1994).

RUBIO, R.; ALBERTÍ, J. Y RAURET, G.
Intern. J. Environ. Anal. Chem. 52, 203, (1993a).

RUBIO, R.; PADRÓ, A.; ALBERTÍ, J. Y RAURET, G.
Anal. chim. Acta. 283, 160 (1993b)

SIBATA, Y.; MORITA, M. Y FUWA, K.
Analyst, 110, 1269 (1985).

SMICHOWSKI, P.N., DE LA CALLE-GUNTIÑAS, M.B. CÁMARA, C.
Fresenius, J. Anal. Chem. 348, 380 (1994a).

SMICHOWSKI, P.N., DE LA CALLE, M.B., MADRID, Y., COBO,
M.G., Y CÁMARA, C.
Spectrochim. Acta., 49b, 11, 1049-1055 (1994b)

SUGIMURA, Y. SUZUKI, Y. Y MIYAKE, Y.
J. Oceanogr. Soc. Japan. 32, 235 (1976).

SUGIMURA, Y. Y SUZUKI, Y.
J. Oceanogr. Soc. Japan. 33, 23, (1977).

TAKAYANAGI, K. Y WONG, G.T.F.
Anal. Chim. Acta. 148, 263 (1983).

TAKAYANAGI, K. Y WONG, G.T.F.
Marine Chemistry, 14, 141 (1984).

TAKAYANAGI, K. Y COSSA, D.
Marine and Stuarine Geochemistry. Sigleo, A.C. y Hattori, A.
(ed); Lewis Publishers (1985a).

TAKAYANAGI, K. Y WONG, G.T.F.
Geochimica et Cosmochimica Acta, 49, 539, (1985b).

TAKAYANAGI, K. WONG, G.T.F. Y FILARDO, M.J.
J. of the Oceanografical Soc. of Japan 45, 129 (1989).

VALCÁRCEL, M. Y LUQUE DE CASTRO, M.D.
Flow injection Analysis, principles and Applications, Ellis
Horwood, Chichester, (1987).

VERLINDEN, M.; BAART, J. Y DEELSTRA, H.
Talanta, 27, 633 (1980).

VERLINDEN, M.
Talanta, 29, 875 (1982)

VIEN, S.H. Y FRY, R.C.
Anal. Chem. 60, 465, (1988).

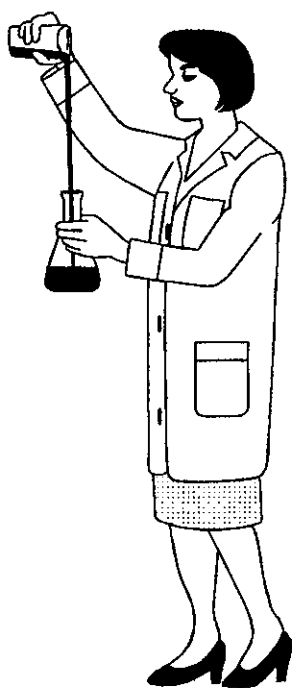
WELZ, B. Y MELCHER, M.
Anal. Chim. Acta. 165, 131 (1984a)

WELZ, B. Y MELCHER, M.
Analyst, 109, 569 (1984b)

WELZ, B.; WOLYNETZ, M.S. Y VERLINDEN, M.
Pure & Appl. Chem. 59, 927 (1987).

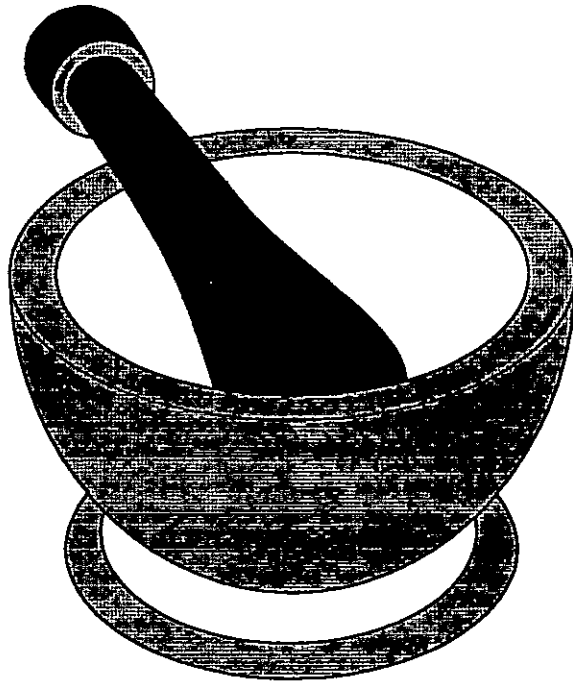
Revisión bibliográfica

YAMAMOTO, M.; YAMUDA, M. Y YAMAMOTO, Y.
Anal. Chem. 57, 1382 (1985).



PARTE B

PARTE EXPERIMENTAL



CAPÍTULO III

**DESARROLLO DE MÉTODOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE
Se(IV) Y Se(VI)**

CAPÍTULO III - DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO.

- III.1.- Preparación de reactivos.
- III.2.- Aparatos y material utilizado.
- III.3.- Acoplamiento FI-HG-AAS y flujo continuo HG-AAS para la determinación de especies de selenio (Se(IV) y Se(VI)). Aplicaciones analíticas.
 - III.3.1.- Antecedentes.
 - III.3.2.- Reducción en línea de Se(VI) a Se(IV).
 - III.3.3.- Optimización del sistema de generación de hidruros en continuo e inyección en flujo.
 - III.3.4.- Características analíticas y aplicaciones.
 - III.3.5.- Discusión de resultados.
- III.4.- Preconcentración de Se(IV) y Se(VI) en microcolumnas de alúmina. Acoplamiento FI-HG-AAS.
 - III.4.1.- Columna preconcentradora: prestaciones analíticas y estudio bibliográfico.
 - III.4.2.- La alúmina como soporte preconcentrador.
 - III.4.3.- Parámetros físico-químicos de la preconcentración-elución.
 - III.4.4.- Características analíticas y aplicaciones.
 - III.4.5.- Discusión de resultados.
- III.5.- Bibliografía.

III.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Uno de los principales problemas que surgen en la preparación de reactivos y muestras cuando se trabaja con especies metálicas en concentraciones inferiores a $\mu\text{g L}^{-1}$ es la elección del recipiente en que se han de guardar las muestras y disoluciones patrón. En el capítulo V, se presenta un exhaustivo estudio sobre la estabilidad de Se(IV) y Se(VI) en distintos medios, recipientes y temperaturas de conservación. Este estudio fue necesario debido a la gran controversia existente en la bibliografía sobre la estabilidad de Se(IV) y Se(VI). La agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos [1976], recomienda ácido nítrico a $\text{pH} < 2$ para garantizar la estabilidad de Se(IV) en aguas naturales. Sin embargo Maseè y col (1981) demostraron que la estabilidad del Se(IV) no depende del pH, porque no observaron pérdidas de dicho analito a $\text{pH} = 8.5$.

Parte experimental

Independientemente del pH, se ha demostrado que la baja temperatura de almacenamiento favorece la estabilidad de las especies. Con estos antecedentes todas las disoluciones utilizadas en la realización experimental de esta memoria se prepararon como se explica a continuación, se almacenaron en botellas de polietileno y se conservaron en el frigorífico.

- Disolución patrón de Se(VI) de 1000 mg L⁻¹, preparada por disolución de 0.61040 g de Na₂SeO₄ ("Aldrich" 98%) en 250 mL de agua de calidad Milli-Q. A partir de esta disolución patrón se prepararon diariamente y por dilución conveniente las disoluciones de trabajo.

- Disolución patrón de Se(IV) de 1000 mg L⁻¹, preparada por disolución de 0.55310 g de Na₂SeO₃ ("Aldrich" 99%) en 250 mL de agua de calidad Milli-Q. A partir de esta disolución patrón se prepararon diariamente y por dilución adecuada las disoluciones de trabajo.

- Disolución patrón de cloruro de trimetilselenio (TMeSeCl) 1000 mg L⁻¹ en Se. Se prepara por disolución de 0.50490 g de TMeSeCl (sintetizado en el laboratorio según [Palmer y col, 1969]) en 250 mL de agua de calidad Milli-Q. A partir de esta disolución patrón se prepararon diariamente y por dilución apropiada las disoluciones de trabajo.

- Disolución patrón de selenometionina 1000 mg L⁻¹ en Se, preparada por disolución de 0.62090 g de selenometionina ("Aldrich") en 250 mL de agua de calidad Milli-Q. A partir de esta disolución se prepararon diariamente las disoluciones de trabajo.

- Disolución de selenocistina 1000 mg L⁻¹ en Se, preparada por disolución de 1.05780 g de selenocistina ("Aldrich") en HCl 3% (v/v) y enrase a 250 mL con agua de

calidad Milli-Q. A partir de esta disolución se prepararon diariamente las disoluciones de trabajo.

- Disolución de NaBH_4 5% (m/v) en NaOH 1.7% (m/v), preparada por disolución de 8 gramos de NaOH ("Merck") y 25 g de NaBH_4 ("Aldrich") en 500 mL de agua de calidad Milli-Q. La disolución se filtra para eliminar la turbidez.

- Disoluciones de HCl , preparadas por dilución conveniente de HCl concentrado ("Carlo Erba" 37%, banda azul).

- Disolución de HNO_3 0.01 mol L^{-1} , preparada por dilución adecuada de HNO_3 concentrado ("Carlo Erba" 65%, banda roja).

- Disolución de NH_3 2 mol L^{-1} , preparada por dilución conveniente de NH_3 concentrado ("Carlo Erba" 30%, banda azul).

- Disolución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 3% (m/v) en NaOH 2% (m/v), preparada por disolución de 10 gramos de NaOH ("Merck") y 15 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ("Merck") en 500 mL de agua de calidad Milli-Q.

- Alúmina activada A8753 Activity Grade 1(pfs) ("Sigma").

- Cloruro sódico (NaCl , "Merck").

- Ácido sulfúrico ("Carlo Erba" 96% banda roja).

- Disolución de NaH_2PO_4 0.1 mol L^{-1} , preparada por disolución de 13.19900 g de NaH_2PO_4 ("Panreac") en 1000 mL de agua de calidad Milli-Q.

Parte experimental

- Disolución de Na_2HPO_4 , 0.1 mol L^{-1} , preparada por disolución de 14.19600 g de Na_2HPO_4 ("Panreac") en 1000 mL de agua de calidad Milli-Q.

- Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.1 mol L^{-1} pH=6,8, preparada por mezcla de iguales volúmenes de NaH_2PO_4 , 0.1 mol L^{-1} y Na_2HPO_4 , 0.1 mol L^{-1} . La disolución se filtra a vacío a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$.

III.2.- APARATOS Y MATERIAL UTILIZADO.

En esta sección se relacionan los aparatos y el material utilizados en la realización de la parte experimental recogida en esta memoria.

- Espectrofotómetro de absorción atómica "Perkin-Elmer" modelo 2380; equipado con una lámpara de descarga sin electrodo (EDL) de selenio, que opera a 6 W.
- Supletor de potencia ("Power Supply") "Perkin-Elmer".
- Registrador "Perkin-Elmer" Modelo 56.
- Válvula de inyección de seis vías "Omnifit"
- Balanza analítica "Precisa" con sensibilidad 0.01 mg.
- Bomba peristáltica "Gilson Minipuls 2".
- Separador de fases gas-líquido "Philips"
- Célula de atomización de cuarzo "Aplitec".
- Soporte para la célula de cuarzo diseñado en el Laboratorio de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid.
- Horno microondas "Moulinex" 1250-650 W.
- Placa calefactora "P-Selecta".
- Estufa "P-Selecta Digitronic".
- Frigorífico "Corbero"
- Congelador "Zanussi".
- Válvula de inyección de seis vías de baja presión "Rheodyne" con bucle de 100 μ L.
- Bomba de alta presión "Waters" modelo 590.
- Columna cromatográfica aniónica "Hamilton PRP-X100 (25 cm X 4.1 mm i.d).
- Sistema de purificación de agua Milli-Q "Millipore".
- Micropipetas "Brand" de volumen variable y fijo.

Parte experimental

- pH-mV metro "Crison Digit 501".
- Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada y recipientes de polietileno y teflón para almacenar disoluciones y muestras.
- Argón C-50 "Carburos Metálicos".
- Acetileno C-26 "Carburos Metálicos"
- Medidor de flujo de gases de 0-50 L h⁻¹ para graduar el flujo de argón.
- Tubos flexibles de Tygon (0.60 cc m⁻¹) "Gilson".
- Tubos rígidos de teflón de 0.5 y 1.0 mm de diámetro interno.
- Tamiz de 180 μ m de poro.

III.3.- ACOPLAMIENTOS: INYECCIÓN EN FLUJO-GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (FI-HG-AAS) Y FLUJO CONTINUO HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES INORGÁNICAS DE SELENIO (Se(IV) Y Se(VI)). APLICACIONES ANALÍTICAS.

III.3.1. ANTECEDENTES.

Como ya se mencionó en el capítulo II (apartado 2.5) la generación de hidruros es un método de introducción de muestra en detectores atómicos muy utilizado en la actualidad, debido a las grandes ventajas que presenta frente a la introducción convencional de la muestra (nebulización directa).

Las ventajas que presenta la generación de hidruros son: separa el analito de la matriz, disminuyendo las posibles interferencias de la matriz; rebaja el límite de detección, permitiendo su uso en el análisis medioambiental; permite la determinación de las distintas especies del elemento así como su acoplamiento a técnicas de preconcentración y separación.

Para la reacción de formación del hidruro, diversos autores emplearon, en principio, la mezcla metal ácido (Zn/HCl ó Sn/HCl) como agentes reductores [Holak, W., 1969]. Sin embargo esta reacción presentaba inconvenientes tales como su lenta cinética, problemas de contaminación debido a los reactivos (metal) y su baja eficacia en la formación del hidruro. Este agente reductor fue desplazado por la aparición del NaBH₄ que en medio ácido proporciona grandes cantidades de H₂↑, capaz de reducir el analito y formar su hidruro cuantitativa e instantáneamente [Smidth y Royer, 1973].

Parte experimental

Tradicionalmente la generación de hidruros se ha realizado de forma discontinua, haciendo caer el borohidruro sobre la muestra previamente acidificada. El hidruro arrastrado por una corriente de argón llega a una célula de cuarzo (calentada electrotérmicamente ó por una llama aire-acetileno), donde se produce la atomización del elemento de interés.

En la actualidad la forma discontinua ó "batch" de generar el hidruro está dejando paso a sistemas más automáticos como el continuo ó la inyección en flujo (FI), por su mayor versatilidad, facilidad, rapidez de operación, posibilidad de automatización y su menor gasto de reactivos y muestras. Gracias a la introducción de estos sistemas semi-automáticos en la generación del hidruro se ha observado un gran auge en el uso de esta técnica tanto en investigación (proponiendo nuevas aplicaciones) como en el análisis de rutina de todos los elementos formadores de hidruro (Sb, As, Se, Ge, Te, Pb, Sn y Hg (vapor frío)).

La determinación de otras especies de selenio, distintas del Se(IV) precisa previamente una etapa de transformación de la especie de partida en Se(IV). Esta etapa, como ya se indicó en la revisión bibliográfica (Capítulo II.2.5), puede ser limitante ya que precisa mineralizaciones y posteriores reducciones lentas, lo que aumenta los problemas de contaminación ó de pérdidas del analito. Por tanto la necesidad de conseguir una reducción en línea con el proceso de generación del hidruro es de gran importancia con el fin de conseguir la total automatización de la generación del hidruro de selenio. En este sentido, se han estudiado todos los parámetros que influyen en la generación en continuo y en inyección en flujo del hidruro de selenio inorgánico, a partir de los grados de oxidación (IV) y (VI).

III.3.2. REDUCCIÓN EN LÍNEA DE Se(VI) A Se(IV).

En un principio, la reducción en línea de Se(VI) a Se(IV). La reducción de Se(VI) a Se(IV) se ha llevado a cabo convencionalmente utilizando diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (siempre superior a 6 mol L^{-1}) como agente reductor y calentando la muestra ya acidificada, en placa calefactora ó baño de agua a una temperatura próxima a los 100°C , por un tiempo que oscilaba entre 10 y 40 minutos. Una vez conseguida la reducción cuantitativa del Se(VI) a Se(IV) en discontinuo, el procedimiento se ha adaptado a la reducción en línea, tanto en sistema en continuo como en inyección en flujo.

Nuestras primeras experiencias para la reducción en línea de Se(VI) a Se(IV) se llevaron a cabo, con HCl concentrado, e introduciendo el bucle de reducción ($1.5 \text{ m} \times 0.5 \text{ mm i.d}$) en un baño de agua (100°C) calentado mediante una placa calefactora. Sin embargo este sistema de calefacción no proporciona la suficiente temperatura para que en el interior del bucle y al paso de la muestra, se produzca la reducción cuantitativa del Se(VI) a Se(IV), y la eficiencia de la reducción alcanzada, fue siempre inferior al 50%. Por tanto fue necesario el uso de un baño que proporcionara temperaturas más altas. En principio, se probaron baños de silicona y de polvo de grafito; eligiéndose el segundo por sus mejores prestaciones en cuanto a manipulación y rapidez para alcanzar temperaturas más elevadas en un tiempo menor.

La muestra puede introducirse acidificada en el sistema ó bien realizarse la acidificación de la misma dentro del sistema en continuo. Inicialmente la acidificación de la muestra se realizó fuera del sistema para conocer exactamente la concentración de agente reductor (ácido clorhídrico) que

Parte experimental

precisa la reducción en línea. Así con una temperatura del baño de grafito aproximada de 170°C , se probaron concentraciones de ácido clorhídrico final en la muestra entre 0 y 10 mol L^{-1} para diferentes cantidades de Se(IV) y Se(VI). Los resultados de esta optimización se muestran en la Figura 7.

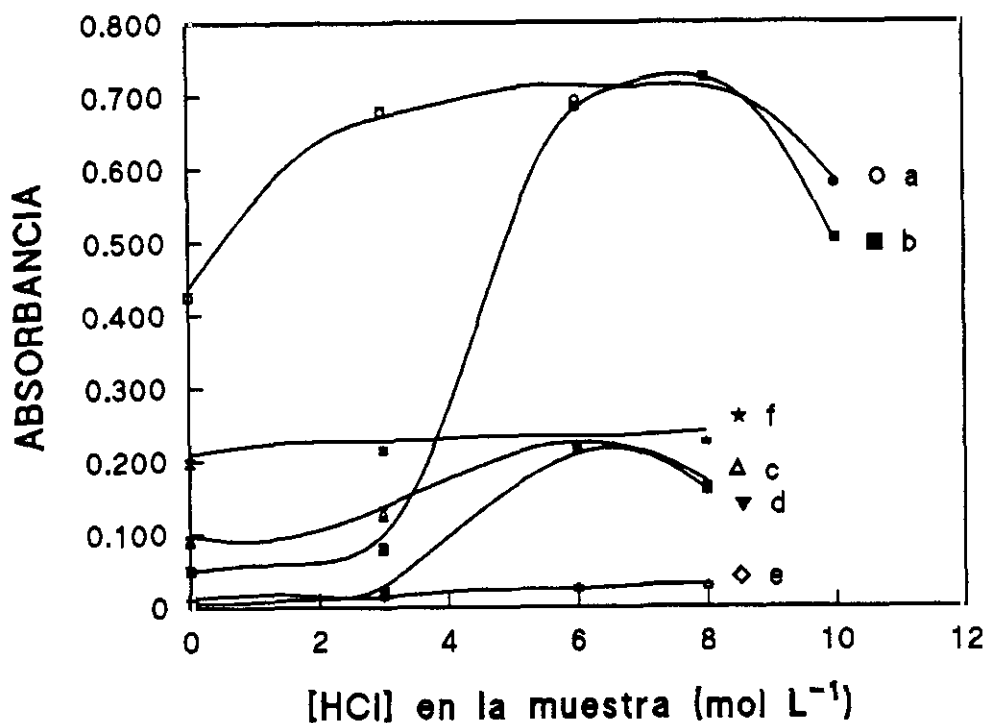


Figura 7. Influencia de la concentración de ácido clorhídrico en la muestra en la reducción en línea de Se(VI) a Se(IV). a) $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) con calefacción. b) $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI) con calefacción. c) $25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) con calefacción. d) $25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI) con calefacción. e) $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI) sin calefacción. f) $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) sin calefacción.

Como puede observarse la reducción de Se(VI) a Se(IV) precisa del sistema calefactor y una concentración de ácido del orden ó superior a 6 mol L^{-1} tanto cuando la concentración de selenio en la muestra es de 25 ó de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. También se observa que el calentamiento del sistema presenta un aumento de la sensibilidad en la determinación de Se(IV), (curvas a y f), posiblemente debido a que un aumento de la temperatura proporciona también un aumento en la eficiencia de la generación del hidruro.

El empleo del horno de microondas para realizar la reducción en línea, en lugar del horno de grafito ofrece grandes ventajas frente al segundo en cuanto a: limpieza, rapidez para alcanzar la temperatura deseada en menor tiempo. Además, al parar el microondas, el horno se enfría instantáneamente. Para conocer las prestaciones del microondas en la reducción, en línea del Se(VI) a Se(IV), se introduce el bucle de reducción por los respiraderos del horno.

Las optimizaciones llevadas a cabo para la reducción "en línea" utilizando éste como sistema calefactor son: disposición del bucle, potencia del horno microondas y concentración del ácido clorhídrico. Todos estos parámetros se han optimizado con un bucle de teflón de 0.5 mm de diámetro interno y 1.5 m de longitud.

La disposición del bucle dentro del microondas no es un parámetro crucial en la reducción en línea; sin embargo, con el fin de homogeneizar al máximo la muestra con el ácido clorhídrico, se ha utilizado un bucle anudado, atravesando el horno microondas con el fin que el calentamiento sea más efectivo. La potencia del horno microondas se varió entre 200 y 650 W. Se comprobó que la reducción sólo es cuantitativa cuando la potencia del microondas fue la máxima

Parte experimental

(650 W), potencias inferiores provocaron reducciones inferiores al 50% y desviaciones típicas superiores al 15%.

La concentración del ácido clorhídrico, que se mezcla con la muestra antes de introducirse en el microondas, se varió entre 6 y 10 mol L⁻¹. Los resultados se muestran en la Figura 8. Como puede observarse es necesario una concentración de ácido clorhídrico de 10 mol L⁻¹ para obtener la reducción cuantitativa del Se(VI) a Se(IV); concentraciones inferiores de 10 mol L⁻¹ de ácido proporcionaron reducciones no cuantitativas, por lo que se escogió esa concentración para todas las posteriores experiencias.

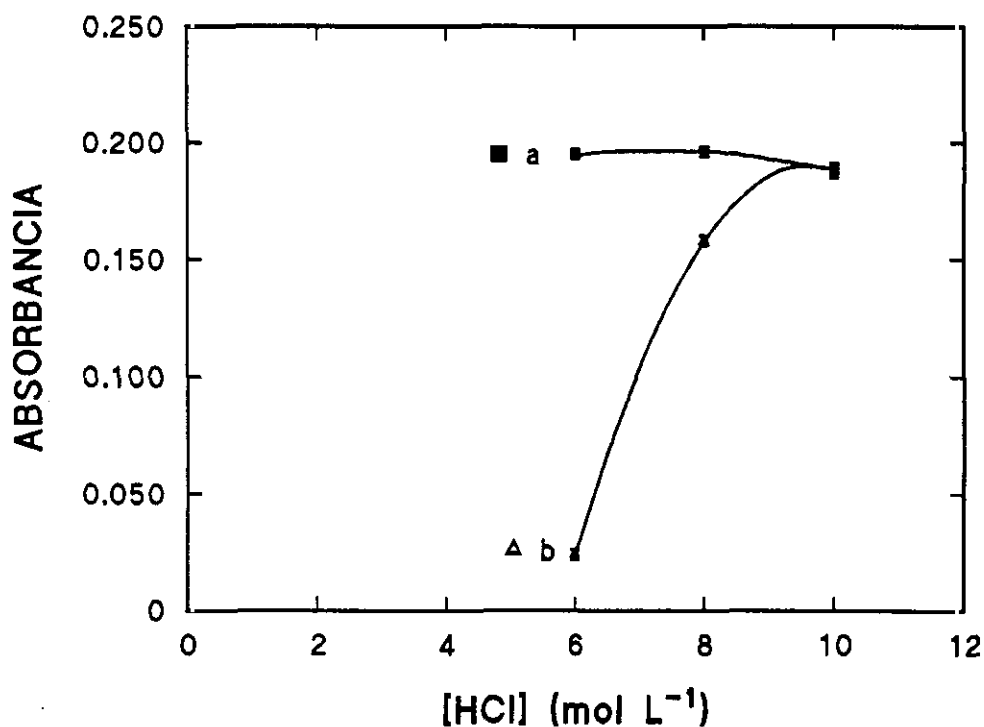


Figura 8.- Influencia de la concentración de ácido clorhídrico para la reducción en línea de Se(VI) a Se(IV).

a) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV), b) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI).

La concentración de ácido necesaria para la reducción en línea del Se(VI) a Se(IV) es ligeramente inferior (10 mol L⁻¹ frente a 12 mol L⁻¹) cuando el sistema de calefacción utilizado es un horno microondas en lugar de un baño de polvo de grafito. Esta disminución aumenta el tiempo de vida de los tubos de bombeo del ácido, disminuye el gasto de ácido y mejora las condiciones de trabajo del operador, por trabajar con ácidos más diluidos.

El microondas como sistema calefactor aumenta la versatilidad de la reducción en línea, por presentar rapidez y eficacia, facilitando su acoplamiento con otros sistemas como HPLC, preconcentración en línea, mineralizaciones en línea, etc.

III.3.3.- OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE GENERACIÓN DE HIDRUROS EN CONTÍNUO E INYECCIÓN EN FLUJO.

Se optimizaron dos formas de generación del hidruro: en continuo y por inyección en flujo. En la **Figura 9** se muestra el sistema utilizado para la generación del hidruro de selenio de forma continua. La **Figura 10** presenta el sistema cuando la introducción de la muestra se realiza por inyección en flujo (FI). La determinación de selenio (total) se realiza con el sistema calefactor encendido. La determinación de Se(IV) se realiza en frío y por diferencia entre ambos se calcula la concentración de Se(VI).

Los parámetros que afectan a la generación de hidruros se dividen en parámetros físicos y parámetros químicos. Como parámetros físicos se estudió: el flujo de argón como gas portador del hidruro de selenio, los flujos de la muestra y reactivos (velocidad de la bomba peristáltica), y la influencia de la longitud y forma de los bucles de reacción. Los parámetros químicos optimizados son: concentración del

Parte experimental

reductor (NaBH_4), concentración del ácido (HCl) para la determinación de Se(IV) y para la determinación de Se(VI) . Todos los parámetros que afectan a la generación de hidruros se optimizaron con una disolución patrón de Se(IV) (única especie capaz de generar el hidruro), comprobando posteriormente su bondad en la reducción en línea de Se(VI) a Se(IV) .

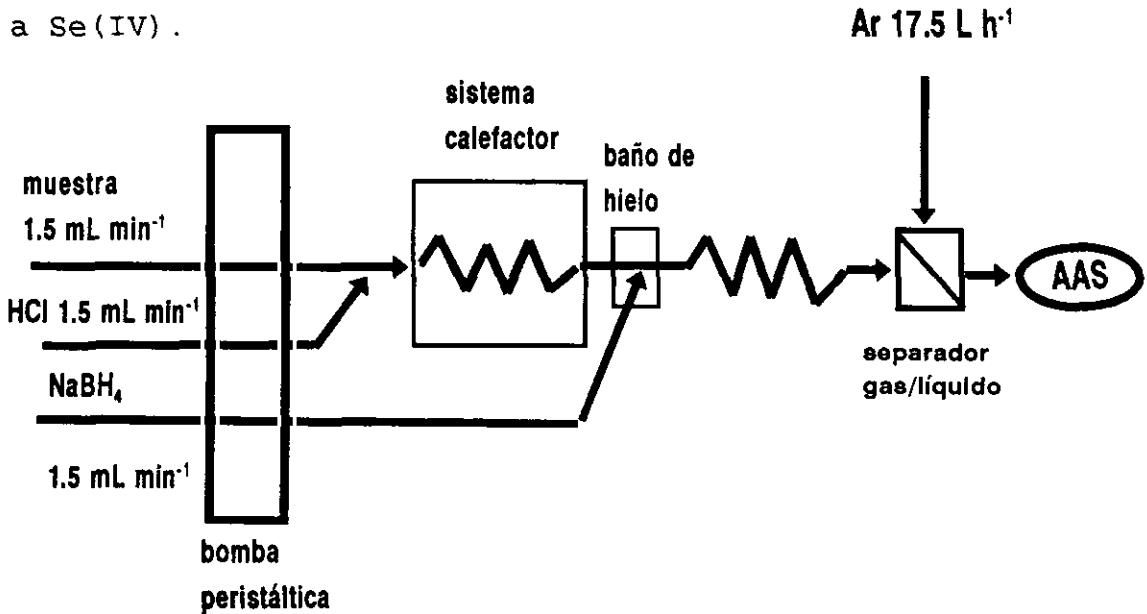


Figura 9. Esquema del sistema en continuo de generación del hidruro.

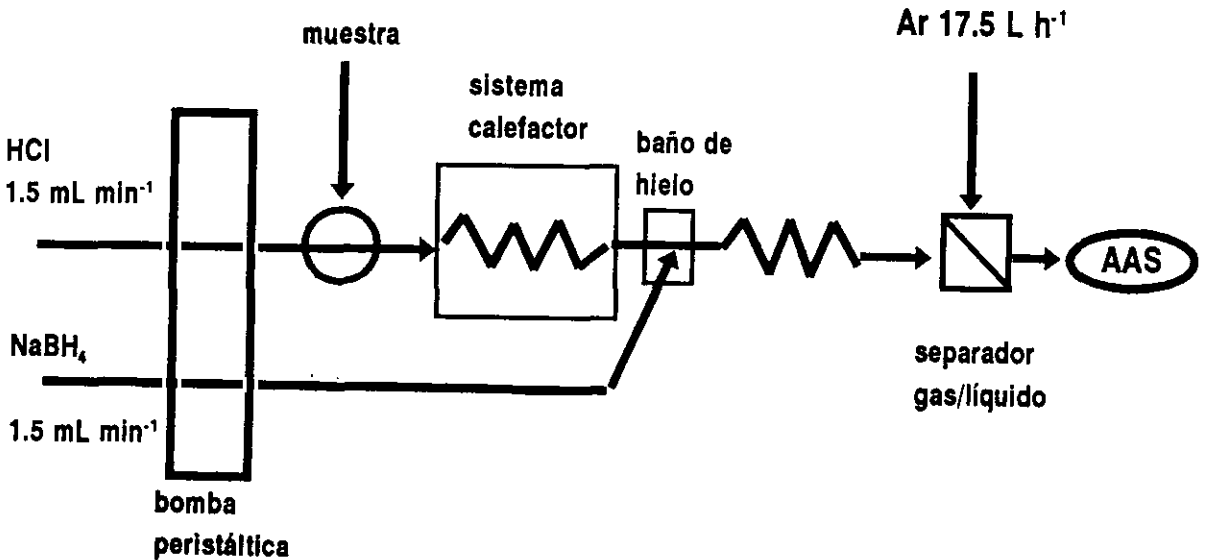


Figura 10. Sistema de generación de hidruro por inyección en flujo (FI).

Influencia del flujo de argón.

El empleo de argón como gas portador del hidruro de selenio está firmemente establecido; sin embargo, el flujo del mismo es un parámetro crucial a optimizar. Un flujo inferior al óptimo impide la liberación del hidruro de la disolución donde se genera al mismo tiempo que retarda el aporte del mismo a la célula de atomización con la consiguiente pérdida de sensibilidad. Un flujo superior al óptimo, implica una excesiva dilución del hidruro en el gas portador así como un paso tan rápido a través de la célula de atomización que puede dar lugar a la salida del elemento antes de su atomización sin proporcionar la consiguiente señal.

Para optimizar el flujo de argón se varió éste de 2.5 a 20 L h⁻¹. Como se observa en la Figura 11, el comportamiento que presenta la variación de este parámetro frente a la señal analítica es distinto cuando el sistema utilizado es el FI ó el de flujo continuo. En el primero de los casos (FI) la señal analítica aumenta, con el aumento del flujo de argón, presentando un hábito uniforme y disminuyendo su desviación típica. Sin embargo, cuando el sistema utilizado es el de flujo continuo la señal disminuye, reduciéndose también la desviación típica, al incrementarse el flujo de argón de 2.5 a 9.0 L h⁻¹; observándose posteriormente un aumento de la señal analítica, con disminución de la desviación típica al aumentar el flujo de argón entre 9.0 y 20 L h⁻¹. El flujo de argón elegido para ambos sistemas de introducción de muestra fue 17.5 L h⁻¹. Cuando el sistema utilizado es el flujo continuo, la señal analítica óptima se obtiene a flujos menores (2.5 L h⁻¹) (debido posiblemente a una menor dilución del hidruro en el gas de arrastre) sin embargo la elevada desviación típica hace imposible el uso de éste.

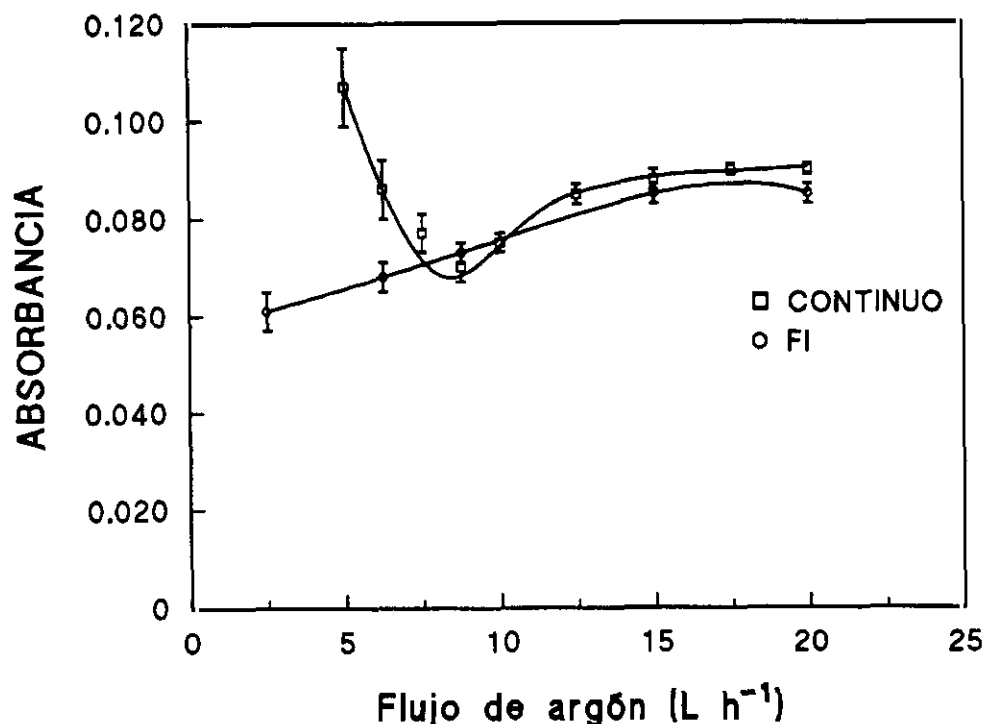


Figura 11. Influencia de la variación del flujo de argón, en FI y continuo sobre la señal analítica del H_2Se ($[Se]=50 \mu g L^{-1}$).

Influencia del flujo de reactivos y muestra.

Para optimizar este parámetro se varió el flujo de la muestra y de los reactivos (HCl , $NaBH_4$) entre 0.9 y $1.7 mL min^{-1}$. En ambos sistemas al aumentar la velocidad de bombeo se observa un aumento de la señal analítica, lo que es lógico debido al mayor aporte de reactivos, además en el sistema FI los picos se hacen más perfectos y estrechos y en continuo disminuye la desviación típica al aumentar el flujo de muestra y reactivos (Figura 12). Se eligió un flujo de

muestra y reactivos de 1.5 mL min^{-1} , por ser el flujo de trabajo más cómodo y que mejores resultados presenta.

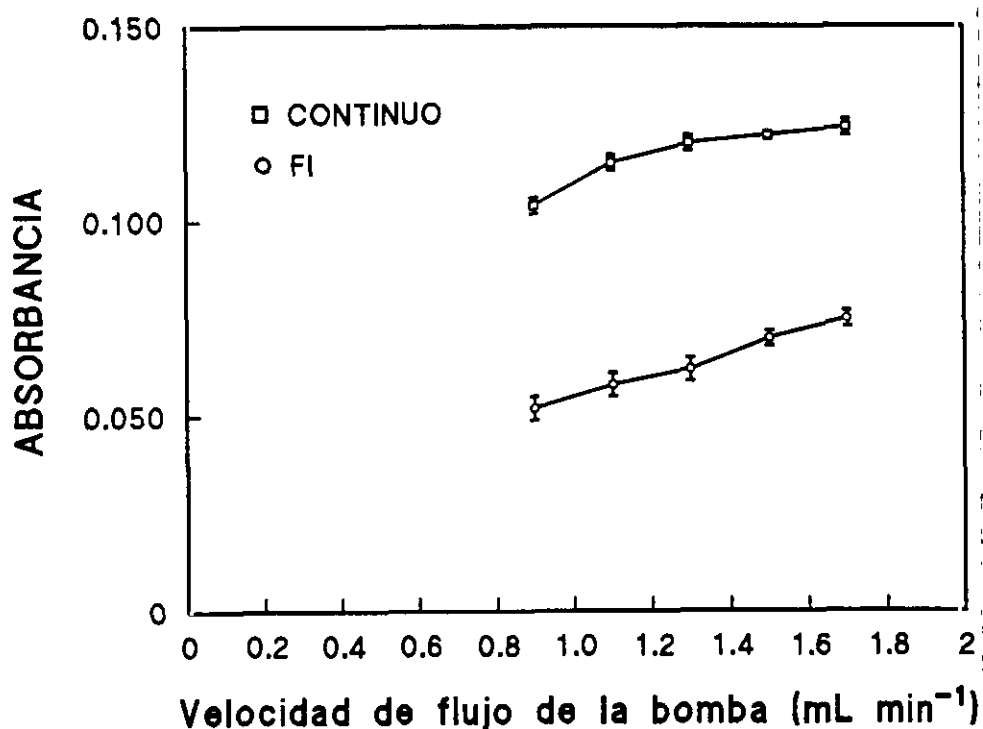


Figura 12. Influencia del caudal de bombeo en FI y continuo sobre la señal analítica del H_2Se ($[\text{Se}] = 50 \mu\text{g L}^{-1}$).

Influencia de la longitud y forma del bucle de reacción.

La misión del bucle de reacción es facilitar la mezcla íntima de la muestra con los reactivos formadores del hidruro. Para optimizar este parámetro se probaron cinco bucles de reacción de diferentes longitudes y formas de 10, 20, 30, 40 y 50 cm (0.5 mm i.d). No se observó influencia en la señal analítica tanto cuando el sistema de introducción de

Parte experimental

la muestra es el continuo ó de inyección en flujo. Una vez elegido el bucle de 30 cm, se probaron distintas formas de insertarlo en el sistema: de modo lineal, anudado ó enrollado sobre si mismo. Tampoco este parámetro produjo diferencias significativas en la señal analítica, eligiéndose el bucle con tres nudos por ofrecer una mayor reproducibilidad de las respuestas analíticas.

Influencia de la concentración del borohidruro sódico.

La concentración de NaBH_4 controla la liberación del hidrógeno que forma el hidruro de selenio, sirviendo al mismo tiempo de gas portador auxiliar del argón para conducir el hidruro formado a la célula de atomización.

La concentración de borohidruro sódico se varió en el intervalo 0.1-5% (m/v). Como se observa en la Figura 13 el hábito que presentan las curvas es idéntico tanto cuando el sistema utilizado es la inyección en flujo (FI) o el continuo. Ambas curvas presentan un máximo a la concentración de 0.5 % (m/v) de NaBH_4 ; para disminuir rápidamente con el aumento de la concentración del reductor hasta hacerse inapreciable la señal analítica a concentraciones superiores al 4% (m/v). Además a concentraciones superiores al 3% se producen problemas de sobrepresión en el sistema y por tanto de reproducibilidad. Se eligió para posteriores estudios la concentración óptimo de borohidruro sódico del 0.5 % (m/v).

Influencia de la concentración del ácido clorhídrico.

El HCl proporciona el medio necesario para que se produzca la acción reductora del borohidruro por formación de hidrógeno elemental. Para optimizar este parámetro se probaron concentraciones de ácido clorhídrico entre 0.1 y 8 mol L^{-1} para la generación del hidruro de selenio a partir

de Se(IV) de forma continua ó por inyección en flujo. Además se probó este parámetro a dos concentraciones diferentes de reductor (NaBH_4). Como se observa en la Figura 14 (a-d), al aumentar la acidez entre 0.1 y 2 mol L^{-1} se produce un incremento de la señal analítica muy acusado; sin embargo, este incremento se hace más suave para concentraciones superiores a 2 mol L^{-1} . Se eligió una concentración de ácido clorhídrico 4 mol L^{-1} a fin de asegurar un medio ácido, idóneo y prever la neutralización del mismo por la posible basicidad de la muestra y reactivos auxiliares.

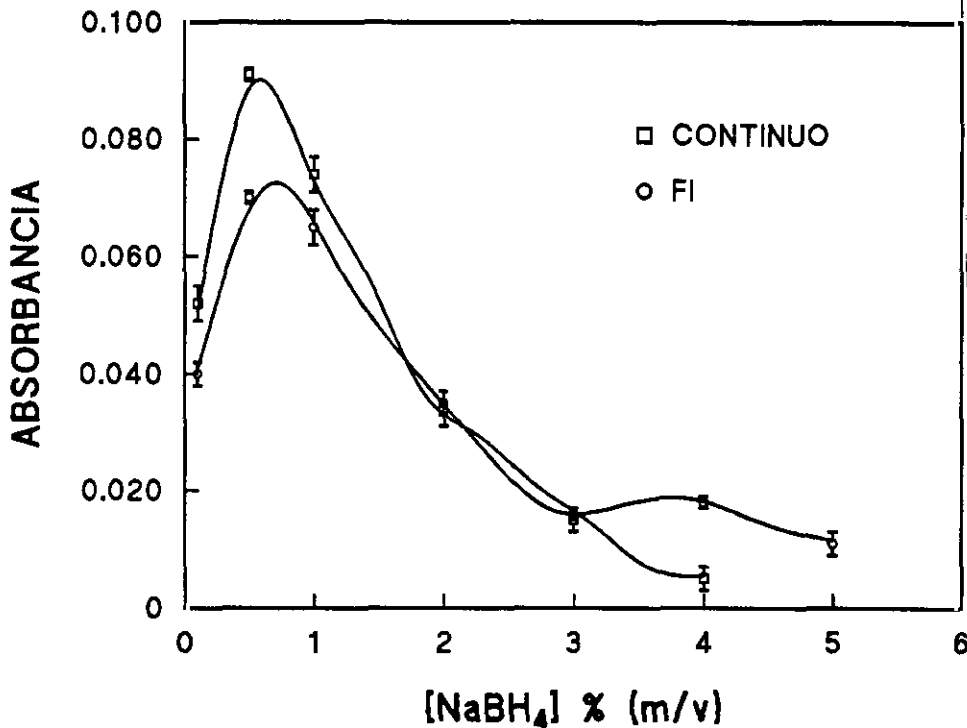


Figura 13. Influencia de la concentración de NaBH_4 , en FI y continuo en la formación del H_2Se ($[\text{Se}] = 50 \mu\text{g L}^{-1}$).

Cuando la generación del hidruro de selenio se realiza a partir de Se(VI) (previamente reducido en línea, como se

Parte experimental

indicó anteriormente, Apartado III.3.2) el hábito que presenta la curva es distinto, como puede observarse en la Figura 14 e. Al igual que en el caso anterior cuando la concentración de ácido aumenta entre 0 y 2 mol L⁻¹ se produce un incremento muy acusado de la señal analítica, posteriormente la señal se mantiene prácticamente constante sin ofrecer dependencia de la acidez entre el intervalo de 2-6 mol L⁻¹. Para concentraciones superiores a 6 mol L⁻¹ se produce de nuevo un incremento de la respuesta analítica muy acusada hasta concentraciones del orden de 10-12 mol L⁻¹.

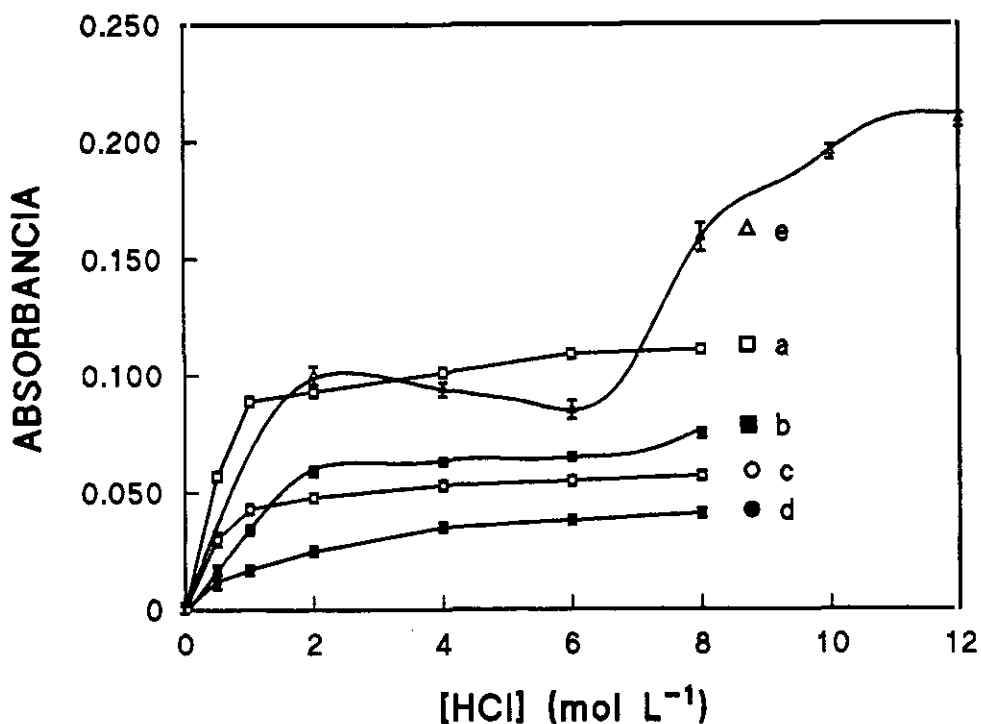


Figura 14. Influencia de la concentración de ácido clorhídrico. a) en continuo, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) NaBH₄ 0.5 %. b) en continuo, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) NaBH₄ 1 %. c) en FI, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) NaBH₄ 0.5 %. d) en FI, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) NaBH₄ 1 %. e) en FI, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI) NaBH₄ 0.5 %.

Como se ha estudiado en el apartado anterior la reducción cuantitativa del Se(VI) a Se(IV), como paso previo a la generación, sólo ocurre para elevadas concentraciones de ácido. Esta fuerte acidez favorece asimismo la formación del hidruro correspondiente cuando esta reacción de la formación del hidruro va precedida de la prereducción.

Para la generación del hidruro de selenio a partir de Se(VI) se utiliza una concentración de ácido 12 mol L⁻¹, pudiendo rebajarse a 10 mol L⁻¹, sin presentar una disminución acusada de la sensibilidad, siendo la finalidad el preservar el deterioro de los tubos utilizados para bombear dicho reactivo.

III.3.4.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y APLICACIONES.

En la Tabla VII se resumen los parámetros físico-químicos óptimos para la generación del hidruro de selenio de forma continua o por inyección en flujo.

En la Tabla VIII se comparan las características analíticas de los métodos propuestos, utilizando la inyección en flujo ó el continuo, y la prereducción en línea. El límite de detección se determina siguiendo las normas de la IUPAC [Long y col, 1983], como tres veces la desviación típica del blanco.

Así mismo se realizó un estudio de la selectividad de los distintos métodos propuestos. En la Tabla IX se comparan la interferencia que presentan algunos metales en la determinación de Se(IV) ó Se(VI) (según proceda) por generación de hidruros. La interferencia se expresa en tanto por ciento y se calcula como la señal analítica obtenida por una disolución de Se(IV) ó Se(VI) (50 µg L⁻¹) con el interferente en la proporción adecuada multiplicada por 100,

Parte experimental

partido por la señal analítica de un disolución de Se(IV) ó Se(VI) ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) en ausencia de interferente. Por tanto el valor 100% indica que no se produce interferencia mientras que el 0% indica que el interferente anula la señal analítica del selenio.

Tabla VII.- Parámetros analíticos en el sistema FI y continuo para la generación del hidruro de selenio.

Flujo de argón	17.5 L h^{-1}
Velocidad de bombeo de reactivos	1.5 mL min^{-1}
Longitud del bucle de reacción	30 cm
$[\text{NaBH}_4]$ (m/v)	0.5 %
$[\text{HCl}]$ generación del hidruro a partir de Se(IV)	4 mol L^{-1}
$[\text{HCl}]$ en la muestra para la reducción del Se(VI) a Se(IV)	6 mol L^{-1}
$[\text{HCl}]$ generación del hidruro a partir de Se(VI)	10 mol L^{-1}

Tabla VIII.- Características analíticas en el sistema FI y continuo para la generación del hidruro de selenio a partir de Se(IV) y Se(VI).

	SIN REDUCCIÓN (Se(IV))		CON REDUCCIÓN (Se(total))	
	FI	CONTINUO	FI	CONTINUO
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6-130	5-125	2-150	5-150
Precisión (%)	2	2	3	5
Sensibilidad (u.a $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$) 10^3	1.99	2.10	3.84	3.10
Límite de detección Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.0	1.5	0.7	1.5
Límite de detección Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	--	--	0.7	1.5

Además de los elementos señalados en la Tabla IX se ensayaron otros elementos como interferentes, sin que produjeran disminución de la señal analítica en la determinación de selenio por los métodos propuestos. Los elementos metálicos que no produjeron interferencia en una proporción (Se:interferente) (1:1000) fueron : Co (II) [como $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$], Mn(II) [como $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$], Mg(II) [como MgO], Ba(II) [como BaCl_2], Na(I) [como NaCl], K(I) [como KCl], Cd(II) [como $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$], y Zn(II) [como $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$].

Como aniones se probaron los compuestos aniónicos, que se encuentran con frecuencia en las muestras a elevadas concentraciones. Para los aniones SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- y PO_4^{3-} se ensayaron relaciones (Se:interferente) de hasta (1:10000), no observándose disminución de la señal analítica del selenio, en ninguno de los casos.

A la vista de los resultados de la Tabla IX, se puede concluir que la generación de hidruros tanto en su forma en continuo como por inyección en flujo es mucho más selectiva que los métodos en discontinuo. La reducción de Se(VI) a Se(IV) en línea con la generación de hidruros hace mucho más selectivo el método, reduciendo considerablemente las interferencias y los depósitos de metal reducido que se crean en el sistema. Esto puede deberse a la alta concentración de ácido y la elevada temperatura utilizada en la generación del hidruro de selenio a partir de Se(VI).

APLICACIONES ANALÍTICAS

El método propuesto se ha aplicado en un principio a la determinación en FI y en continuo de Se(IV) y Se(VI) en aguas de mar. Debido a la falta de materiales de referencia certificados con contenidos de Se(IV) y Se(VI), para evaluar la bondad del método se hizo necesario realizar un estudio de

Parte experimental

recuperación en agua destilada y agua de mar obteniéndose recuperaciones del orden del 99 %. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla X.

TABLA IX.- Estudio comparativo de interferencias en discontinuo, inyección en flujo (FI) y en continuo en la formación del hidruro de selenio a partir de Se(IV) y Se(VI).

		SEÑAL OBTENIDA EN (%)				
		Se(IV)			Se(VI)	
INTERFERENTE		DISCONTINUO [†]	FI	CONTINUO	FI	CONTINUO
Fe(polvo)	Fe (1:1000)		74	100	---	----
	Fe(II) (1:30)	80	---	---	---	----
Ni(NO ₃) ₂	Ni(II) (1:1)		100	100	100	100
	(1:10)	45	87	100	100	100
	(1:100)		64	100	100	100
	(1:1000)		27	100	75	100
(NH ₄) ₂ MoO ₄	Mo(VI) (1:100)		100	100		
	(1:1000)		100	89		
PdCl ₂	Pd (1:1)		96	97	100	97
	(1:10)		83	65	100	75
	(1:100)		0	0	65	0
Zr(NO ₃) ₄	Zr(IV) (1:10)		100	100		
	(1:100)		75	100		
	(1:1000)		69	100		
Cu(NO ₃) ₂	Cu(II) (1:1)	50	86	92	100	100
	(1:10)	0	56	60	100	100
	(1:100)		0	0	86	85
	(1:1000)			52	57	
CrCl ₃	Cr(III) (1:10)		100	100		
	(1:100)		100	93		
	(1:1000)		72	66		
Ag(NO ₃)	Ag(I) (1:1)		100	100	100	100
	(1:10)		46	100	81	84
	(1:100)		0	0	66	45

TABLA IX (continuación).

		SEÑAL OBTENIDA EN (%)					
		Se(IV)				Se(VI)	
INTERFERENTE		DISCONTINUO [†]	FI	CONTINUO	FI	CONTINUO	
As ₂ O ₃	As(III) (1:1)	100	100	100	85	100	
	(1:10)	100	100	100	81	100	
	(1:100)	90	100	76	34	100	
	(1:1000)	20	34	24	34	0	
As ₂ O ₅	As(V) (1:10)		100	100			
	(1:100)		89	76			
	(1:1000)		43	24			
Potasio antimonil tartrato	Sb(III) (1:10)	100	100	100	100	100	
	(1:100)	70	73	21	33	0	
	(1:1000)	10	29	21			
Potasio piroantimoniato	Sb(V) (1:100)		100	100			
	(1:1000)		35	19			
Hg(NO ₃) ₂	Hg(II) (1:1)	100	100	100			
	(1:10)	70	100	100			
	(1:100)	20	100	100			
	(1:1000)		100	100			

* Resultados tomados de Welz y col, 1984 y Verlinden, 1979.

A la vista de los resultados, se observa que la concentración de Se(IV) en las dos aguas de mar analizadas, se encuentra por debajo del límite de detección. Por el contrario, es posible apreciar una concentración relativamente elevada de Se(VI) en ambas aguas. Los estudios de recuperación realizados, mostraron que ésta se obtiene el torno al 100% tanto en el método FI como en continuo. Los análisis realizados por el método FI proporcionaron resultados análogos siendo por tanto un método alternativo al continuo.

Tabla X.- Contenido en Se(IV) y Se(VI) en aguas de mar y estudio de recuperación.

Muestra	Se(IV)	Se(VI)
Agua de mar (Santander, playa) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	< Límite de detección	5 \pm 1
Agua de mar (Gran Canaria, playa) ($\mu\text{g L}^{-1}$) (1)	< Límite de detección	10 \pm 1
(1) + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV)	51.0 \pm 0.5	11 \pm 1
(1) + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI)	< Límite de detección	60 \pm 2
(1) + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) + + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(VI)	23 \pm 2	36 \pm 2

III.3.5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- La reducción "en línea" de Se(VI) a Se(IV) ofrece grandes ventajas frente a la reducción convencional. Por ser un sistema cerrado evita las pérdidas del elemento por volatilidad; es más rápido, cómodo y permite la determinación en continuo del analito.

- El método desarrollado permite la determinación del Se(VI) y del Se(IV) con alta sensibilidad y selectividad. Sin embargo, no es posible con estos métodos separar ambos grados de oxidación por lo que la concentración de Se(VI) se determina por diferencia entre el contenido de selenio total después de la reducción y la concentración de Se(IV).

- El sistema por inyección en flujo (FI) presenta mayor sensibilidad y menores límites de detección que el sistema en continuo. Los dos sistemas (FI) y continuo de generación de hidruros resultan más cómodos, seguros y baratos (el gasto de reactivos, gases, células de cuarzo y muestras es muy

inferior al que se produce cuando la generación del hidruro se realiza en su forma discontinua).

- Al trabajar en concentraciones tan elevadas de ácido, el método desarrollado ofrece gran selectividad ya que las interferencias procedentes de otros aniones y cationes presentes en la muestra están minimizadas. Otra ventaja adicional es que el método no está influenciado por la elevada concentración salina de la muestra; lo que hace posible su aplicación directa a aguas de mar y a muestras sólidas, previamente mineralizadas, si nuestro interés es la determinación de selenio total.

III.4.- PRECONCENTRACIÓN DE Se(IV) Y Se(VI) EN MICROCOLUMNAS DE ALÚMINA. ACOPLAMIENTO FI-HG-AAS.

III.4.1.- COLUMNAS PRECONCENTRADORAS: PRESTACIONES ANALÍTICAS Y ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.

El uso de soportes sólidos para la preconcentración de las distintas especies de selenio ha sido utilizado por diferentes autores con el fin de mejorar los límites de detección ofrecidos por las distintas técnicas analíticas de detección y cuantificación de este analito. Otros autores han utilizado los soportes sólidos para eliminar parte de la matriz de la muestra y por tanto posibles interferencias en la detección del selenio; así, se ha utilizado una columna conteniendo XAD-8 para eliminar compuestos orgánicos de la matriz que acompañan al selenio [Roden y Tallman, 1982]; una resina quelatante, copolímero de estireno-divinilbenceno conteniendo grupos imino-diacetatos, para eliminar Ni(II) y Cu(II) de la muestra [Ikeda, 1985], ó una columna Chelex-100 para eliminar interferencias metálicas [Campanella, y col 1987].

Muangnocharoen y col en 1988, eluyeron selectivamente el Se(IV) y Se(VI) presentes en muestras de aire, utilizando para ello un soporte sólido. Una vez atrapadas las especies de selenio en la solución colectora, el Se(VI) queda retenido en una resina de intercambio aniónico (Ag-1X8) en medio HCl 0.05 mol L⁻¹, eluyéndose el Se(IV) presente en la muestra. El límite de detección conseguido fue de 0.03 ng m⁻³ para ambas especies.

Posteriormente Örnemark y Olin (1994a y b) utilizaron como soportes sólidos para la preconcentración de Se(IV) y Se(VI) una resina Dowex 1X8 ó bien una mezcla de Dowex 1X8 y

XAD-8 obteniendo factores de preconcentración de 13 y 20 respectivamente dependiendo del soporte sólido utilizado. La técnica de detección utilizada fue la generación de hidruros acoplada a la espectrometría de absorción atómica (HG-AAS). El límite de detección es del orden de ng L^{-1} , permitiendo la aplicación del método para la determinación de selenio en aguas naturales (de río, de lago ó de bebida).

III.4.2. LA ALÚMINA COMO SOPORTE PRECONCENTRADOR.

La alúmina presenta varias formas, la más estable de las cuales es la "alfa"- Al_2O_3 . Su estructura es del tipo CaF_2 , con un empaquetamiento compacto hexagonal de O^{2-} en el que $2/3$ de los huecos octaédricos están ocupados por Al^{3+} . La llamada alúmina activada es la "gamma"- Al_2O_3 , cuya estructura es de tipo espinela ($\text{A}^{2+}\text{B}_2^{3+}\text{O}_4$). La "gamma"- Al_2O_3 es un tipo especial de espinela en el que los O^{2-} están formando un empaquetamiento cúbico compacto, cuyos huecos tetraédricos y $5/3$ de los octaédricos están ocupados por átomos de Al^{3+} . Los restantes huecos octaédricos quedan vacantes y son capaces de alojar en su interior cationes monovalentes [Gutiérrez Ríos, E., 1985].

La "gamma"- Al_2O_3 , debido a la posibilidad de retener en su interior cationes, presenta una gran superficie de adsorción, de ahí que su uso principal sea la cromatografía. El mecanismo de interacción dependerá de la naturaleza de las uniones entre el catión que rellena el hueco y los aniones que se quieren retener. En nuestro caso, el catión será H^+ procedente de un ácido fuerte (HNO_3), y los aniones SeO_3^{2-} y SeO_4^{2-} . Este tipo de interacciones no es específica de un único compuesto, por tanto, existirá una competencia entre los distintos aniones (dadores de e^-) por los centros activos. Según que la interacción, tanto cinética como termodinámicamente esté más o menos favorecida, se producirá

Parte experimental

la retención y elución de las especies participantes en el proceso.

La estructura que presenta la alúmina la hace apta para su uso como soporte sólido para la preconcentración de distintos elementos; así, Cox y col en 1985 propusieron la separación y preconcentración de Cr(III) y Cr(VI) en muestras medioambientales obteniendo límites de detección de 1.4 y 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

Posteriormente, estos mismos autores propusieron la preconcentración de SO_4^{2-} sobre microcolumnas de alúmina, utilizando HNO_3 0.01 mol L^{-1} , como disolución transportadora y activadora de la alúmina y NH_3 2 mol L^{-1} como eluyente del analito de la microcolumna de alúmina. El límite de detección fue de 2.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el método se aplicó a la determinación de SO_4^{2-} en aguas naturales [Cox, A. y col, 1987].

Smichowski y col en 1994 han propuesto la preconcentración de Sb(III) y Sb(V) sobre microcolumnas de alúmina, utilizando como sistema de detección GF-AAS. El factor de preconcentración obtenido fue de 300 y el factor de recuperación fue del 80%; empleando una disolución de HCl 4 mol L^{-1} como eluyente de las especies de antimonio retenidas en la microcolumna. El método se aplicó a muestras enriquecidas de aguas de mar.

Posteriormente, estos mismos autores [Smichowski y col, 1994b] utilizando diferentes medios tamponados en la muestra preconcentraron selectivamente Sb(III) y Sb(V). Cuando la muestra tiene un pH=7.5 se preconcentra con un factor del 100% el antimonio total. El Sb(III) se preconcentra con un factor del 75% a pH=9.5. La concentración de Sb(V) se obtiene por diferencia entre Sb(total) y Sb(III). El método se aplicó en aguas naturales, siendo el límite de detección de 4 pg

(cuando el factor de preconcentración es de 75).

Recientemente, las microcolumnas de alúmina se han utilizado en la preconcentración de Pt y en la prospección de yacimientos geológicos.

Cantarero y col en 1994 utilizaron microcolumnas de alúmina acopladas a la espectrometría de absorción atómica con llama para la determinación de Pt en aguas naturales enriquecidas del analito. Si la preconcentración del analito en microcolumnas se acopla a un ICP-MS como técnica de detección; los límites de detección se rebajan considerablemente, pudiendo aplicarse el método para la determinación de Pt en aguas naturales. [Hidalgo y col, 1995].

III.4.3.- PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA PRECONCENTRACIÓN-ELUCIÓN.

Una vez demostrada las prestaciones de la alúmina para la preconcentración de algunos elementos y de sus especies, se han estudiado las prestaciones de la misma para la preconcentración del Se(IV) y Se(VI) a niveles de concentración de $\mu\text{g L}^{-1}$ a fin de acercarnos a la determinación de ambos grados de oxidación en las concentraciones reales existentes en las muestras medioambientales. Conocer las condiciones óptimas de la preconcentración, compatibilizar los parámetros físico-químicos de la preconcentración con las variables físico-químicos de la generación de hidruros con inyección en flujo (resumidos en la Tabla VII) y proponer el método para la aplicación a muestras reales, ha sido el objetivo de este estudio.

La alúmina ácida utilizada presenta un tamaño de partícula de 150-180 μm . Con el fin de obtener homogeneidad

Parte experimental

en las columnas, se pasa la alúmina por un tamiz de 180 μm , rechazándose la alúmina que no permanezca en el tamiz.

Los topos de la columna son esponjas de gomaespuma tratadas con los activantes y eluyentes que más tarde se utilizarán en el proceso de preconcentración/elución. Este tratamiento asegura la inalterabilidad de la esponja durante el proceso. Se sumergieron las esponjas en una disolución de HNO_3 , 1 mol L^{-1} . y se dejaron durante 48 horas. Tras ello, se sacaron de dicha disolución, se aclararon con agua destilada y se sumergieron en una disolución de NH_3 , 2 mol L^{-1} durante otras 48 horas. Por último, se retiran de la disolución amoniacal, se aclaran convenientemente con agua destilada y se dejan secar.

La construcción de las microcolumnas de alúmina se realiza en tubos de teflón de 1 mm de diámetro interno. Se coloca un trozo de esponja (anteriormente tratada), que impide la pérdidas de alúmina, dejando pasar a su través los reactivos. A continuación, se rellena el tubo de teflón con la alúmina tamizada, evitando la compactación, hasta alcanzar una longitud de unos 8-10 cm. Por último se coloca otra esponja en el extremo final del tubo.

Las optimizaciones de los diferentes parámetros se han llevado a cabo acondicionando la alúmina a su forma protonada pasando a su través a 0.5 mL min^{-1} durante diez minutos una disolución de HNO_3 , 0.01 mol L^{-1} . Se ha optimizado la preconcentración-elución de los analitos en la microcolumna de alúmina de forma discontinua. Cuando se obtuvieron las mejores condiciones de la preconcentración-elución, la columna se insertó en el sistema en continuo desarrollado para la preconcentración-elución-determinación en línea. La **Figura 15** muestra el esquema global del sistema.

La optimización de todos los parámetros se reseña a continuación: así, dentro de los parámetros que influyen en la retención del Se(IV) y Se(VI) en la microcolumna de alúmina, se ha optimizado la velocidad de paso de la muestra por la microcolumna.

Los principales parámetros en la elución son la naturaleza de la solución eluyente, velocidad del eluyente por la microcolumna, volumen de elución y condiciones de regeneración de la columna.

Finalmente, adaptar las condiciones de preconcentración-elución con la determinación por HG-AAS, ha obligado a la optimización de las condiciones para la generación de hidruros a partir del Se(IV) y Se(VI) con termoreducción en continuo.

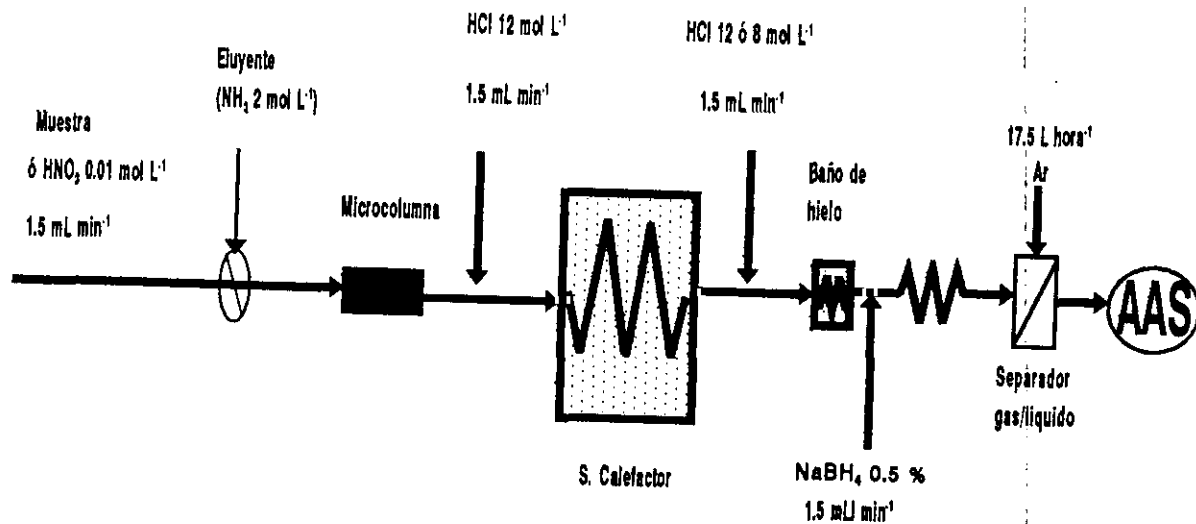


Figura 15.- Sistema acoplado de preconcentración y determinación de Se(total) y Se(IV) por HG-AAS.

Influencia de la velocidad de la muestra en la retención.

Para estudiar la influencia de la velocidad de la muestra a través de la microcolumna en la retención de los analitos se ha variado el flujo entre 0.5 y 1.5 mL min⁻¹ (flujos superiores no se ensayaron ya que 1.5 mL min⁻¹ es el flujo óptimo de reactivos en la generación del hidruro). Como se observa en la **Figura 16**, la retención del selenio en la microcolumna de alúmina aumenta ligeramente al incrementarse el flujo de la muestra a través de la microcolumna. Se ha elegido como flujo óptimo de retención el de 1.5 mL min⁻¹; ya que a este flujo se acorta el tiempo de análisis y además es el flujo óptimo de generación de hidruros.

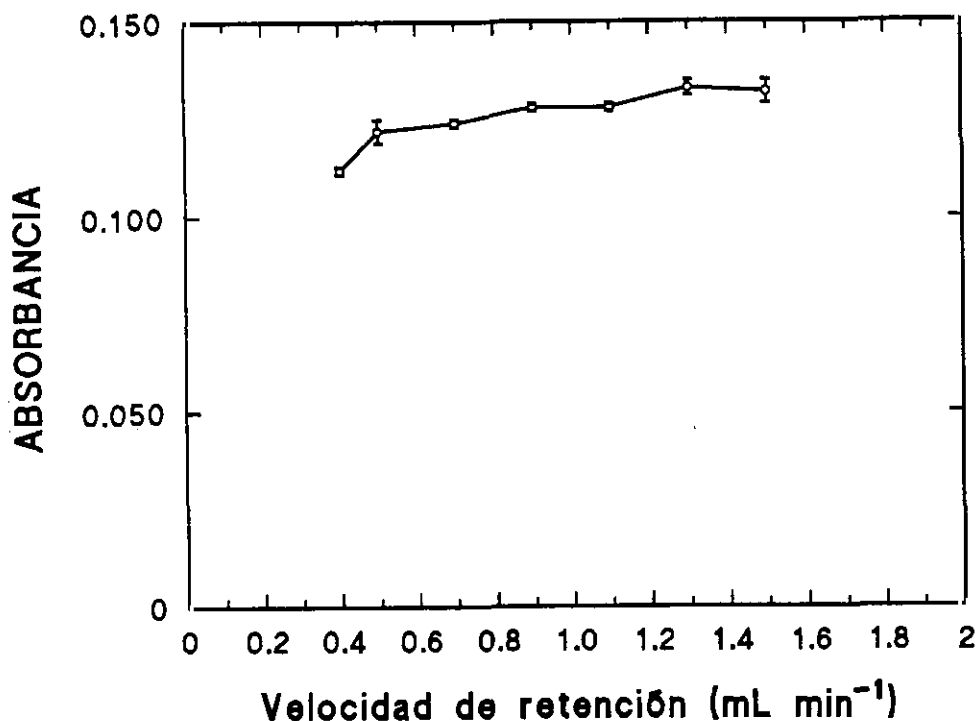


Figura 16.- Influencia de la velocidad de la muestra en la retención de los analitos.

Empleo de diferentes eluyentes para la posible elución selectiva de Se(IV) y Se(VI).

Con el fin de eluir de forma selectiva el Se(IV) y el Se(VI) se probaron diferentes eluyentes, tratando de encontrar, en función del pH, condiciones idóneas para la elución selectiva de las especies.

Los eluyentes ensayados fueron: diferentes concentraciones de amoníaco; disoluciones reguladoras de acético/acetato (pH=4.8) y de fosfato ácido/fosfato (pH=8.0). Los resultados obtenidos se compararon en todos los casos con una disolución que contenía 125 ng de analito (Se(IV) y Se(VI)) en el medio eluyente probado, como disolución de referencia. La optimización se realizó como se indica: 5 mL de muestra conteniendo $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) o Se(VI) se pasaron por la microcolumna eluyéndose el analito en 1 mL de disolución eluyente (muestra, según la Tabla XI); Posteriormente se procedió a realizar una segunda elución del analito de la columna con 1 mL más de eluyente, constituyendo lo que se denomina residuo. Los resultados obtenidos como recuperación se muestran en la Tabla XI. Como puede apreciarse, ningún eluyente fue capaz de proporcionar elución selectiva del Se(IV) ó del Se(VI), siendo para ambos grados de oxidación, los porcentajes de la elución muy similares. Así mismo se observa la bondad del amoníaco 2 mol L^{-1} como eluyente para la preconcentración de ambas especies de selenio y la baja eficacia de los demás eluyentes probados.

Influencia de la velocidad del eluyente en la microcolumna.

La velocidad del flujo del eluyente puede considerarse un parámetro crítico (y de hecho para algunas especies lo es) en la elución de las especies de selenio. Un flujo rápido,

Parte experimental

puede producir la no elución de las especies junto con un mayor aporte de la solución básica al sistema generador de hidruros favoreciendo la neutralización del medio ácido necesario para la reducción al hidruro en las condiciones óptimas.

Tabla XI.- Estudio comparativo de diferentes eluyentes para la elución de Se(IV) y Se(VI) de la microcolumna de alúmina.

BLUYENTE	INYECCIÓN	Se(IV), ‰	Se(VI), ‰
0.01 mol L ⁻¹ NH ₃	Referencia	100±4	100±2
	Muestra	87±5	110±3
	Residuo	9±5	8±3
0.25 mol L ⁻¹ NH ₃	Referencia	100±3	100±3
	Muestra	83±5	72±2
	Residuo	8±5	9±5
2 mol L ⁻¹ NH ₃	Referencia	100±5	100±5
	Muestra	100±4	97±6
	Residuo	1±2	2±3
1 mol L ⁻¹ HAc/Ac ⁻	Referencia	100±3	100±5
	Muestra	10±4	22±6
	Residuo	1±2	1±3
0.1 mol L ⁻¹ HAc/Ac ⁻	Referencia	100±3	100±4
	Muestra	8±3	15±4
	Residuo	1±2	1±4
1 mol L ⁻¹ HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻	Referencia	100±3	100±2
	Muestra	80±2	71±6
	Residuo	10±3	10±2
0.1 mol L ⁻¹ HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻	Referencia	100±5	100±1
	Muestra	75±3	68±6
	Residuo	10±1	12±2

Por el contrario, un flujo lento de la solución eluyente, puede provocar un desalajo paulativo de las especies del selenio dispersándose la concentración eluida en el flujo rápido de los reactivos de la generación. Las condiciones óptimas de la elución serán aquellas que eluyan las especies de forma cuantitativa en el menor volumen de fase y que pase a través del sistema de la forma más rápida posible.

La velocidad de flujo del eluyente (NH_3 , 2 mol L^{-1}) se ha variado entre 0.5 y 1.5 mL min^{-1} . Como se observa en la Figura 17, la velocidad de elución tiene menor influencia en la eficacia del proceso de preconcentración que la velocidad de retención, no apreciándose variación entre flujos altos ó bajos de elución. Se eligió el flujo de 1.5 mL min^{-1} , por presentar ventajas adicionales como: facilidad en la elución al mismo flujo que la retención y acoplamiento óptimo a las condiciones de generación.

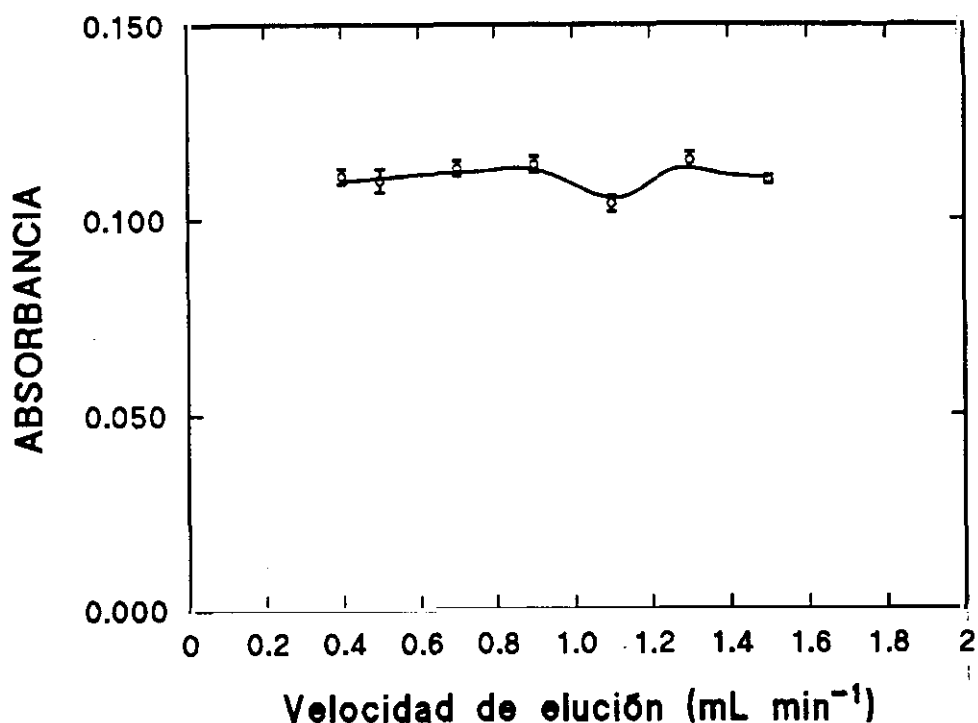


Figura 17.- Influencia de la velocidad de elución.

Parte experimental

Influencia del medio ácido regenerador de la microcolumna.

Se probaron dos medios ácidos como activadores de la microcolumna de alúmina con diferentes concentraciones de amoníaco como eluyente del analito de la microcolumna una vez preconcentrado. Los resultados se muestran en la Tabla XII, como puede observarse la unión de HNO_3 0.01 mol L^{-1} y NH_3 2 mol L^{-1} como activador y eluyente respectivamente ofrece los mejores resultados de recuperación en la preconcentración de Se(IV) y Se(VI) en estas microcolumnas.

Tabla XII.- Influencia del par activador/eluyente.

Activador	Eluyente (1 mL)	Eficiencia(%)
HNO_3 0.01 mol L^{-1}	NH_3 2 mol L^{-1}	100±2
	NH_3 0.25 mol L^{-1}	71±3
	NH_3 0.05 mol L^{-1}	44±2
	NH_3 0.01 mol L^{-1}	0±1
HCl 0.01 mol L^{-1}	NH_3 2 mol L^{-1}	77±2
	NH_3 0.25 mol L^{-1}	55±1

Influencia del volumen de elución.

Se ensayaron volúmenes de elución de NH_3 2 mol L^{-1} entre 25 y 2000 μL , para 125 ng de Se preconcentrado previamente en la microcolumna. Como se observa en la Figura 18, la eficiencia en la elución aumenta al aumentar el volumen de elución entre 25 y 500 μL ; para mantenerse prácticamente constante desde 500 a 2000 μL . Volúmenes superiores a 1000 μL proporciona peores factores de preconcentración además de presentar picos de respuesta más anchos. Se escogió un volumen de elución de 500 μL por ser el óptimo en cuanto

eficiencia y posibilidad de un mayor factor de preconcentración.

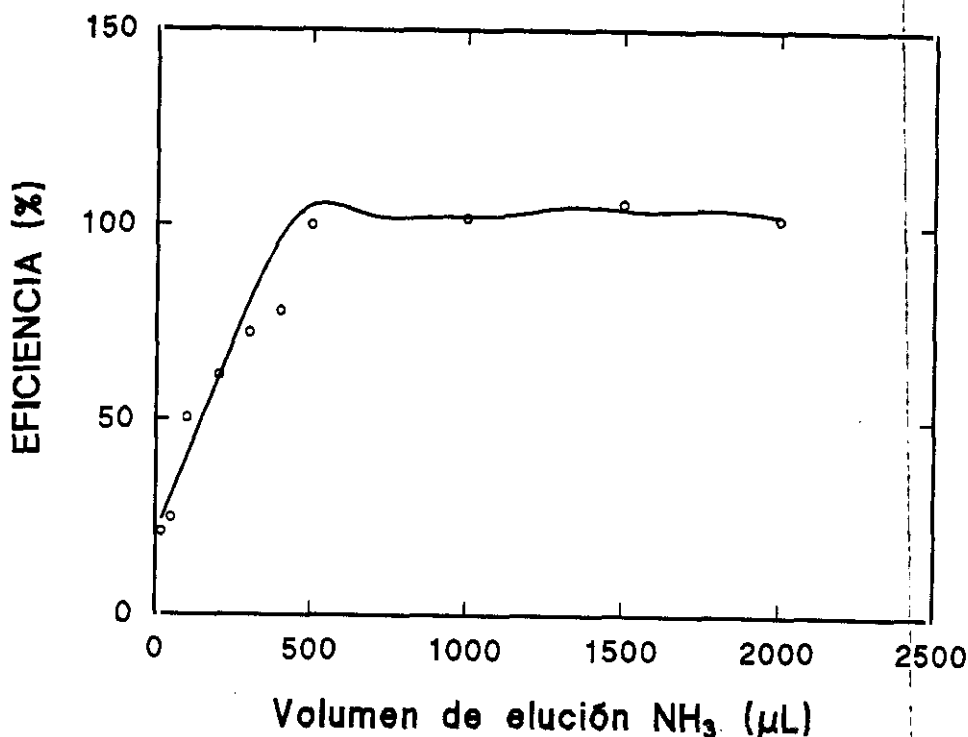


Figura 18.- Influencia del volumen de solución eluyente NH₃, 2 mol L⁻¹ en la eficiencia de elución de Se(IV) ([Se]= 125 ng).

Influencia de la concentración de HCl y del NaBH₄ en la generación del hidruro.

Debido a que la elución del selenio de la microcolumna de alúmina se realiza en un medio básico (NH₃, 2 mol L⁻¹); se optimizó la influencia del medio ácido en la generación del hidruro cuando la muestra se presenta en un medio amoniacal. Los resultados obtenidos aconsejan aumentar la concentración

Parte experimental

del ácido clorhídrico a 8 mol L^{-1} , en la generación del hidruro cuando se parte de Se(IV) (Figura 19). Cuando la generación del hidruro se realiza a partir de Se(VI), por tanto con un sistema de preredución en línea, el HCl utilizado tanto para la acidificación de la muestra (previa a la reducción) como para la generación del hidruro será 12 mol L^{-1} .

Otro parámetro optimizado, antes del acoplamiento en línea del sistema de preconcentración y de detección es la concentración del medio reductor (NaBH_4), presentando idénticos resultados a los obtenidos cuando la generación de hidruros se realiza sin preconcentración previa en microcolumnas de alúmina (Figura 13). Por tanto la concentración de NaBH_4 será 0.5 \% (m/v) en 0.16 \% (m/v) de NaOH.

Acoplamiento de la microcolumna al sistema de termoreducción-hidruros-absorción atómica.

Una vez optimizadas las variables de la preconcentración de los analitos en la microcolumna, el paso siguiente consistió en insertar la microcolumna dentro del sistema para trabajar en forma continua. El esquema desarrollado viene dado en la Figura 15. Se acondiciona la microcolumna de alúmina haciendo pasar por ésta, durante 5 minutos una disolución de HNO_3 , 0.01 mol L^{-1} a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. A continuación, se sustituye la solución portadora por un volumen perfectamente conocido de la muestra mientras que al mismo tiempo van entrando en el sistema los reactivos formadores del hidruro. La retención cuantitativa del Se(IV) y Se(VI) en la microcolumna viene indicada por la ausencia de señal en el sistema de medida. Una vez preconcentrada la muestra se inyecta el eluyente, NH_3 , 2 mol L^{-1} , ayudados por una válvula de inyección, eluyéndose conjuntamente el Se(IV) y Se(VI).

Cuando el sistema calefactor (horno microondas ó de polvo de grafito) está encendido, se produce la reducción del Se(VI) a Se(IV), determinándose por tanto el Se(total) presente en la muestra. Cuando se realiza una nueva preconcentración en las mismas condiciones, pero en la elución, el sistema calefactor está apagado, se determina Se(IV) exclusivamente. La concentración de Se(VI) se calcula por diferencia entre el contenido de Se(total) y el de Se(IV).

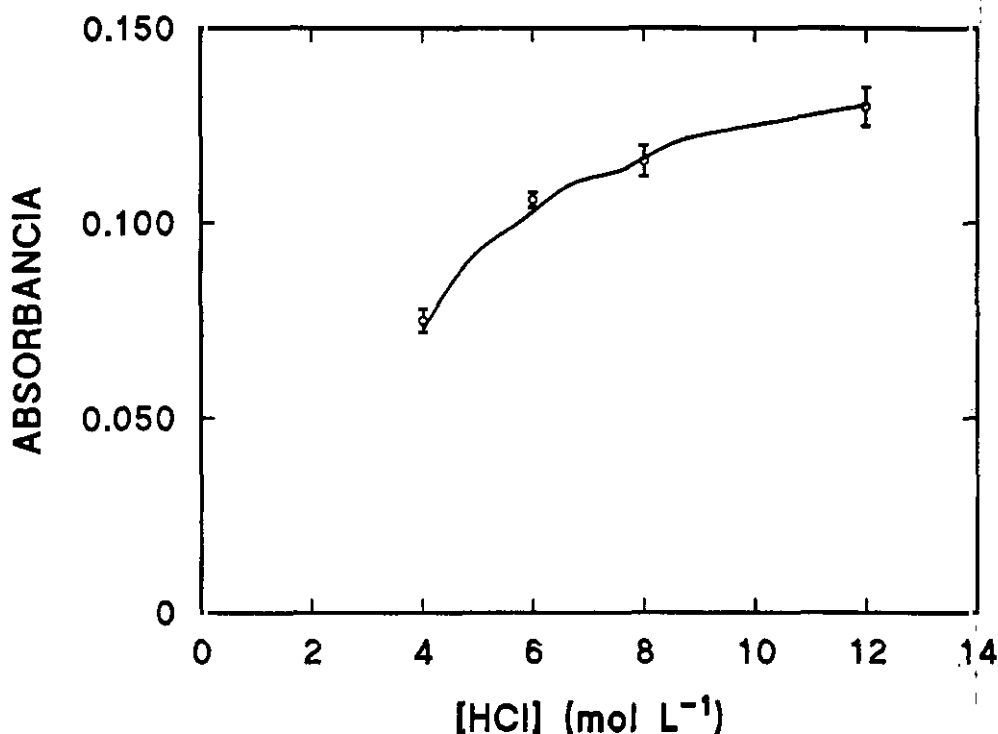


Figura 19.- Influencia de la concentración de clorhídrico en la formación del H₂Se después de la preconcentración-elución ([Se]= 125 ng).

III.4.4.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y APLICACIONES.

En la Tabla XIII se resumen los parámetros físico-químicos óptimos utilizados en la preconcentración en microcolumnas de alúmina con detección por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

Tabla XIII.- Parámetros analíticos de la preconcentración-determinación de Se(IV) y Se(VI).

Flujo de retención	1.5 mL min ⁻¹
Flujo de elución	1.5 mL min ⁻¹
Eluyente ([NH ₃])	2 mol L ⁻¹
Activador ([HNO ₃])	0.01 mol L ⁻¹
Tiempo de activación	5 min
Volumen de elución	500 µL
[HCl] generación del hidruro a partir de Se(IV)	8 mol L ⁻¹
[HCl] generación del hidruro a partir de Se(VI)	12 mol L ⁻¹
[NaBH ₄] ‰ (m/v)	0.5
Velocidad de bombeo de reactivos de hidruros	1.5 mL min ⁻¹
Flujo de argón	17.5 L h ⁻¹

Capacidad preconcentradora de la microcolumna de alúmina para las especies de Se(IV) y Se(VI).

Se ha realizado un estudio para conocer el intervalo de linealidad (ó la capacidad de la microcolumna de alúmina para preconcentrar Se(IV) y Se(VI)). Para ello se preconcentraron cantidades crecientes del analito en la microcolumna. Así mismo se realizó un calibrado sin preconcentración en el eluyente con el fin de comprobar si la pérdida en el intervalo de linealidad se debía a la técnica ó a la capacidad de la microcolumna de alúmina. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 20. Como se observa la

columna pierde analito cuando la concentración del mismo es superior a $120 \mu\text{g L}^{-1}$.

Las características analíticas del método propuesto se resumen en la Tabla XIV; considerando un factor de preconcentración de 50 (factor medio sin riesgo de pérdida de eficiencia en la preconcentración), se recomienda el uso de adición estándar para el análisis de las muestras con el fin de evitar posibles interferencias debidas a la matriz de la misma.

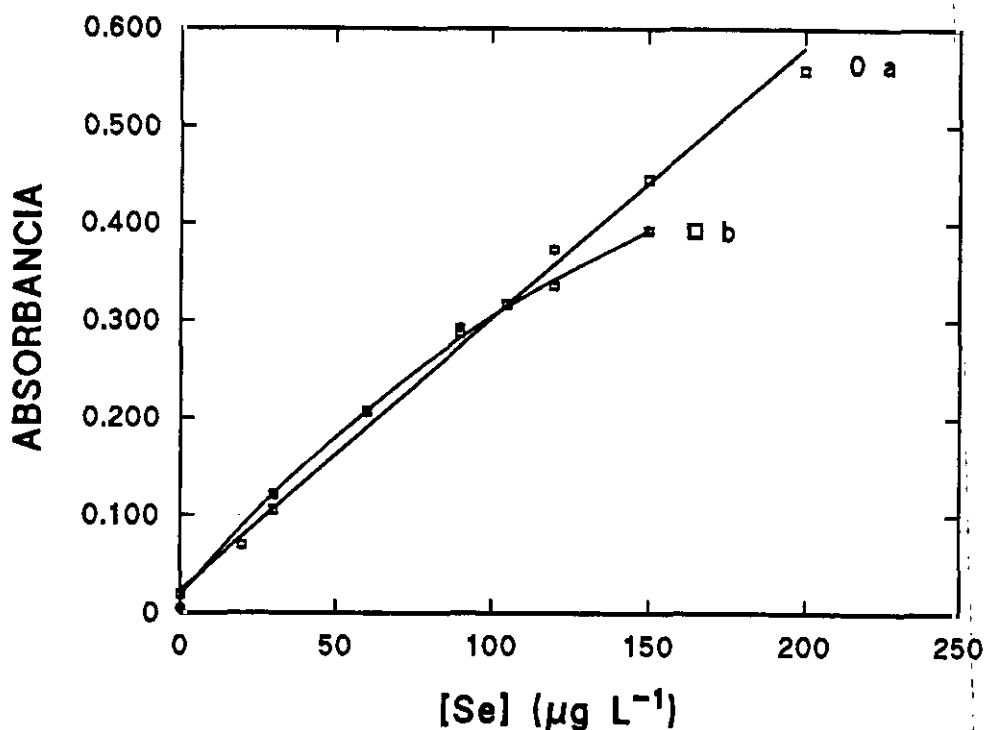


Figura 20.- Influencia de la concentración del analito en la eficiencia de la preconcentración en microcolumna de alúmina. a) calibrado en NH_3 2 mol L^{-1} , b) calibrado preconcentrado.

Tabla XIV.- Características analíticas de la preconcentración.

	Se (IV)	Se (VI)
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.04-120	0.04-120
Precisión próxima al límite de detección (%)	5	5
Precisión próxima a la saturación de la microcolumna (%)	3	3
Sensibilidad (u.a L μg^{-1}) 10^3	2.1	2.0
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.01	0.01

Interferencias.

Debido a que la alúmina se acondiciona en su forma ácida, únicamente los aniones presentarán afinidad por los centros activos de la microcolumna de alúmina interfiriendo en la retención del selenito (SeO_3^{2-}) ó seleniato (SeO_4^{2-}) en ésta. En este estudio se ensayaron los aniones que acompañan a la muestra generalmente a más altas concentraciones (PO_4^{3-} , Cl^- y SO_4^{2-}). El NO_3^- no presenta interferencia por ser el anión que se utiliza para el acondicionamiento de la microcolumna de alúmina. Los resultados del estudio de interferencias se resumen en la Tabla XV. Se observa que en la proporción de 1:10³ no interfiere ningún anión en la retención en la microcolumna del Se(IV) y del Se(VI). En la proporción 1:10⁶ se produce interferencia del SO_4^{2-} , PO_4^{3-} y Cl^- debido a que ocupa los centros activos de la microcolumna.

Tabla XV.- Estudio de interferencias (Recuperación de las señales del Se(IV) y Se(VI) en presencia de posibles interferentes).

especie	PO_4^{3-}	Cl^-	SO_4^{2-}
Se(IV)	100% (1:10 ³) 40% (1:10 ⁶)	100% (1:10 ³) 42% (1:10 ⁶)	100% (1:10 ³) 64% (1:10 ⁶)
Se(VI)	100% (1:10 ³) 100% (1:10 ⁶)	100% (1:10 ³) 100% (1:10 ⁶)	100% (1:10 ³) 32% (1:10 ⁶)

Aplicaciones analíticas.

El método se ha aplicado a la determinación de Se(IV) y Se(VI) en aguas de mar y del grifo; paralelamente, se han realizado estudios de recuperación, obteniéndose recuperaciones próximas al 100%; incluso en las aguas de elevada concentración salina tal y como indica la Tabla XVI.

Tabla XVI.- Resultados de la aplicación del método al análisis de aguas.

Muestra	Se(IV) ($\mu g L^{-1}$)	Se(VI) ($\mu g L^{-1}$)
Agua de mar (Santander 2, puerto) (1)	1.8±0.2	0.98±0.05
1 + 7.5 $\mu g L^{-1}$ Se(IV) + + 7.5 $\mu g L^{-1}$ Se(VI)	9.5±0.4	8.3±0.5
Agua grifo (2)	< Límite de detección	< Límite de detección
(2) + 5 $\mu g L^{-1}$ Se(IV)	4.9±0.3	< Límite de detección
(2) + 5 $\mu g L^{-1}$ Se(VI)	< Límite de detección	5.2±0.4

III.4.5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- La retención de Se(IV) y Se(VI) en microcolumnas de alúmina, es una alternativa muy importante a los métodos usuales de extracción para la preconcentración de Se(IV) y/o Se(VI), ya que se consigue la preconcentración de ambas especies permitiendo simultáneamente la separación de la matriz que las acompaña. En los métodos usuales de extracción con disolventes, sólo es posible realizar la extracción de un grado de oxidación con un reactivo químico adecuado; idéntico problema presenta el empleo de resinas quelatantes.

- Las microcolumnas son fáciles de preparar, transportar y acoplar a sistemas de detección.

- El factor de preconcentración con el que puede trabajarse está fuertemente influenciado por la matriz de la muestra; especialmente si ésta contiene aniones. Sin embargo, el método propuesto aplicado a aguas naturales y marinas permite trabajar con un factor de preconcentración de 50; obteniéndose eficiencias del 100% para ambos grados de oxidación.

- El sistema de preconcentración puede acoplarse "en línea" a un sistema de detección de alta sensibilidad como es la espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS), y potencialmente podría acoplarse a sistemas más sensibles como el ICP-MS.

- Los límites de detección conseguidos son suficientemente bajos como para permitir su aplicación a muestras medioambientales.

III.5.- BIBLIOGRAFIA.

- CANTARERO, A.; GÓMEZ, M.M.; CÁMARA, C. PALACIOS, M.A.
Anal. Chim. Acta, 296, 205 (1994).
- COX, A.G.; McLEOD, C.W.; MILES, D.L.; COOK, J.M.
J. Anal. Atom. Spectrom. 2, 553 (1987).
- COX, A.G.; McLEOD, C.W.
Mikrochim Acta. 81, 125, (1992).
- D`ULIVO, A.; LAMPUGNANI, L.; SFETSIOS, B.; ZAMBONI, R. Y
FORTE, C.
Analyst, 119, 633 (1994).
- EPA-600/4-76-049 SEPTEMBER (1976).
"Handbook for sampling and sample preservation of water and
waste water".
- GÓMEZ, M.M.; HIDALGO, M.M.; PALACIOS, M.A.
Fresenius J. Anal. Chem. (en prensa) (1995).
- GUTIERREZ RÍOS, E.
Química Inorgánica, Editorial Reverté (1985).
- HIDALGO, M.M.; GÓMEZ, M.M.; PALACIOS, M.A.
Analyst, 120, 1911 (1995).
- HOLAK, W.
Anal. Chem. 41, 1712 (1969).
- LONG, L.G., WINEFORDNER, J.D.
Anal. Chem. 55, 713 (1983).
- LÓPEZ, M.A.; GÓMEZ, M.M.; PALACIOS, M.A.; Y CÁMARA, C.
Fresenius J. Anal. Chem., 346, 643 (1993).
- LÓPEZ-GONZÁLVES, M.A.; GÓMEZ, M.M.; PALACIOS, M.A.; CÁMARA,
C.
J. Anal. Atom. Spectrom. 9, 291 (1994).
- MASEÈ, R., MAESSEN, F.J., Y DE GOEIJ, J.M.
Anal. Chim. Acta. 127, 181 (1981).
- PALMER, I.S., FISCHER, D.D., HALVERSON, A.W. Y OLSON, O.E.
Biochim, Biophys. Acta. 177, 336 (1969).
- SMICHOWSKI, P.N.; DE LA CALLE-GUNTIÑAS, M.B.; CÁMARA, C.
Fresenius, J. Anal. Chem. 348, 380 (1994a)

Parte experimental

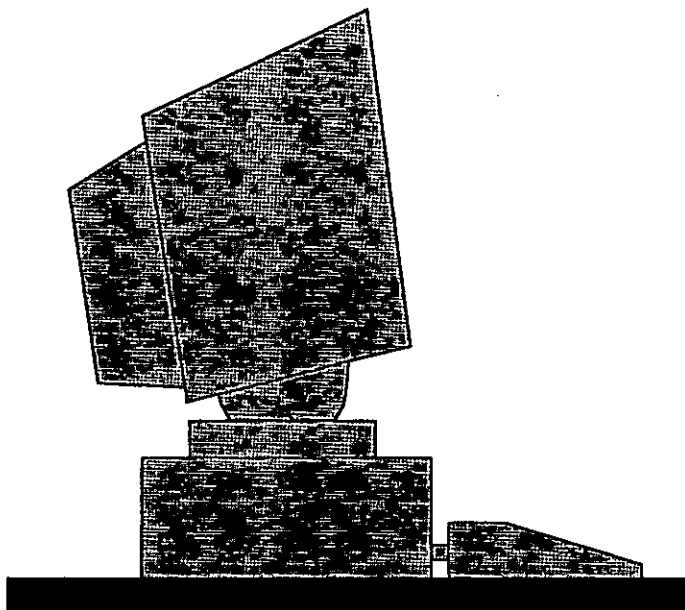
SMICHOWSKI, P.N.; DE LA CALLE, M.B.; MADRID, Y.; COBO, M.G.;
CÁMARA, C.
Spectrochim. Acta. 49b, 11, 1049, (1994b).

SMIDTH, F.J., ROYER, J.L.
Anal. Lett. 6, 17 (1973).

VERLINDEN, M.
Fresenius Z Anal. Chem. 296, 253 (1979).

WELZ, B. Y MELCHER, M.
Analyst, 109, 569 (1984a).

WELZ, B. Y MELCHER, M.
Analyst, 109, 569 (1984b)



CAPÍTULO IV

ACOPLAMIENTOS HPLC-HG-AAS

CAPÍTULO IV.- ACOPLAMIENTOS HPLC-HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS DE SELENIO. TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES.

- IV.1.- Introducción.
- IV.2.- Acoplamiento HPLC-HG-AAS para la determinación de Se(IV) y Se(VI).
 - IV.2.1.- Módulo cromatográfico: flujo y concentración del eluyente.
 - IV.2.2.- Parámetros analíticos óptimos y aplicaciones analíticas.
- IV.3.- Preconcentración de Se(IV) y Se(VI) en microcolumnas de alúmina y separación-determinación mediante el acoplamiento HPLC-HG-AAS.
 - IV.3.1.- Características analíticas y aplicaciones.
- IV.4.- Determinación de las especies organometálicas del selenio: Transformación de especies.
 - IV.4.1.- Formación del hidruro de selenio a partir de TMeSe.
 - IV.4.2.- Formación del hidruro de selenio a partir de SeCys y SeMet.
 - IV.4.3.- Características analíticas y aplicaciones.
 - IV.4.4.- Discusión de resultados.
- IV.5.- Acoplamiento del módulo de transformación de especies al sistema HPLC-MO-HG-AAS. Aplicación a la determinación en línea de TMeSe, Se(IV) y Se(VI).
 - IV.5.1.- Características analíticas y aplicaciones.
 - IV.5.2.- Discusión de resultados.
- IV.6.- Bibliografía.

IV.- ACOPLAMIENTOS HPLC-HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS DE SELENIO. TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES.

IV.1.- INTRODUCCIÓN.

Como ya se indicó en el capítulo II, la problemática que plantea el uso de técnicas cromatográficas para la determinación de especies metálicas u organometálicas en muestras medioambientales es el alto límite de detección que ofrecen utilizando detectores convencionales. Por lo tanto se hace necesario el acoplamiento de la técnica cromatográfica a técnicas de detección que ofrezcan bajos límites de detección. De ahí el auge que ha adquirido en los últimos años el uso de estos acoplamientos para la determinación de muy diferentes tipos de elementos metálicos y sus compuestos organometálicos.

Parte experimental

También se ha visto que para la determinación de compuestos de selenio, el sistema de detección que ofrece límites de detección adecuados para su aplicación a muestras de interés medioambiental es la espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros. Sin embargo esta técnica presenta un gran inconveniente para la determinación de diferentes especies de selenio, ya que únicamente el Se(IV) es capaz de generar el hidruro; por lo que se hace necesaria una etapa previa de conversión a Se(IV) de todas las demás especies.

En esta parte de la memoria, se desarrollan inicialmente las condiciones cromatográficas para la separación de las especies aniónicas inorgánicas del elemento acoplado la reducción en línea del Se(VI) a Se(IV) para la posterior determinación del hidruro (capítulo IV.2).

La muestra puede inyectarse en el cromatógrafo después de haber sido preconcentrada en la microcolumna de alúmina, esta forma de trabajo, permite reducir los límites de detección en 1 ó 2 órdenes de magnitud, dependiendo de la complejidad de la matriz (capítulo IV.3).

Finalmente, para la determinación de especies organometálicas, se ha abordado la transformación a Se(IV) del ión $TMeSe^+$, así como de los aminoácidos selenometionina (SeMet), selenocistina (SeCys). El acoplamiento de este sistema transformador de especies como interfase entre la salida de las especies del cromatógrafo y el sistema detector, permite la determinación en línea de estas especies organometálicas del selenio presentes en la muestra. Estudiada la transformación (capítulo IV.4) se ha optimizado el acoplamiento mencionado para la especiación de Se(IV), Se(VI) y $TMeSe$.

IV.2.- ACOPLAMIENTOS HPLC-HG-AAS PARA LA DETERMINACIÓN DE Se(IV), Se(VI).

IV.2.1.- MÓDULO CROMATOGRÁFICO: FLUJO Y CONCENTRACIÓN DEL ELUYENTE.

Debido a la naturaleza aniónica de las especies a determinar, una columna de intercambio aniónico puede ser en principio la más idónea. A pH=6.8 (pH de la disolución amortiguadora eluyente) el Se(IV) (pKa= 2.3 y 7.8) estará en su forma protonada (HSeO_3^-); mientras que el Se(VI) estará en su forma aniónica SeO_4^{2-} (pKa=2.1). Al tener el Se(VI) mayor interacción electrostática con la columna, eluirá en último lugar. La columna escogida para ello es una columna aniónica de poliestireno-divinilbenceno trimetilamonio de (25 cm x 4.1 mm d.i); Hamilton PRP-X100. Como eluyente para esta columna se probaron diferentes concentraciones de la disolución reguladora de fosfato a pH=6.8.

La Figura 21 muestra el diseño empleado de acoplamiento HPLC-HG-AAS empleando la reducción en microondas como interfase, en dicho diseño, se acopla el módulo cromatográfico directamente al sistema desarrollado previamente para la determinación de Se(total) y Se(IV) por reducción en línea - HG-AAS. Es de prever que la fase móvil empleada para la elución del Se(IV) y Se(VI), de la columna cromatográfica, no interfiera en la determinación en línea de ambas especies ya que el PO_4^{3-} no es interferencia en la generación de hidruros. La forma de trabajo es la siguiente: La muestra se inyecta en la fase móvil que es arrastrada hacia la columna, donde se produce la separación de las diferentes especies de acuerdo con su capacidad de retención. A medida que las especies salen de la columna, arrastradas por el eluyente, se mezclan con el HCl y juntos pasan al

Parte experimental

horno microondas, que se encuentra a la máxima potencia. El Se(IV) se mezcla con el HCl, cuya única misión es la de proporcionar el medio ácido para la generación del hidruro. Cuando la especie eluida es el Se(VI), se produce la reducción cuantitativa del Se(VI) a Se(IV) en el interior del horno por la acción del HCl, al mismo tiempo, se alcanza la acidez necesaria para la formación del hidruro. Teniendo en cuenta que todos los parámetros de la determinación se encuentran optimizados en el capítulo anterior (III.3.2); solamente los parámetros del módulo cromatográfico son los optimizables.

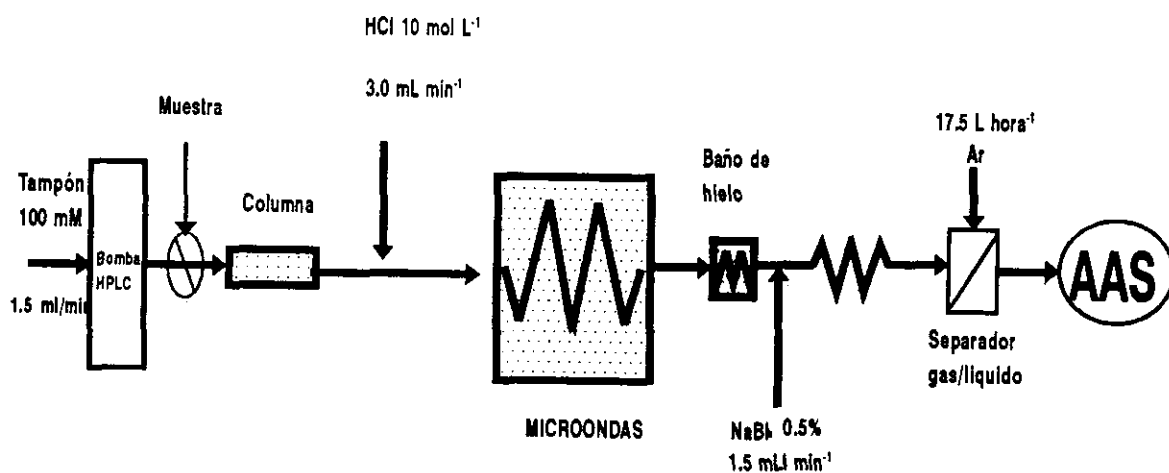


Figura 21.- Sistema en línea HPLC-reducción en microondas-HG-AAS.

Para ello, la concentración de la disolución reguladora de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) se varió entre 80 y 120 mmol L⁻¹ a un flujo de 1.0 mL min⁻¹. Concentraciones superiores no se probaron debido a la baja solubilidad de una de las sales de

partida. Los resultados (tiempo de retención vs concentración del eluyente) se muestran en la Figura 22. Un aumento de la concentración de la disolución reguladora no afecta al tiempo de retención del Se(IV) mientras que el de Se(VI) disminuye (aproximadamente 1.5 minutos), siendo este descenso más acusado entre 90 y 100 mmol L⁻¹. Al aumentar la concentración de fosfato se observó también un aumento de la señal analítica de las distintas especies de selenio, produciéndose un estrechamiento de los picos cromatográficos. Se escogió una concentración de trabajo de 100 mmol L⁻¹.

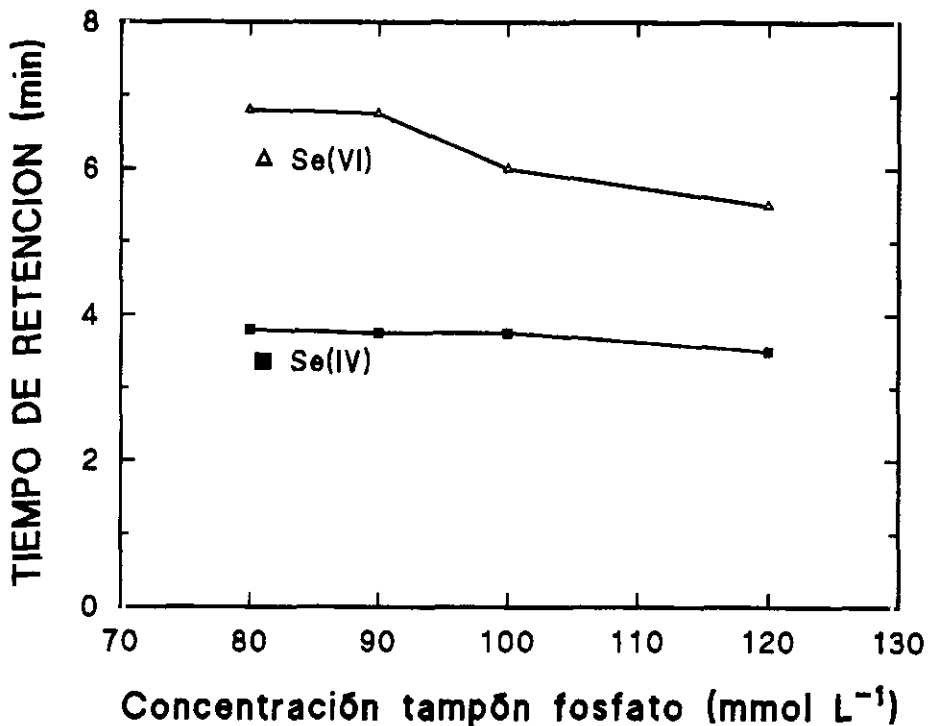


Figura 22.- Influencia de la concentración de fosfato en la separación cromatográfica de Se(IV) y Se(VI) ([Se(IV)] = 100 µg L⁻¹ ; [Se(VI)] = 100 µg L⁻¹).

Parte experimental

El flujo del eluyente cromatográfico se varió entre 1 y 1.5 mL min⁻¹. Flujos superiores no se ensayaron por producir sobrepresión en el sistema de reducción y baja eficiencia en dicho proceso, así como presiones demasiado elevadas en la columna cromatográfica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23; observándose, como era de esperar, que al aumentar el flujo del eluyente disminuyen los tiempos de retención de los analitos. Además, las señales analíticas aumentan debido al estrechamiento que se produce en los picos cromatográficos. El flujo escogido fue de 1.5 mL min⁻¹, por ser el que mejores resultados ofreció, sin producir problemas adicionales de sobrepresión.

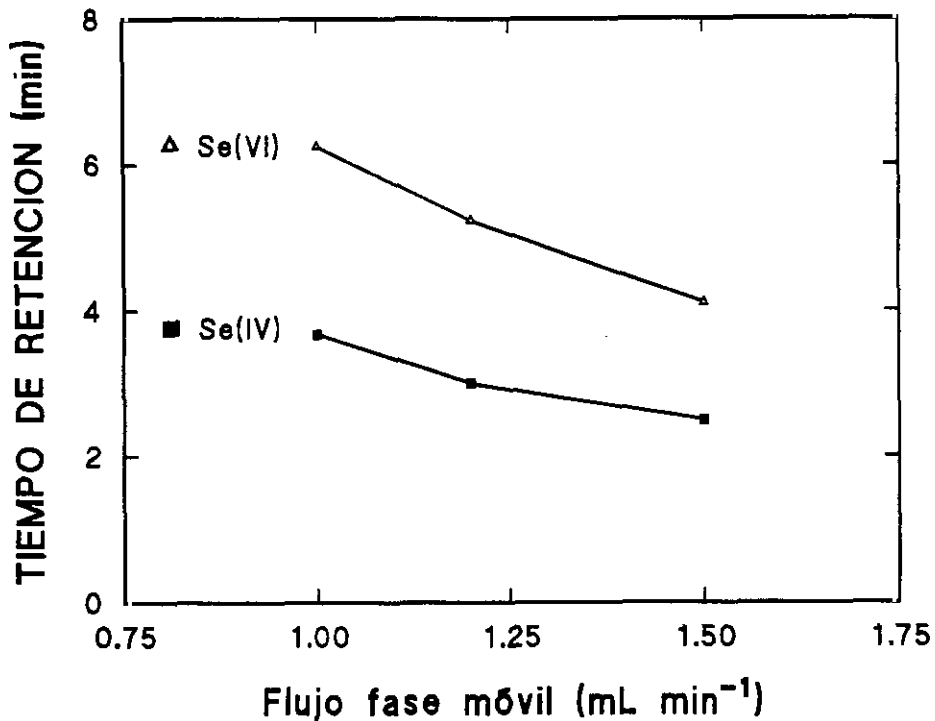


Figura 23.- Influencia del flujo del tampón fosfato en la separación cromatográfica de Se(IV) y Se(VI)
([Se(IV)] = 100 µg L⁻¹ ; [Se(VI)] = 100 µg L⁻¹).

IV.2.2.- PARÁMETROS ANALÍTICOS ÓPTIMOS Y APLICACIONES ANALÍTICAS.

La separación cromatográfica se muestra en la Figura 24, el pico más estrecho es del Se(IV) y el más ancho corresponde al Se(VI), que como se indicó anteriormente es el que mayor interacción electrostática tiene y por tanto el que más se retiene en la columna.

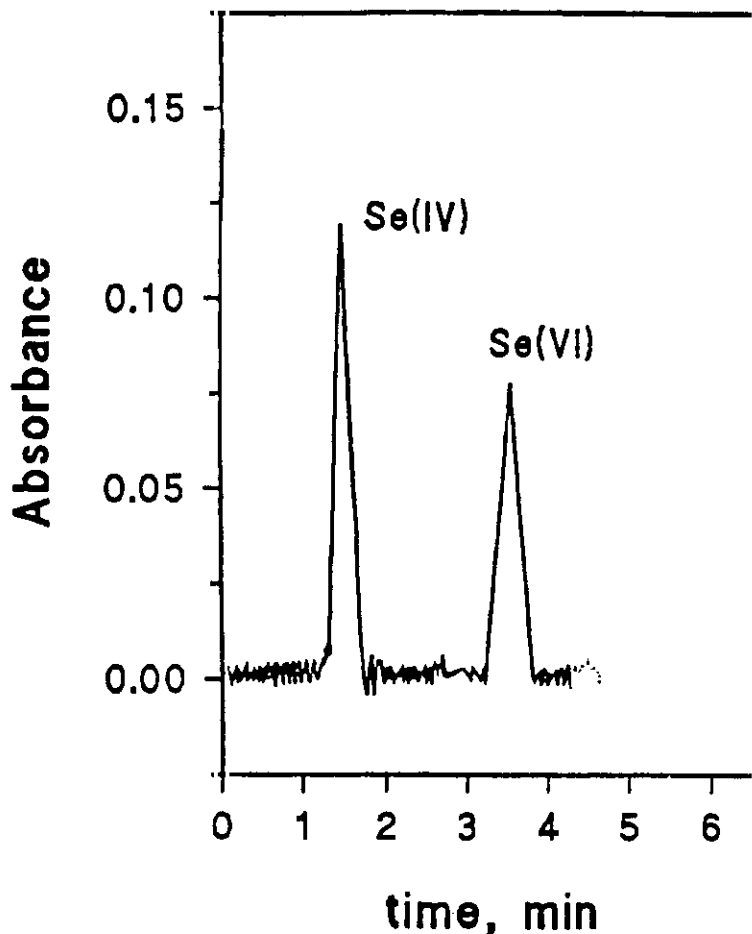


Figura 24.- Cromatograma de Se(IV) y Se(VI) ([Se(IV)]= 120 $\mu\text{g L}^{-1}$; [Se(VI)]= 125 $\mu\text{g L}^{-1}$) .

La Tabla XVII resume las condiciones operatorias óptimas para la determinación independiente de Se(IV) y Se(VI).

Parte experimental

Tabla XVII.- Parámetros analíticos en la especiación de Se(IV) y Se(VI) por HPLC-HG-AAS.

Fase móvil	100 mmol L ⁻¹ disolución reguladora de fosfato pH=6.8.
Flujo de la fase móvil	1.5 mL min ⁻¹ .
Volumen de inyección	100 µL.
[HCl]	10 mol L ⁻¹ .
Flujo de HCl	3 mL min ⁻¹ .
[NaBH ₄]	0.5 % (m/v) en 0.16% (m/v) NaOH
Flujo de NaBH ₄	1.5 mL min ⁻¹ .
Flujo de argón	17.5 L h ⁻¹ .

El método propuesto se aplicó con éxito a la determinación de Se(IV) y Se(VI) en las muestras de alta concentración de un ejercicio de intercomparación y de certificación, que se detalla exhaustivamente en los capítulos V y VI. Las muestras contenían además 2000 mg L⁻¹ de Cl⁻, no presentando este elemento ninguna interferencia en la separación y detección de las especies de nuestro interés. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XVIII, pudiendo observarse su concordancia con el valor medio obtenido por todos los laboratorios participantes.

Tabla XVIII.-Resultados analíticos en los ejercicios de intercomparación y certificación.

	Ejercicio de intercomparación.		Ejercicio de certificación	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
Resultado obtenido (µg L ⁻¹)	49±2	51±4	35±2	44±1
Media de los valores aceptados (µg L ⁻¹)	51±3	50±4	35±2	45±4
Cantidad añadida a las muestras (µg L ⁻¹)	50.0	50.0	35.0	45.0

IV.3. PRECONCENTRACIÓN DE Se(IV) Y Se(VI) EN MICROCOLUMNA DE ALÚMINA Y SEPARACIÓN-DETERMINACIÓN MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO HPLC-HG-AAS.

Una de las dificultades que presenta el acoplamiento de la preconcentración y la separación cromatográfica, es el eluyente utilizado en la preconcentración, como se ha visto previamente. El Se(IV) y Se(VI) se eluyen de la microcolumna de alúmina con una disolución de NH_3 2 mol L^{-1} . Este medio básico puede modificar la resolución de los picos cromatográficos del Se(IV) y Se(VI), así como la eficiencia de la generación del hidruro.

El procedimiento operatorio seguido, auna las condiciones óptimas de preconcentración del Se(IV) y Se(VI) (ver Apdo III.4) con las condiciones óptimas de separación cromatográfica y formación de los hidruros de estas especies. El sistema utilizado es el previamente desarrollado por HPLC-HG-AAS (Figura 21).

Ante la dificultad de acoplar la microcolumna de alúmina con el sistema de inyección cromatográfico, se realiza la preconcentración en discontinuo inyectando en el cromatógrafo la muestra eluida.

Trabajar en discontinuo se traduce en facilidad, comodidad y economía; ya que si éste se realiza en línea, durante el tiempo utilizado en la activación de la microcolumna, preconcentración y elución (aproximadamente 15 minutos), el sistema de separación y detección está funcionando (gastando reactivos y gases) sin que se produzca ninguna señal analítica.

La forma de trabajo es la siguiente: la microcolumna de

Parte experimental

alúmina se acondicionará con la disolución de HNO_3 , 0.01 mol L^{-1} a 1.5 mL min^{-1} , durante 5 minutos, posteriormente a este mismo flujo se pasará la muestra; una vez concluida esta etapa se eluirán los analitos de interés [Se(IV) y Se(VI)] con $500 \mu\text{L}$ de NH_3 , 2 mol L^{-1} , recogién dose en un vial de polietileno y procediéndose posteriormente a su inyección en el cromatógrafo; teniendo en cuenta que el volumen de inyección óptimo en el cromatógrafo es de $100 \mu\text{L}$, es posible con el volumen recogido en los viales, inyectar tres veces la misma muestra.

IV.3.1.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y APLICACIONES.

La separación cromatográfica se muestra en la Figura 25, como puede apreciarse la resolución en la separación cromatográfica no empeora lo que aconseja el empleo del sistema propuesto.

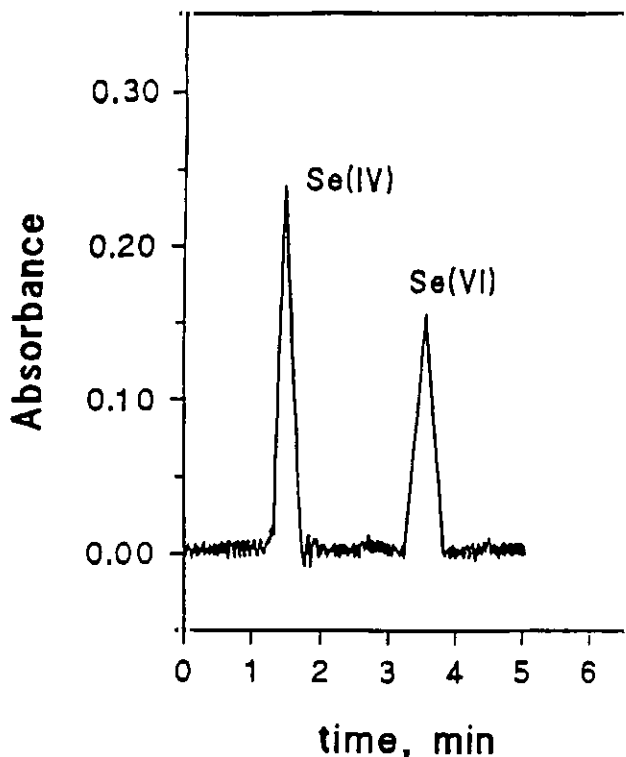


Figura 25.- Cromatograma del Se(IV) y Se(VI) en NH_3 , 2 mol L^{-1} .

Los parámetros analíticos óptimos para la preconcentración y separación de Se(IV) y Se(VI) se resumen en la Tabla XIX.

Las características analíticas del método propuesto se resumen en la Tabla XX.

Los calibrados obtenidos se muestran en la Figura 26. El método se ha aplicado a la determinación de Se(IV) y Se(VI) en muestras acuosas de baja concentración en un ejercicio de intercomparación y en un candidato a material de referencia (CRM). Los resultados coincidieron con la media de los demás participantes y con la cantidad añadida en la preparación de las muestras (Tabla XXI).

Tabla XIX.- Parámetros analíticos de la preconcentración y determinación de Se(IV) y Se(VI) por HPLC-HG-AAS.

Fase móvil	100 mmol L ⁻¹ disolución reguladora de fosfato pH = 6.8.
Flujo de la fase móvil	1.5 mL min ⁻¹ .
Volumen de inyección	100 µL.
[HCl]	10 mol L ⁻¹ .
Flujo de HCl	3 mL min ⁻¹ .
[NaBH ₄]	0.5 % (m/v) en 0.16% (m/v) NaOH
Flujo de NaBH ₄	1.5 mL min ⁻¹ .
Flujo de argón	17.5 L h ⁻¹ .
[NH ₃]	2 mol L ⁻¹ .
Flujo de NH ₃	1.5 mL min ⁻¹ .
Volumen de NH ₃	500 µL.
[HNO ₃]	0.01 mol L ⁻¹ .
Flujo de HNO ₃	1.5 mL min ⁻¹ .

Las muestras se preconcentraron 20 veces (el factor máximo de preconcentración es 50), con el fin de obviar la interferencia del Cl⁻, presente en la muestra para asegurar la estabilidad de las especies. Este factor de preconcentración de 20 fue suficiente para la determinación de Se(IV) y Se(VI) en las muestras propuestas.

Tabla XX.- Características analíticas de la preconcentración y determinación de Se(IV) y Se(VI) por HPLC-HG-AAS.

	Se(IV)	Se(VI)
Tiempo de retención (min)	1.75	3.50
Intervalo de linealidad (ng)	0.25-50	0.4-50
Precisión (%)	8-4	10-2
Sensibilidad (u.a. L μg^{-1}) $\times 10^2$	1.62	1.05
Límite de detección (ng)	0.07	0.11

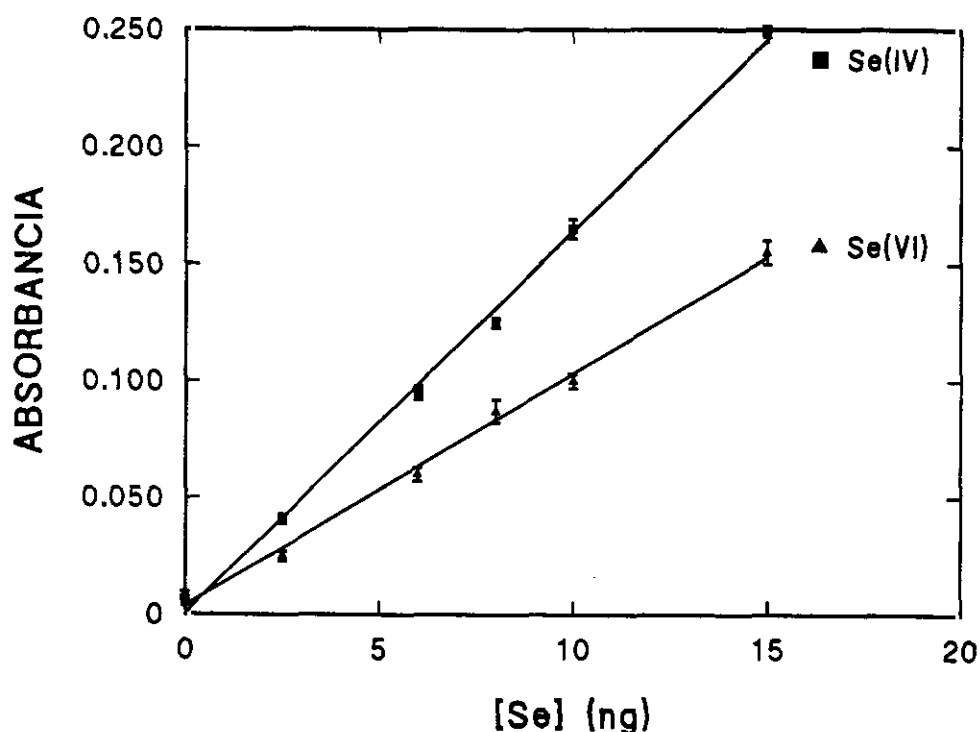


Figura 26.- Calibrados de Se(IV) y Se(VI) por HPLC-HG-AAS, previa preconcentración (alúmina)/elución en NH_3 , 2 mol L^{-1} .

Tabla XXI.-Resultados analíticos en los ejercicios de intercomparación y certificación.

	Ejercicio de intercomparación.		Ejercicio de certificación	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
Resultado obtenido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6.2 \pm 0.6	6.25 \pm 0.05	6.3 \pm 0.2	8.2 \pm 0.2
Media de los valores aceptados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.6 \pm 0.4	6.2 \pm 0.3	5.8 \pm 0.4	7.7 \pm 0.7
Cantidad añadida a las muestras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6.0	6.0	6.0	8.0

IV.4.- DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES ORGANOMETÁLICAS DEL SELENIO: TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES.

Una vez desarrollado el método analítico que permite la determinación diferenciada de las especies inorgánicas del selenio, el siguiente paso ha sido abordar la determinación de trimetilselenio, metabolito que se encuentra principalmente en la orina como producto de biometilación de las especies inorgánicas del selenio, y de la selenometionina y selenocistina, aminoácidos del selenio que forman parte de las proteínas del selenio entre las que se encuentra la glutatona peroxidasa de indiscutible función fisiológica en los organismos vivos.

La detección de estas formas orgánicas del selenio, en el sistema desarrollado para las especies inorgánicas, involucra dos pasos adicionales con respecto a estas últimas: el primero es la transformación en línea de estas especies orgánicas a formas inorgánicas. La oxidación de la materia orgánica (única forma de descomposición) lleva consigo la oxidación del selenio desde el estado de oxidación en que se encuentra a Se(VI). Después de este primer paso, el segundo implica la reducción del Se(VI) a Se(IV) para formar el hidruro correspondiente. En este apartado se aborda el primer paso de la determinación cuantitativa, es decir el estudio de la transformación de estas tres especies orgánicas del selenio a formas inorgánicas.

IV.4.1.-FORMACIÓN DEL HIDRURO DE SELENIO A PARTIR DE LA ESPECIE TMeSe.

La descomposición del TMeSe ($(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$) ha sido durante muchos años la etapa más problemática en la determinación de este analito. Welz y Melcher en 1984 propusieron un ataque

con ácidos fuertes (nitríco, sulfúrico y perclórico) y altas temperaturas (310°C) para la descomposición de este compuesto (apartado II.2.5.). Recientemente D`Ulivo y col en 1994, han propuesto un método en discontinuo para la descomposición cuantitativa de selenometionina y trimetilselenio utilizando una mezcla de ácido bromhídrico/bromuro y el calor proporcionado por un horno microondas.

El esquema utilizado para la descomposición y determinación "en línea" de las tres especies se muestra en la Figura 27.

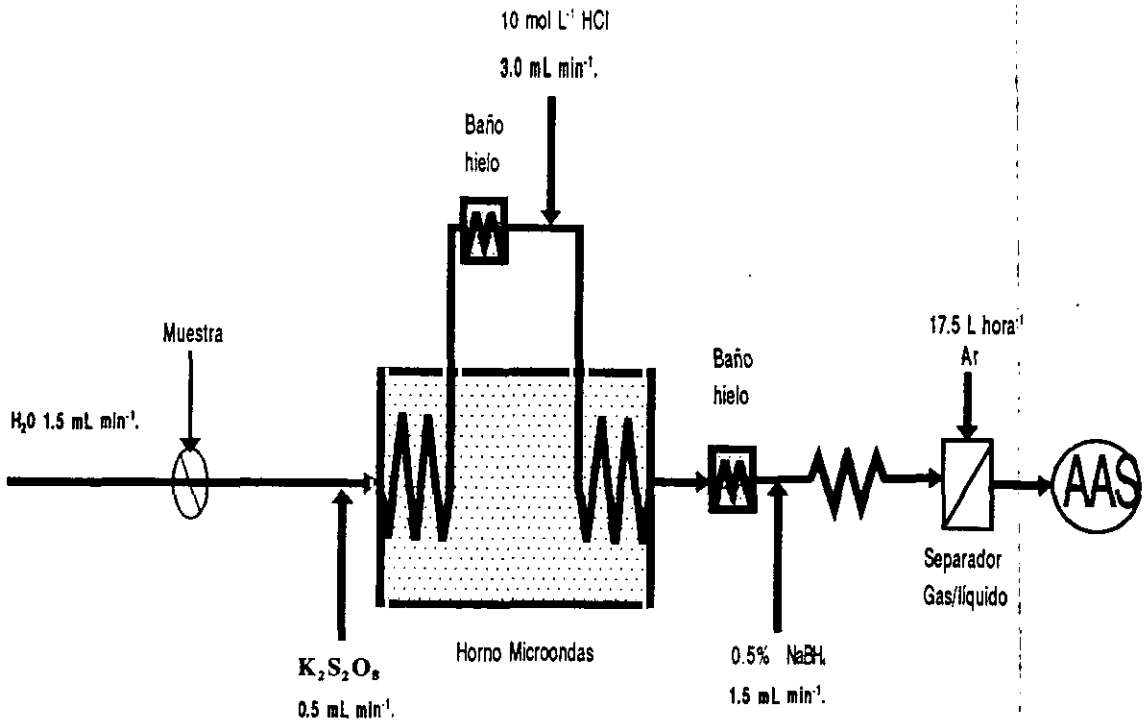


Figura 27.- Sistema utilizado para la descomposición y determinación en línea de TMeSe, SeCys, y SeMet.

Parte experimental

Los parámetros involucrados se han optimizado inicialmente para el ión trimetilselenio, comparando las señales analíticas con las obtenidas para Se(IV) y Se(VI) en idénticas condiciones; posteriormente, se han ensayado con ligeras modificaciones para la SeCys y SeMet.

Empleo del persulfato potásico como reactivo oxidante.

Se utilizó una disolución de persulfato en medio básico y en caliente como medio oxidante para la descomposición del compuesto orgánico, por ser el medio utilizado por otros autores para la descomposición de organoarsenicales con buenos resultados. [López y col, 1993; López-Gonzálvez y col, 1994].

El procedimiento operatorio seguido en la optimización de la descomposición ha sido el siguiente: Se introduce la muestra que contiene las especies orgánicas del selenio a través de una válvula de inyección en un flujo portador de agua y mediante un sistema en T se une con una disolución de persulfato potásico estabilizada con NaOH. Esta disolución pasa a un bucle de reacción introducido en un horno microondas que opera a la máxima potencia. En este primer bucle idealmente se produce la descomposición cuantitativa del organoselenio, así como la oxidación de la posible materia orgánica de la matriz. La muestra oxidada sale del horno microondas y pasa a través de un baño de hielo a fin de enfriar y despresurizar el sistema. Ya en este punto, mediante una nueva T conectada al sistema, la muestra se acidifica con la disolución de HCl que actúa de reductor del Se(VI) y juntos pasan a un segundo bucle de reducción que se encuentra dentro del horno microondas. La acción del reductor y la temperatura del horno, convierte al Se(VI) en Se(IV) que pasa al módulo de determinación por formación del hidruro de selenio correspondiente.

La concentración de $K_2S_2O_8$ se varió de 0.1 a 5 % (m/v) con un flujo de 0.5 mL min^{-1} . La máxima señal analítica (descomposición cuantitativa) del trimetilselenio se obtiene cuando la concentración de $K_2S_2O_8$ es mayor del 2.5 %; sin embargo, concentraciones superiores al 4 % producen sobrepresiones en el sistema y por tanto afectan de forma importante a la irreproducibilidad de la descomposición. Como se observa en la Figura 28, la señal óptima se obtiene cuando en las mismas condiciones iguales cantidades de TMeSe y de Se(IV) ofrecen la misma señal, indicando que la descomposición del TMeSe es cuantitativa y que además la etapa de reducción prevalece sobre la etapa de oxidación ya que en un primer momento por efecto del $K_2S_2O_8$ y del calor el Se(IV) inyectado en el sistema pasa a Se(VI) para después en el bucle de reducción transformarse de nuevo en Se(IV). La concentración de $K_2S_2O_8$ óptima para la descomposición de TMeSe es del 3 % (m/v).

Una vez optimizada la concentración del medio oxidante (persulfato) se varió el flujo de éste. El flujo de persulfato se varió de 0.1 a 0.6 mL min^{-1} , observándose que flujos inferiores a 0.5 mL min^{-1} no producen una eficiencia del 100 % en la descomposición del trimetilselenio. El flujo elegido como óptimo para la descomposición del TMeSe es 0.5 mL min^{-1} , debido a que flujos superiores producen problemas de sobrepresión en el sistema y por tanto de irreproducibilidad del proceso.

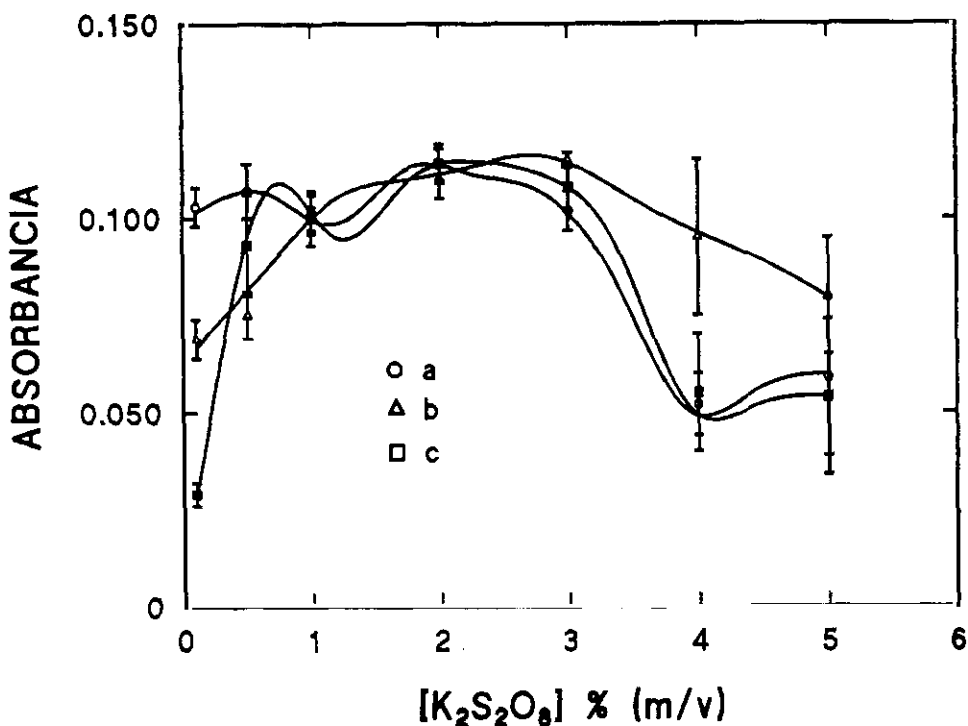
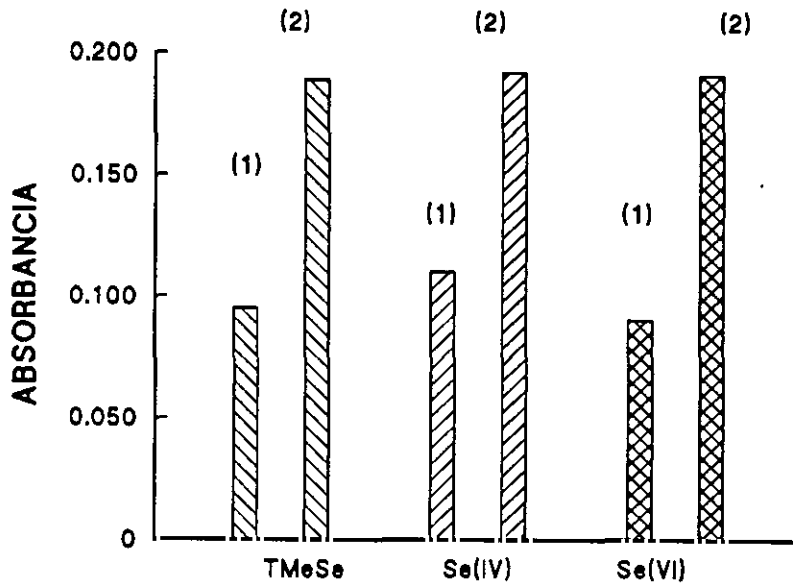


Figura 28.- Influencia de la concentración de $K_2S_2O_8$ en la descomposición del TMeSe. a) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV), b) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(VI), c) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se como TMeSe.

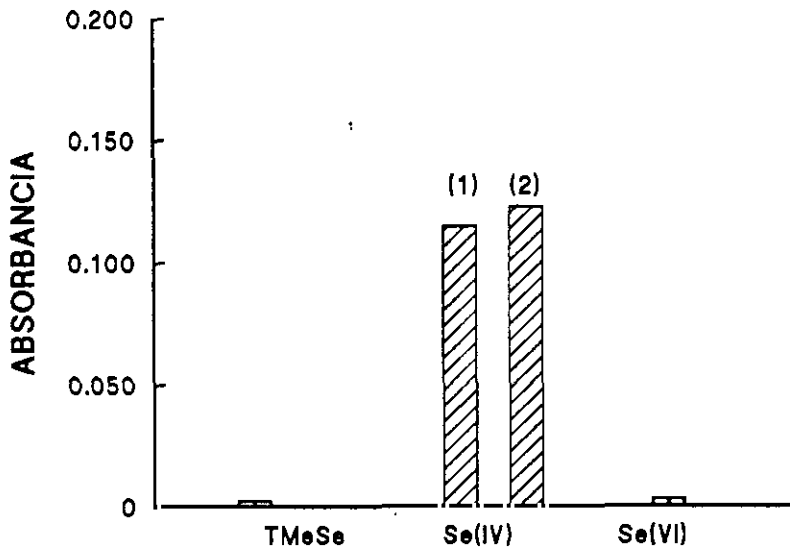
Optimización del flujo y concentración del HCl.

La concentración del reductor (ácido clorhídrico) utilizado para la reducción del Se(VI) a Se(IV) y para la generación del hidruro se varió de 6 a 12 mol L^{-1} . La reducción cuantitativa del Se(VI) a Se(IV) y por tanto, la descomposición cuantitativa del TMeSe se llevó a cabo utilizando una concentración de ácido clorhídrico igual ó superior a 10 mol L^{-1} . El flujo de HCl necesario para la reducción en línea y para la generación del hidruro de selenio es 3 mL min^{-1} ; la Figura 29 muestra la respuesta analítica obtenida para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, en sus distintas formas (Se(IV), Se(VI) y TMeSe) cuando el microondas está

encendido y apagado (obteniéndose únicamente la señal derivada de la inyección de Se(IV)).



A



B

Figura 29.- Eficiencia de la generación del H_2Se en línea a partir de TMeSe, Se(IV) y Se(VI). (1) en HCl 10 mol L^{-1} a 1.5 mL min^{-1} . (2) HCl 10 mol L^{-1} a 3.0 mL min^{-1} a) con microondas, b) sin microondas.

Parte experimental

Como puede observarse en la **Figura 29**, sólo se obtiene señal analítica de las especies de Se(VI) y TMeSe cuando éstas han pasado a través del horno microondas en funcionamiento ya que precisan el calor para una transformación a Se(IV). Además precisan de un caudal de ácido clorhídrico elevado (3.0 mL min^{-1}) para que la transformación sea cuantitativa y por tanto las señales de TMeSe y Se(VI) se igualen con la proporcionada por idéntica cantidad de Se(IV) en las mismas condiciones.

IV.4.2.-OPTIMIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE SeMet y SeCys.

La descomposición de la selenometionina y la selenocistina se ha abordado teniendo en cuenta las experiencias llevadas a cabo anteriormente con el Se(VI) y con el TMeSe.

Dada la naturaleza orgánica de los compuestos a determinar, se utilizará un sistema de descomposición similar al utilizado para la descomposición del trimetilselenio (bucle de oxidación, bucle de reducción, persulfato potásico como oxidante, etc).

Descomposición de la selenocistina.

En una primera experiencia se hizo patente que para la descomposición de la selenocistina, basta el calor generado en el horno microondas, no siendo necesario el aporte auxiliar del reactivo oxidante persulfato, para su pre-reducción a Se(IV). El proceso es cuantitativo cuando se utiliza para la reducción y generación del hidruro de selenio $\text{HCl } 10 \text{ mol L}^{-1}$ a un flujo de 3.0 mL min^{-1} .

En todos los casos la señal analítica de la selenocistina se comparó con la señal proporcionada por,

igual cantidad de selenio, como Se(IV), en las mismas condiciones. Se observó que el rendimiento de la descomposición de selenocistina es del 100% hasta concentraciones de selenio de este compuesto de $400 \mu\text{g L}^{-1}$.

Descomposición de la selenometionina.

La descomposición cuantitativa de la selenometionina es totalmente distinta a la de la selenocistina ya que precisa condiciones exhaustivas tanto en la etapa de oxidación como en la de reducción. La etapa de oxidación se lleva a cabo utilizando persulfato potásico como oxidante. Las variables optimizadas de nuevo para esta descomposición fueron: concentración de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, concentración de NaOH, flujo del persulfato y tiempo de encendido del microondas.

Al igual que en el caso anterior, la señal analítica de la selenometionina se comparó con la señal obtenida por igual cantidad de selenio, como Se(IV).

La concentración de persulfato se varió entre 1 y 3 % (m/v). No se ensayaron concentraciones superiores al 3%, ya que con la experiencia obtenida para el TMeSe se observó que se producen sobrepresiones en el sistema y por tanto irreproducibilidad de las medidas. El medio básico que contiene la disolución de persulfato se varió entre el 1 y el 2% (m/v) de NaOH. Los resultados obtenidos por la variación de los parámetros anteriormente mencionados se muestran en la Figura 30; como puede observarse en ninguno de los casos la cuantitatividad del proceso supera el 20% y sorprendentemente se aprecia cierta tendencia de mejora al disminuir la concentración de persulfato.

Una práctica común en el empleo del horno microondas para todas las experiencias realizadas en las que era

Parte experimental

necesario esta interfase, era poner en funcionamiento el horno a la máxima potencia en el momento de la inyección de la muestra en el flujo de solución portadora, ó en el caso de su conexión al HPLC, una vez que eluye el Se(IV), que es la especie menos retenida. Sin embargo, en el caso de la selenometionina, se comprobó que dando al horno de microondas un tiempo de precalentamiento antes de la inyección de la muestra, se mejoraba la descomposición de la selenometionina ya que aumentaba sensiblemente la eficiencia de la generación del hidruro. Ensayados diferentes tiempos de precalentamiento y disminuyendo el flujo de persulfato al mismo tiempo que se aumentaba la concentración de NaOH del medio persulfato, se encontraron condiciones experimentales para la descomposición cuantitativa de la selenometionina; igualándose a la señal obtenida para Se(IV) en el intervalo de concentraciones ensayadas.

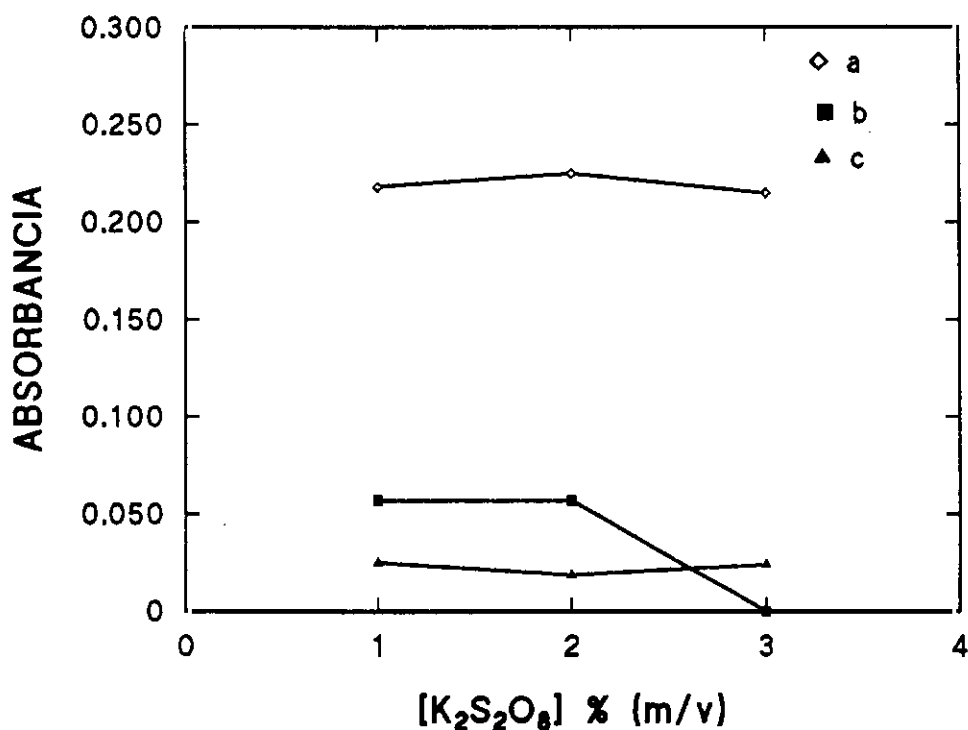


Figura 30. Influencia de la $[K_2S_2O_8]$. a) $100 \mu g L^{-1}$ de Se(IV), b) $100 \mu g L^{-1}$ de Se (SeMet) $[NaOH]= 2 \%$ (m/v), c) $100 \mu g L^{-1}$ de Se (SeMet) $[NaOH]= 1 \%$ (m/v)

El flujo de persulfato se varió igualmente observándose que valores inferiores a 0.5 mL min^{-1} eran insuficientes para la descomposición de la selenometionina y valores superiores producían un exceso de oxidante en el sistema disminuyendo la señal proporcionada por el Se(IV). Se eligen como valores óptimos un flujo de 0.5 mL min^{-1} del 1 % (m/v) de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en 2 % (m/v) de NaOH y un minuto de precalentamiento del microondas (concentraciones superiores disminuyen la eficiencia del proceso).

El coeficiente de variación obtenido dependió enormemente de las condiciones ensayadas siendo mínimo (5-7%) para las seleccionados en el presente estudio.

IV.4.3.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y APLICACIONES.

Los parámetros analíticos óptimos para la descomposición y determinación de trimetilselenio, selenometionina y selenocistina se resumen en la Tabla XXII.

Tabla XXII.- Parámetros analíticos.

$[\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8]/[\text{NaOH}]$	1%(m/v)/2%(m/v).
Flujo de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	0.5 mL min^{-1} .
[HCl]	10 mol L^{-1} .
Flujo de HCl	3.0 mL min^{-1} .
$[\text{NaBH}_4]$	0.5 % (m/v).
flujo de NaBH_4	1.5 mL min^{-1} .
Flujo de argón	17.5 L h^{-1} .
Potencia del microondas	650 W
Tiempo de precalentamiento (para SeMet y SeCys)	1 minuto

El método se aplicó a la determinación de trimetilselenio, selenometionina y selenocistina en aguas enriquecidas, obteniéndose recuperaciones del 100 %. Las características analíticas del método se muestran en la Tabla XXIII.

Tabla XXIII.- Características analíticas.

	TMeSe	SeMet	SeCys
Intervalo de linealidad (ng)	1-40	1-40	1-40
Precisión (%)	6-3	3-1	4-2
Sensibilidad (u.a ng ⁻¹) x 10 ²	1,49	1.43	1.37
Límite de detección (ng)	0.7	0.7	0.7

IV.4.4.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- El método propuesto permite la descomposición "en línea" de trimetilselenio, selenometionina y selenocistina de forma cuantitativa, rápida, instantánea y fácilmente acoplable a técnicas de detección.

- La descomposición de los selenoorgánicos "en línea" permite su futuro acoplamiento a técnicas cromatográficas.

- Los límites de detección obtenidos permiten la aplicación del método a muestras medioambientales y de interés analítico.

IV.5.- ACOPLAMIENTO DEL MÓDULO DE TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES AL SISTEMA HPLC-MO-HG-AAS. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN EN LÍNEA DE TMeSe, Se(IV) Y Se(VI).

La Figura 31 muestra el acoplamiento HPLC-oxidación MO-reducción MO-HG-AAS empleado, para la determinación simultánea de las especies inorgánicas del Se y la especie orgánica TMeSe. La muestra se inyecta en el sistema cromatográfico y las especies de selenio se separan en una columna aniónica (Hamilton PRP-X100); las especies separadas de la columna se mezclan con una disolución de $K_2S_2O_8$ al 3 % (m/v) estabilizada en 2 % (m/v) de NaOH, y mediante un bucle de oxidación (1.5 m de longitud 0.5 mm de diámetro interno) se introducen en el horno microondas, donde por efecto del calor se produce la descomposición de las diferentes especies de selenio a Se(VI). Posteriormente por efecto del ácido clorhídrico y del calor se produce la reducción de Se(VI) a Se(IV). Ya convertidas todas las especies en Se(IV) reaccionan con $NaBH_4$ 0.5 % (m/v) generándose el hidruro que arrastrado por una corriente de argón llega a la célula de cuarzo dónde se atomiza y se cuantifica por absorción atómica.

IV.5.1.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y APLICACIONES.

Ya en este punto de la memoria, todas las variables que pueden incidir en el proceso han sido optimizadas en los anteriores apartados. Hay que resaltar que dentro del módulo cromatográfico debido a la naturaleza catiónica del TMeSe⁺, eluye en primer lugar de la columna en el volumen muerto. La Figura 32 muestra los cromatogramas obtenidos para el TMeSe, Se(IV) y Se(VI) en las condiciones óptimas dadas en la Tabla XXIV.

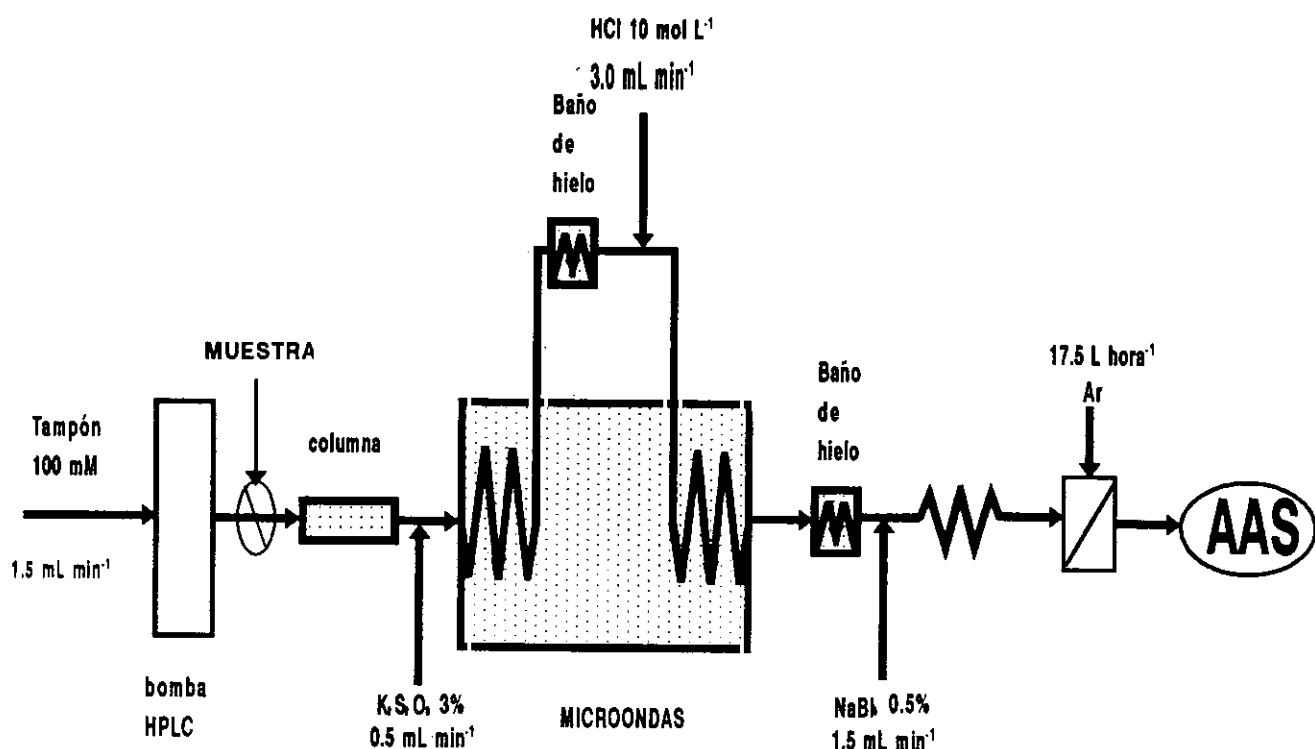


Figura 31.- Sistema en línea HPLC-oxidación/reducción en microondas-HG-AAS.

En la Tabla XXV se resumen las características analíticas del método propuesto.

Los calibrados se muestran en la Figura 33. El microondas se conectó desde el momento de la inyección y no se paró durante todo el cromatograma; otra posibilidad es desconectar el microondas después de obtener el pico de TMeSe y volverlo a conectar cuando el Se(IV) es eluido (esta especie no precisa prereducción) para que se produzca la reducción del Se(VI); sin embargo, como ya se comentó anteriormente la sensibilidad obtenida del Se(IV) aumenta cuando el microondas está conectado durante todo el

cromatograma.

Tabla XXIV.- Parámetros analíticos.

Fase móvil	100 mmol L ⁻¹ disolución reguladora de fosfato a pH= 6.8.
Flujo de la fase móvil	1.5 mL min ⁻¹ .
Volumen de inyección	100 µL.
[K ₂ S ₂ O ₈]	3 ‰ (m/v) en 2 ‰ (m/v) de NaOH
Flujo de K ₂ S ₂ O ₈	0.5 mL min ⁻¹
[HCl]	10 mol L ⁻¹ .
Flujo de HCl	3 mL min ⁻¹ .
[NaBH ₄]	0.5 ‰ (m/v) en 0.16 ‰ (m/v) NaOH
Flujo de NaBH ₄	1.5 mL min ⁻¹ .
Flujo de argón	17.5 L h ⁻¹ .

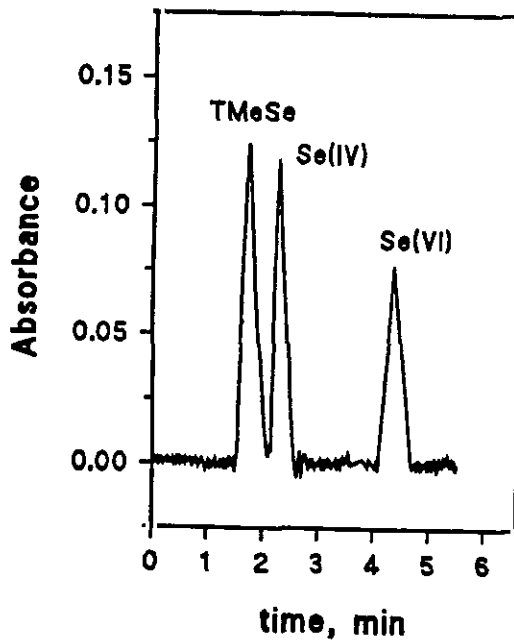


Figura 32.- Cromatograma del TMeSe, Se(IV) y Se(VI).

Tabla XXV.- Características analíticas para la determinación de TMeSe, Se(IV) y Se(VI) por HPLC-MO-HG-AAS.

	TMeSe	Se(IV)	Se(VI)
Tiempo de retención (min)	1.75	2.50	4.25
Intervalo de linealidad (ng)	2-45	2-50	3-50
Precisión (%)	10-4	5-2	10-3
Sensibilidad (u.a ng ⁻¹) x 10 ³	11.20	8.68	5.55
Límite de detección (ng)	1.1	1.4	2.2

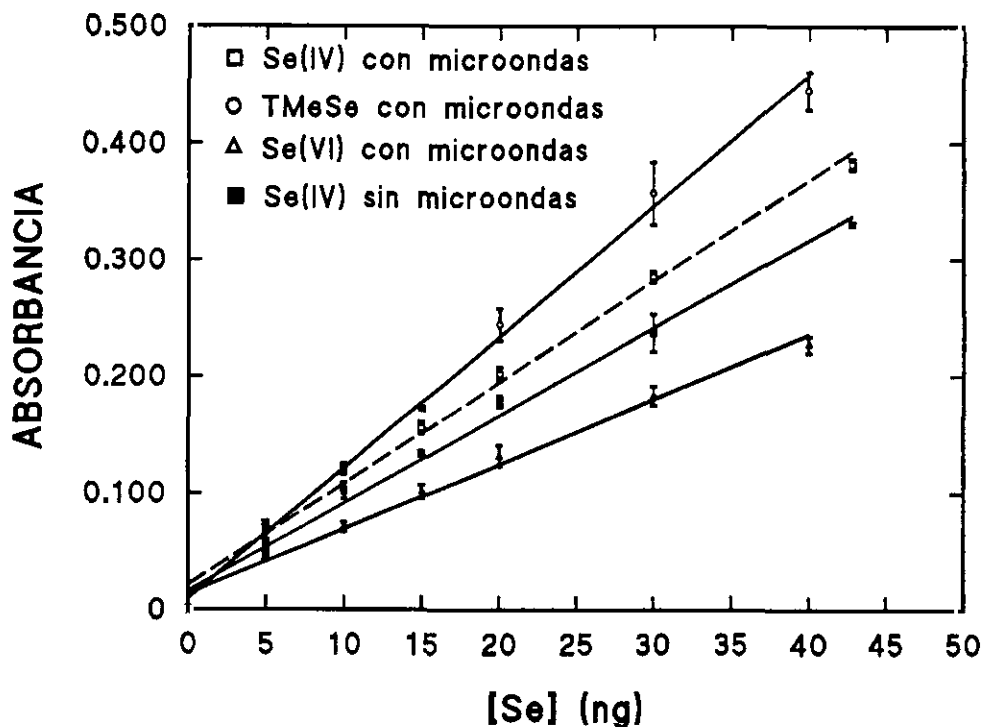


Figura 33.- Calibrados de Se(IV), TMeSe y Se(VI) mediante HPLC-MO-HG-AAS.

El método se ha aplicado a la determinación de TMeSe, Se(IV) y Se(VI) en aguas enriquecidas de estos analitos obteniéndose recuperaciones cuantitativas.

IV.5.2.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- El método permite la separación y posterior determinación de TMeSe, Se(IV) y Se(VI) de forma simultánea con alta sensibilidad y selectividad. Además, la descomposición cuantitativa del trimetilselenio es fácil, rápida, cuantitativa y acoplable a cualquier técnica de detección sensible.

- La descomposición del trimetilselenio y la reducción del Se(VI) por realizarse "en línea" ofrece ventajas tales como: evita las pérdidas del elemento por volatilidad, es más rápido, cómodo y el gasto de reactivos es mucho menor.

IV.6.- BIBLIOGRAFIA.

D'ULIVO, A.; LAMPUGNANI, L.; SFETSIOS, B.; ZAMBONI, R. Y FORTE, C.

Analyst, 119, 633 (1994).

EPA-600/4-76-049 SEPTEMBER (1976).

"Handbook for sampling and sample preservation of water and waste water".

HOLAK, W.

Anal. Chem. 41, 1712 (1969).

LONG, L.G., WINEFORDNER, J.D.

Anal. Chem. 55, 713 (1983).

LÓPEZ, M.A.; GÓMEZ, M.M.; PALACIOS, M.A.; Y CÁMARA, C.

Fresenius J.Anal. Chem., 346, 643 (1993).

LÓPEZ-GONZÁLVEZ, M.A.; GÓMEZ, M.M.; PALACIOS, M.A.; CÁMARA, C.

J. Anal. Atom. Spectrom. 9, 291 (1994).

SMIDTH, F.J., ROYER, J.L.

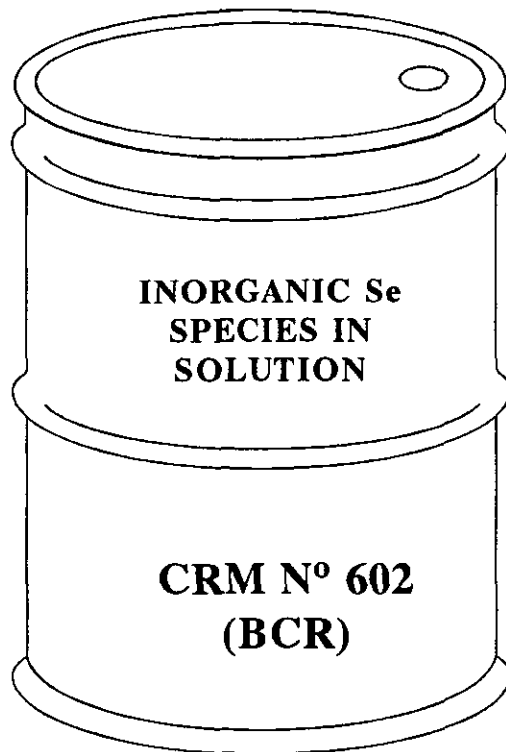
Anal. Lett. 6, 17 (1973).

VERLINDEN, M.

Fresenius Z Anal. Chem. 296, 253 (1979).

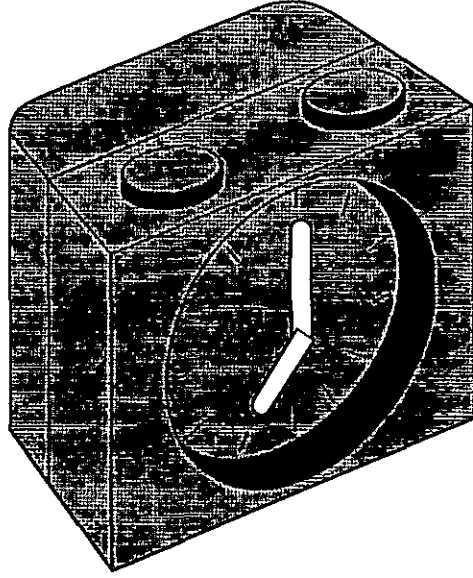
WELZ, B. Y MELCHER, M.

Analyst, 109, 569 (1984)



PARTE C

**ESTUDIO ENCAMINADO A LA
PREPARACIÓN DE UN "CRM"**



CAPÍTULO V

ESTUDIO DE ESTABILIDAD

CAPÍTULO V.- ESTABILIDAD DE ESPECIES.

- V.1.- Introducción: inestabilidad de las especies del selenio en medios acuosos.
- V.2.- Efecto de los parámetros físico-químicos en la estabilidad.
 - Influencia del pH, contenedor, temperatura y Cl^- .
 - V.2.1.-Preparación de muestras.
 - V.2.2.-Protocolo de tratamiento estadístico.
 - V.2.3.-Procedimientos operatorios y resultados obtenidos.
 - V.2.4.-Conclusiones.
- V.3.- Bibliografía.

V.1.- INTRODUCCIÓN: INESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DEL SELENIO EN MEDIOS ACUOSOS.

Como ya se ha reflejado anteriormente en esta memoria, existe una gran controversia en la bibliografía sobre la estabilidad de las especies de selenio; siendo las especies inorgánicas Se(IV) y Se(VI) las más estudiadas.

Shendrikar y col en 1975, estudiaron la estabilidad del Se(IV) en agua a $\text{pH}=7$ en vidrio y polietileno, observando pérdidas del 4% y 8% respectivamente en 15 días.

La agencia de protección del Medio ambiente de los Estados Unidos [1976], recomienda acidificar las muestras con ácido nítrico a $\text{pH}<2$, con el fin de preservar la estabilidad del Se(IV) presente en las aguas naturales.

Posteriormente Cheam y Agemian en 1980, estudiaron la estabilidad de 1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) y Se(VI) en muestras acuosas. Los resultados demostraron que en las muestras acidificadas a $\text{pH}=1.5$ con H_2SO_4 , y envasadas en polietileno y pyrex, las especies de (Se(IV) y Se(VI)) se mantuvieron estables durante 125 días. También demostraron que a pHs

Estudio de estabilidad

mayores la estabilidad de las especies es menor, siendo el pyrex el envase que ofrece mejores resultados de estabilidad.

Sin embargo, Maseè y col (1981); demostraron la estabilidad del Se(IV) a pH=8.5; ya que no observaron pérdidas de dicho analito en estas condiciones.

Schutz y Tukekian (1965) al igual que Cheam y Agemian en 1980 no observaron pérdidas de selenito y seleniato en muestras de aguas de mar. Las sales disueltas en la muestra actúan como estabilizante del Se(IV), disminuyendo su interacción con la superficie del contenedor y por tanto los procesos de adsorción, evitando así las pérdidas del analito. Sin embargo, Measures y Burton en 1980, propusieron la acidificación de las muestras de agua de mar, a pH=2 con ácido clorhídrico, para asegurar la estabilidad del Se(IV) y Se(VI) en vidrio y polietileno durante 4.5 meses.

En un estudio entre laboratorios de control de calidad se recomendó la acidificación de las muestras con 0.02% (v/v) de ácido sulfúrico, obteniéndose buenos resultados de estabilidad para concentraciones de selenio dentro del intervalo de 0 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selenio.

Robberecht y van Grieken en 1980, recomendaron el uso de altas concentraciones de ácido clorhídrico (32%) con el fin de asegurar la estabilidad del selenito y seleniato presente en aguas naturales durante varias semanas si la muestra se almacena en contenedores de polietileno.

Posteriormente, May y Kane (1984) no observaron pérdidas de Se(IV) durante 50 días de almacenaje en contenedores de polietileno y vidrio si a las muestras se les añadía 15 % (v/v) de HCl ó 5 % (v/v) de H_2SO_4 , o bien una mezcla de ambos ácidos. Estos autores también propusieron el uso de

contenedores de teflón y ácido sulfúrico con el fin de preservar la estabilidad del Se(IV) y Se(VI).

Dada la controversia existente sobre la estabilidad de las especies de Se(IV) y Se(VI), y que uno de los objetivos del trabajo es la obtención de un material de referencia acuoso que contenga las especies inorgánicas de selenio (Se(IV) y Se(VI)); es necesario realizar previamente un exhaustivo estudio sobre las condiciones físico-químicas que contribuyen a la estabilización de estas especies.

V.2.- EFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN LA ESTABILIDAD.

Los principales parámetros que pueden influir en la estabilidad a lo largo del período de almacenamiento en el que es vigente un material de referencia, son fundamentalmente los siguientes: tipo de recipiente, pH de la muestra, temperatura de almacenaje, acción de la luz y finalmente la influencia de las sales disueltas en la estabilización de los analitos.

El estudio se realizó para diferentes disoluciones conteniendo alta y baja concentración de Se(IV) y Se(VI) (10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) a pH= 6 y 2 (con ácido sulfúrico) y se almacenaron en diferentes contenedores (polietileno y teflón, que son los más usados en la bibliografía), a distintas temperaturas (-20°C , 20°C y 40°C) y en presencia de la luz y la oscuridad.

En un segundo estudio se investigó la influencia de cantidades crecientes de Cl^{-} en las condiciones óptimas deducidas del primer estudio. Así, las disoluciones se embotellaron en envases de polietileno y se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C), en la oscuridad durante un año.

V.2.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Para el primer estudio de estabilidad, se prepararon 10 litros de 8 disoluciones iniciales conteniendo 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) y Se(VI); a 2 pHs distintos (2 y 6), en ausencia y en presencia de 100 mg L^{-1} de Cl^{-} (NaCl). En la bibliografía se recomienda el uso de ácido sulfúrico y sales disueltas con el fin de garantizar la estabilidad de las especies inorgánicas de selenio (Se(IV) y Se(VI)). Posteriormente estas 8 disoluciones iniciales se distribuyeron en contenedores de polietileno ó teflón de 500 mL de capacidad, salvo aquellas disoluciones que por estar sometidas a (-20°C) y a 40°C , se conservaron en contenedores de 100 mL, el objetivo de este cambio estriba en poder emplear un contenedor para cada análisis, con el fin de mantener durante todo el tiempo las muestras a la temperatura estudiada sin cambios en la misma. La Tabla XXVI y XXVII muestran las distintas condiciones de almacenamiento de las muestras durante un año. Las muestras se analizaron por HG-AAS, después de 1 día, 1 semana, 2 semanas, 2 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses.

V.2.2.-PROTOCOLO DE TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Previamente se realizó un estudio estadístico basado en el análisis de la varianza (ANOVA); con el fin de conocer la calidad de las 8 disoluciones iniciales y si el pH, ó el Cl^{-} afectan a las concentraciones iniciales de selenito y seleniato. La Tabla XXVIII muestra el valor de F experimental para cada disolución. En todos los casos el valor de F experimental es menor que el valor teórico (3,24), demostrando que la concentración inicial de las distintas especies de selenio es independiente del pH y del Cl^{-} .

Tabla XXVI.- Disoluciones de Se(IV) y Se(VI) sometidas a distintas condiciones físico-químicas.

Se(IV) y Se(VI)	pH	Cl ⁻	Cont/Temp(°C)
10 µg L ⁻¹ de Se(IV) y 10 µg L ⁻¹ de Se(VI) 6	2 (H ₂ SO ₄)	0 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno/ -20°C
			Polietileno/ 20°C
			Polietileno/ 20°C (luz)
			Polietileno/ 40°C
			Teflón/ 20°C
	6	100 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno/ -20°C
			Polietileno/ 20°C
			Polietileno/ 20°C (luz)
			Polietileno/ 40°C
			Polietileno/ -20°C
50 µg L ⁻¹ de Se(IV) y 50 µg L ⁻¹ de Se(VI)	6	0 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno/ 20°C
			Polietileno/ 20°C (luz)
			Polietileno/ 40°C
			Teflón/ 20°C
			Polietileno/ -20°C
	6	100 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno/ 20°C
			Polietileno/ 20°C (luz)
			Polietileno/ 40°C
			Polietileno/ -20°C
			Polietileno/ 20°C

Tabla XXVII. Disoluciones de Se(IV) y Se(VI) con Cl⁻.

Se(IV) y Se(VI)	pH	Cl ⁻	Cont/Temp (20°C)
10 µg L ⁻¹ de Se(IV) y 10 µg L ⁻¹ de Se(VI) 6 50 µg L ⁻¹ de Se(IV) y 50 µg L ⁻¹ de Se(VI)	2 (HCl)	Aprox 300 mg L ⁻¹ procedente del HCl	Polietileno
	6	0 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		100 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		500 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		1000 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		2000 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		3000 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		5000 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (NaCl)	Polietileno
		19000 mg L ⁻¹ Cl ⁻ (contenido aproximado del agua de mar)	Polietileno

Tabla XXVIII Control de calidad de las 8 disoluciones iniciales mediante análisis de la varianza (ANOVA).

Especie	Concentración	pH		100 mg L ⁻¹ Cl ⁻		Fexp
Se(IV)	10 µg L ⁻¹	2	6	con	sin	1.00
Se(VI)	10 µg L ⁻¹	2	6	con	sin	1.59
Se(IV)	50 µg L ⁻¹	2	6	con	sin	2.65
Se(VI)	50 µg L ⁻¹	2	6	con	sin	1.89

La influencia de los parámetros físico-químicos se evaluó por el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en cada momento del análisis. En este tratamiento estadístico, el factor Rx y los intervalos de incertidumbre en las medidas juegan un papel fundamental para decidir la

estabilidad de las disoluciones en las diferentes condiciones de almacenamiento.

El factor Rx se calcula como el cociente entre la concentración de la disolución, preparada en las distintas condiciones mencionadas en un tiempo t y la concentración de la disolución, sometida a las mismas condiciones pero almacenada a -20°C, (se toma como referencia) al mismo tiempo t.

$$Rx = X_x / X_{(-20^\circ C)}$$

En el caso de las disoluciones almacenadas a (-20°C) ó sin disolución análoga a -20°C, Rx se calculará como el cociente entre la concentración de la especie en un tiempo dado y la concentración inicial de la misma especie.

$$Rx = X_{t=t} / X_{t=0}$$

La incertidumbre en cada punto U_x viene dado por la expresión:

$$U_x = ((C.V)^2_{.x} + (C.V)^2_{.-20^\circ C})^{1/2} Rx / 100.$$

donde C.V es el coeficiente de variación de la concentración.

La estabilidad se evalúa representando Rx frente al tiempo transcurrido de almacenamiento de las disoluciones. Se considerará que una especie es idealmente estable cuando Rx sea igual a 1; sin embargo se estimará una especie estable si su Rx se encuentra en el intervalo de $1+U_x$ y $1-U_x$.

V.2.3.-PROCEDIMIENTOS OPERATORIOS Y RESULTADOS OBTENIDOS.

En los tiempos reglamentados, se han analizado los contenidos en Se(IV) y Se(VI) de las muestras almacenadas.

Estudio de estabilidad

Para la determinación de Se(IV) y Se(total) se ha empleado la generación de hidruros-absorción atómica en continuo, después de la preredución en discontinuo del Se(VI) a Se(IV). La concentración de Se(VI) se determina por diferencia entre Se(total) y Se(IV).

Los resultados de las concentraciones de Se(IV) y Se(VI) en las muestras en diferentes condiciones de almacenamiento se recogen en las Tablas I-XXV en el Anexo y se representan en las Figuras 1-15.

Al estar la incertidumbre, U_x , afectada por el coeficiente de variación, es lógico pensar que ésta será menor en las muestras de alta concentración y en el caso del Se(VI). Su aumento para el Se(VI) se debe a que la concentración se calcula como la diferencia entre Se(total) y Se(IV); por tanto el error asociado a la medida es la suma de los errores.

Influencia del pH en la estabilidad de las especies de selenio.

Como puede observarse en la Figura 34, el Se(IV) presente en las disoluciones a pH=2 (H_2SO_4) almacenadas a temperatura ambiente, en contenedores de polietileno, es inestable a las dos concentraciones ensayadas (10 y $50 \mu g L^{-1}$); iniciándose la disminución de su concentración después de un mes de almacenamiento. Sin embargo esta disminución en la concentración del Se(IV), no significa un aumento en la concentración del Se(VI) (Figura 35); no existiendo, por tanto, interconversiones de una especie en otra. Las pérdidas de Se(IV), deben achacarse a adsorciones de dicha especie en las paredes del contenedor.

Estos resultados están en clara contradicción con los

resultados publicados en la bibliografía [EPA-600/4-76-094, 1976; Cheam y Agemian, 1980]. Sin embargo, la inestabilidad del Se(IV) a temperatura ambiente en contenedores de polietileno se repite cuando la acidificación de la muestra a pH=2 se realiza con ácido clorhídrico (proporcionando una concentración de Cl⁻ aproximada de 300 mg L⁻¹), (Figura 36), el Se(IV) presente en las muestras se pierde completamente después de un año de almacenamiento sin observarse transformaciones a Se(VI), que como anteriormente, se mantiene estable durante el año estudiado.

También a pH=6. el Se(IV) mantenido en los contenedores de polietileno es inestable como se muestra en la Figura 37, para las dos concentraciones ensayadas, sin embargo, la pérdida del elemento en la disolución es menos acusada que para el primer medio.

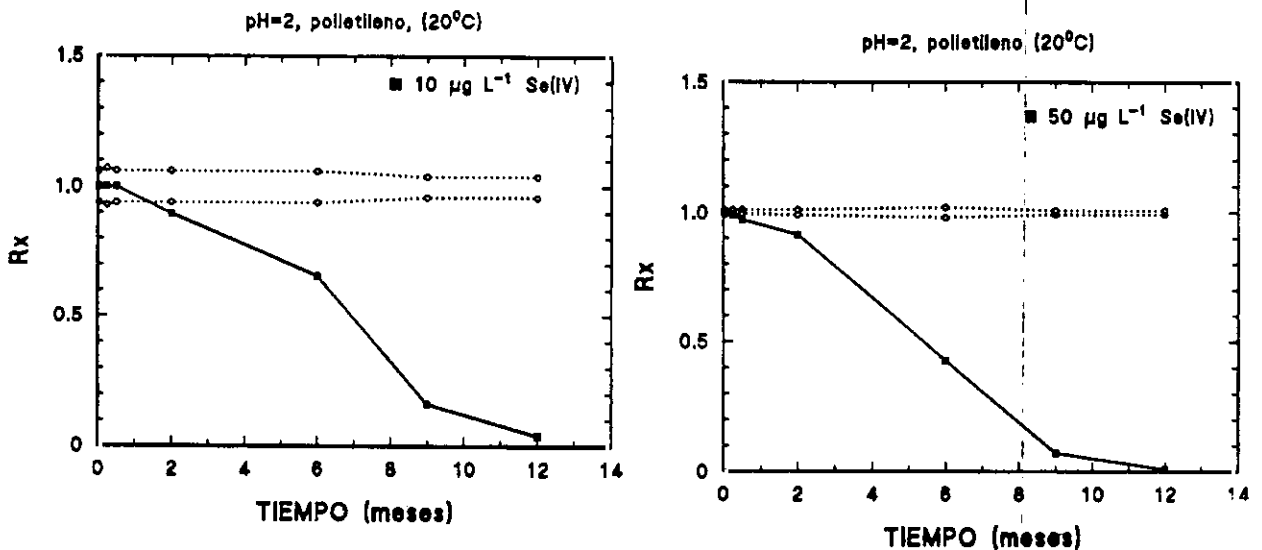


Figura 34.- Estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=2 (H₂SO₄) en contenedores de polietileno.

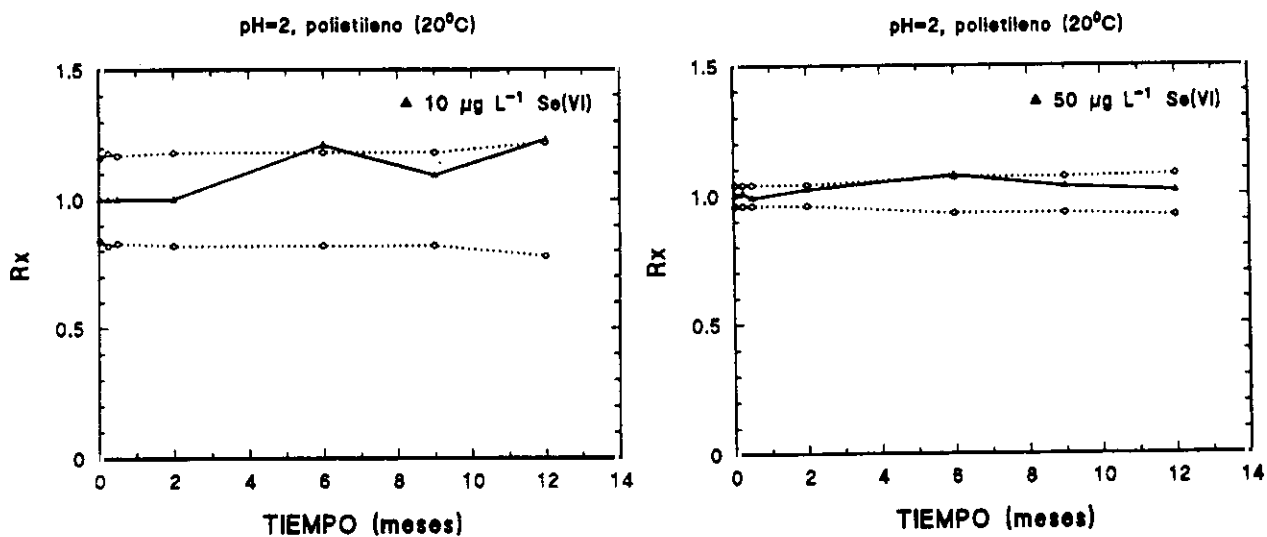


Figura 35.- Estabilidad de Se(VI) a 20°C, pH=2 (H₂SO₄) en contenedores de polietileno.

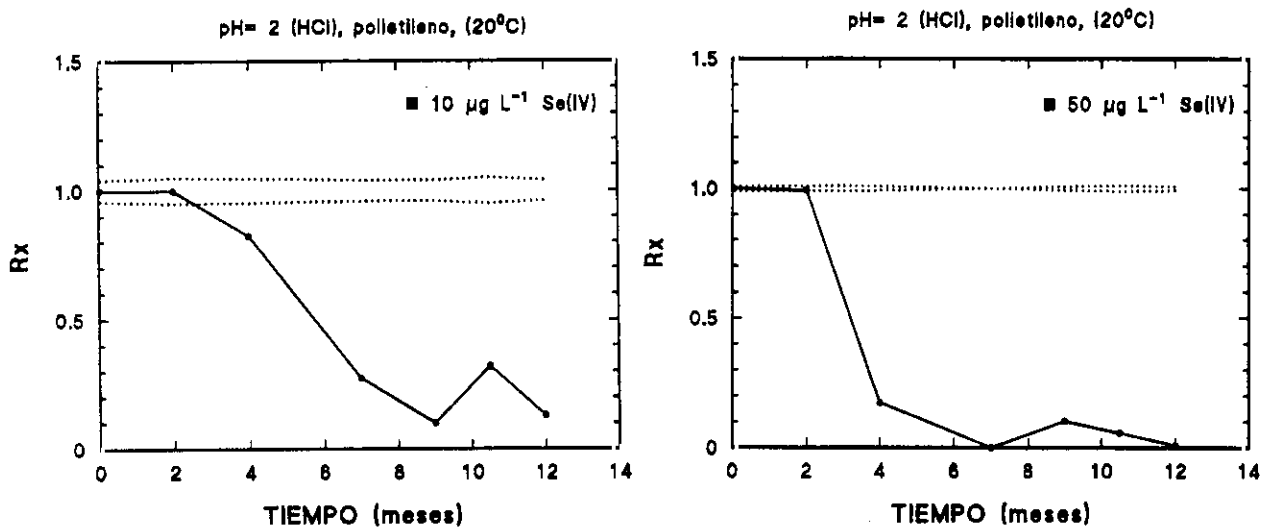


Figura 36.- Estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=2 (HCl) en contenedores de polietileno.

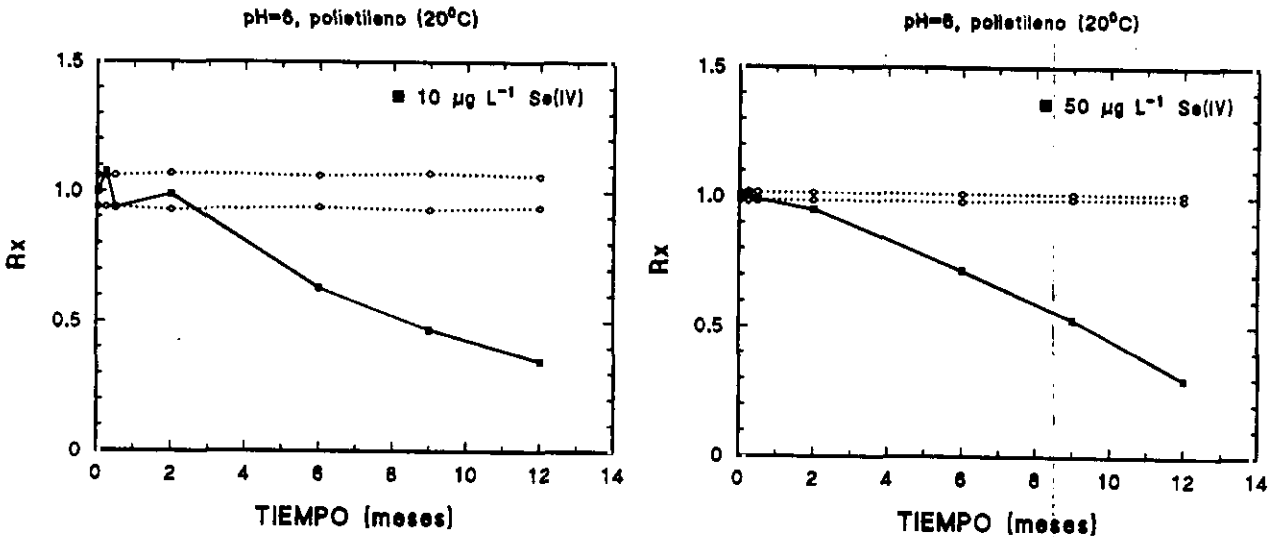


Figura 37.- Estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=6 en contenedores de polietileno.

El Se(IV) y Se(VI) en contenedores de teflón tiene un comportamiento distinto que el observado en contenedores de polietileno. Como se observa en la Figura 38, la concentración de Se(IV) en las disoluciones a pH=6 disminuye con el tiempo de almacenamiento. Esta disminución puede atribuirse a una transformación de esta especie en Se(VI), que se observa un aumento de esta especie en ambas concentraciones ensayadas, sin embargo, la transformación no es cuantitativa como puede apreciarse en la Figura 39. Por el contrario, ambas especies Se(IV) y Se(VI) se mantienen estables en contenedores de teflón a pH=2; como puede observarse en la Figura 40; el Se(IV) en la muestra de baja concentración ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) presenta un comportamiento anómalo de estabilidad, lo que también podría deberse a un error experimental no controlado. Estos resultados están en concordancia con la bibliografía [May y Kane, 1984].

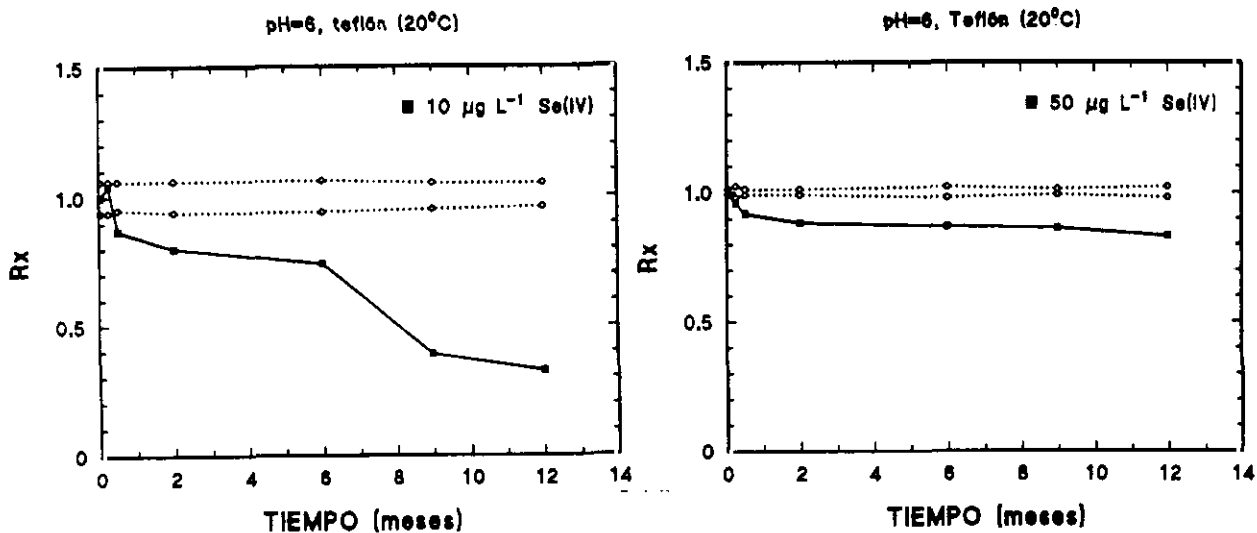


Figura 38.- Estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=6 en contenedores de teflón.

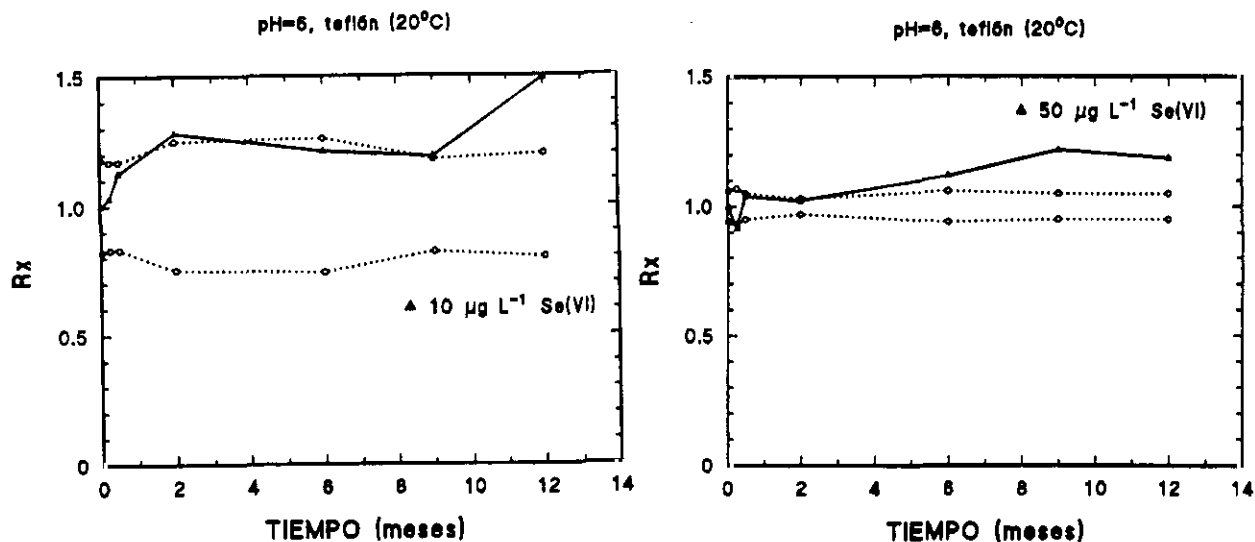


Figura 39.- Estabilidad de Se(VI) a 20°C, pH=6 en contenedores de teflón.

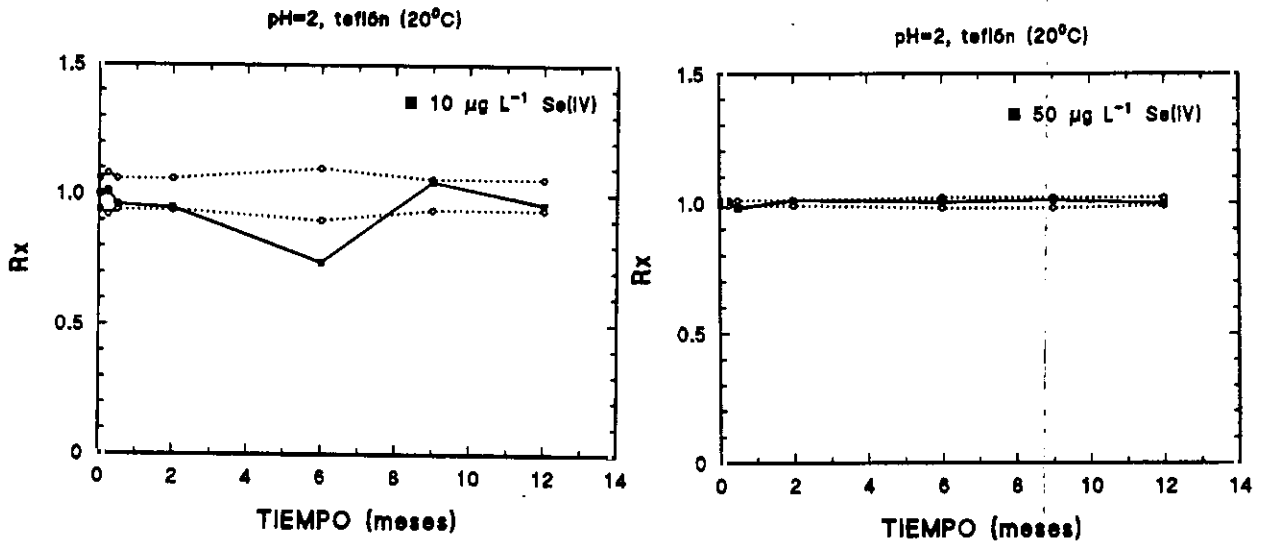


Figura 40.- Estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=2 en contenedores de teflón.

Influencia del Cl^- en la estabilidad de las especies de selenio.

En La Figuras 41 y 42 se muestra la influencia del Cl^- en la estabilidad del Se(IV) para 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ a los pHs 2 y 6 en contenedores de polietileno. Se observa que la presencia de Cl^- (100 mg L^{-1}) en las muestras acuosas de Se(IV) y Se(VI) contribuye a aumentar la estabilidad del Se(IV) a los dos pHs estudiados y a las temperaturas de 40°C y 20°C respectivamente.

En el caso del Se(VI), no se observa esta influencia debido a su comportamiento estable en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Estudio de estabilidad

Este aumento de la estabilidad por la presencia de Cl^- , ya había sido detectado anteriormente [Schutz y Tukekian, 1965; Cheam y Agemian, 1980]. Estos autores atribuyen a este analito la estabilidad del Se(IV) en muestras de agua de mar debido a que su presencia hace que la interacción del Se(IV) con la superficie del contenedor disminuya. Este hecho puede deberse a la gran facilidad que tiene el polietileno de clorarse, es decir de adsorber Cl^- incorporándolo a su estructura, disminuyendo la porosidad de la superficie del polietileno [Gómez Fatou] y haciendo más difícil la adsorción del Se(IV) a la superficie del contenedor.

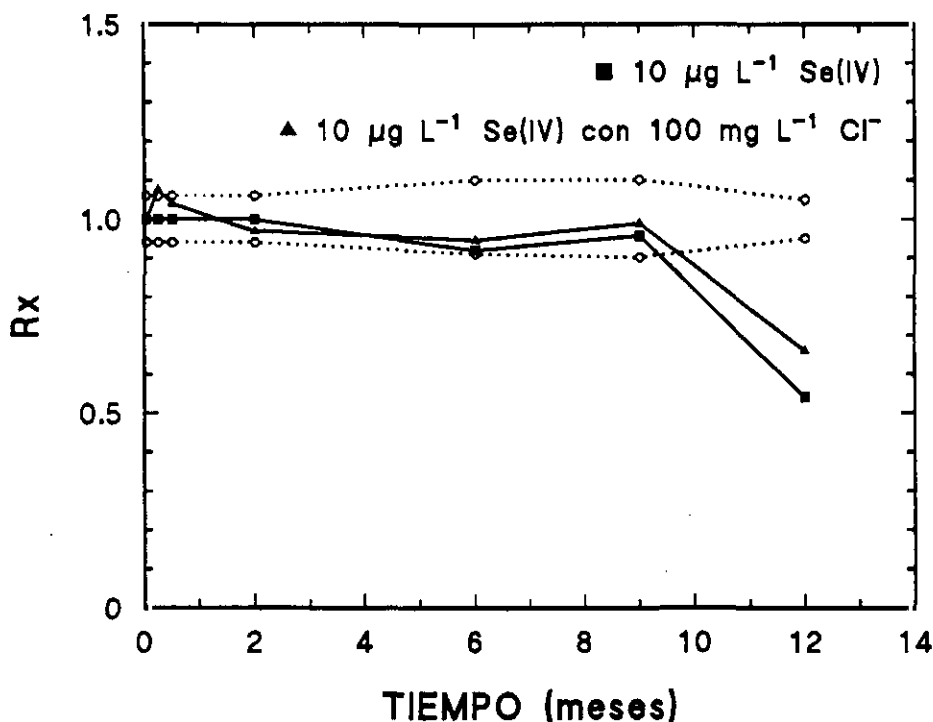


Figura 41.- Influencia del Cl^- en la estabilidad de Se(IV) a 40°C , $\text{pH}=2$ en contenedores de polietileno.

Una vez comprobado este factor de estabilidad, se realizó un estudio más exhaustivo de este efecto, con el fin de conocer la influencia de la concentración de Cl^- en la estabilidad de las distintas especies inorgánicas de selenio

en muestras acuosas a pH=6 (pH óptimo de estabilidad en polietileno), en contenedores de polietileno y almacenadas a temperatura ambiente.

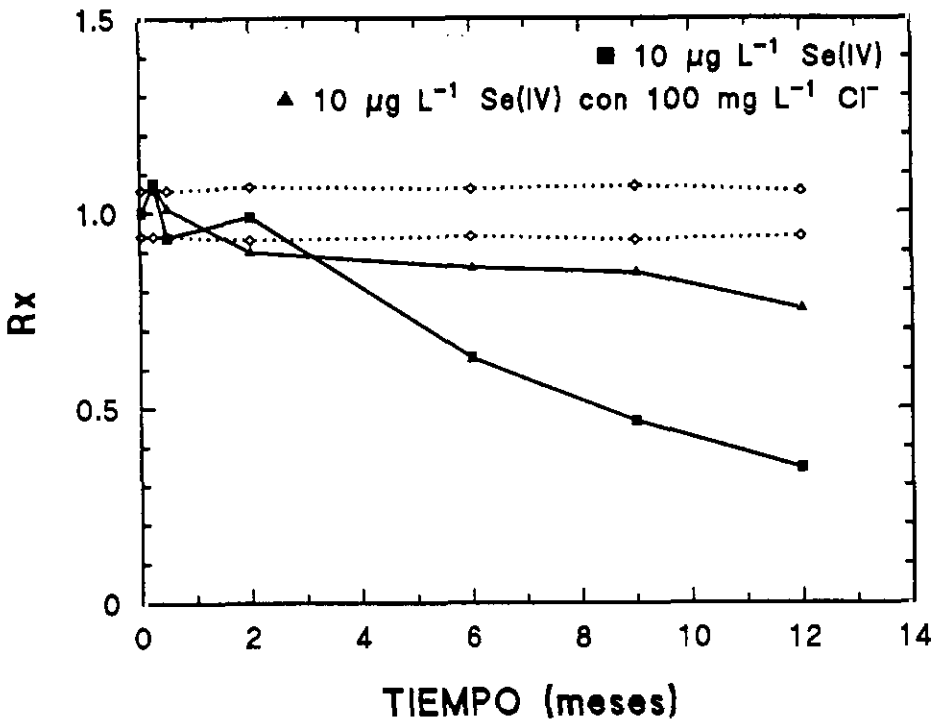


Figura 42.- Influencia del Cl⁻ en la estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=6 en contenedores de polietileno.

Los resultados obtenidos, Figura 43, fueron similares en las dos concentraciones ensayadas. Como puede observarse la estabilidad del Se(IV) aumenta a medida que aumenta la concentración en Cl⁻. Para el estudio de intercomparación y de certificación, se elige una concentración de 2000 mg L⁻¹ de Cl⁻, por ser la menor concentración de Cl⁻ que garantiza la estabilidad de estas especies al menos durante 9 meses. Concentraciones superiores de Cl⁻ aumentan la estabilidad, (muestra en agua de mar); sin embargo esta concentración de Cl⁻ tan elevada, puede interferir en el método de determinación de las distintas especies de selenio (Se(IV) y

Se(VI)).

Influencia de la temperatura en la estabilidad de las especies de selenio.

El Se(IV) y Se(VI) presente en las muestras conservadas en el congelador a (-20°C) se mantiene estable en todas las condiciones ensayadas, sin influir en su estabilidad el pH ni la presencia de Cl⁻.

La influencia de la temperatura en la estabilidad del Se(IV) se muestra en las Figuras 44 y 45 (el Se(VI) se mantiene estable a todas las temperaturas ensayadas); observándose en todas las condiciones de pH y Cl⁻ que la estabilidad del Se(IV) a 40°C es mayor que a temperatura ambiente (20°C). Este hecho puede atribuirse a dos factores: i) la temperatura aumenta la movilidad de las moléculas en la disolución disminuyendo su retención en las paredes del contenedor. ii) Las disoluciones mantenidas a 40°C se embotellaron en contenedores de 100 mL, utilizándose un envase para cada análisis en el tiempo. Este hecho hizo que la relación superficie del envase volumen a 40°C no variara a lo largo del tiempo, haciendo más difícil la adsorción del Se(IV) en la superficie del envase. Por el contrario, las muestras mantenidas a T^a ambiente fueron de 500 mL y se abrieron en los distintos tiempos en que se realizaron los análisis. En las muestras almacenadas a temperatura ambiente, la relación superficie del envase volumen de la muestra aumenta con el tiempo, aumentando la adsorción del Se(IV) en las paredes del contenedor.

Estudio de estabilidad

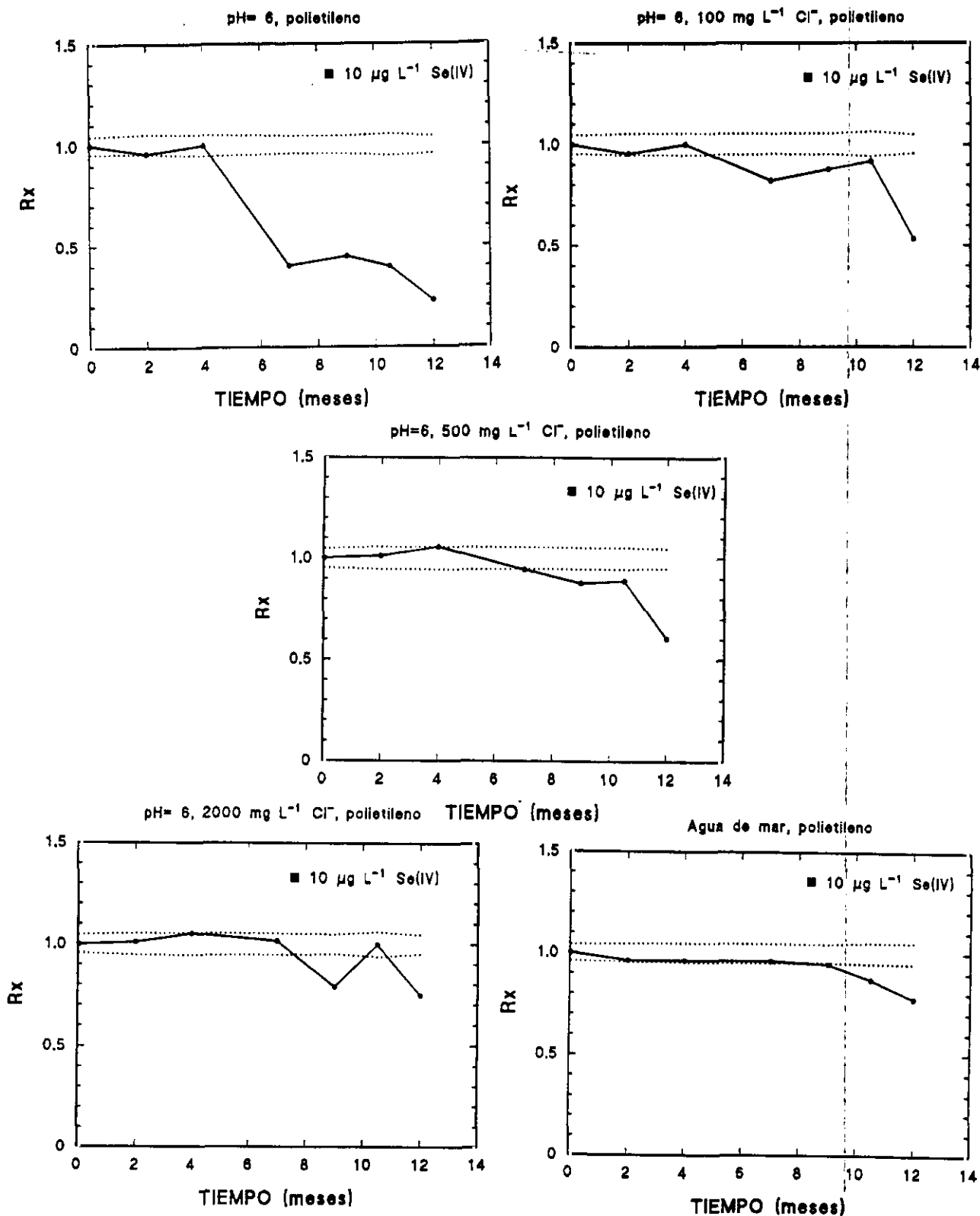


Figura 43.- Influencia del Cl⁻ en la estabilidad de Se(IV) a 20°C, pH=6 en contenedores de polietileno.

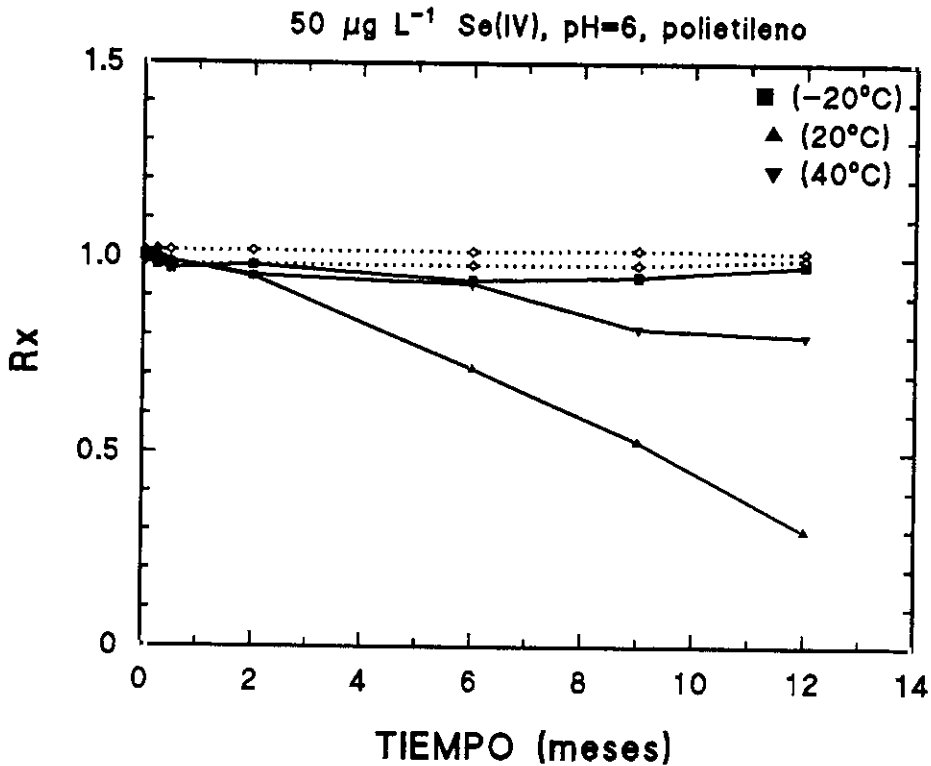


Figura 44.- Influencia de la Tª en la estabilidad de Se(IV) pH=6 en contenedores de polietileno.

La posible influencia que en la estabilidad del Se(IV) y Se(VI) tiene la relación entre la superficie del contenedor y el volumen de muestra, se comprobó almacenando una muestra conteniendo 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) y 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se(VI) y 2000 mg L^{-1} de $\text{Cl}^{-1}(\text{NaCl})$ en distintos contenedores de polietileno. Paralelamente, uno de estos contenedores se utilizó para todos los análisis (aumentando así la relación entre la superficie del recipiente y el volumen de la muestra con el tiempo). Los resultados obtenidos en ambos casos se muestran en la Figura 46, donde puede apreciarse la inestabilidad de las muestras si los contenedores se abrían (Figura 46a) y la estabilidad en caso contrario (Figura 46b).

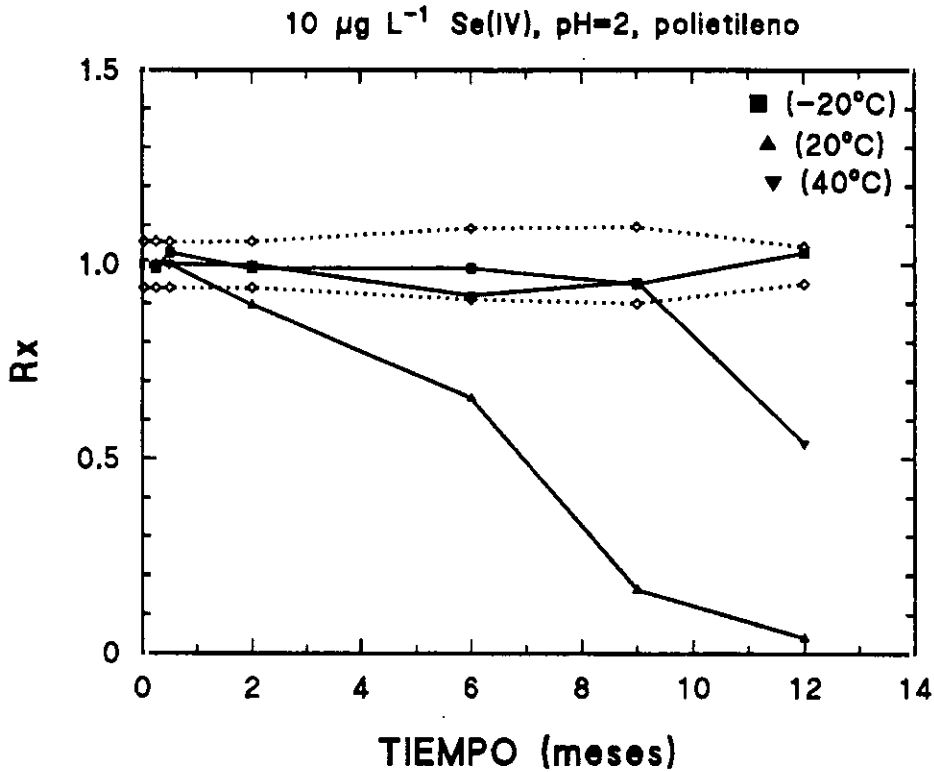


Figura 45.- Influencia de la T° en la estabilidad de Se(IV) $\text{pH}=2$ en contenedores de polietileno.

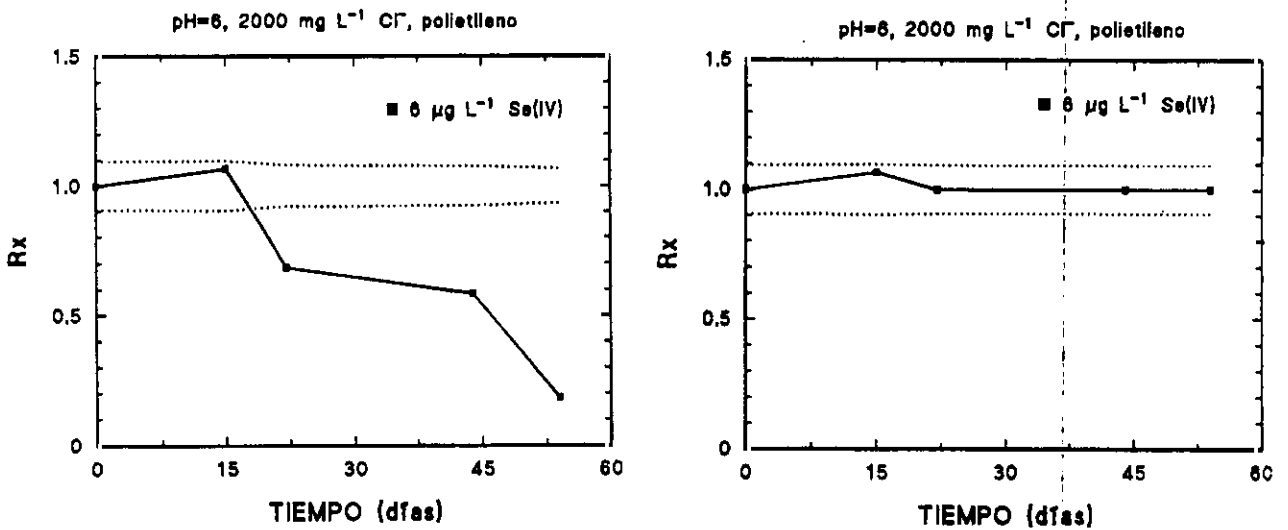


Figura 46.- Influencia de la relación superficie/volumen.
 a) análisis de la misma botella (incrementando el volumen muerto), b) análisis de una botella para cada análisis.

V.2.4.-CONCLUSIONES.

A la vista del estudio realizado, puede concluirse que:

- El Se(VI) se mantiene estable en todas las condiciones ensayadas durante un año.

- La temperatura óptima de estabilidad del Se(IV) es (-20°C).

- El Cl^- tiende a estabilizar el Se(IV) presente en la muestra; una concentración de 2000 mg L^{-1} de Cl^- , garantiza la estabilidad de 10 y $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) durante al menos 9 meses en contenedores de polietileno a temperatura ambiente (20°C). La estabilidad total del Se(IV) se alcanza en muestras de agua de mar (concentración aproximada de Cl^- de 19000 mg L^{-1}).

- En contenedores de polietileno la estabilidad de Se(IV) es menor en muestras a $\text{pH}=2$ que a $\text{pH}=6$, tanto si el $\text{pH}=2$ se consigue por adición de HCl ó H_2SO_4 .

- En contenedores de teflón la estabilidad del Se(IV) es mayor en muestras a $\text{pH}=2$ que a $\text{pH}=6$; siendo el Se(IV) estable durante un año cuando a la muestra se le añade H_2SO_4 , hasta $\text{pH}=2$.

- El hecho que las especies se muestren más estables a 40°C que a 20°C parece deberse a la relación superficie/volumen del contenedor, más que a la propia temperatura, ya que el Se(IV) se mantiene estable cuando esta relación no varía a lo largo del tiempo.

- La incidencia de la luz en las disoluciones no mostró poseer ningún efecto sobre la estabilidad de las especies durante el mes ensayado.

V.3.- BIBLIOGRAFÍA.

CHEAM, V., AGEMIAN, H.

Anal. Chim. Acta., 113, 237 (1980).

CHEAM, V., ASPILA, K.I.

Interlaboratory Quality Control Study, N° 26, Arsenic and Selenium in Water, Report N° 68, Inland Water Directorate, Water Quality Branch, Burlington, (1980).

EPA-600/4-76-049 SEPTEMBER (1976).

"Handbook for sampling and sample preservation of water and waste water".

GOMEZ FATOU, J.M.

"Polímeros de adición", Ciencia y tecnología de los materiales plásticos Vol II. (Selección de artículos publicados en "Revista de plásticos modernos". Madrid.

MASEÈ, R., MAESSEN, F.J., Y DE GOEIJ, J.M.

Anal. Chim. Acta. 127, 181 (1981).

MAY, T.W., KANE, D.A.

Anal. Chim. Acta., 161, 387 (1984).

MEASURES, C.I., BURTON, J.D.

Anal. Chim. Acta., 120, 177 (1980).

ROBBERECHT, H.J., VAN GRIEKEN, R.E.

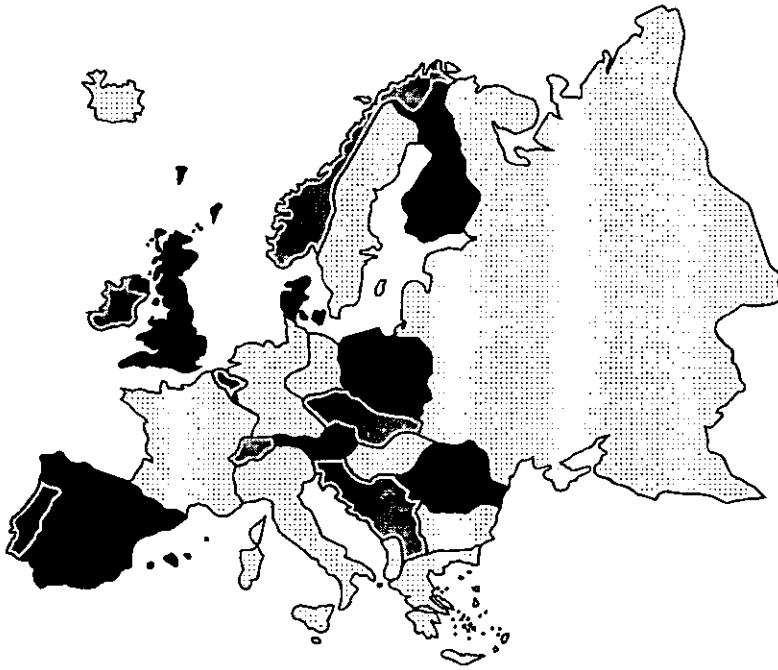
Anal. Chem. 52, 449 (1980)

SCHUTZ, D.F., TUKEKIAN, K.K.

Geochim. Cosmochim. Acta., 29, 259 (1965).

SHENDRIKAR, A.D., WEST, P.W.

Anal. Chim. Acta., 74, 189 (1975).



CAPÍTULO VI
INTERCOMPARACIÓN Y
CERTIFICACIÓN

CAPÍTULO VI - PREPARACIÓN DE UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO.

VI.1.- Ejercicio de intercomparación.

VI.1.1.- Preparación de muestras para un ejercicio de intercomparación.

VI.1.2.- Participantes y técnicas analíticas implicados.

VI.1.3.- Resultados y discusión.

VI.2.- Ejercicio de certificación.

VI.2.1.- Preparación de muestras para un estudio de certificación.

VI.2.2.- Participantes y técnicas analíticas implicados.

VI.2.3.- Resultados y discusión.

VI.3.- Conclusiones.

VI.1.- EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN.

Como ya se indicó en el objeto del trabajo uno de los principales fines de la investigación desarrollada en esta memoria es la obtención de un material de referencia certificado (CRM) acuoso de las especies inorgánicas de selenio (Se(IV) y Se(VI)). Para ello, se realizó un ejercicio de intercomparación en el que participaron 17 laboratorios de 8 países europeos; seguido de un estudio de certificación en el que participaron 19 laboratorios de 8 países europeos.

Los principales objetivos de un ejercicio de intercomparación son: i) detectar posibles fuentes de error en el método aplicado, ii) permitir a los laboratorios participantes validar los métodos analíticos utilizados en la especiación de selenio, iii) promover la colaboración científica entre los participantes en el ejercicio y iv) certificar el contenido de un material de referencia certificado (CRM).

En la determinación de Se(IV) y Se(VI) en matrices acuosas, los principales errores analíticos pueden deberse a:

Intercomparación y certificación

- a) preparación y almacenamiento inadecuada de la muestra.
- b) pretratamiento de la muestra (eficiencia inferior al 100 % en la reducción de Se(VI) a Se(IV) cuando se utiliza la técnica de generación de hidruros).
- c) método de medida (calibración).
- d) tratamiento de datos.

Todas estas posibles fuentes de error fueron consideradas y discutidas en el ejercicio de intercomparación.

VI.1.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN.

El ejercicio de intercomparación se inició con la preparación de 2 grupos de disoluciones de distinta concentración de Se(IV) y Se(VI). Una disolución de alta concentración en el orden de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(VI) (muestra A) y otra de baja concentración del orden de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada especie (muestra B). Con el fin de garantizar la estabilidad de las distintas especies en ambas disoluciones (alta y baja concentración) se adicionó Cl^- (2000 mg L^{-1}) como NaCl. Las disoluciones, a $\text{pH}=6$, se almacenaron en botellas de polietileno de 125 mL (condiciones óptimas de estabilidad a temperatura ambiente) y se enviaron a los diferentes laboratorios participantes para su análisis.

II.1.2.- PARTICIPANTES Y TÉCNICAS ANALÍTICAS IMPLICADAS.

Los laboratorios participantes utilizaron distintas metodologías y técnicas de análisis para la determinación de Se(IV) y Se(VI). La mayoría de los métodos utilizados basaron la determinación de Se(VI) en el cálculo por diferencia entre Se(total) y Se(IV). En la Tabla XXIX se reseña siempre que fue proporcionado por los laboratorios participantes, el

Intercomparación y certificación

método elegido para la determinación.

La reducción de Se(VI) a Se(IV), en todos los casos, se llevó a cabo utilizando como reductor, ácido clorhídrico en distintas concentraciones (entre 1 y 8 mol L⁻¹). El calentamiento se realizó en baño de agua, placa calefactora u horno microondas; alcanzándose temperaturas entre 60 y 100°C; el tiempo de reducción osciló entre 20 segundos (para sistemas en continuo) y 40 minutos.

La determinación independiente de Se(IV) y Se(VI), sólo fue realizada por 5 laboratorios utilizando en todos los casos la cromatografía líquida de alta eficacia con columnas de intercambio aniónico acoplada a diferentes detectores de alta sensibilidad como (ICP-MS ó HG-AAS).

Tabla XXIX Métodos analíticos utilizados en el ejercicio de intercomparación.

Lab N°	Universidad de Amberes (Wilrijk, Bélgica)	
1	Se(IV)	Se(VI)
<p>A</p> <p>Técnica: CGC-MIP-ABS. Método:</p> <p>a) Derivatización a Et₂Se con NaBEt₄ b) Atrapamiento criogénico (-150°C) en una columna de sílice. c) Inyección en línea de la especie derivatizada.</p> <p>B</p> <p>Técnica: FI-HG-AAS</p>	<p>A</p> <p>Técnica: CGC-MIP-ABS. Método:</p> <p>a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 100°C durante 40 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p> <p>B</p> <p>Técnica: FI-HG-AAS. Método:</p> <p>a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 100°C durante 40 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>	

Intercomparación y certificación

Lab N°	Universidad Técnica de Viena (Viena, Austria)	
5	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AAS	<p>A</p> <p>Técnica: GF-AAS. Método: a) Inyección de la muestra en el horno de grafito. b) Determinación de Se(total) c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p> <p>B</p> <p>Técnica HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 90°C durante 20 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>
Lab N°	Dpto Q. Analítica. UCM (Madrid, España)	
6	Se(IV)	Se(VI)
	<p>Técnica: HPLC-HG-AAS.</p> <p>Método:</p> <p>a) Preconcentración en microcolumnas de alúmina (las muestras de baja concentración). b) Elución en NH₃ 2 mol L⁻¹. c) Inyección del eluido en el cromatógrafo. HPLC-HG-AAS.</p>	<p>Técnica: HPLC-HG-AAS.</p> <p>Método:</p> <p>a) Preconcentración en microcolumnas de alúmina (las muestras de baja concentración). b) Elución en NH₃ 2 mol L⁻¹. c) Inyección en el cromatógrafo. d) Reducción "en línea" de Se(VI) a Se(IV).</p>
Lab N°	CISE (Milan, Italia)	
7	Se(IV)	Se(VI)
	<p>Técnica: HG-GF-AAS.</p> <p>Método:</p> <p>a) Formación del H₂Se por reacción con NaBH₄ en medio ácido. b) Atrapamiento del H₂Se e inyección en el horno de grafito. c) Determinación de Se(IV).</p>	<p>Técnica: GF-AAS.</p> <p>Método:</p> <p>a) Inyección de la muestra en el horno de grafito. b) Determinación de Se(total). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>

Intercomparación y certificación

Lab N°	Escuela de Ciencias Aplicadas; Universidad Montfort (Leicester, Gran Bretaña)	
8	Se(IV)	Se(VI)
	<p><u>A</u> Técnica: HG-ICP-MS.</p> <p><u>B</u> Técnica: HG-AAS.</p> <p><u>C</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.</p>	<p><u>C</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.</p>
Lab N°	Lab. Fotofísica; Universidad de Burdeos (Francia)	
9	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-HG-ICP-MS	<p>Técnica: FI-HG-ICP-MS.</p> <p>Método:</p> <p>a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ durante 2 minutos en un horno microondas al 70% de potencia.</p> <p>b) Determinación de Se(total) como Se(IV).</p> <p>c) Se(VI) = Se (total) - Se (IV).</p>
Lab N°	Universidad de Plymouth (Gran Bretaña)	
10	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AFS	<p>Técnica: HG-AFS.</p> <p>Método:</p> <p>a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 70°C durante 30 minutos.</p> <p>b) Determinación de Se(total) como Se(IV).</p> <p>c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>
Lab N°	Dpto de Química; Universidad de Roma (Italia)	
11	Se(IV)	Se(VI)
	<p>Técnica: DPP (alta concentración).</p> <p>Técnica: DPCSV (baja concentración).</p>	<p>Técnica: DPP ó DPCSV.</p> <p>Método:</p> <p>a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 4 mol L⁻¹ en un horno microondas.</p> <p>b) Determinación de Se(total) como Se(IV).</p> <p>c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>

Intercomparación y certificación

Lab N°	Universidad de Southampton (U.K)	
12	Se(IV)	Se(VI)
12	Técnica: HG-AAS	Técnica: HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ a 80°C durante 15 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI)= Se(total)-Se(IV).
Lab N°	Servicio Central de Análisis (Vernaison, Francia)	
13	Se(IV)	Se(VI)
	<u>A</u> Técnica: FI-HG-AAS.	<u>A</u> Técnica: FI-HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ a 60°C durante 5 minutos en un horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI)= Se(total)- Se(IV).
	<u>B</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.	<u>B</u> HPLC-ICP-MS.
Lab N°	Ministerio de Salud (Soborg, Dinamarca)	
14	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HPLC-ICP-MS.	Técnica: HPLC-ICP-MS.
Lab N°	Laboratorio de Química Mineral (Estrasburgo, Francia)	
15	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AAS	
Lab N°	Dpto. Q. Analítica; Universidad de Córdoba (España).	
16	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-CSV	Técnica: FI-CSV Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 1 mol L ⁻¹ durante 30 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI)= Se(total)-Se(IV).

Intercomparación y certificación

Lab N°	Centro de Análisis Químico; Universidad de Sheffield. (Gran Bretaña).	
17	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-ICP-MS. Método: a) Determinación directa de Se(total) b) $Se(IV) = Se(total) - Se(VI)$	Técnica: FI-ICP-MS. Método: a) Retención de Se(VI) en microcolumnas de alúmina. b) elución con amoníaco c) Inyección "en línea" FI-ICP-MS.
Lab N°	Escuela de Ciencias Analíticas (Dublin, Irlanda)	
18	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AAS	Técnica: HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 4 mol L ⁻¹ a 100°C durante 10 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) $Se(VI) = Se(total) - Se(IV)$.
Lab N°	ENBA. Dpto. de Protección Ambiental (Roma, Italia)	
19	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AAS	Técnica: HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 4 mol L ⁻¹ en un horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) $Se(VI) = Se(total) - Se(IV)$

VI.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cada laboratorio presentó 5 resultados individuales para cada especie de selenio y para cada una de las muestras de alta y baja concentración. Los resultados, recogidos en la Tabla XXX (a-d), se representaron en diagramas de barras en las que se indica: la técnica utilizada, la media y la desviación típica del resultado (Figuras 47-50). Aplicando criterios estadísticos se rechazaron algunos resultados por estar fuera del intervalo de confianza ("outliers"), ó por presentar desviaciones típicas muy elevadas (superiores al 10%) ó por no estar avalados por la persona responsable en la

discusión de los mismos.

En la discusión de resultados se puso de manifiesto la dificultad de algunos laboratorios en la reducción cuantitativa de Se(VI) a Se(IV); generalmente debido al empleo de temperaturas y del reductor no suficientemente elevadas. Los laboratorios que utilizaron como sistema detector el ICP-MS (sin previa derivatización por formación del hidruro de selenio) observaron interferencias del Cl⁻ por formación en el plasma de la molécula ArCl (m/z=77). Una forma de eliminar esta interferencia es el uso de N₂ como gas auxiliar en el ICP-MS. Otras posibilidades son la dilución de la muestra y por tanto una disminución de la concentración del interferente ó la separación entre éste y el analito mediante el uso de una columna cromatográfica apropiada.

El único laboratorio que calculó la concentración de Se(IV) por diferencia entre Se(total) y Se(VI) (siendo esta última la especie detectada), obtuvo en todos los casos resultados inferiores a los de la media (y al valor real). La causa de error se atribuye a la falta de cuantitatividad en la retención de las especies de selenio debido a la presencia de elevadas concentraciones de Cl⁻ en la muestra y a la separación no cuantitativa de las especies de selenio (Se(IV) y Se(VI)).

Las Tablas XXX a-d muestran los resultados obtenidos por los participantes en los 5 botes analizados así como la media de los valores obtenidos con su desviación standard. Las Figuras 48-51 muestran los resultados de las concentraciones y desviaciones dadas por los laboratorios y la media y desviación standard de los mismos.

Las Figuras 51-54 muestran los resultados seleccionados de las concentraciones y desviaciones típicas proporcionadas

Intercomparación y certificación

por dichos laboratorios.

Tabla XXX.a. Resultados de Se(IV) en la muestra A ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1°	2°	3°	4°	5°	Media \pm SD
1(a)	51.70 \pm 2.04	50.85 \pm 2.40	49.80 \pm 1.20	50.13 \pm 3.84	50.70 \pm 1.19	50.64 \pm 2.35
1(b)	52.00	51.00	50.30	52.50	52.30	51.62 \pm 0.89
2(a)		42.90	49.40			46.60 \pm 4.90
2(b)	47.10	44.70		46.30	46.40	46.20 \pm 2.70
3	36.60	35.90	42.00	41.50	45.40	40.30 \pm 3.60
5	53.50	55.00	50.00	50.00	51.00	51.90 \pm 2.20
6	51.57 \pm 1.00	50.39 \pm 1.60	49.32 \pm 1.67	47.88 \pm 2.15	48.03 \pm 2.35	49.43 \pm 2.30
7	53.76 \pm 9.71	53.08 \pm 3.74	43.46 \pm 4.10	49.34 \pm 3.78	27.62 \pm 1.90	45.45 \pm 9.64
8(a)						44.30 \pm 5.80
8(b)						53.50 \pm 2.10
8(c)						47.50 \pm 3.20
9	49.56 \pm 0.01	52.08 \pm 0.06	51.97 \pm 0.11	52.11 \pm 0.06	53.07 \pm 0.06	51.78 \pm 1.31
10	52.70	53.74	53.51	52.32	52.59	52.97 \pm 0.55
11	53.00	57.90	56.40	59.30	53.80	56.10 \pm 2.70
12	59.33 \pm 2.00	56.01 \pm 1.03	57.89 \pm 1.23	54.62 \pm 0.50	56.00 \pm 0.61	56.70 \pm 1.84
13(a)	51.20 \pm 2.00	51.00 \pm 1.50	51.70 \pm 1.40	50.80 \pm 1.10	49.30 \pm 1.50	50.80 \pm 0.80
13(b)	49.30 \pm 1.99	45.90 \pm 1.24	52.30 \pm 0.47	49.90 \pm 1.00	46.80 \pm 0.33	48.80 \pm 2.29
14	68.42 \pm 1.70	103.00 \pm 1.00	65.24 \pm 2.65	66.3 \pm 3.76	57.84 \pm 1.71	71.15 \pm 15.50
15	28.40	28.40	27.60	27.90	28.10	28.00 \pm 0.40
16	37.90 \pm 2.10	39.10 \pm 2.00				38.50 \pm 2.00
17	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
18	38.00	34.00	39.00	39.00	38.00	37.60 \pm 1.85
19	52.00	56.00	54.00	53.00	51.00	53.20 \pm 1.92

Intercomparación y certificación

Tabla XXX.b. Resultados de Se(VI) en la muestra A ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1(a)	48.97 \pm 3.35	50.65 \pm 4.66	50.90 \pm 4.18	51.12 \pm 6.16	49.9 \pm 4.66	50.31 \pm 4.69
1(b)	48.70	50.60	52.60	52.90	52.00	51.36 \pm 1.55
2(a)		57.70 \pm 9.90	51.20 \pm 3.40			53.20 \pm 9.00
2(b)	47.70 \pm 5.40	51.02 \pm 5.70		54.30 \pm 6.40	55.00 \pm 5.00	51.90 \pm 7.00
3	40.80	42.40	57.60	50.40	45.00	47.20 \pm 6.10
5						57.70 \pm 6.60
6	52.56 \pm 1.70	54.18 \pm 3.50	49.69 \pm 4.06	47.67 \pm 1.50		50.97 \pm 3.70
7	50.70 \pm 8.39	48.44 \pm 5.53	57.18 \pm 11.00	64.08 \pm 6.27	85.32 \pm 2.74	63.14 \pm 13.3
8(c)						41.40 \pm 3.70
9	45.26 \pm 0.182	43.68 \pm 0.12	47.64 \pm 0.12	45.69 \pm 0.14	43.79 \pm 0.07	45.21 \pm 1.62
10	52.79	52.95	51.47	51.90	52.06	52.23 \pm 0.56
11	43.30	42.30	44.10	44.20	46.70	44.10 \pm 3.60
12	62.90	62.70	61.40	63.40	61.10	62.30 \pm 2.10
13(a)	49.20 \pm 4.30	52.30 \pm 4.80	52.80 \pm 5.20	53.40 \pm 4.90	55.20 \pm 4.70	52.60 \pm 2.18
13(b)	56.2 \pm 2.54	54.4 \pm 1.79	59.0 \pm 0.12	57.2 \pm 1.03	55.2 \pm 0.39	56.40 \pm 1.79
14	80.04 \pm 1.25	73.74 \pm 1.54	83.80 \pm 0.10	73.80 \pm 2.89	80.60 \pm 2.96	78.17 \pm 4.40
15						51.00 \pm 4.00
16	12.50 \pm 1.90	10.50 \pm 1.70				11.50 \pm 3.10
17	53.50	52.00	49.80	50.70	48.80	51.00 \pm 1.70
18	16.00	16.00	16.00	18.00	19.00	17.00 \pm 1.26
19	50.00	41.50	42.00	49.00	46.50	45.80 \pm 3.40

Intercomparación y certificación

Tabla XXX.c. Resultados de Se(IV) en la muestra B ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1(a)	5.23 \pm 0.32	5.06 \pm 0.24	5.10 \pm 0.32	5.22 \pm 0.18	5.24 \pm 0.30	5.17 \pm 0.28
1(b)	5.98	5.96	5.68	6.00	5.98	5.92 \pm 0.12
2(a)	5.57	5.65	5.94	5.89	5.95	5.71 \pm 0.36
2(b)	5.23 \pm 0.34	5.04	5.25 \pm 0.15		5.14 \pm 0.22	5.18 \pm 0.26
3	11.18	7.45	8.76	8.20		8.90 \pm 1.40
5	5.96	6.07	5.59	5.42	5.60	5.65 \pm 0.31
6	5.65 \pm 0.14	5.93 \pm 0.42	5.74 \pm 0.18	7.14 \pm 0.06	6.31 \pm 0.15	6.15 \pm 0.59
7	5.86 \pm 0.24	5.76 \pm 0.40	5.50 \pm 0.38	5.98 \pm 0.55	5.92 \pm 0.58	5.80 \pm 0.17
8(a)						5.30 \pm 0.30
8(b)						6.00 \pm 0.40
8(c)						4.60 \pm 0.40
9	5.17 \pm 0.06	5.20 \pm 0.12	5.23 \pm 0.07	5.24 \pm 0.10	5.17 \pm 0.15	5.20 \pm 0.03
10	5.74	5.74	5.74	5.69	5.73	5.73 \pm 0.10
11	5.40	5.10	5.30	5.70	5.30	5.40 \pm 0.20
12	5.50	6.00	5.90	5.80	5.95	5.94 \pm 0.34
13(a)	5.75 \pm 0.15	6.00 \pm 0.14	5.94 \pm 0.18	6.02 \pm 0.13	5.70 \pm 0.18	5.88 \pm 0.15
13(b)	4.32 \pm 0.33	5.13 \pm 0.08	5.73 \pm 0.70	5.31 \pm 0.35	5.51 \pm 0.21	5.20 \pm 0.54
14	7.30 \pm 0.67	6.85 \pm 1.13	9.27 \pm 0.33	7.73 \pm 0.54	8.50 \pm 0.37	7.89 \pm 1.09
15	3.10	3.10	3.60	3.60	3.00	3.30 \pm 0.30
16	3.90 \pm 0.40	3.20 \pm 0.20	3.40 \pm 0.20	3.20 \pm 0.10	3.00 \pm 0.10	3.30 \pm 0.40
17	4.37	3.88	3.88	4.04	3.81	4.00 \pm 0.20
18	3.40	3.14	3.51	3.04	3.70	3.35 \pm 0.23
19	6.30	6.30	5.70	5.90	5.90	6.00 \pm 0.24

Intercomparación y certificación

Tabla XXX.d. Resultados de Se(VI) en la muestra B ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1(a)	4.67 \pm 0.46	4.95 \pm 0.66	4.98 \pm 0.53	5.34 \pm 0.61	4.68 \pm 0.52	4.92 \pm 0.56
1(b)	6.54	6.28	6.40	6.58	6.32	6.42 \pm 0.12
2(a)	4.01	4.49	5.14	3.19	3.97	4.05 \pm 0.57
2(b)	5.31	5.47 \pm 0.07	5.03 \pm 0.20		6.12 \pm 0.53	5.43 \pm 0.51
3	6.58	5.11	6.03	5.59		5.82 \pm 0.50
5						7.7
6	6.18 \pm 0.01	6.23 \pm 0.05	6.27 \pm 0.01	6.27 \pm 0.01	6.29 \pm 0.07	6.25 \pm 0.05
7	3.98 \pm 0.32	3.96 \pm 0.45	4.14 \pm 0.45	3.66 \pm 0.64	3.54 \pm 0.52	3.86 \pm 0.22
8(c)						7.30 \pm 0.40
9	6.71 \pm 0.023	6.15 \pm 0.02	6.43 \pm 0.01	6.87 \pm 0.02	6.71 \pm 0.01	6.57 \pm 0.29
10	6.58	6.58	6.46	6.66	6.58	6.57 \pm 0.10
11	5.70	7.40	6.70	5.30	6.60	6.40 \pm 0.90
12	8.30	7.50	6.60	7.90	7.20	7.50 \pm 0.44
13(a)	6.40 \pm 0.51	6.00 \pm 0.54	6.36 \pm 0.38	6.18 \pm 0.53	6.45 \pm 0.43	6.28 \pm 0.19
13(b)	6.22 \pm 0.51	6.25 \pm 0.74	6.22 \pm 0.40	5.79 \pm 0.29	5.06 \pm 0.57	5.91 \pm 0.51
14	10.32 \pm 0.41	9.76 \pm 0.48	12.27 \pm 0.25	11.0 \pm 0.10	10.06 \pm 0.28	10.68 \pm 0.90
15	---	---	---	---	---	---
16			0.9 \pm 0.10	1.0 \pm 0.10	1.1 \pm 0.20	1.0 \pm 0.10
17	4.90	4.15	4.17	4.29	4.22	4.18 \pm 0.07
18	---	---	---	---	---	---
19						6.2 \pm 0.54

Figura 47.- Concentraciones de Se(IV) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra A.

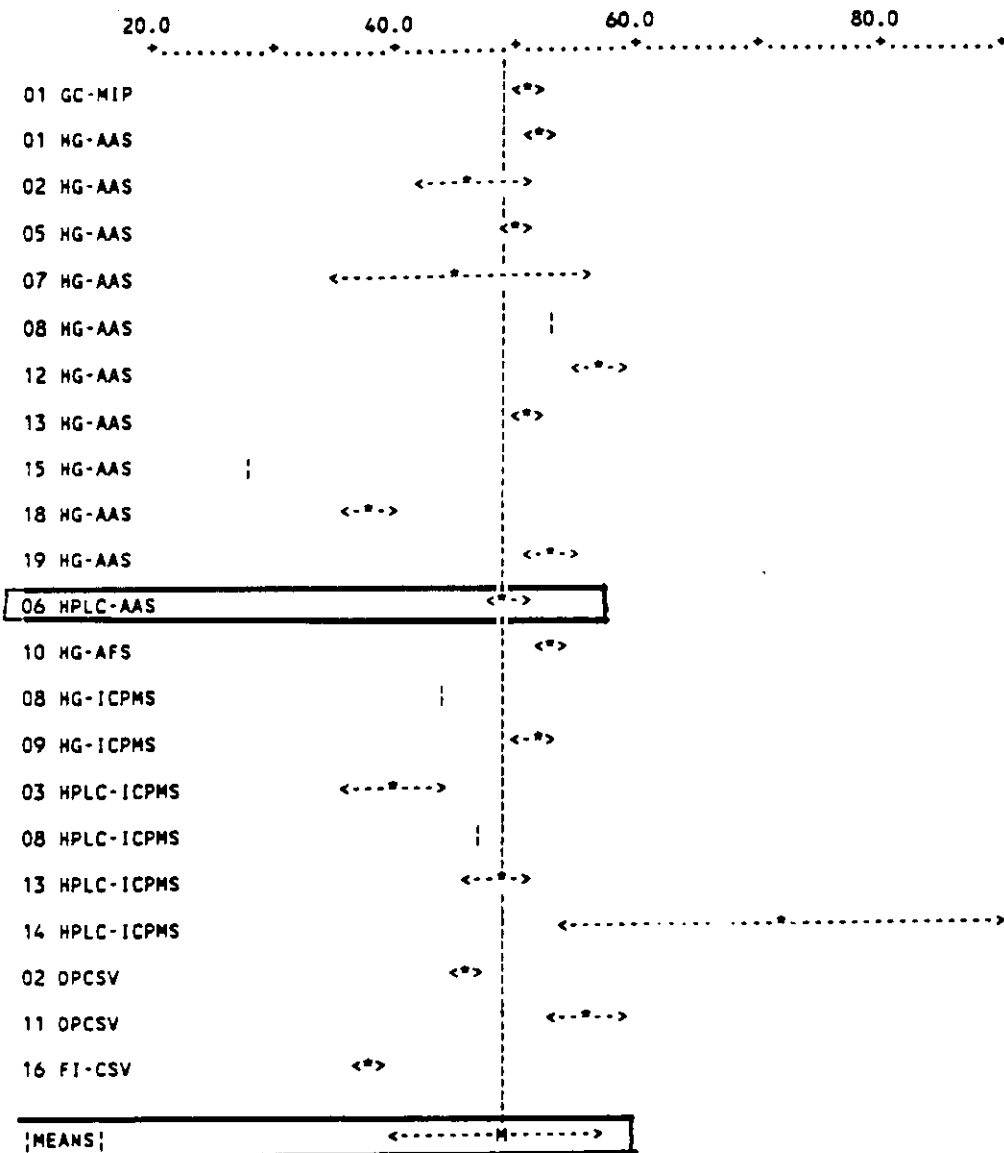


Figura 48.- Concentraciones de Se(VI) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra A.

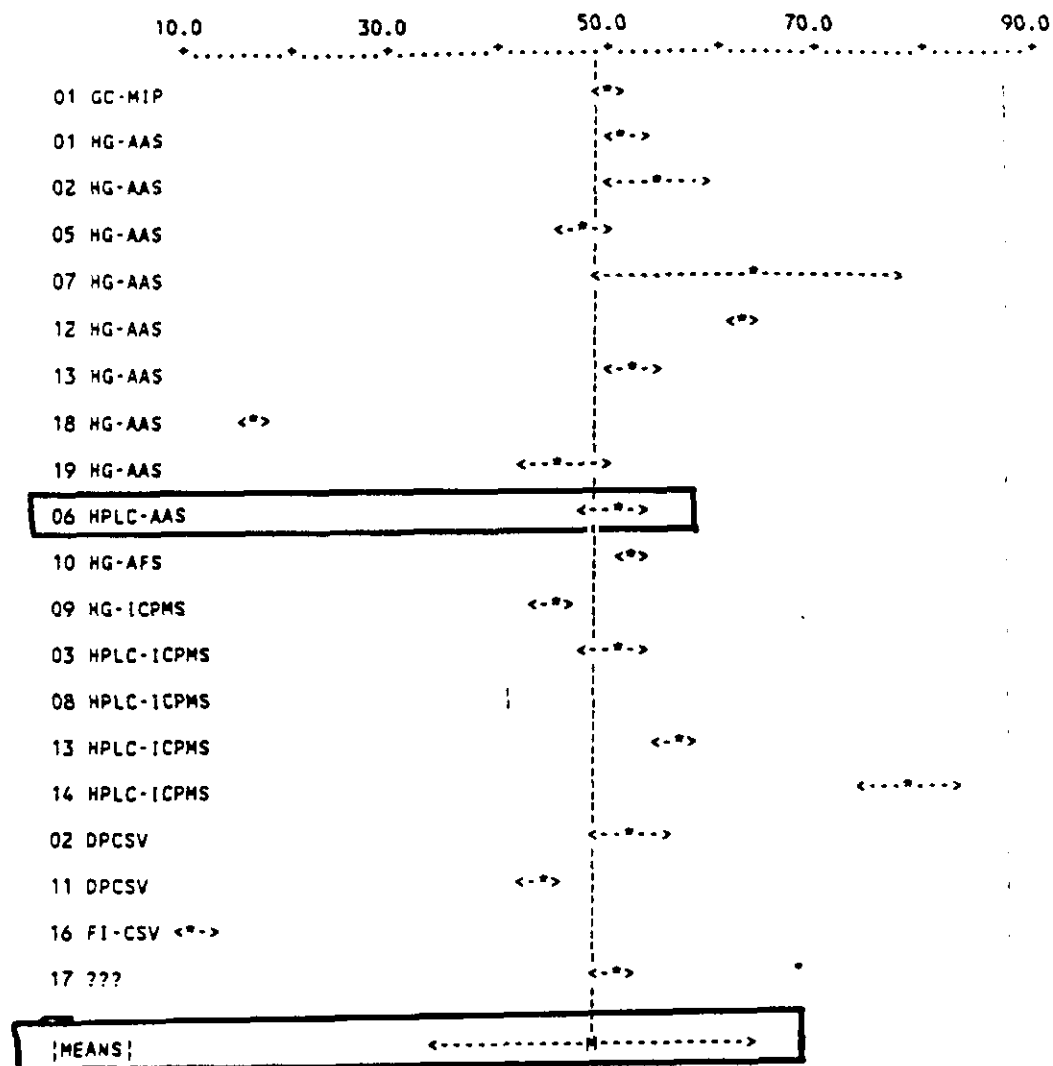


Figura 49.- Concentraciones de Se(IV) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra B.

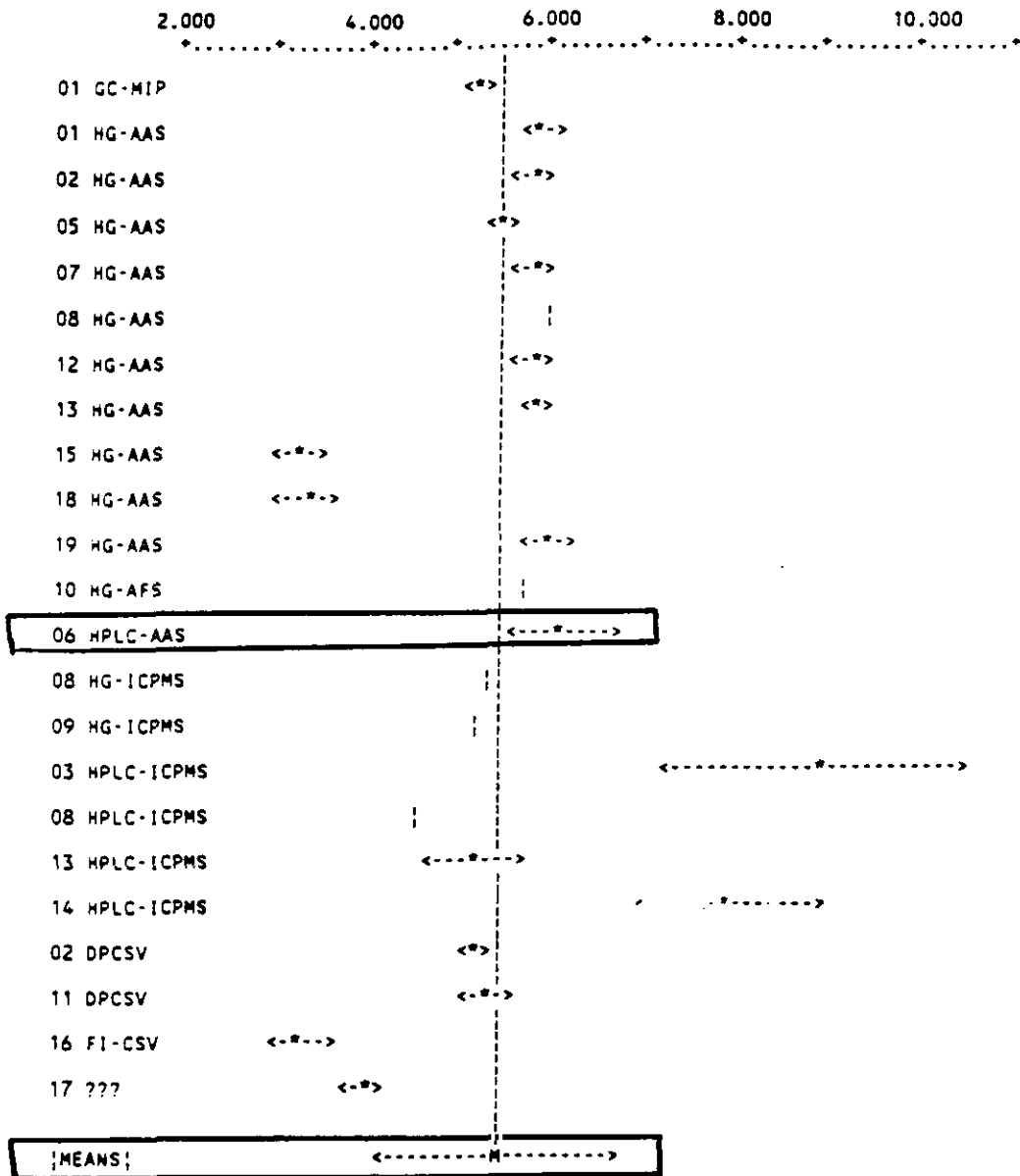


Figura 50.- Concentraciones de Se(VI) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra B.

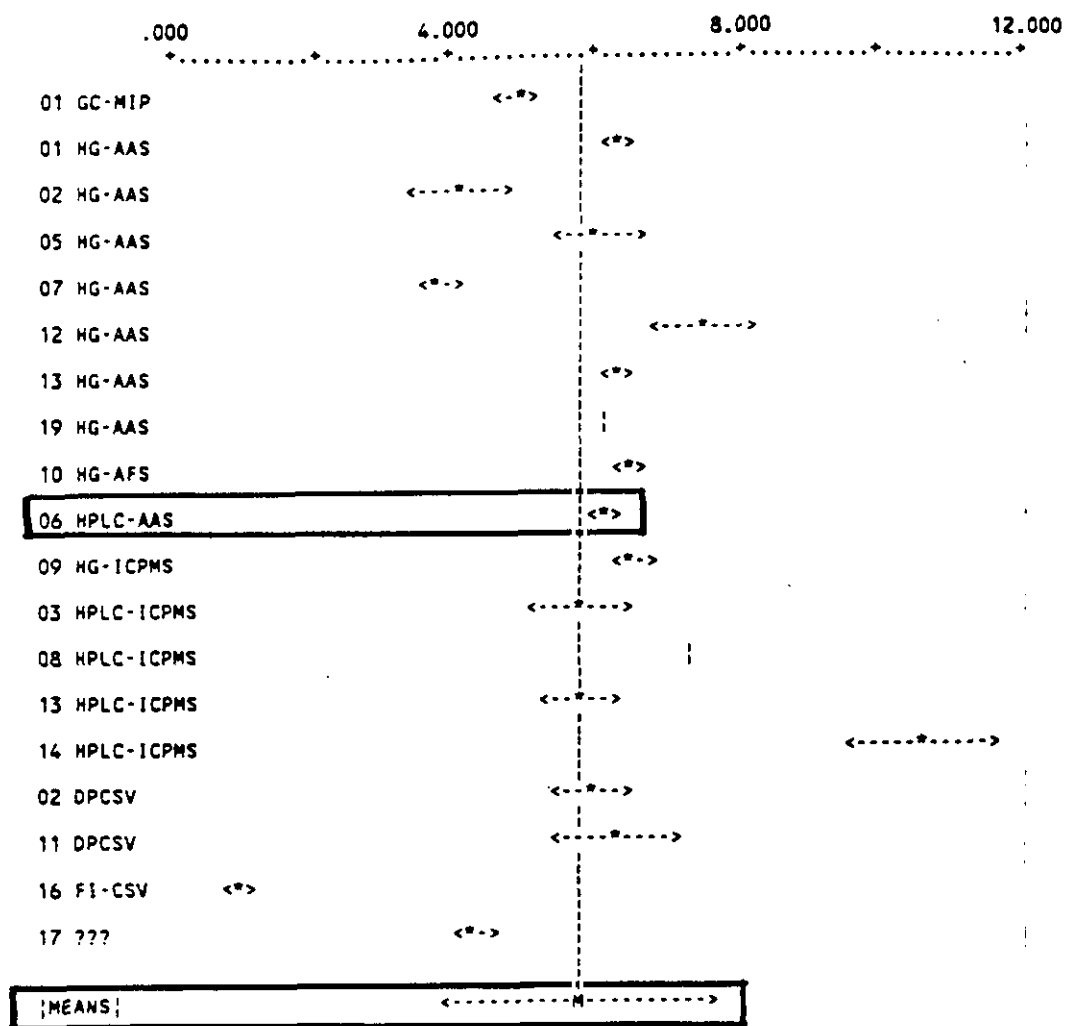


Figura 51- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(IV) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra A.

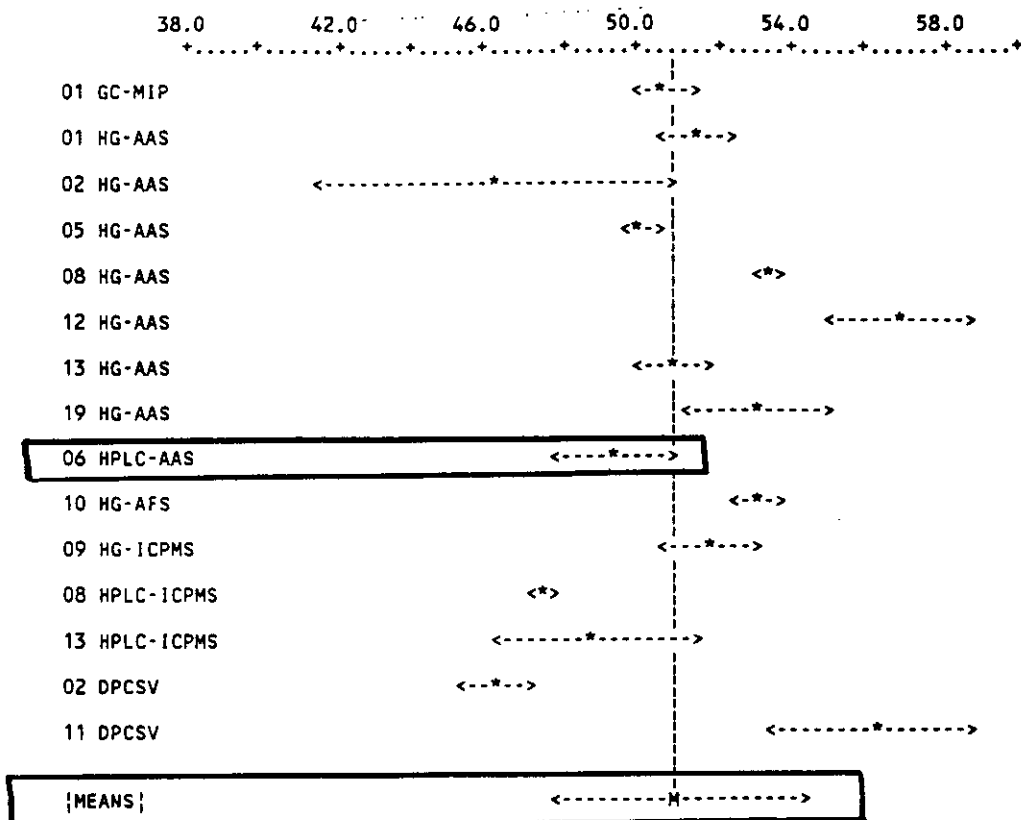


Figura 52.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(VI) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra A.

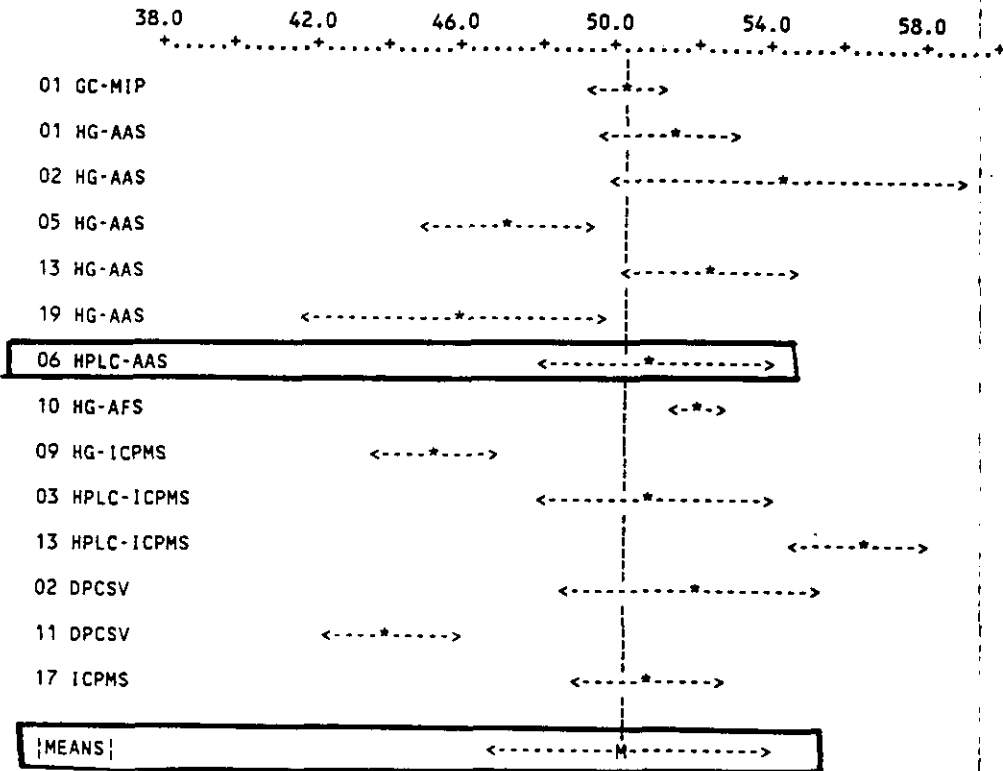


Figura 53.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(IV) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra B.

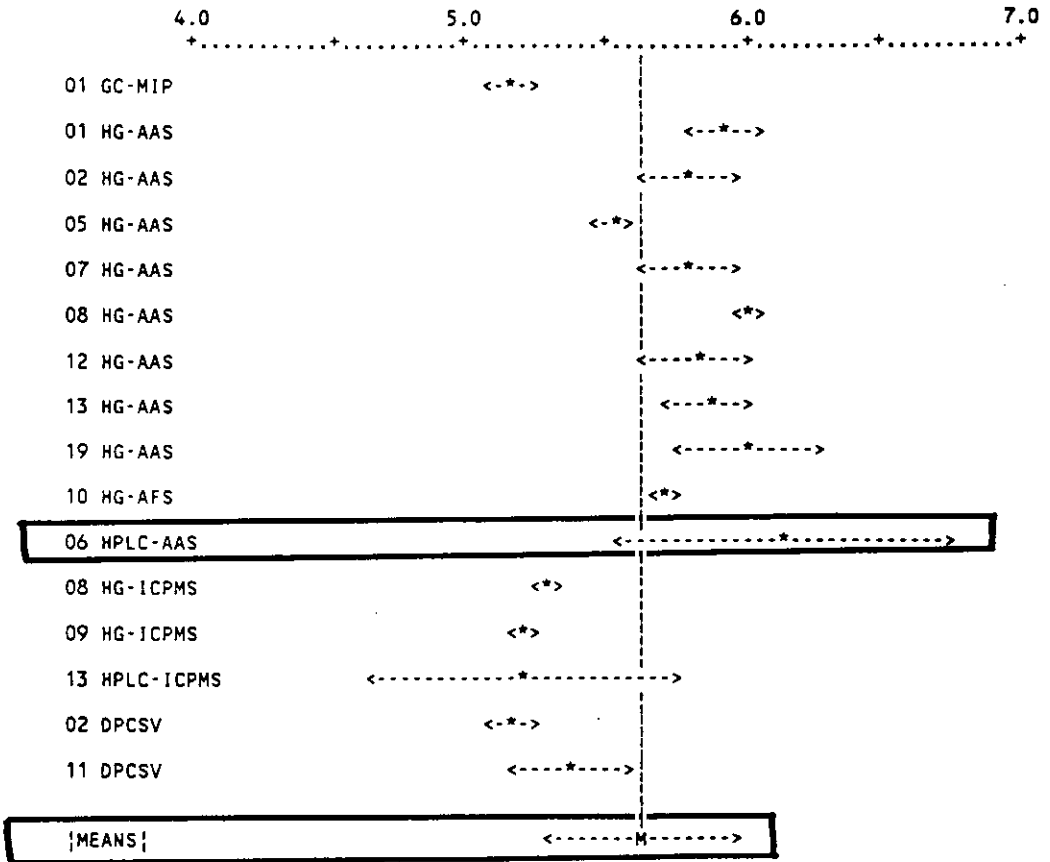
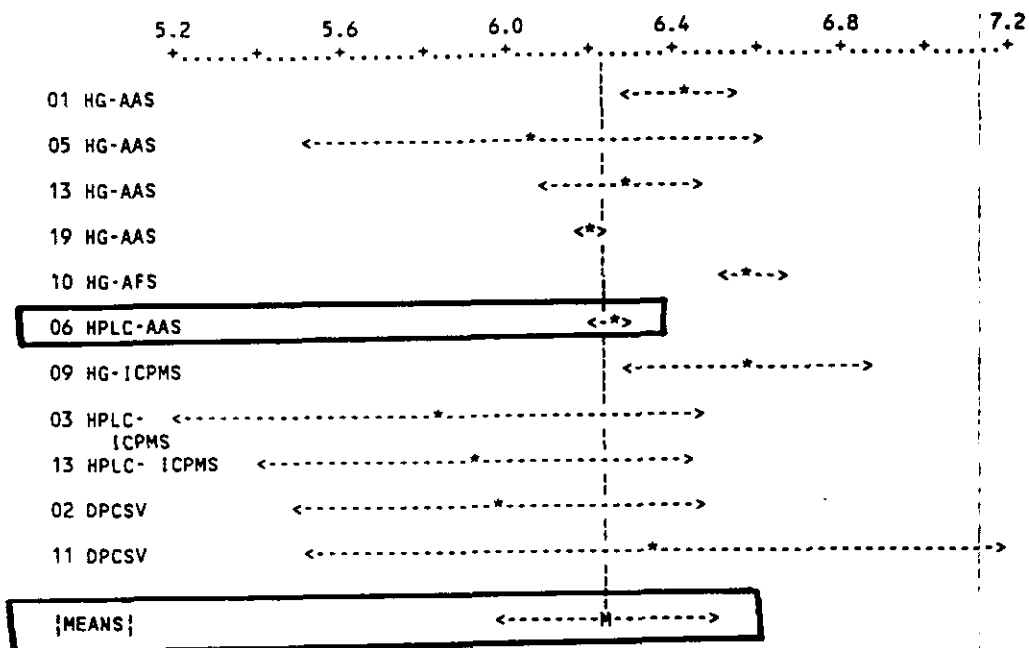


Figura 54.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(VI) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la muestra B.



Intercomparación y certificación

Como puede observarse de los resultados obtenidos para Se(IV) en la muestra A, el coeficiente de variación entre laboratorios fue 17.5% y la media de $48.72 \pm 8.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Después de la eliminación de resultados discrepantes, el coeficiente de variación disminuyó al 6.3% siendo el nuevo valor medio de $51.03 \pm 3.19 \mu\text{g L}^{-1}$. El valor esperado era de $50.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

De los resultados obtenidos para Se(VI) en la muestra A el coeficiente de variación de todos los valores fue 29.4% y la media $48.92 \pm 14.4 \mu\text{g L}^{-1}$; después de eliminarse resultados discrepantes, el coeficiente de variación disminuyó al 7.0% y el valor medio obtenido fue $50.33 \pm 3.54 \mu\text{g L}^{-1}$ y $50.00 \mu\text{g L}^{-1}$ el valor esperado.

En el caso del Se(IV) en la muestra B, el coeficiente de variación fue 23.7% y la media $5.45 \pm 1.3 \mu\text{g L}^{-1}$; después de eliminarse algunos resultados discrepantes, el coeficiente de variación disminuyó al 6.2% siendo el valor medio obtenido de $5.63 \pm 0.35 \mu\text{g L}^{-1}$. El valor esperado (por preparación) fue de $6.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

Finalmente, para Se(VI) en la muestra B el coeficiente de variación fue de 31.9% y la media $5.90 \pm 1.9 \mu\text{g L}^{-1}$; después de eliminarse los valores discrepantes, el coeficiente de variación disminuyó al 4.1% siendo el valor medio $6.21 \pm 0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ y $6.00 \mu\text{g L}^{-1}$ el valor esperado.

En los diagramas correspondientes se han señalado los valores dados por nuestro laboratorio y señalado con el número 6. Se observa que en todos los casos hemos sido un laboratorio cuyos resultados han sido tomados en cuenta para establecer el valor medio, hecho que valida el método analítico que ha sido puesto a punto en esta memoria.

VI.2. EJERCICIO DE CERTIFICACIÓN.

Una vez finalizado el ejercicio de intercomparación, detectadas las posibles fuentes de error, demostrada la homogeneidad y estabilidad de las muestras y acordado el modo de presentar y tratar los resultados, se procedió a iniciar el ejercicio de certificación en el que se analizan dos soluciones acuosas conteniendo las especies inorgánicas de selenio (Se(IV) y Se(VI)) en alta (A) y baja concentración (B). Debido a la falta de laboratorios que determinan independientemente el Se(VI) de las muestras, se acordó la certificación de los contenidos de Se(IV), Se(total). La concentración de Se(VI), se daría únicamente como valor indicativo.

VI.2.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA UN EJERCICIO DE CERTIFICACIÓN.

Se procedió a la preparación de dos materiales de referencia de alta (A) y baja concentración en selenio. Para ello, las disoluciones se prepararon de igual modo que las utilizadas en el ejercicio de intercomparación. Se prepararon dos tipos de disoluciones (disolución B-baja concentración y disolución A-alta concentración). La disolución B contenía $6.0 \mu\text{g L}^{-1}$ y $8.0 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) y de Se(VI) respectivamente, y 2000 mg L^{-1} de Cl^- (NaCl) como estabilizante de las especies de selenio. La solución A contenía $35.0 \mu\text{g L}^{-1}$ y $45.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) y de Se(VI) respectivamente y 2000 mg L^{-1} de Cl^- . Las disoluciones se embotellaron en contenedores de polietileno de 125 mL y se enviaron a los participantes para su análisis.

VI.2.2.-PARTICIPANTES Y TÉCNICAS ANALÍTICAS IMPLICADAS.

En la Tabla XXXI se relacionan los laboratorios participantes en el estudio de certificación, así como los métodos y técnicas utilizadas por parte de éstos.

Como puede observarse hay una pequeña variación en los laboratorios implicados en la certificación y en los métodos y técnicas utilizados.

Los problemas en la reducción del Se(VI) a Se(IV), detectados en el ejercicio de intercomparación, fueron subsanados en este estudio; ya que se utilizaron concentraciones de HCl superiores a las utilizadas en el ejercicio de intercomparación (entre 4 y 8 mol L⁻¹). Muchos laboratorios variaron la forma de calentar la muestra sustituyendo el baño de agua ó la placa calefactora por un horno microondas; permitiendo este último sistema calefactor la reducción "en línea" de Se(VI) a Se(IV) con el sistema de detección.

La determinación independiente de Se(VI) fue realizada únicamente por 5 laboratorios. En todos los casos se utilizaron columnas de intercambio aniónico y detectores de alta sensibilidad como el ICP-MS ó HG-AAS. El valor de Se(VI) en las muestras se dará como indicativo; ya que sólo fue analizado independientemente por un pequeño número de participantes.

Tabla XXXI.- Métodos analíticos utilizados en la certificación del contenido de Se(IV) y Se(VI) en disoluciones acuosas.

Lab N°	Universidad de Amberes (Wilrijk, Bélgica)	
1	Se(IV)	Se(VI)
	<p>Técnica: CGC-MIP-ABS. Método: a) Derivatización a Et₂Se con NaBEt₃. b) Atrapamiento criogénico a (-150°C) en una columna de sílice. c) Inyección "en línea" de la especie derivatizada en el cromatógrafo.</p>	<p>Técnica: CGC-MIP-ABS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 100°C (baño de agua) durante 10 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>
Lab N°	Universidad Pau y de Pays de L'Adour (Pau, Francia)	
2	Se(IV)	Se(VI)
	<p><u>A</u> Técnica: CT-HG-QF-AAS</p> <p><u>B</u> Técnica: DPCSV</p>	<p><u>A</u> Técnica: CT-HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 90°C durante 40 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p> <p><u>B</u> Técnica: DPCSV. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ a 90°C durante 40 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>
Lab N°	Dpto. Química Medioambiental, CSIC (Barcelona, España)	
3		
	<p>Técnica: HPLC-ICP-MS. Método: a) Preconcentración "en línea" utilizando una columna preconcentradora de iguales características a la columna cromatográfica. b) Inyección directa en el cromatógrafo.</p>	<p>Técnica: HPLC-ICP-MS. Método: a) Preconcentración "en línea" utilizando una columna preconcentradora de iguales características a la columna cromatográfica. b) Inyección directa en el cromatógrafo.</p>

Intercomparación y certificación

Lab N°	Instituto Pasteur de Lille (Lille, Francia)	
4	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AFS	Técnica: HG-AFS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ durante 10 minutos en un horno microondas (Prolabo M301). b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).
Lab N°	Universidad Técnica de Viena (Viena, Austria)	
5	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-HG-AAS	A Técnica: GF-AAS. Método: a) Inyección directa en el horno de grafito. b) Determinación de Se(total). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV). B Técnica: FI-HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ a 90°C (baño de agua) durante 20 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).
Lab N°	Dpto Q. Analítica. UCM (Madrid, España)	
6	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HPLC-HG-AAS. Método: a) Preconcentración en microcolumnas de alúmina (las muestras de baja concentración). b) Elución en NH ₃ 2 mol L ⁻¹ . c) Inyección del eluido en el cromatógrafo. HPLC-HG-AAS.	Técnica: HPLC-HG-AAS. Método: a) Preconcentración en microcolumnas de alúmina (las muestras de baja concentración). b) Elución en NH ₃ 2 mol L ⁻¹ . c) Inyección en el cromatógrafo. d) Reducción "en línea" de Se(VI) a Se(IV).

Intercomparación y certificación

CISR (Milán, Italia)		
7	Se(VI)	Se(VI)
	Técnica: HG-GF-AAS. Método: a) Formación del H ₂ Se por reacción con NaBH ₄ en medio ácido. b) Atrapamiento del H ₂ Se e inyección en el horno de grafito. c) Determinación de Se(IV).	Técnica: GF-AAS. Método: a) Inyección de la muestra en el horno de grafito. b) Determinación de Se(total). c) Se(VI) = Se(total)-Se(IV).
Lab N°	Escuela de Ciencias Aplicadas; Universidad de Montfort; (Leicester, Gran Bretaña)	
8	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-HG-AFS.	
Lab N°	Lab. fotofísica; Universidad Burdeos (Francia)	
9	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-HG-ICP-MS.	Técnica: FI-HG-ICP-MS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ durante 2 minutos en un horno microondas al 70% de potencia. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI)= Se (total)- Se (IV).
Lab N°	Universidad de Plymouth (Gran Bretaña)	
10	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AFS	Técnica: HG-AFS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ a 70°C durante 30 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI)= Se(total)- Se(IV).
Lab N°	Dpto. de Química; Universidad de Roma (Italia)	
11	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: DPP (alta concentración). Técnica: DPCSV (baja concentración).	Técnica: DPP ó DPCSV. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 4 mol L ⁻¹ en un horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI)= Se(total)- Se(IV).

Intercomparación y certificación

Lab N°	Universidad de Southampton (Gran Bretaña)	
12	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AAS	Técnica: HG-AAS. Método: a) Reducción "en línea" de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ en horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).
Lab N°	Servicio Central de Análisis (Vernaison, Francia)	
13	Se(IV)	Se(VI)
	<p><u>A</u> Técnica: HG-QF-AAS.</p> <p><u>B</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.</p> <p><u>C</u> Técnica: FI-HG-ICP-MS</p>	<p><u>A</u> Técnica: HG-QF-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ durante 10 minutos en un horno microondas a 20 W (60°C). b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p> <p><u>B</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.</p> <p><u>C</u> Técnica: FI-HG-ICP-MS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L⁻¹ durante 10 minutos en un horno microondas a 20 W (60°C). b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).</p>
Lab N°	Ministerio de Salud. (Soborg, Dinamarca)	
14	Se(IV)	Se(VI)
	<p><u>A</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.</p>	<p><u>A</u> Técnica: HPLC-ICP-MS.</p> <p><u>B</u> Técnica: ICP-MS. Método: a) Nebulización directa de la muestra. b) Determinación de Se(total).</p>

Intercomparación y certificación

Lab N°	Laboratorio de Química Mineral (Estrasburgo, Francia)	
15	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: HG-AAS.	Técnica: HG-AAS. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ durante 12 minutos. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).
Lab N°	Dpto. Q. Analítica; Universidad de Córdoba (España).	
16	Se(IV)	Se(VI)
	<u>A</u> Técnica: FI-CSV.	<u>A</u> Técnica: FI-CSV. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 6 mol L ⁻¹ en un horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).
	<u>B</u> Técnica: FI-HG-AFS.	<u>B</u> Técnica: FI-HG-AFS. Método: a) Reducción "en línea" de Se(VI) a Se(IV) con HCl 6 mol L ⁻¹ en un horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).
Lab N°	Centro de Análisis Químico; U. Sheffield (Gran Bretaña)	
17	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: IC-ICP-MS.	Técnica: IC-ICP-MS
Lab N°	ENEA. Dpto. Protección Ambiental (Roma, Italia)	
19	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: GC-PPD. Método: a) Formación del complejo piazoselenio a pH=1.8. b) Extracción del complejo en tolueno, c) Evaporación del disolvente en el rotavapor. d) Inyección en el cromatógrafo de gases.	Técnica: GC-PPD. Método: a) Reducción en discontinuo de Se(VI) a Se(IV): calentamiento de la muestra en HCl 4 mol L ⁻¹ en un horno microondas. b) Determinación de Se(total) como Se(IV). c) Se(VI) = Se(total) - Se(IV).

Intercomparación y certificación

Lab N°	Perkin-Elmer (Überlingen, Alemania)	
21	Se(IV)	Se(VI)
	Técnica: FI-GP-AAS. Método: a) Preconcentración de Se(IV) sobre microcolumnas de sílice C18. b) Formación del complejo de Se(IV) con APDC. c) Elución de Se(IV) de la microcolumna con etanol. d) Inyección en el horno de grafito. e) Determinación de Se(IV).	Técnica: GP-AAS. Método: a) Inyección de la muestra en el horno de grafito. b) Determinación de Se(total). c) $Se(VI) = Se(total) - Se(IV)$.

VI.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cada laboratorio presentó 5 resultados independientes de cada especie inorgánica de selenio y de Se(total) para cada una de las muestras propuestas (A y B). Los resultados facilitados por cada laboratorio se resumen en las **Tablas XXXII (a-f)**. Al igual que en el ejercicio de intercomparación; los resultados se representaron en diagramas de barras en los que se muestran la media del laboratorio, la desviación típica, el laboratorio y la técnica utilizada (**Figuras 55-60**). Aplicando los criterios estadísticos similares a los del ejercicio de intercomparación, se rechazaron algunos resultados por estar fuera del intervalo ("outliers"), ó tener desviaciones típicas muy elevadas. Los resultados de la primera selección se presentan en las **Figuras 61-66**. Los valores admitidos en la certificación después de la segunda selección se muestran en las **Figuras 67-72**.

Como se observa en las gráficas los valores rechazados no pertenecen a una misma metodología ó técnica; por tanto, los errores detectados no se pueden atribuir a errores inherentes al método de análisis utilizado; sino más bien a errores puntuales del laboratorio tales como de calibración,

reducción, etc.

Los laboratorios que utilizaron la cromatografía de gases presentaron desviaciones típicas elevadas (en torno al 10%). Estos resultados se aceptaron para la certificación por ser la desviación típica inherente al método de análisis utilizado.

Intercomparación y certificación

Tabla XXXII.a. Resultados de Se(IV) en la muestra de A ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1	33.35	35.27	37.72	31.50	36.59	34.89 \pm 2.50
2a	46.30	46.70	46.80	46.30	44.80	46.18 \pm 0.80
2b	42.20	44.50	45.00	46.90	48.00	45.32 \pm 2.25
3	162.70	109.80	76.00	32.50	78.30	91.90 \pm 48.2
4	33.26	33.49	34.53	33.40	34.70	33.87 \pm 0.68
5	31.89	27.80	28.70	30.76	29.40	29.71 \pm 1.63
6	35.85	36.82	35.36	34.88	34.38	35.35 \pm 1.89
7	49.50	46.00	44.60	46.40	47.70	46.80 \pm 1.70
8	35.22	35.15	34.84	34.74	35.09	35.01 \pm 0.21
9	32.69	32.41	33.65	34.84	34.58	33.63 \pm 1.09
10	45.24	44.14	44.49	44.98	44.66	44.70 \pm 0.38
11	41.12	39.28	40.03	40.35	40.69	40.29 \pm 0.70
12	37.00	36.40	36.40	36.80	36.80	37.70 \pm 0.30
13a	34.68	35.09	34.95	34.10	35.85	34.93 \pm 0.64
13b	34.29	34.27	34.17	34.55	34.87	34.43 \pm 0.28
13c	33.70	33.90	32.47	33.87	33.38	33.46 \pm 0.59
14a	35.70	36.30	36.00	35.20	35.30	35.70 \pm 0.46
15	32.10	31.90	34.30	34.70	32.30	33.06 \pm 1.19
16a	32.10	39.98	41.02	34.44	41.36	37.38 \pm 4.23
16b	35.08	37.22	35.29	35.08	34.76	35.49 \pm 0.88
17	36.00	37.90	38.20	38.60	38.40	37.80 \pm 0.91
19	39.58	43.04	37.51	40.66	36.47	39.45 \pm 2.32
21	33.58	34.90	34.51	33.96	34.30	34.25 \pm 0.45

Tabla XXXII.b. Resultados de Se(total) en la muestra A ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1	75.61	80.41	69.44	81.30	76.80	76.71 \pm 4.71
2b	70.40	71.30	71.90	72.60	75.40	72.32 \pm 1.90
3*	290.00	198.90	146.30	76.30	138.30	169.96 \pm 71.53
4	83.09	82.74	82.44	81.43	83.00	82.54 \pm 0.67
5	82.67	81.41	78.24	76.85	79.60	79.75 \pm 2.35
6*	80.28	82.97	79.79	77.58	77.08	79.54 \pm 2.11
7	84.90	82.90	84.00	82.40	86.10	84.10 \pm 1.50
8						
9	76.47	81.01	82.22	85.58	84.11	81.88 \pm 3.49
10	79.71	79.74	79.37	80.27	79.18	79.65 \pm 0.37
11	101.10	103.15	101.05	100.80	103.42	101.90 \pm 1.27
12	89.00	90.00	91.00	84.00	80.50	86.90 \pm 4.50
13a	76.04	76.79	78.12	81.50	79.88	78.47 \pm 2.24
13b*	79.62	79.26	80.20	80.32	80.02	79.88 \pm 0.44
13c	76.76	77.91	76.96	79.52	78.21	77.87 \pm 1.11
14a*	81.20	81.50	81.30	82.40	81.40	81.56 \pm 0.43
14b	79.60	79.20	80.80	-----	-----	79.90 \pm 0.83
15	77.50	50.00	82.50	74.00	82.10	73.22 \pm 12.03
16a	-----	75.00	79.30	86.09	82.96	80.84 \pm 4.78
16b	78.34	80.77	77.57	78.48	79.75	78.98 \pm 1.13
17*	85.80	89.40	91.00	91.30	91.70	89.84 \pm 2.17
19	78.90	78.31	79.49	96.57	90.45	84.74 \pm 7.42
21	77.67	78.49	76.49	80.66	79.93	78.64 \pm 1.51

* Se (total) = Se(VI) + Se(IV).

Intercomparación y certificación

Tabla XXXII.c. Resultados de Se(VI) en la muestra de A ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1	42.26	45.14	31.72	49.80	40.21	41.82 \pm 6.00
2	28.20	26.80	27.40	25.70	25.70	26.76 \pm 0.97
3*	127.30	89.10	70.30	43.80	60.00	78.10 \pm 32.00
4	49.83	49.25	47.91	48.03	48.30	48.66 \pm 0.75
5	50.78	53.61	49.54	46.09	50.20	50.04 \pm 2.42
6*	44.43	46.15	44.43	42.70	42.70	44.08 \pm 1.29
7	35.40	36.90	39.40	36.00	38.40	37.22 \pm 1.49
8						
9	43.79	48.60	48.57	50.74	49.53	48.24 \pm 2.65
10	34.47	35.60	34.88	35.29	34.52	34.95 \pm 0.45
11	59.98	63.87	60.75	60.45	62.73	61.56 \pm 1.49
12	52.00	53.60	54.60	47.20	43.70	50.20 \pm 4.60
13a	41.36	41.70	43.17	47.40	43.95	43.52 \pm 2.41
13b*	45.33	44.99	46.03	45.77	45.15	45.45 \pm 0.43
13c	43.06	44.01	44.49	45.65	44.83	44.41 \pm 0.96
14a*	45.50	45.20	45.30	47.20	46.10	45.90 \pm 0.83
15	45.40	19.10	48.20	39.30	49.80	40.36 \pm 11.2
16a	-----	35.02	38.28	51.65	41.60	41.64 \pm 6.23
16b	43.26	43.55	42.28	43.4	44.99	43.50 \pm 0.87
17*	49.80	51.50	52.80	52.70	53.30	52.10 \pm 0.99
19	39.32	35.27	41.98	55.91	53.98	45.29 \pm 8.19
21	44.09	43.59	41.98	46.70	45.63	44.40 \pm 1.64

* Resultados independientes de Se(VI).

Tabla XXXII.d. Resultados de Se(IV) en la muestra B ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1	5.69	5.72	6.48	6.04	5.83	5.95 \pm 0.33
2a	7.09	7.17	7.32	7.30	7.03	7.18 \pm 0.13
2b	6.96	7.08	7.45	7.54	7.67	7.34 \pm 0.30
3	2.90	2.80	2.90	3.20	3.40	3.04 \pm 0.25
4	5.75	5.49	5.82	5.93	5.76	5.75 \pm 0.16
5	5.69	6.15	5.80	6.01	5.74	5.88 \pm 0.19
6	5.86	6.40	6.23	6.35	6.58	6.28 \pm 0.24
7	6.20	6.50	6.30	6.60	6.30	6.40 \pm 0.10
8	5.87	5.69	5.78	5.65	6.08	5.81 \pm 0.17
9	5.89	5.61	5.59	6.05	6.09	5.84 \pm 0.24
10	6.33	6.38	6.34	6.35	6.38	6.36 \pm 0.02
11	7.02	7.02	6.77	7.02	6.66	6.90 \pm 0.17
12	5.50	6.00	6.00	6.00	6.30	6.00 \pm 0.30
13a	5.82	5.98	5.51	5.58	5.71	5.72 \pm 0.19
13b	5.75	5.73	5.76	5.80	5.55	5.72 \pm 0.10
13c	5.65	5.86	5.57	5.80	5.78	5.73 \pm 0.12
14a	5.80	5.60	5.90	5.70	5.90	5.80 \pm 0.13
15	6.20	4.60	6.40	6.20	6.00	5.88 \pm 0.66
16a	4.95	5.94	4.11	5.00	5.82	5.16 \pm 0.74
16b	5.04	5.00	5.28	5.18	5.26	5.15 \pm 0.11
17	4.92	5.29	5.37	5.43	5.45	5.29 \pm 0.19
19	5.26	6.34	6.75	6.25	7.01	6.32 \pm 0.60
21	4.96	5.01	5.08	4.81	4.90	4.95 \pm 0.08

Intercomparación y certificación

Tabla XXXII.e. Resultados de Se(total) en la muestra B ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1	13.70	13.40	13.50	14.60	13.40	13.72 \pm 0.51
2	13.88	15.20	14.00	14.84	14.36	14.46 \pm 0.56
3*	13.10	10.20	9.60	11.10	13.20	11.44 \pm 1.48
4	13.97	14.26	14.16	14.30	14.50	14.19 \pm 0.14
5	14.57	14.86	15.22	15.00	14.44	14.82 \pm 0.32
6 [†]	13.77	14.63	14.26	14.76	14.97	14.48 \pm 0.42
7	11.90	12.50	12.80	11.80	11.40	12.10 \pm 0.60
8						
9	13.23	13.87	13.87	14.46	14.67	14.01 \pm 0.57
10	13.97	13.84	13.84	13.94	13.60	13.84 \pm 0.13
11	13.14	13.31	13.14	13.03	13.75	13.27 \pm 0.28
12	13.20	13.60	12.60	12.80	13.60	13.20 \pm 0.50
13a	13.16	13.73	13.46	13.76	14.05	13.63 \pm 0.34
13b [†]	13.78	13.65	14.13	14.15	13.31	13.80 \pm 0.35
13c	13.71	13.98	14.08	14.08	14.21	14.01 \pm 0.19
14a [†]	13.70	13.40	14.10	13.60	14.00	13.76 \pm 0.26
14b	14.40	14.50	14.00	-----	14.70	14.40 \pm 0.29
15	12.80	10.90	13.00	13.00	13.00	12.54 \pm 0.82
16a	14.26	8.97	9.38	14.26	12.48	11.87 \pm 2.56
16b	11.90	12.77	12.58	12.44	12.96	12.53 \pm 0.36
17 [†]	12.25	12.68	13.13	13.26	13.65	12.99 \pm 0.48
19	11.57	10.86	12.55	14.37	13.97	12.66 \pm 1.35
21	11.76	11.58	14.52	10.07	10.20	11.63 \pm 1.60

* Se(total) = Se(VI) + Se(IV).

Tabla XXXII.f. Resultados de Se(VI) en la muestra B ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Lab N°	1	2	3	4	5	Media \pm SD
1	8.01	7.68	7.02	8.56	7.57	7.77 \pm 0.51
2b	6.92	8.12	6.55	7.30	6.69	7.12 \pm 0.56
3*	10.20	7.40	6.70	7.90	9.80	8.40 \pm 1.53
4	8.22	8.77	8.34	8.37	8.74	8.49 \pm 0.22
5	8.88	8.71	9.42	8.99	8.70	8.94 \pm 0.26
6*	7.91	8.23	8.03	8.41	8.39	8.19 \pm 0.20
7	5.70	6.00	6.50	5.20	5.10	5.70 \pm 0.52
8						
9	7.34	8.27	8.23	8.41	8.58	8.17 \pm 0.48
10	7.64	7.46	7.50	7.59	7.22	7.48 \pm 0.15
11	6.12	6.29	6.37	6.01	7.09	6.38 \pm 0.38
12	7.70	7.60	6.60	6.80	7.30	7.20 \pm 0.50
13a	7.37	7.75	7.70	7.93	8.34	7.81 \pm 0.36
13b*	8.03	7.92	8.37	8.35	7.76	8.09 \pm 0.27
13c	8.06	8.12	8.51	8.28	8.43	8.28 \pm 0.19
14a*	7.90	7.80	8.20	7.90	8.10	8.00 \pm 0.16
15	6.60	6.50	6.60	6.80	7.00	6.70 \pm 0.18
16a	9.31	3.03	5.27	9.26	6.66	6.70 \pm 2.40
16b	6.86	7.77	7.30	7.26	7.70	7.38 \pm 0.33
17*	7.33	7.39	7.76	7.83	8.20	7.70 \pm 0.32
19	6.31	4.52	5.80	8.12	6.96	6.34 \pm 1.20
21	6.80	6.57	9.47	5.26	5.30	6.68 \pm 1.53

* Resultados independientes de Se(VI).

Figura 55.- Concentraciones de Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

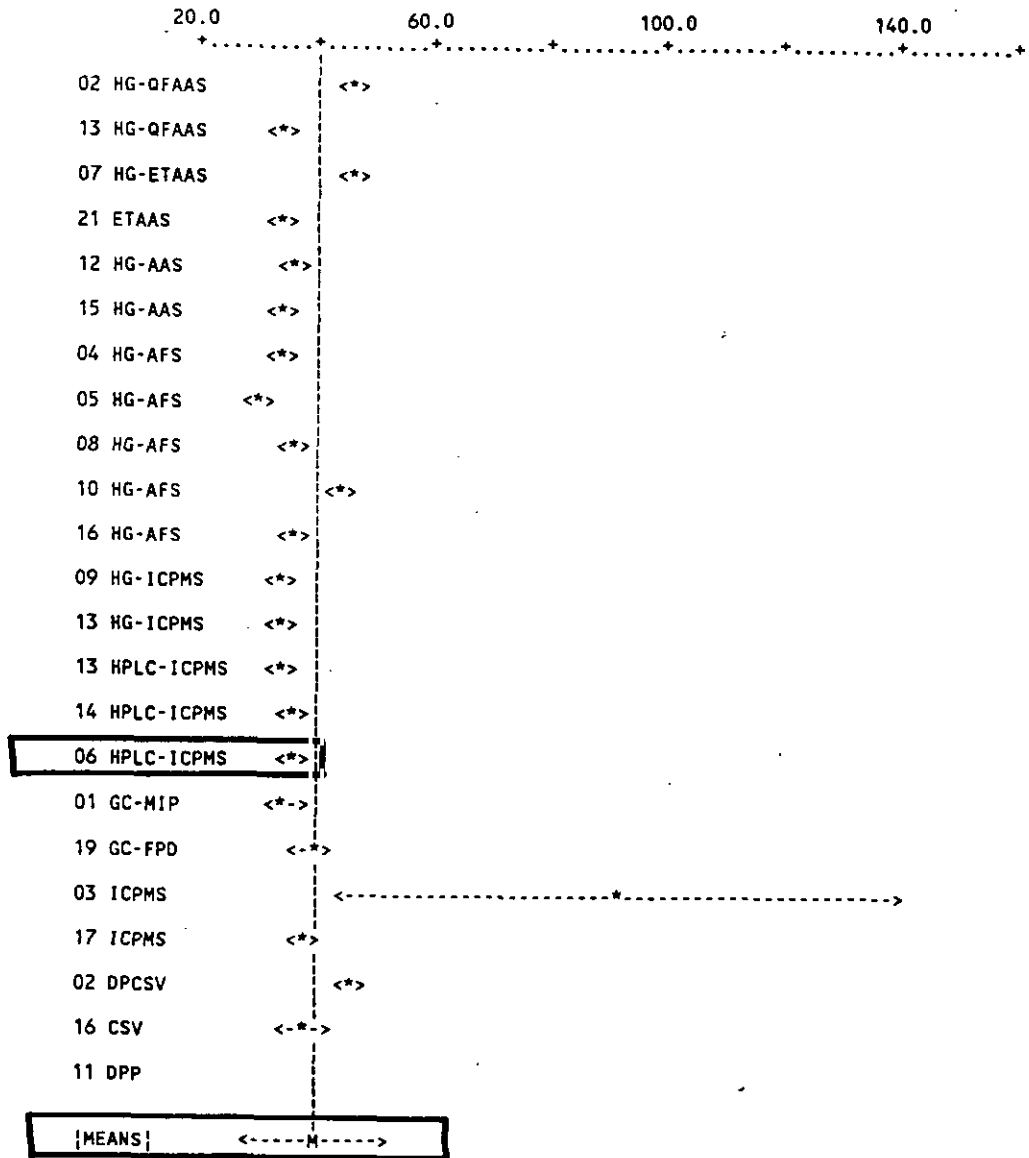


Figura 56.- Concentraciones de Se(total) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

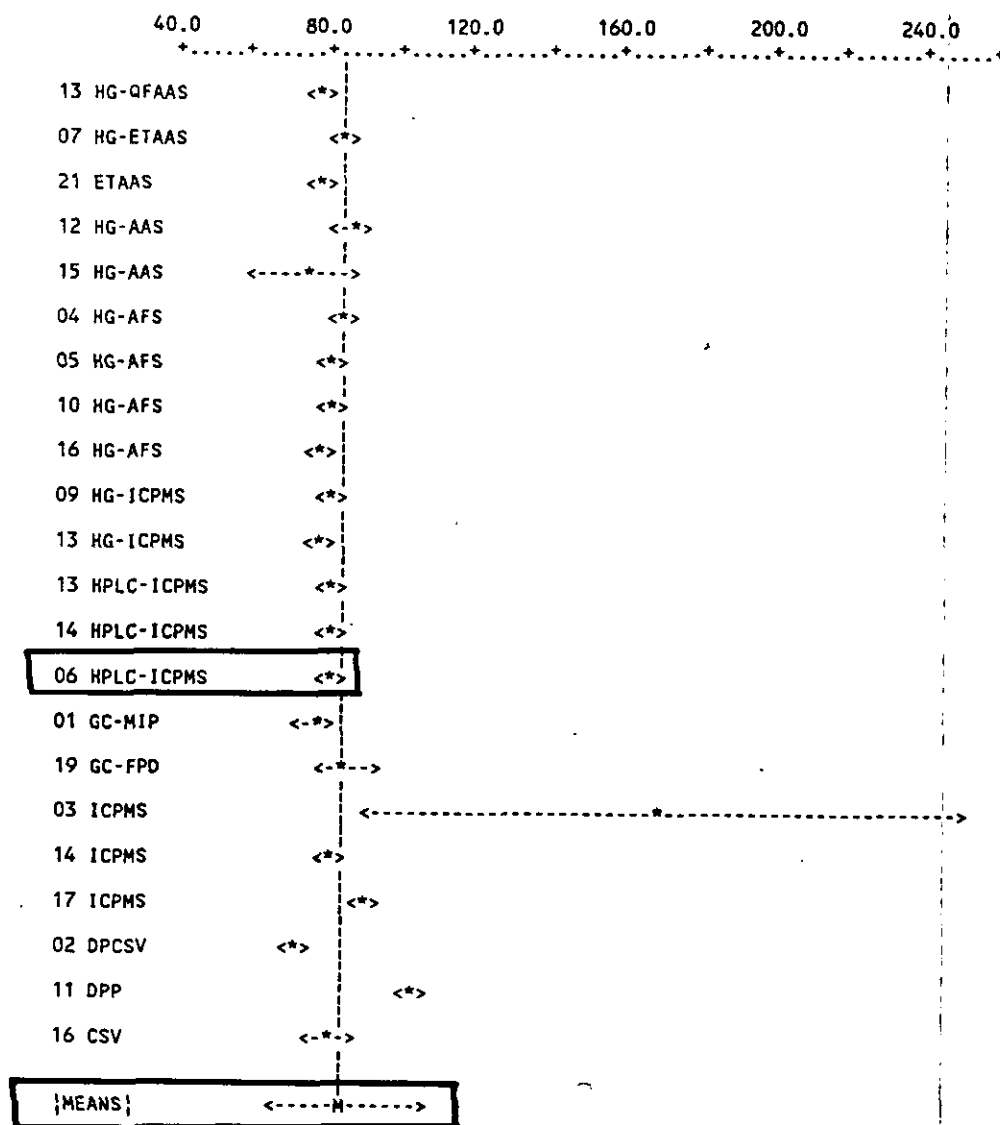


Figura 57.- Concentraciones de Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

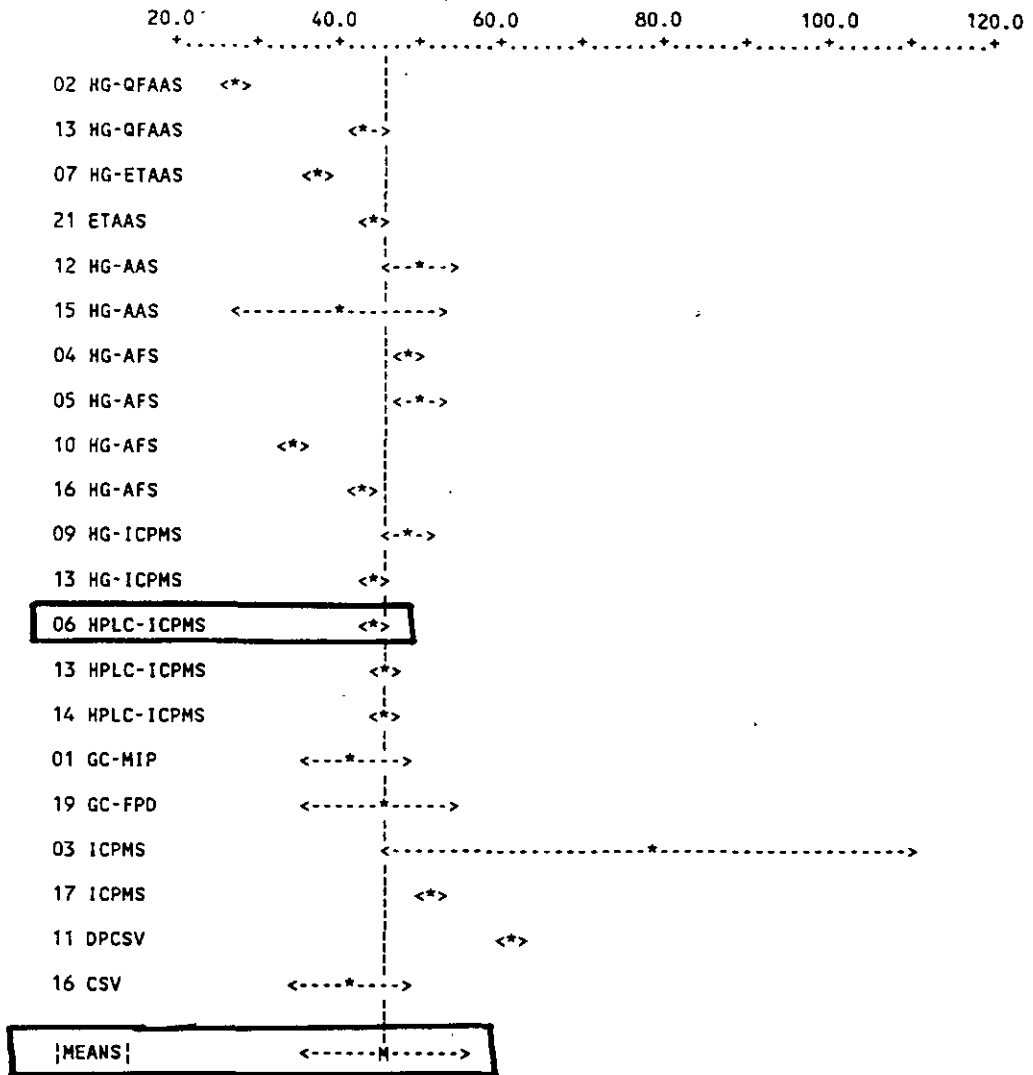


Figura 58.- Concentraciones de Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.

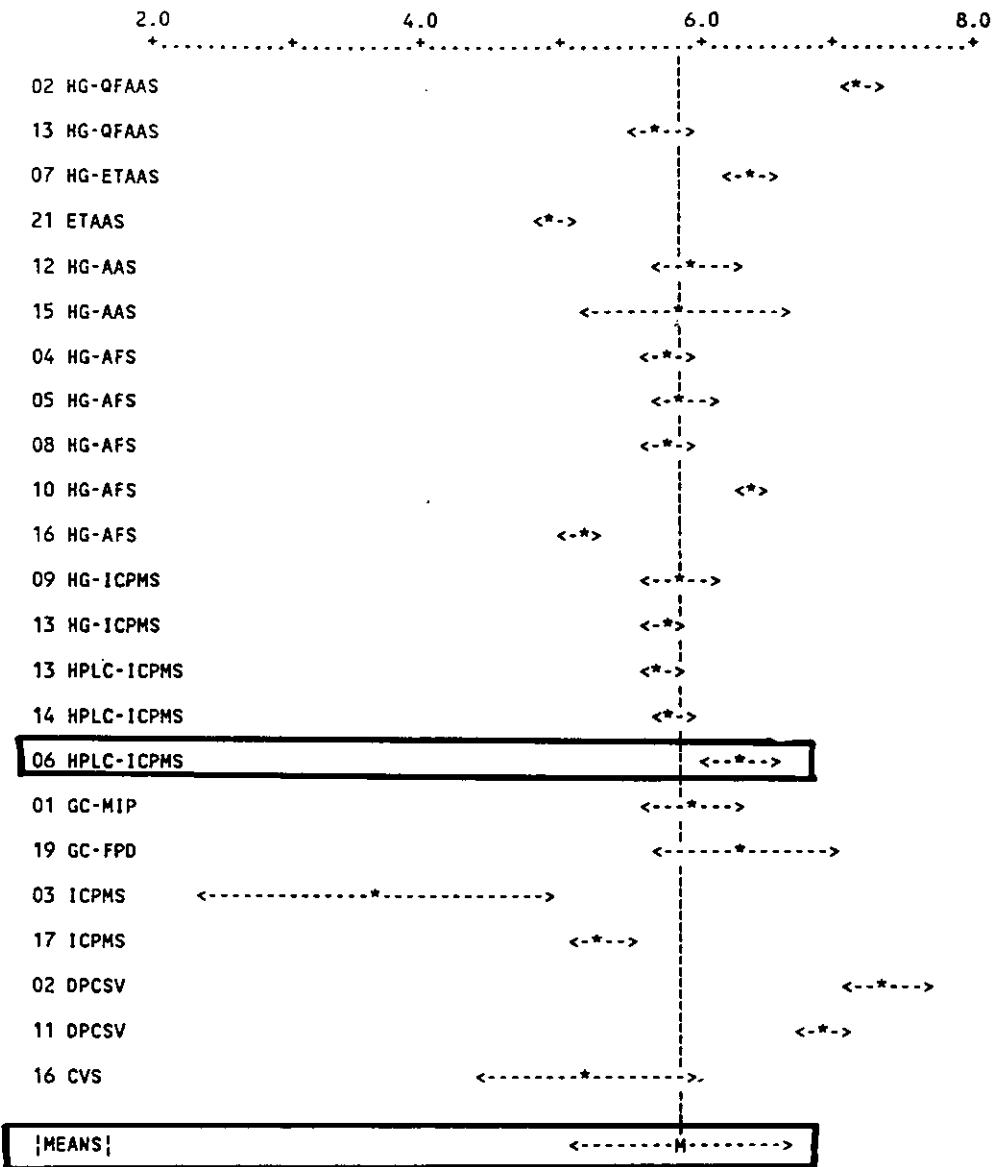


Figura 59.- Concentraciones de Se(total) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.

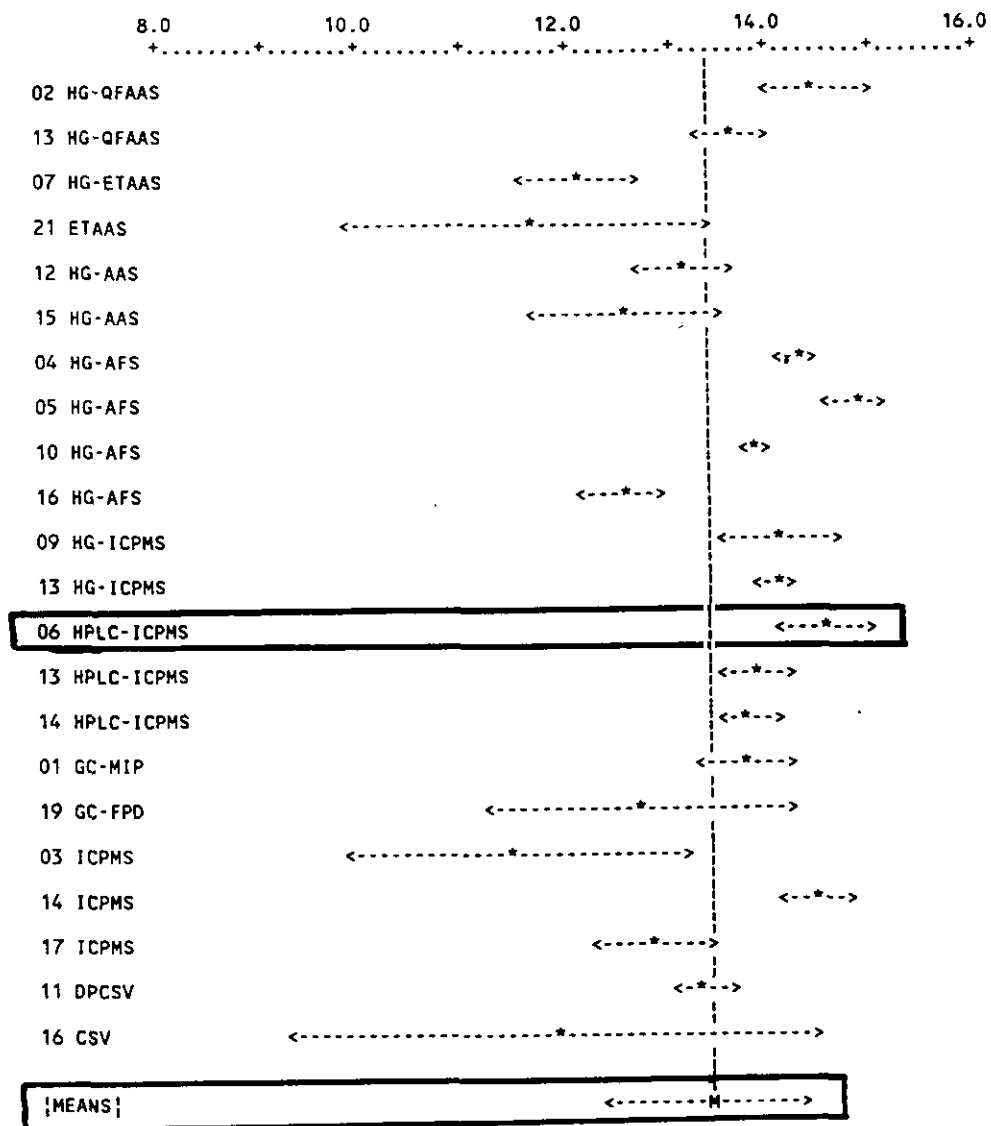
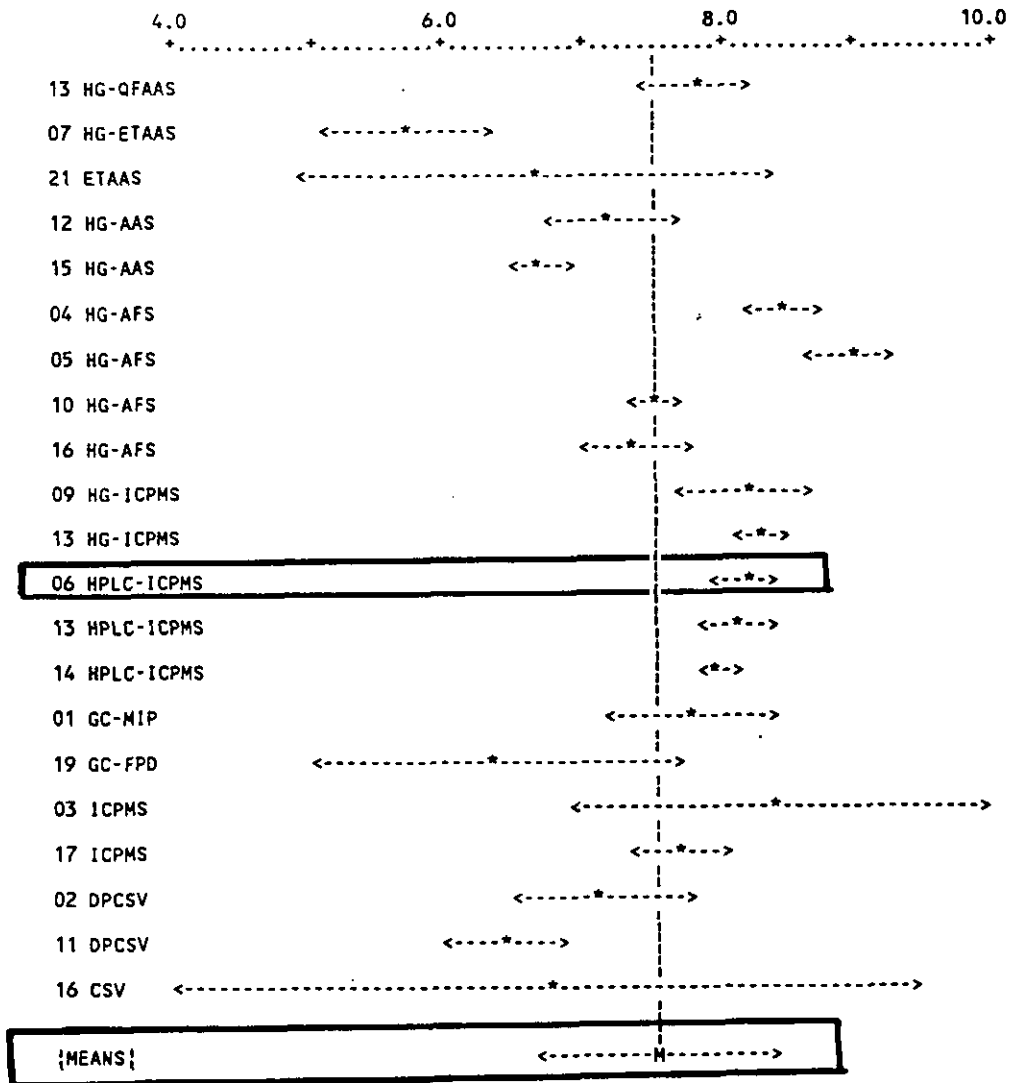


Figura 60.- Concentraciones de Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.



Intercomparación y certificación

Figura 61- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

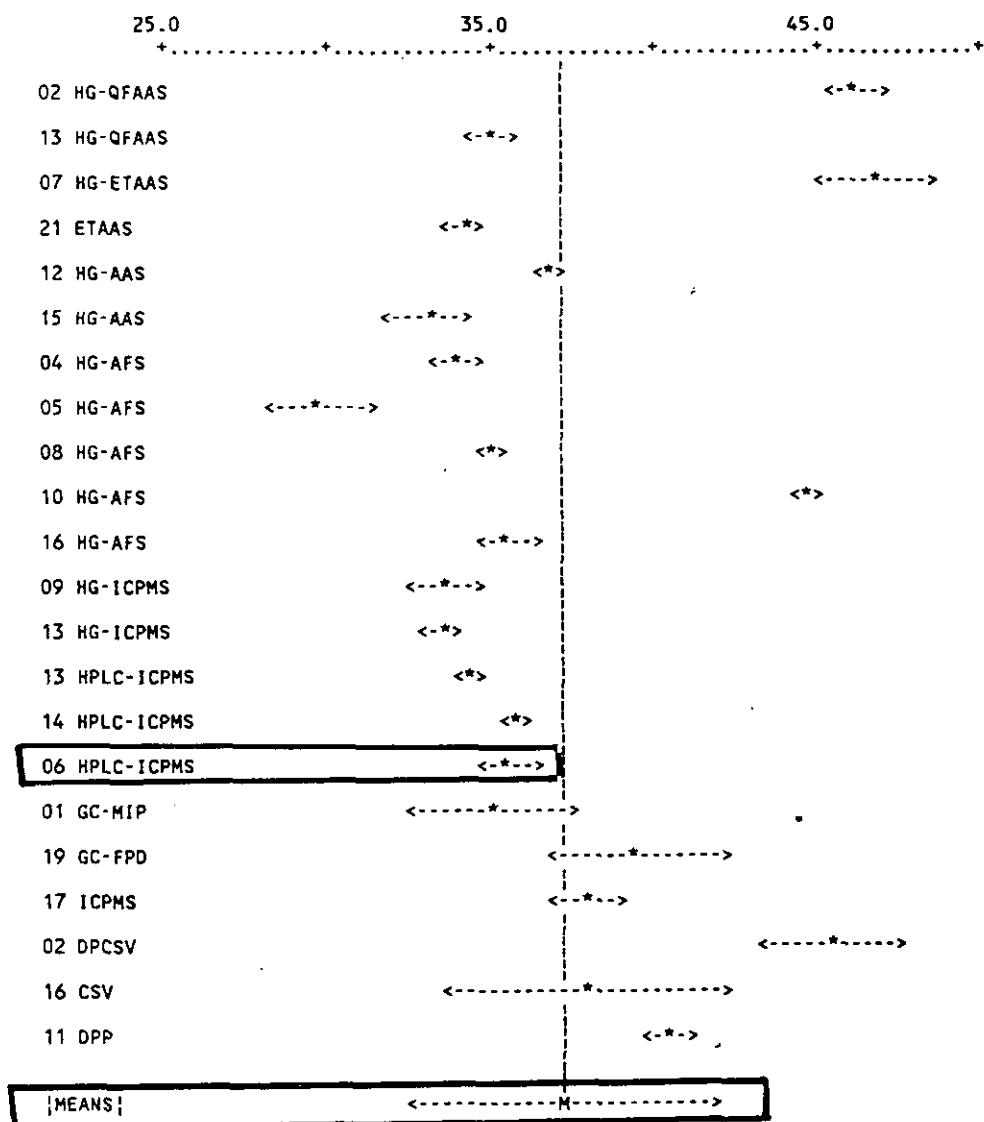
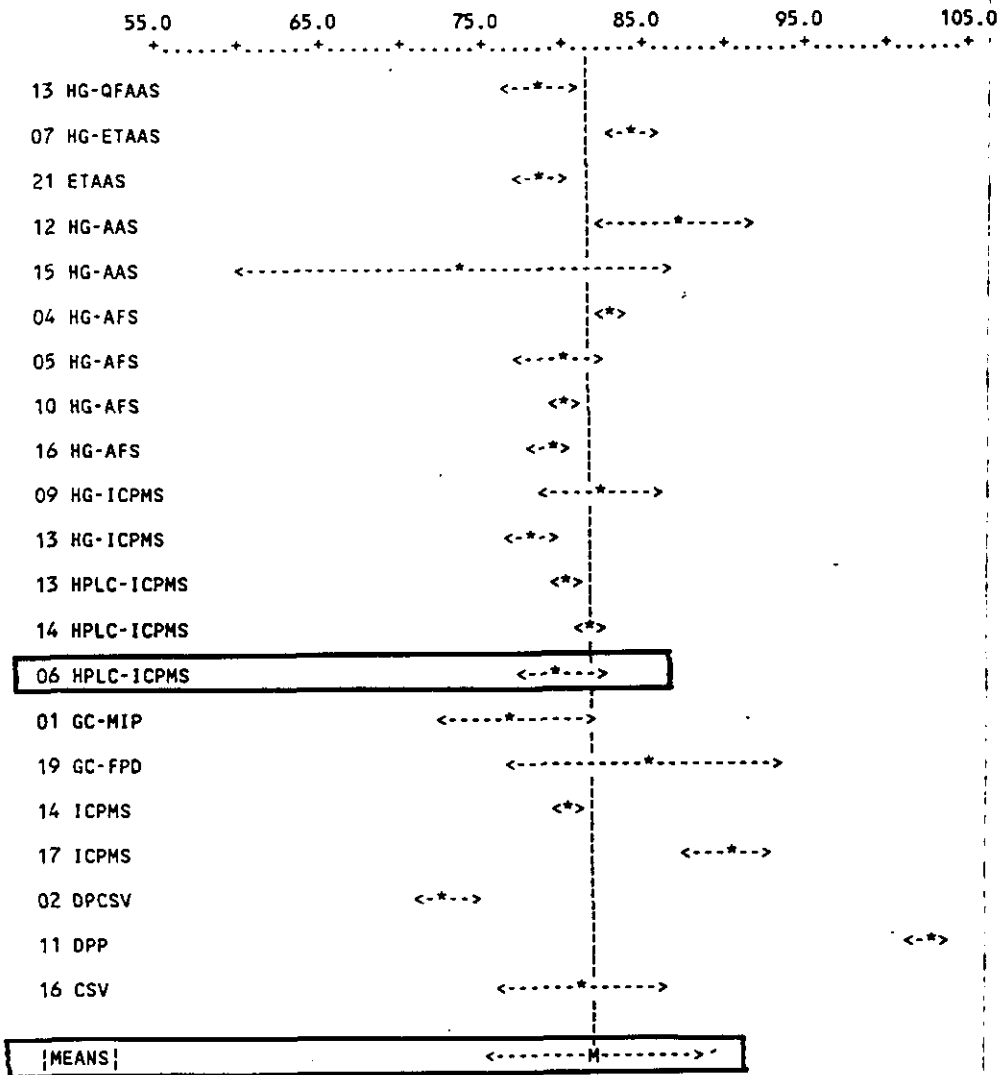


Figura 62- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(total) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.



Intercomparación y certificación

Figura 63.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

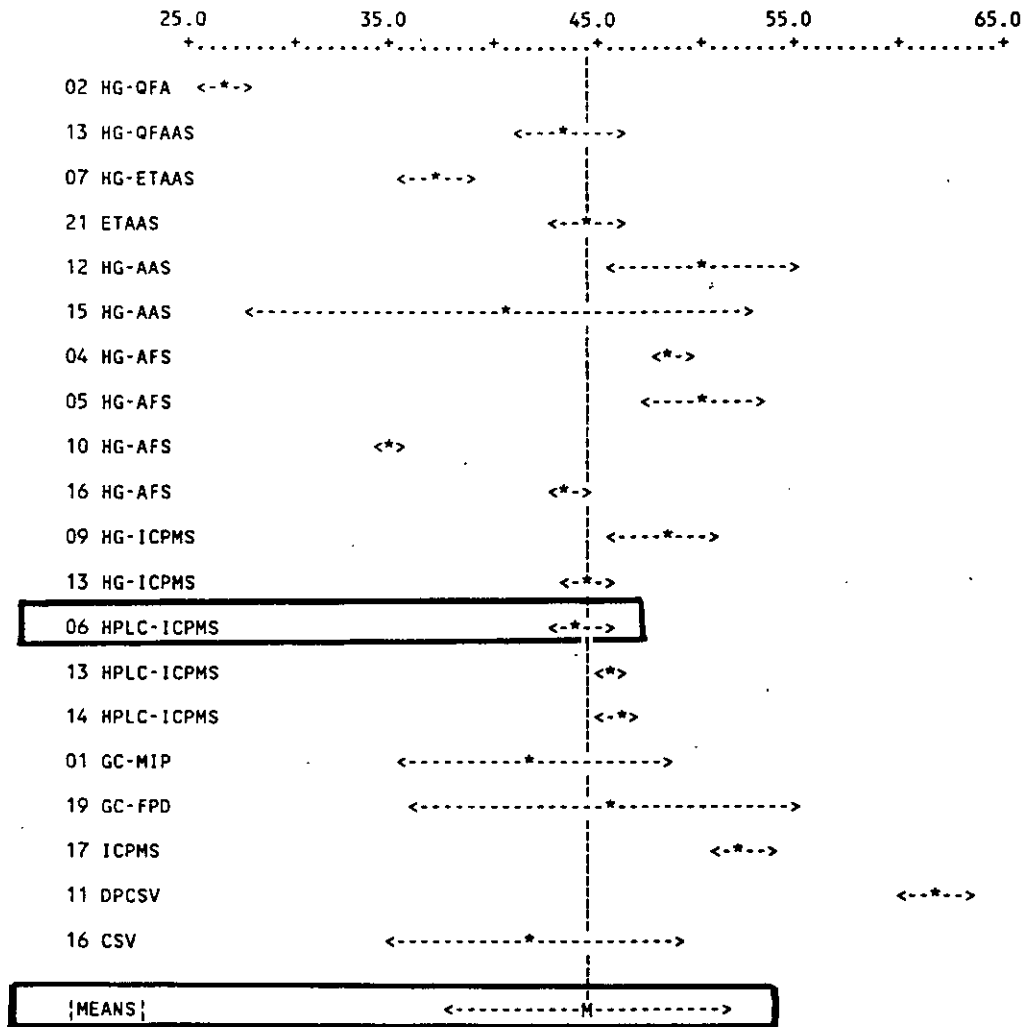


Figura 64.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.

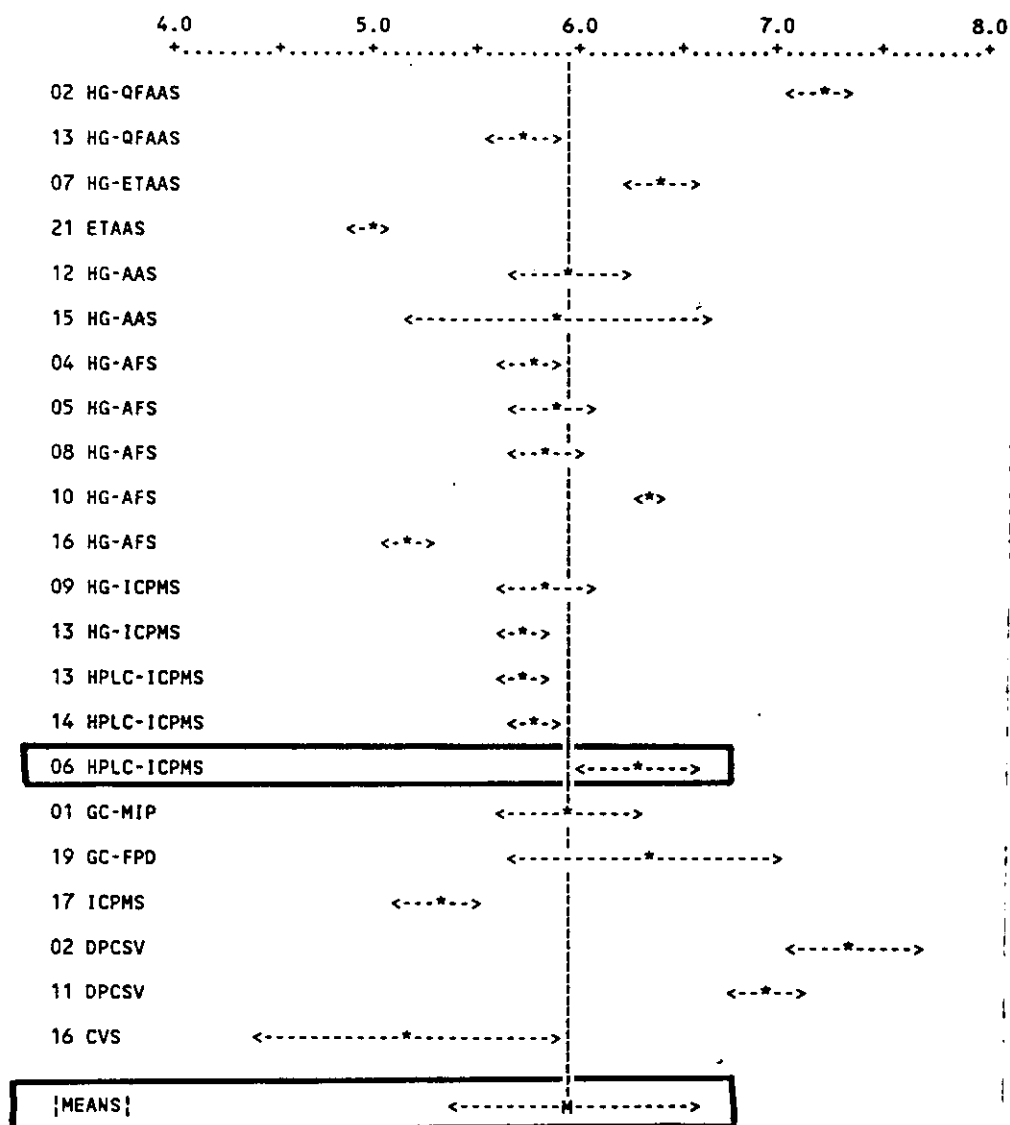


Figura 65.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(total) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.

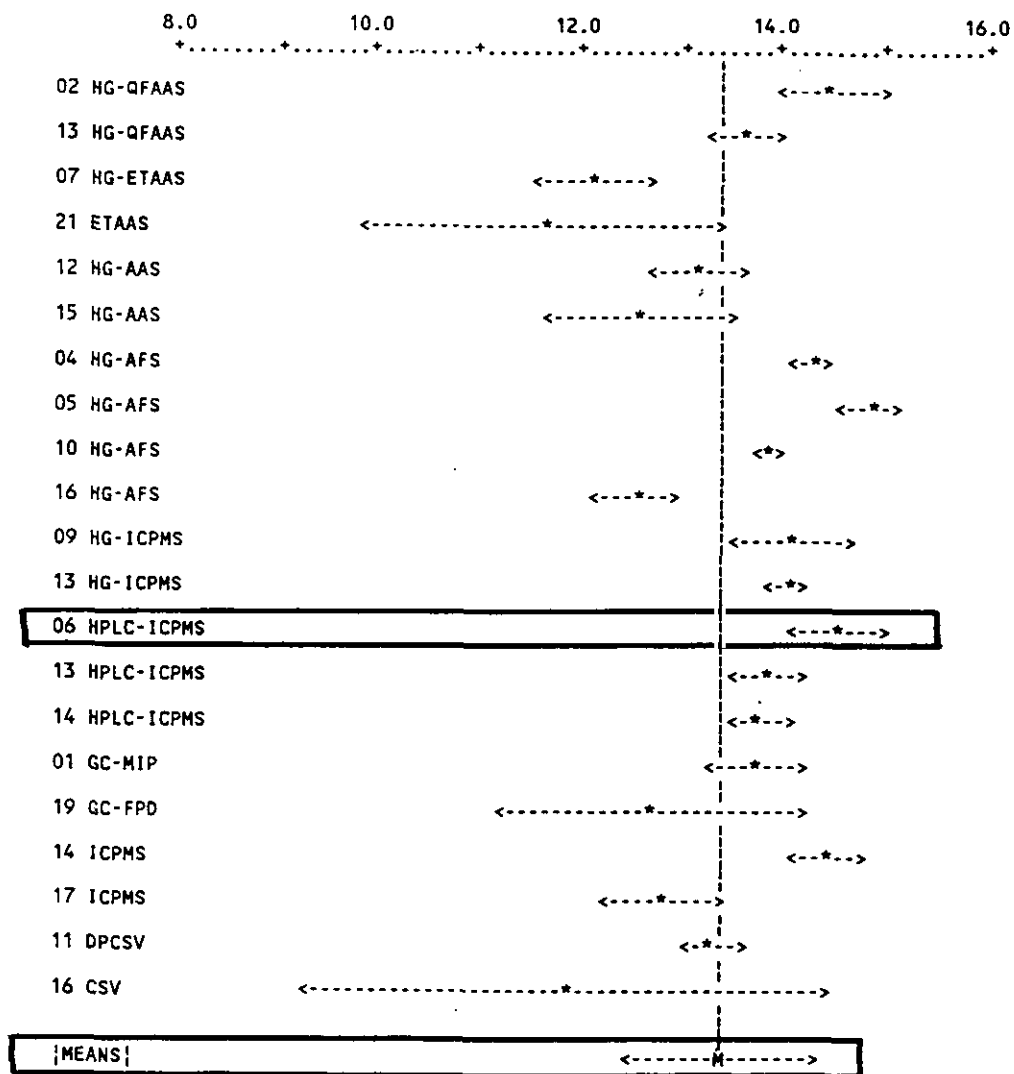


Figura 66.- Resultados seleccionados de las concentraciones de Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.

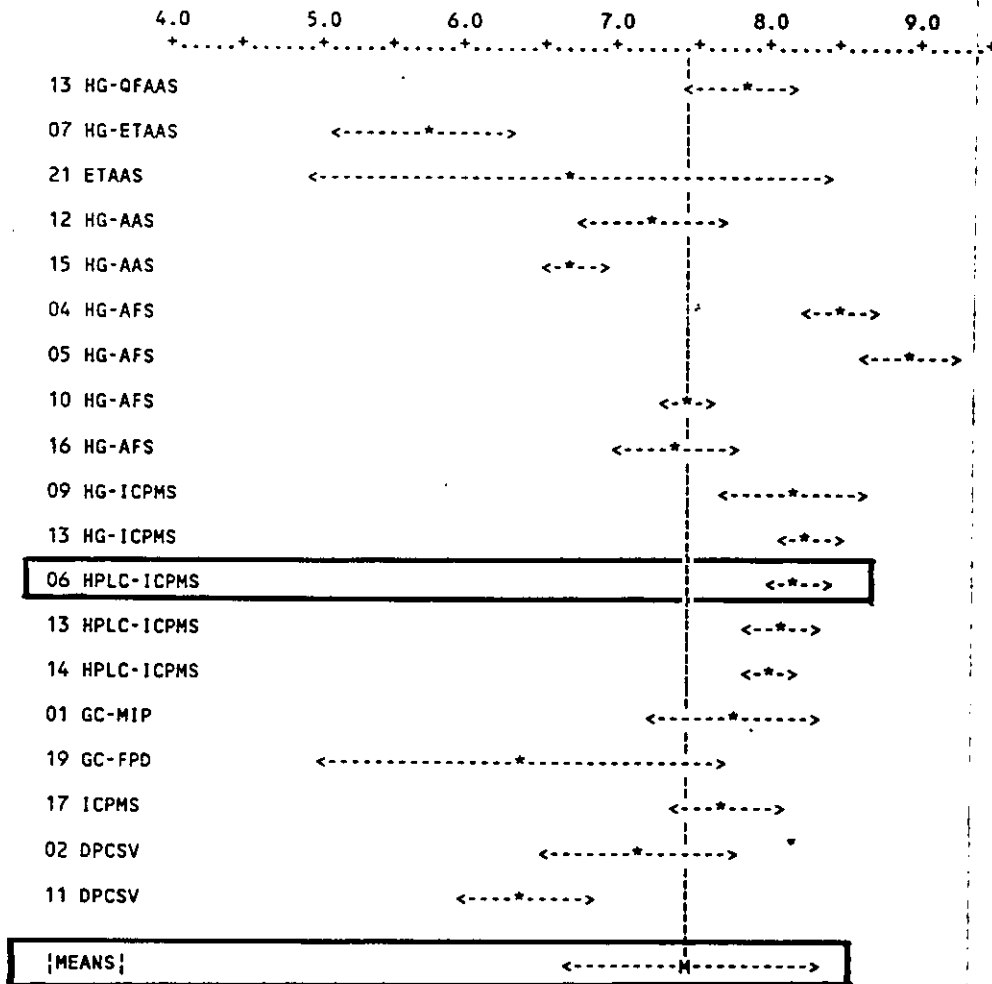


Figura 67- Resultados admitidos en la certificación de las concentraciones de Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

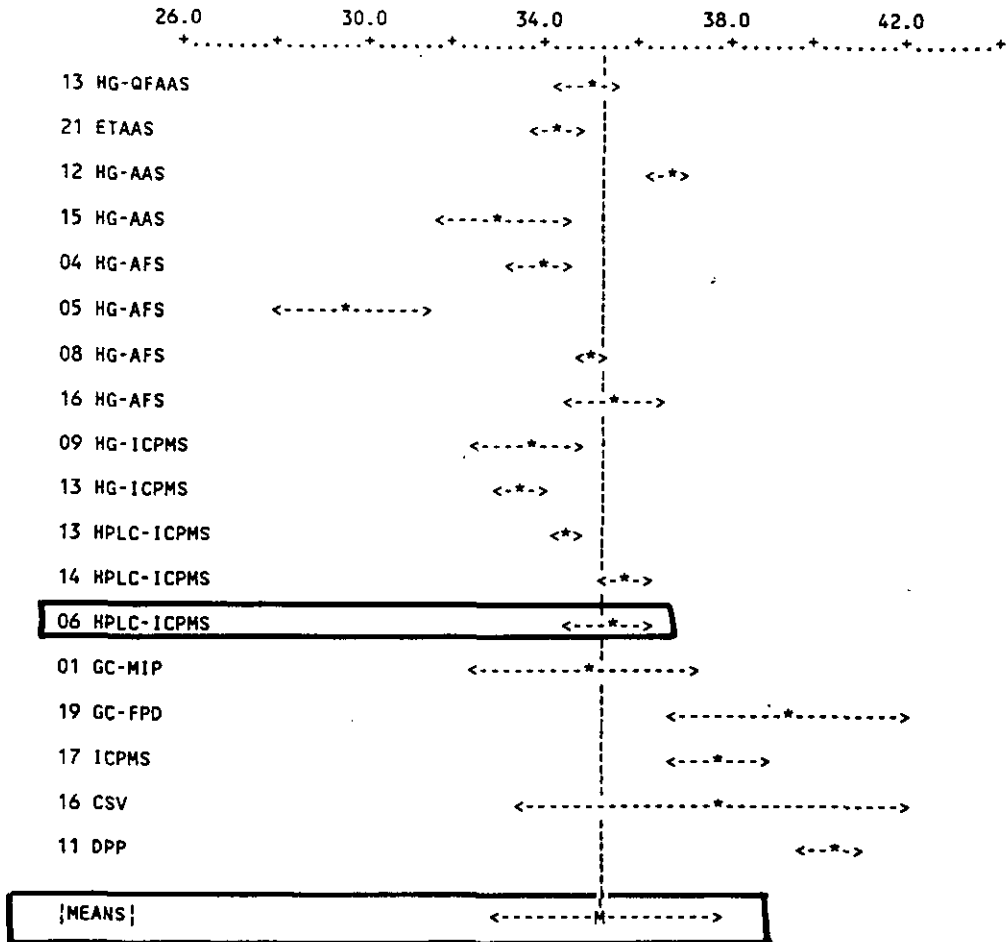


Figura 68- Resultados admitidos en la certificación de las concentraciones de Se(total) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

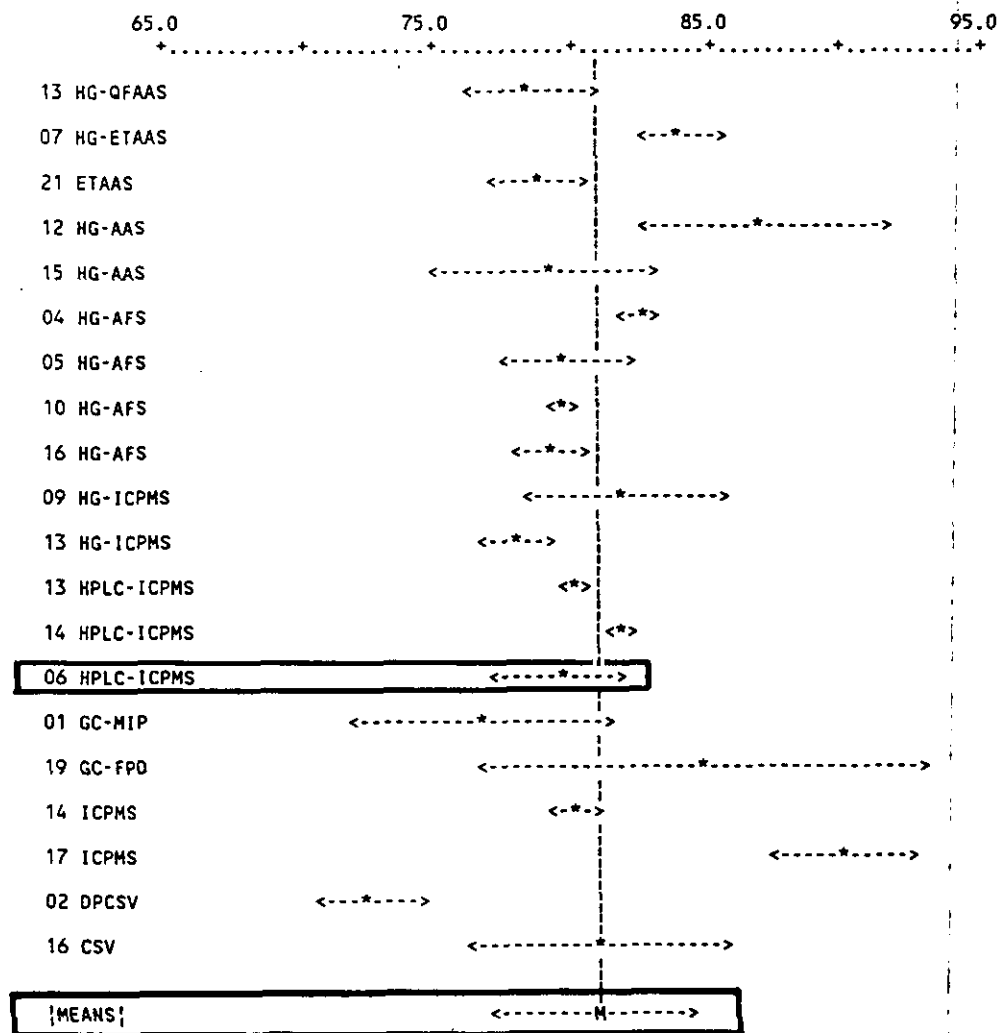


Figura 69.- Resultados admitidos en la certificación de las concentraciones de Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución A.

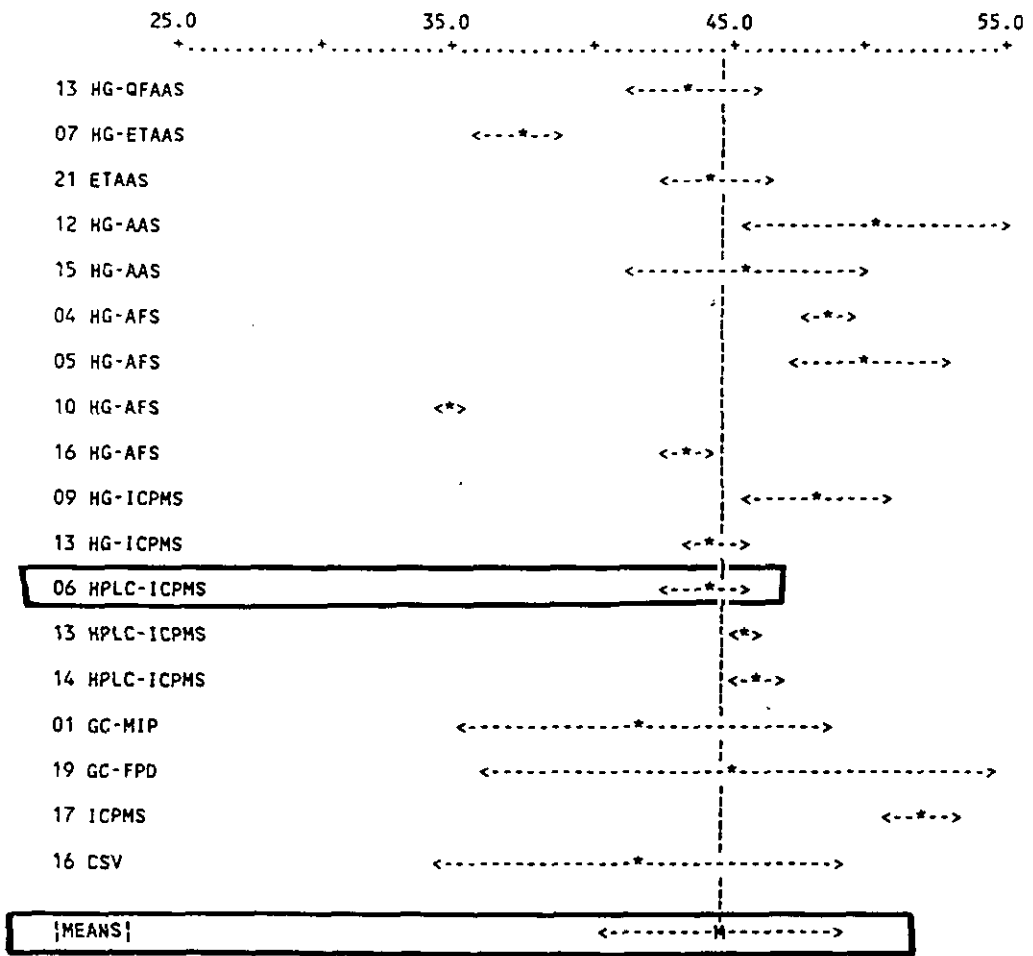
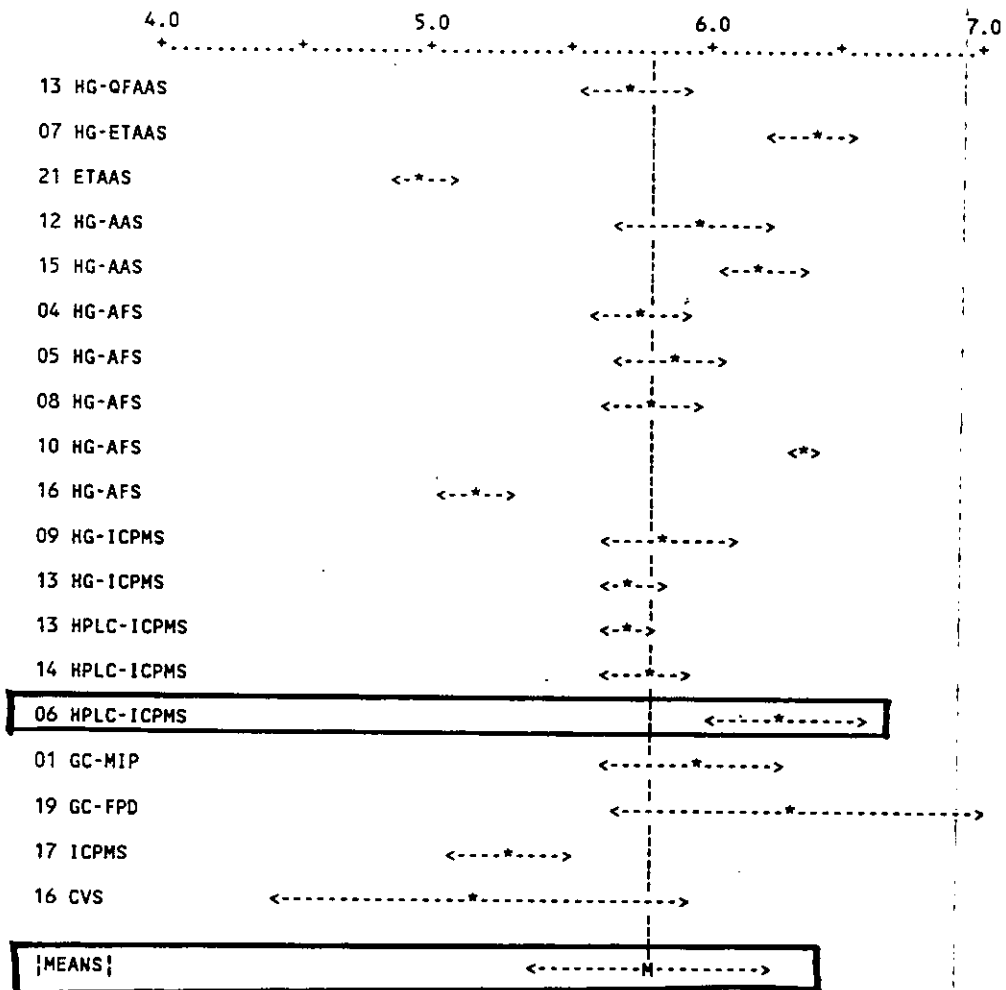


Figura 70.- Resultados admitidos en la certificación de las concentraciones de Se(IV) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.



Intercomparación y certificación

Figura 71.- Resultados admitidos en la certificación de las concentraciones de Se(total) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.

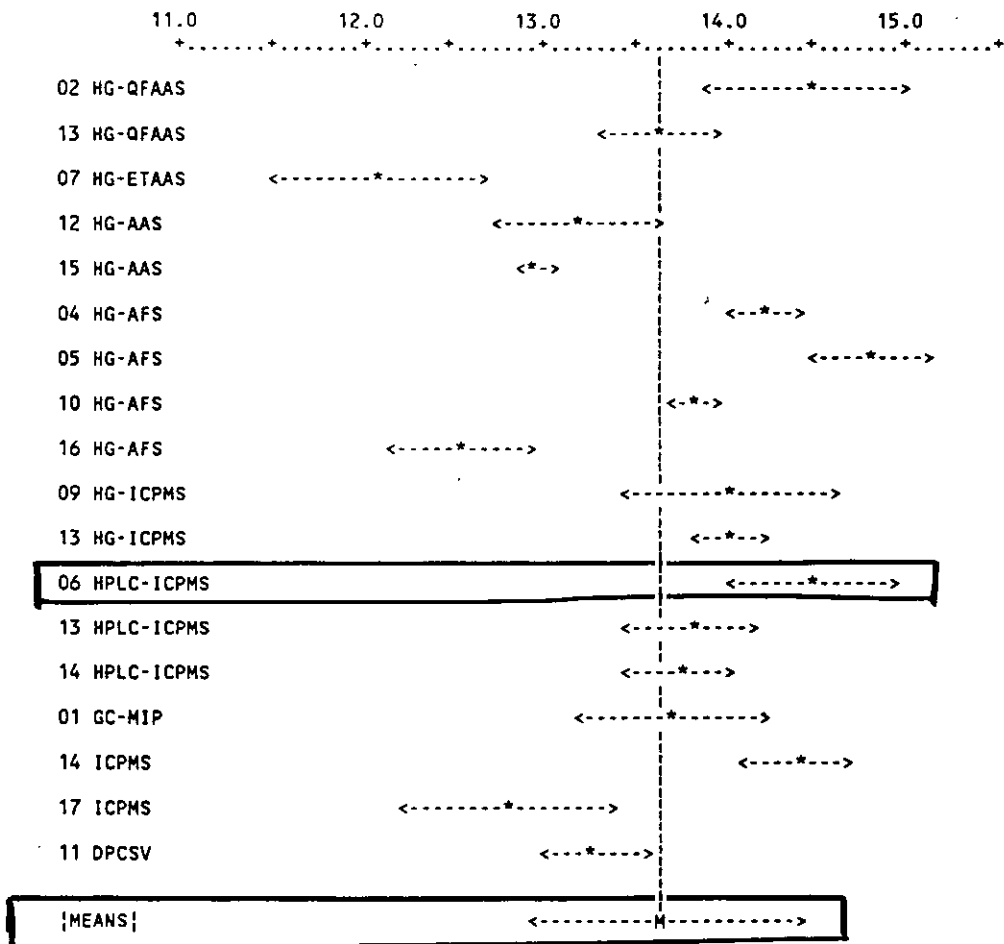
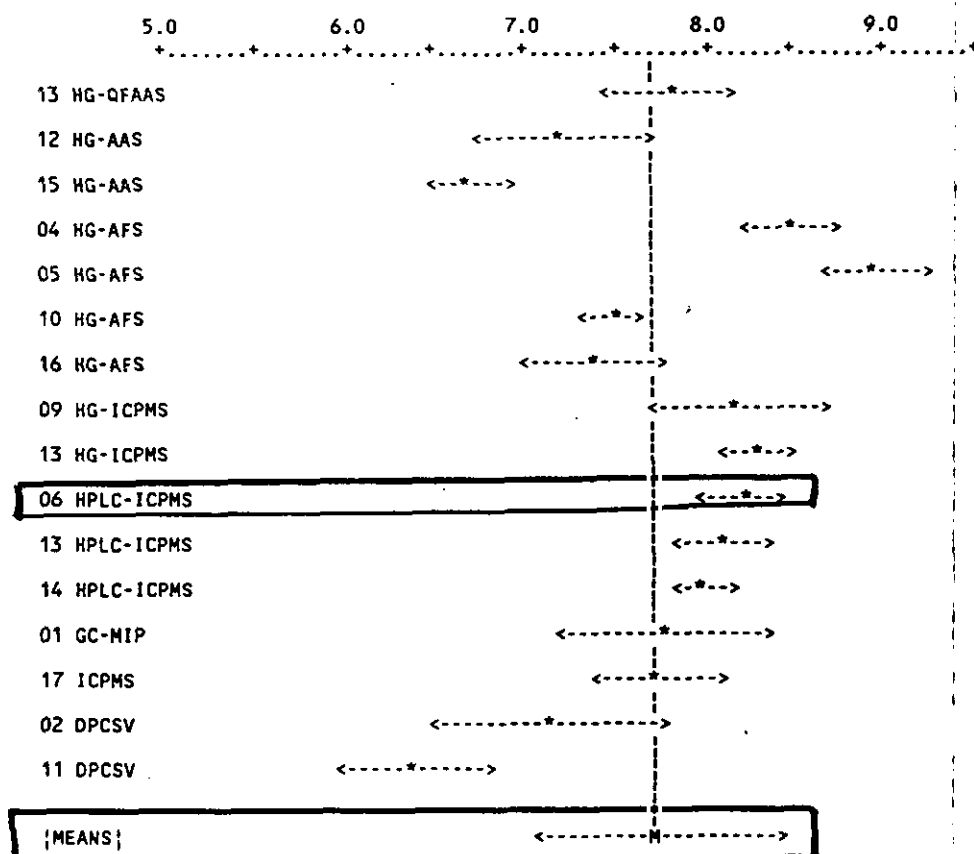


Figura 72.- Resultados admitidos en la certificación de las concentraciones de Se(VI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) y desviaciones típicas obtenidas por los laboratorios en la disolución B.



El coeficiente de variación entre laboratorios para Se(IV) incluyendo todos los resultados en las disoluciones de alta concentración, fue de 31,0% y la media $36.60 \pm 12.28 \mu\text{g L}^{-1}$. Después de eliminarse algunos resultados, el coeficiente de variación disminuyó a 12.60% y la media fue de $37.23 \mu\text{g L}^{-1}$. Se procedió a una segunda selección de resultados obteniéndose una media de $35.33 \pm 2.47 \mu\text{g L}^{-1}$ con un coeficiente de variación del 7,0 %. Este resultado fue

Intercomparación y certificación

plenamente concordante con el preparado de $35.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

Respecto a la concentración de Se(total) en las muestras de alta concentración (A); el coeficiente de variación entre laboratorios resultó ser del 23.2% y la media $85.42 \pm 19.8 \mu\text{g L}^{-1}$, tras la primera selección de resultados el coeficiente de variación disminuyó al 7,6% y la media a $81.39 \pm 6.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Después de una segunda selección de resultados, el coeficiente de variación se redujo al 4.7% resultando la media de $80.65 \pm 3.8 \mu\text{g L}^{-1}$ mientras el valor esperado es $80.0 \mu\text{g L}^{-1}$.

En el caso del Se(VI) (valor indicativo) para las muestras de alta concentración; el coeficiente de variación entre laboratorios fue 21.8 % y la media $46.10 \pm 10.0 \mu\text{g L}^{-1}$, después de una primera selección de resultados, el coeficiente de variación disminuyó a 15.8% siendo la media $44.49 \pm 7.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Una segunda selección de resultados redujo el coeficiente de variación a 9.6% siendo la media $44.82 \pm 4.3 \mu\text{g L}^{-1}$. El valor esperado era de $45.0 \mu\text{g L}^{-1}$.

El coeficiente de variación entre laboratorios, para los resultados de Se(IV) en las muestras de baja concentración, fue 13.2% y la media 5.87 ± 0.8 . La primera selección de resultados disminuyó el coeficiente de variación al 10.3% siendo la media $5.97 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$. Los resultados que se admitieron en la certificación, después de una segunda selección, ofrecieron un coeficiente de variación entre laboratorios de 7.3% y una media de $5.80 \pm 0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ frente a $6.00 \mu\text{g L}^{-1}$, que es el valor esperado.

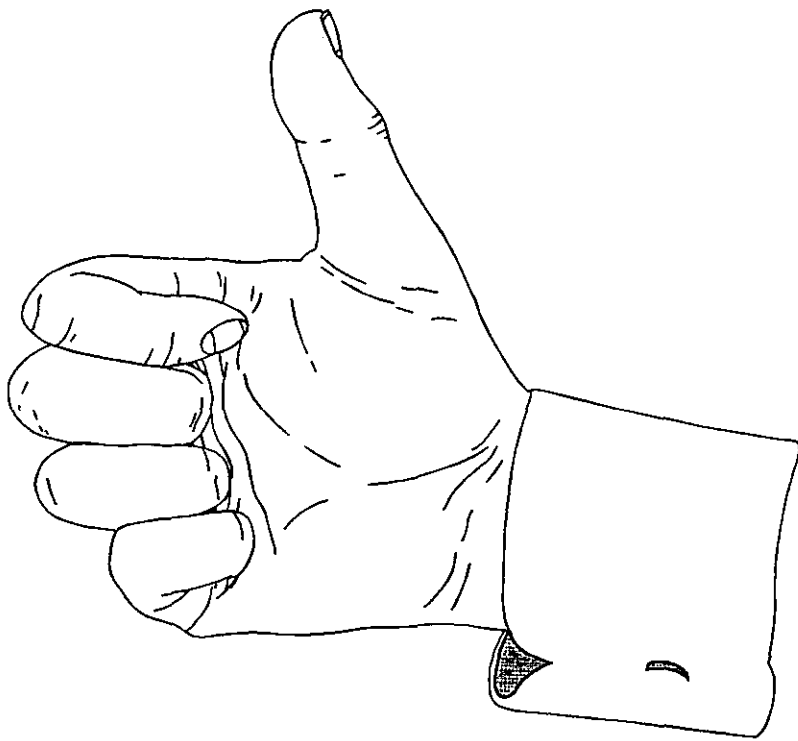
Los resultados facilitados por los laboratorios, para el Se(total) en las muestras de baja concentración, presentaron un coeficiente de variación entre laboratorios de 7.5% y una media de $13.32 \pm 1.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Después de una primera selección

la media resultó $13.42 \pm 0.9 \mu\text{g L}^{-1}$ y el coeficiente de variación 6.9%. El valor medio certificado fue $13.67 \pm 0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ y el coeficiente de variación de 5.4%, mientras el valor esperado era de $14.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

En el caso del Se(VI) (valor indicativo) para las muestras de baja concentración; el coeficiente de variación entre laboratorios fue 11.2 % y la media $7.50 \pm 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$. Después de una primera selección de resultados, el coeficiente de variación no varió (11.2%) siendo la media $7.49 \pm 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$. Una segunda selección de resultados redujo el coeficiente de variación a 8.6% siendo la media $7.72 \pm 0.7 \mu\text{g L}^{-1}$. Este valor fue plenamente concordante con el valor esperado (por preparación) de $8.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

VI.3.- CONCLUSIONES.

- Una vez realizado el primer ejercicio de intercomparación en el que se ponen en evidencia los posibles fuentes de error, se ha conseguido la certificación de los contenidos de Se(IV) y selenio inorgánico total. El contenido de Se(VI) sólo se facilita como valor informativo, obteniendo un resultado que coincide plenamente con el esperado a partir de la preparación de las muestras. Hay que resaltar que todos nuestros resultados han sido admitidos en la certificación del material. Teniendo en cuenta que en esta ocasión hemos analizado de forma independiente el Se(VI) mediante un nuevo procedimiento en el que se ha acoplado el sistema HPLC al generador de hidruros-absorción atómica y que nuestros resultados coinciden con los resultados presentados por otros laboratorios que determinan el Se(VI) por diferencia, empleando otros métodos establecidos, puede deducirse la fiabilidad de nuestro acoplamiento para la determinación diferenciada de las especies de selenio y en consecuencia la validación del método desarrollado.



PARTE D

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1ª.- Se proponen dos métodos para la determinación de selenio inorgánico (Se(IV), Se_T y Se(VI)) en aguas naturales mediante los acoplamientos en línea de reducción asistida por microondas-generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica, en FI y continuo (FI-MO-HG-AAS y continuo-MO-HG-AAS). La determinación diferenciada se realiza con dos inyecciones de la muestra. En la primera, con el módulo de reducción apagado, se determina el Se(IV); en la segunda, con el módulo de reducción de Se(VI) a Se(IV) encendido, se determina Se(total). El contenido de Se(VI) se calcula por diferencia entre el Se(total) y el Se(IV). El límite de detección de 0.7 µg L⁻¹ permite su aplicación a muestras medioambientales. La reducción en línea hace que el método de generación de hidruros sea más selectivo, ya que se reducen considerablemente las interferencias debidas a otros metales.

2ª.- La determinación diferenciada de las especies inorgánicas del selenio, Se(IV) y Se(VI) en aguas naturales, puede abordarse mediante el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta eficacia con columna aniónica (Hamilton PRPX-100), el sistema modular en línea antes descrito: HPLC-MO-HG-AAS; en este caso, con una única inyección pueden determinarse ambos grados de oxidación, con gran sensibilidad y precisión, lo que permite aplicar el método a muestras ambientales. Los límites de detección alcanzados, fueron de 1.4 y 2.2 ng para Se(IV) y Se(VI) respectivamente.

3ª.- Se propone, por primera vez, la descomposición en línea de las especies orgánicas de selenio: selenocistina, selenometionina y trimetilselenio a Se(IV), única forma derivatizable al hidruro correspondiente. La determinación puede llevarse a cabo en el sistema en línea desarrollado con

Conclusiones

dos pasos "en línea" de la muestra a través del horno microondas. En un primer paso de la muestra con $S_2O_8^{2-}$ a través del horno se produce la oxidación cuantitativa de las especies orgánicas de selenio a Se(VI). Después de enfriada la muestra, su introducción en el sistema MO/HCl origina la reducción cuantitativa de Se(VI) a Se(IV). El acoplamiento del cromatógrafo a este tándem en línea "HPLC-MO/oxidación-MO/reducción-HG-AAS" ha permitido desarrollar un método analítico para la especiación de Se(IV), Se(VI) y TMeSe en aguas naturales enriquecidas con estas tres especies. Los límites de detección alcanzados fueron 1.4, 2.2 y 1.1 ng para Se(IV), Se(VI) y TMeSe respectivamente.

4ª.- Se ha desarrollado un sistema de preconcentración de Se(IV) y Se(VI) en microcolumnas de alúmina que permite rebajar considerablemente los límites de detección, del orden de 50 veces, de los procedimientos previamente desarrollados.

5ª.- El método desarrollado mediante el acoplamiento continuo-MO-HG-AAS, se ha aplicado para evaluar la estabilidad del Se(IV) y Se(VI), en función de una serie de parámetros físico-químicos que incluyen, temperatura, pH, naturaleza del ácido, material del contenedor, relación superficie-volumen, presencia de cloruros e incidencia de la luz. Los resultados obtenidos son:

- El Se(VI) se mantiene estable en el tiempo en todas las condiciones ensayadas de Tª, pH, contenedor, Cl^- . La estabilidad del Se(IV) aumenta en presencia de Cl^- , siendo esta especie estable (20 meses) en presencia de 2000 mg L^{-1} de este ión. Las muestras almacenadas a $-20^\circ C$ se mantienen estables en todas las condiciones.

- La acidificación de la muestra a pH=2 con H_2SO_4 ó HCl disminuye la estabilidad del Se(IV) en contenedores de

polietileno; sin embargo en contenedores de teflón la estabilidad aumenta al disminuir el pH.

- La relación superficie del contenedor volumen de muestra es un parámetro importante en la estabilidad del Se(IV). La estabilidad del Se(IV) se alcanza cuando el contenedor está completamente lleno de muestra.

6ª.- Los métodos desarrollados de FI-MO-HG-AAS y HPLC-MO-HG-AAS con y sin precocentración en alúmina, se han validado en la participación en los ejercicios de intercomparación y certificación de Se(IV) y Se(VI) con contenidos del orden 5 y 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ en ambas especies.

7ª.- Se obtiene dos nuevos materiales de referencia N° 602 y N° 603 con valores certificados de Se(IV) y Se(total).

ANEXO

**TABLA I. ESTABILIDAD DE ESPECIES DE SELENIO A (20°C) Y pH=6
EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.8±0.4	9.6±1.2	50.3±0.5	48.1±1.9
1 SEMANA	10.0±0.4	10.8±1.2	49.6±0.4	31.0±1.2
2 SEMANAS	9.0±0.4	11.0±1.2	48.1±0.4	51.0±1.2
1 MES	8.8±0.6	8.8±1.8	50.0±0.4	50.0±1.2
2 MESES	9.5±0.5	10.5±1.5	46.9±0.6	49.7±1.8
6 MESES	5.8±0.5	11.4±1.7	33.9±0.6	50.0±1.8
9 MESES	4.3±0.6	12.4±1.8	25.3±0.4	49.9±1.8
12 MESES	3.3±0.5	12.9±1.5	14.7±0.4	50.7±1.8

**TABLA II. ESTABILIDAD DE ESPECIES DE SELENIO A (20°C) Y
pH=6 EN CONTENEDORES DE TEFLON.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.8±0.4	9.6±1.2	50.3±0.5	47.1±1.9
1 SEMANA	9.7±0.4	10.3±1.2	47.2±0.8	48.5±2.4
2 SEMANAS	8.3±0.4	11.7±1.2	44.7±0.4	53.4±2.4
2 MESES	7.7±0.5	11.4±1.6	43.5±0.4	51.1±1.2
6 MESES	6.8±0.5	12.1±2.1	41.2±0.4	55.9±2.1
9 MESES	3.6±0.4	13.1±1.3	41.2±0.4	59.7±2.1
12 MESES	3.1±0.4	16.1±1.2	41.0±0.7	60.0±2.1

**TABLA III. ESTABILIDAD DE ESPECIES DE SELENIO A (20°C) Y
pH=2 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	9.7±0.4	10.3±1.2	50.4±0.4	48.4±1.2
1 SEMANA	9.6±0.5	10.4±1.5	49.2±0.4	48.5±1.2
2 SEMANAS	10.0±0.4	10.0±1.2	48.6±0.6	49.5±1.5
1 MES	9.4±0.5	9.4±1.5	50.0±0.4	50.0±1.2
2 MESES	8.6±0.4	9.6±1.2	44.3±0.4	50.0±1.2
6 MESES	6.3±0.5	11.6±1.5	20.6±0.7	52.9±2.1
9 MESES	1.5±0.4	10.7±1.2	3.5±0.4	51.1±1.2
12 MESES	0.4±0.4	11.7±1.5	0.4±0.4	51.9±1.2

**TABLA IV. ESTABILIDAD DE ESPECIES DE SELENIO A (20°C) Y
pH=2 EN CONTENEDORES DE TEFLON.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	9.7±0.4	10.3±1.2	50.4±0.4	48.4±1.2
1 SEMANA	9.7±0.6	10.3±1.8	50.0±0.4	49.2±1.2
2 SEMANAS	9.6±0.4	10.4±1.2	49.0±0.4	51.0±1.2
2 MESES	9.1±0.4	9.1±1.2	49.2±0.4	50.0±1.2
6 MESES	7.1±0.9	10.0±2.6	48.5±0.7	50.0±2.1
9 MESES	9.7±0.4	10.1±1.2	49.5±0.5	50.5±1.5
12 MESES	9.6±0.4	10.4±1.2	50.2±0.4	50.8±1.2

TABLA V. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (40°C) Y pH=2 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	10.0±0.4	10.8±1.2	49.9±0.4	49.0±1.2
1 SEMANA	10.0±0.4	10.0±1.2	49.6±0.4	50.4±1.6
2 SEMANAS	10.0±0.4	10.0±1.2	49.0±0.4	47.1±1.2
2 MESES	9.3±0.3	8.6±1.5	48.9±1.1	48.9±3.3
6 MESES	8.8±0.8	11.2±2.4	48.1±0.4	49.4±1.2
9 MESES	8.9±0.4	10.7±1.2	49.3±0.4	50.9±1.2
12 MESES	7.0±0.4	7.5±1.2	47.1±0.4	47.9±1.2

TABLA VI. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (-20°C) Y pH=2 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	10.0±0.4	10.8±1.2	49.9±0.4	49.0±1.2
1 SEMANA	9.3±0.3	10.4±0.9	48.9±0.4	49.6±1.2
2 SEMANAS	9.6±0.4	10.4±1.2	49.1±0.5	49.9±1.5
2 MESES	9.6±0.4	9.7±1.2	47.6±1.5	46.9±3.5
6 MESES	9.3±0.4	10.0±1.2	47.7±0.4	47.7±1.2
9 MESES	9.0±0.4	9.9±1.2	48.6±0.4	48.9±1.2
12 MESES	10.6±0.4	10.7±1.2	48.4±0.4	45.7±1.2

**TABLA VII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C)
Y pH=2 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	10.0±0.4	10.8±1.2	49.9±0.4	49.0±1.2
1 SEMANA	9.6±0.4	10.4±1.2	50.4±0.4	49.2±2.2
2 SEMANAS	10.0±0.4	10.8±1.2	48.1±0.4	50.0±1.6
2 MESES	8.6±0.4	10.4±1.2	41.7±0.4	50.8±1.2
6 MESES	7.0±0.4	11.3±1.5	11.8±0.7	55.8±1.9
9 MESES	1.6±0.4	11.4±1.2	2.4±0.4	55.2±1.9
12 MESES	0.0±0.4	11.7±1.2	0.0±0.4	54.7±1.2

**TABLA VIII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C)
Y pH=6 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.9±0.4	10.8±1.2	49.9±0.4	49.4±1.2
1 SEMANA	10.0±0.6	10.0±1.8	49.6±0.4	48.0±1.2
2 SEMANAS	9.6±0.4	10.4±1.2	48.1±0.4	50.9±1.2
2 MESES	8.1±0.4	10.4±1.2	48.4±0.8	48.4±2.4
6 MESES	8.3±0.4	10.0±1.3	41.2±2.2	51.4±3.0
9 MESES	7.8±0.4	12.2±1.2	39.8±0.4	53.5±1.2
12 MESES	7.1±0.6	12.5±1.8	35.9±0.7	53.9±2.1

**TABLA IX. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (40°C) Y
pH=6 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	9.9±0.4	10.8±1.2	49.9±0.4	49.4±1.2
1 SEMANA	9.6±0.4	10.8±1.2	49.4±0.4	49.8±1.2
2 SEMANAS	10.0±0.4	10.8±1.2	49.0±0.5	50.0±1.5
2 MESES	7.6±0.3	11.3±0.9	42.9±2.3	46.6±3.9
6 MESES	8.3±0.6	10.6±1.8	45.4±0.7	54.9±2.1
9 MESES	7.1±0.6	11.6±1.8	40.9±0.6	57.4±1.8
12 MESES	5.3±0.5	8.7±1.5	36.9±0.5	53.9±2.0

**TABLA X. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (-20°C) Y
pH=6 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	9.9±0.4	10.8±1.2	49.9±0.4	49.4±1.2
1 SEMANA	9.3±0.4	10.7±1.2	48.3±0.4	48.5±1.6
2 SEMANAS	9.5±0.4	10.5±1.2	48.5±0.5	47.6±1.2
2 MESES	9.0±0.6	10.3±1.8	48.3±0.8	48.4±2.4
6 MESES	9.6±0.3	10.1±1.9	49.7±0.4	48.5±2.0
9 MESES	9.2±0.4	10.0±1.2	48.9±0.4	50.8±1.2
12 MESES	9.4±0.4	11.4±1.2	49.8±0.9	51.4±2.7

**TABLA XI. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (-20°C)
Y pH=6 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.8±0.4	9.6±1.2	50.3±0.5	48.1±1.9
1 SEMANA	9.3±0.4	10.0±1.2	49.2±0.8	50.8±2.4
2 SEMANAS	9.6±0.4	10.4±1.2	48.6±0.4	51.4±1.2
2 MESES	9.6±0.4	8.9±1.2	49.2±0.4	50.0±1.2
6 MESES	9.2±0.4	10.0±1.2	47.4±0.4	50.0±1.8
9 MESES	9.2±0.4	11.0±1.2	47.8±0.4	49.0±1.2
12 MESES	9.5±0.4	10.8±1.2	49.3±0.5	54.5±1.2

**TABLA XII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (40°C)
Y pH=6 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.8±0.4	9.6±1.2	50.3±0.5	48.1±1.9
1 SEMANA	9.6±0.4	9.6±1.2	48.8±0.4	47.3±2.0
2 SEMANAS	9.6±0.4	10.4±1.2	48.0±0.4	51.0±1.2
2 MESES	8.6±0.4	10.0±1.2	46.9±0.4	50.0±1.2
6 MESES	7.5±0.6	12.5±1.8	44.2±0.6	50.6±2.7
9 MESES	4.7±0.4	13.7±1.2	39.1±0.8	58.7±2.6
12 MESES	5.2±0.8	7.9±2.4	39.4±0.4	54.5±2.0

TABLA XIII.- ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (-20°C) Y pH=2 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	9.7±0.4	10.3±1.2	50.4±0.4	48.4±1.2
1 SEMANA	9.6±0.4	10.4±1.2	49.6±0.4	46.3±1.2
2 SEMANAS	10.0±0.4	10.0±1.2	50.0±0.4	50.0±1.2
2 MESES	9.6±0.4	9.6±1.2	48.5±0.4	45.9±1.2
6 MESES	9.6±0.4	9.6±1.2	48.3±0.4	49.2±2.4
9 MESES	9.2±0.4	9.8±1.2	48.9±0.8	49.5±3.2
12 MESES	10.0±0.4	9.5±1.2	50.3±0.4	51.1±3.6

TABLA XIV. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (40°C) Y pH=2 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.

CONCENTRACIÓN INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	9.7±0.4	10.3±1.2	50.4±0.4	48.4±1.2
1 SEMANA	9.6±0.4	9.6±1.2	49.2±0.4	49.2±1.2
2 SEMANAS	10.0±0.4	10.0±1.2	49.6±0.4	48.5±2.4
2 MESES	9.6±0.4	10.4±1.2	50.0±0.6	50.0±1.8
6 MESES	8.8±0.8	10.0±1.8	47.5±0.6	49.7±1.8
9 MESES	8.8±0.8	9.9±2.4	46.3±0.4	49.7±1.8
12 MESES	5.4±0.4	7.5±1.2	47.3±0.4	48.7±1.8

**TABLA XV. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C),
LUZ Y pH=2 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

TIEMPO	pH=2		pH=2, 100 mg L ⁻¹ Cl ⁻	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	50.4±0.4	48.4±1.2	49.9±0.4	48.9±1.2
1 SEMANA	48.5±0.4	48.5±0.4	49.6±0.4	48.9±1.2
2 SEMANAS	47.5±0.4	50.5±1.2	49.1±0.4	48.2±1.2
1 MBS	50.0±0.4	50.4±1.6	50.0±1.7	46.4±3.0

**TABLA XVI. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C),
LUZ Y pH=6 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

TIEMPO	pH=6		pH=6, 100 mg L ⁻¹ Cl ⁻	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
1 DÍA	50.3±0.5	48.1±1.9	49.9±0.4	49.4±1.2
1 SEMANA	48.9±0.4	49.6±1.2	48.9±0.4	49.6±1.2
2 SEMANAS	48.0±0.4	51.0±1.2	48.5±0.5	50.5±1.5
1 MBS	48.2±0.8	51.8±2.4	49.5±0.5	50.5±1.5

**TABLA XVII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A
(20°C), pH=6 CON 100 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE
POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.4±0.3	10.0±0.9	46.0±0.4	44.9±1.5
2 MESES	9.0±0.4	11.0±1.2	45.0±0.4	45.9±2.0
4 MESES	9.4±0.4	8.3±1.2	42.9±0.4	46.2±1.2
7 MESES	7.7±0.4	12.3±1.2	37.0±0.4	51.4±1.2
9 MESES	8.2±0.4	9.1±1.2	31.3±0.4	52.1±2.0
10.5 MESES	8.6±0.5	11.4±1.5	30.1±0.5	52.7±1.5
12 MESES	5.0±0.4	14.1±1.2	25.8±0.4	59.1±1.2

**TABLA XVIII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A
(20°C), pH=2 (HCl) EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	10.0±0.3	10.0±0.9	49.1±0.3	47.5±0.9
2 MESES	10.0±0.4	9.2±1.2	48.8±0.4	48.0±1.2
4 MESES	8.2±0.4	10.8±1.2	8.5±0.4	57.3±1.2
7 MESES	2.7±0.4	9.6±1.2	0.0±0.4	63.2±1.2
9 MESES	1.0±0.4	9.0±1.2	5.0±0.4	53.7±1.2
10.5 MESES	3.2±0.5	11.5±1.5	2.7±0.5	51.7±1.2
12 MESES	1.3±0.4	10.0±1.2	0.4±0.4	54.6±1.2

**TABLA XIX. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C),
pH=6 CON 500 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.1±0.3	10.1±0.9	47.2±0.4	43.6±1.7
2 MESES	9.2±0.4	10.0±1.2	45.9±0.4	48.3±1.2
4 MESES	9.6±0.4	10.4±1.2	45.1±0.4	48.8±1.2
7 MESES	8.6±0.4	8.6±1.2	45.7±0.4	53.0±1.2
9 MESES	8.0±0.4	8.0±1.2	43.8±0.4	52.1±1.2
10.5 MESES	8.1±0.4	10.3±1.5	39.9±0.4	50.5±1.5
12 MESES	5.5±0.4	7.3±1.2	36.8±0.5	50.5±1.2

**TABLA XX. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C),
pH=6 CON 5000 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.6±0.3	9.6±0.9	48.5±0.4	51.5±1.2
2 MESES	9.6±0.4	9.6±1.2	46.7±0.4	49.3±1.2
4 MESES	9.6±0.4	10.4±1.2	47.0±0.4	48.0±1.2
7 MESES	3.6±0.4	16.4±1.2	44.5±0.4	50.7±1.2
9 MESES	3.5±0.4	14.5±1.2	44.4±0.4	48.2±1.2
10.5 MESES	4.8±0.5	14.2±1.5	41.3±0.5	53.3±1.5
12 MESES	3.3±0.4	13.8±1.2	38.1±0.3	51.9±0.9

TABLA XXI. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C),
pH=6 CON 1000 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.7±0.3	10.3±0.9	49.5±0.4	48.7±1.2
2 MESES	9.6±0.4	9.6±1.2	44.0±0.4	48.8±1.2
4 MESES	9.5±0.4	10.2±1.2	43.0±0.4	50.5±1.2
7 MESES	7.7±0.4	12.3±1.2	38.3±0.4	43.5±1.2
9 MESES	6.2±0.4	8.1±1.2	37.7±0.4	49.1±1.2
10.5 MESES	6.6±0.4	8.6±1.2	36.7±0.5	50.5±1.5
12 MESES	6.2±0.4	8.1±1.2	33.3±0.4	51.0±1.2

TABLA XXII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A
(20°C), pH=6 CON 3000 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE
POLIETILENO.

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.0±0.3	9.5±0.9	48.5±0.4	51.5±2.0
2 MESES	8.5±0.4	8.5±1.2	46.4±0.4	48.8±1.2
4 MESES	9.6±0.4	8.4±1.2	47.0±0.4	47.0±1.2
7 MESES	7.3±0.4	7.3±1.4	42.4±0.4	51.3±1.2
9 MESES	6.0±0.4	7.0±1.2	45.3±0.4	51.0±1.2
10.5 MESES	8.1±0.5	9.0±1.5	41.3±0.5	53.3±1.5
12 MESES	6.5±0.4	9.5±1.2	39.2±0.4	58.7±1.2

**TABLA XXIII. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A
(20°C), pH=6 CON 2000 mg L⁻¹ Cl⁻ EN CONTENEDORES DE
POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.5±0.3	10.5±0.9	50.8±0.4	48.5±1.2
2 MESES	9.6±0.4	9.6±0.4	46.8±0.4	47.6±1.2
4 MESES	10.0±0.4	12.1±1.2	49.6±0.4	46.4±1.2
7 MESES	9.6±0.4	9.6±1.2	48.9±0.4	47.8±1.2
9 MESES	7.5±0.4	9.6±1.2	46.5±0.4	47.8±1.2
10.5 MESES	9.5±0.5	11.2±1.5	42.0±0.5	46.3±1.5
12 MESES	7.1±0.4	9.1±1.2	39.7±0.4	53.4±1.2

**TABLA XXIV. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A
(20°C), pH=6 EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.**

CONCENTRACION INICIAL	10 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIEMPO				
1 DÍA	9.6±0.3	9.6±0.9	46.0±0.4	44.9±1.9
2 MESES	9.2±0.4	10.0±1.2	42.9±0.4	46.6±1.2
4 MESES	9.6±0.4	10.4±1.2	41.0±0.4	46.6±1.2
7 MESES	3.8±0.4	8.4±1.2	35.8±0.4	55.6±1.2
9 MESES	4.3±0.4	8.6±1.2	39.8±0.4	46.6±1.2
10.5 MESES	3.8±0.5	11.2±1.5	37.0±0.5	48.4±1.5
12 MESES	2.2±0.4	9.3±1.2	35.5±0.5	51.2±2.0

TABLA XXV. ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE SELENIO A (20°C),
pH=6 EN AGUA DE MAR EN CONTENEDORES DE POLIETILENO.

CONCENTRACION INICIAL	10 $\mu\text{g L}^{-1}$		50 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
TIMPO				
1 DÍA	10.4 \pm 0.3	11.2 \pm 0.9	50.4 \pm 0.5	47.4 \pm 2.0
2 MESES	9.0 \pm 0.4	11.0 \pm 1.2	49.3 \pm 0.5	49.4 \pm 1.5
4 MESES	10.0 \pm 0.4	10.4 \pm 1.2	49.5 \pm 0.4	50.5 \pm 2.0
7 MESES	9.9 \pm 0.4	10.0 \pm 1.2	48.1 \pm 0.4	47.7 \pm 1.2
9 MESES	8.8 \pm 0.4	8.8 \pm 1.2	45.2 \pm 0.4	37.1 \pm 1.2
10.5 MESES	8.0 \pm 0.5	9.5 \pm 1.5	41.8 \pm 0.5	47.2 \pm 1.5
12 MESES	7.0 \pm 0.4	9.5 \pm 1.5	43.3 \pm 0.4	51.5 \pm 1.6

FIGURA 1

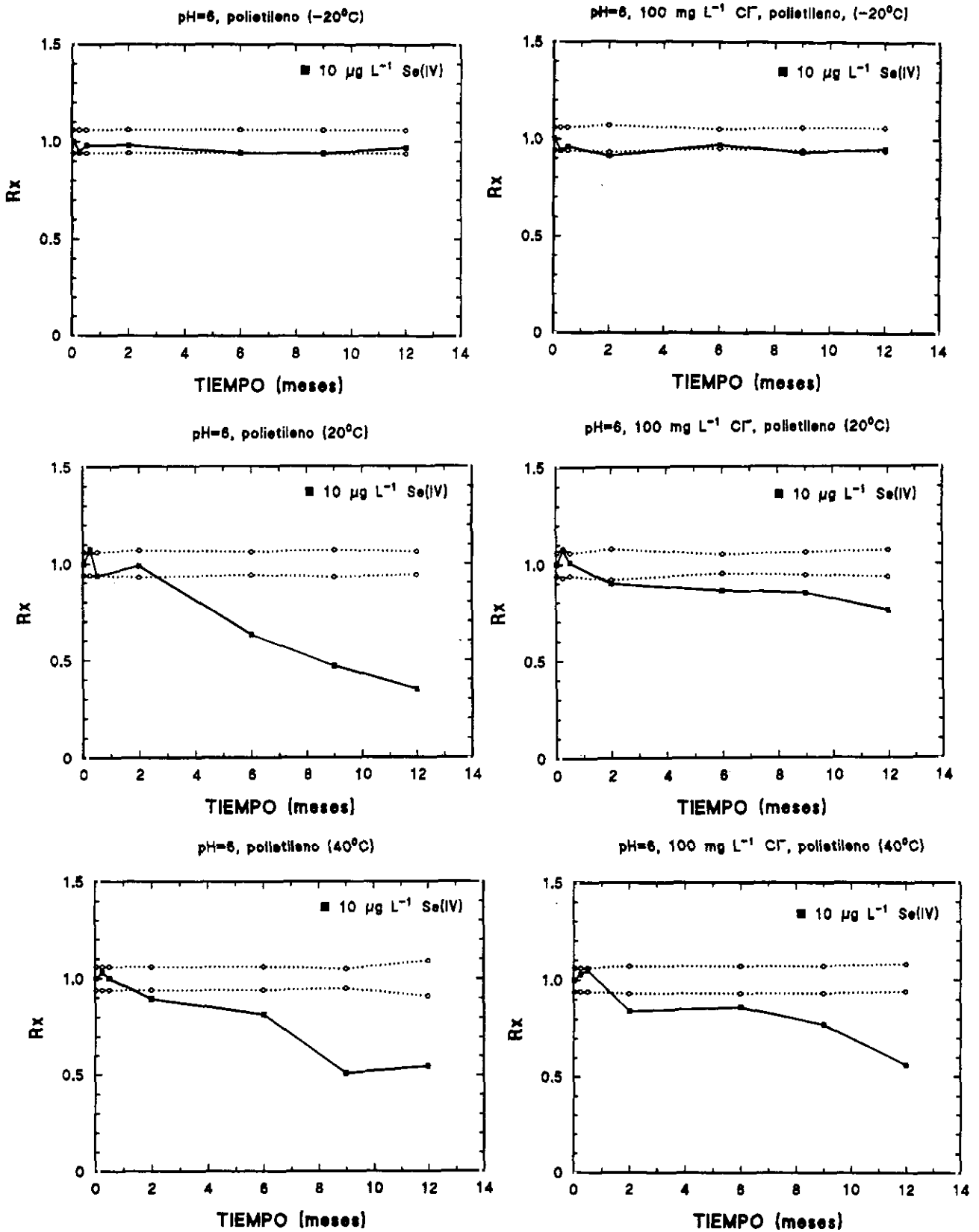


FIGURA 2

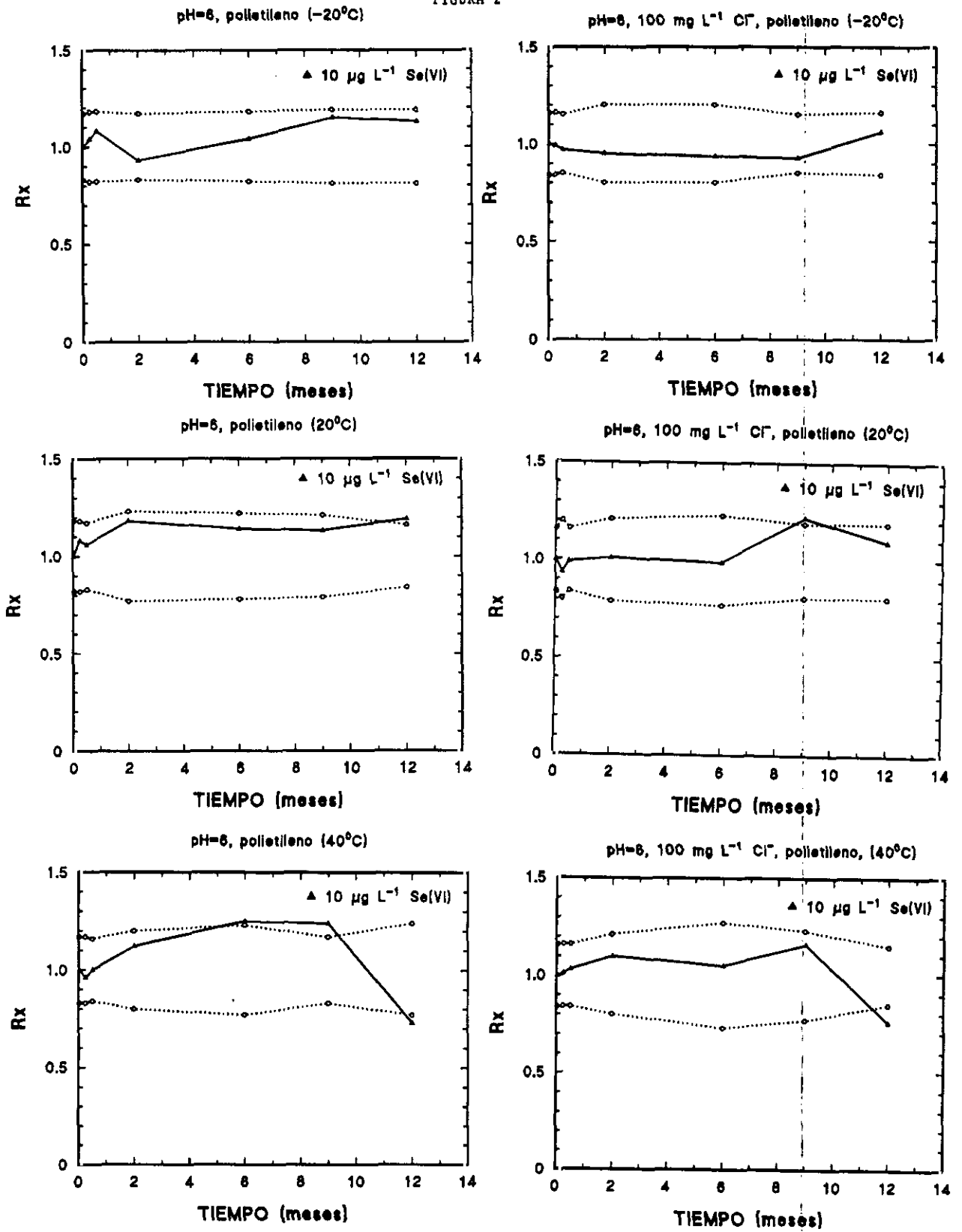


FIGURA 3

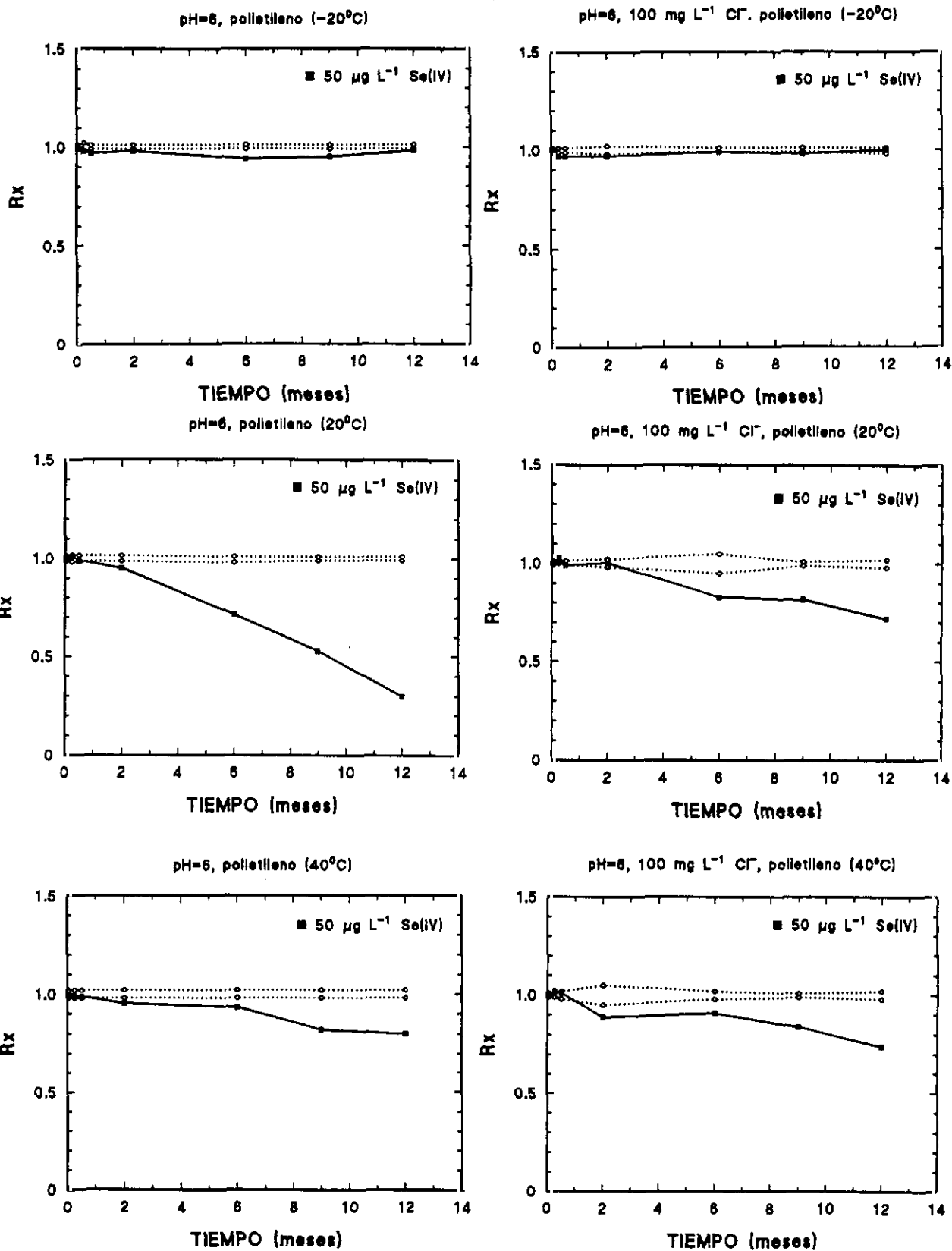


FIGURA 4

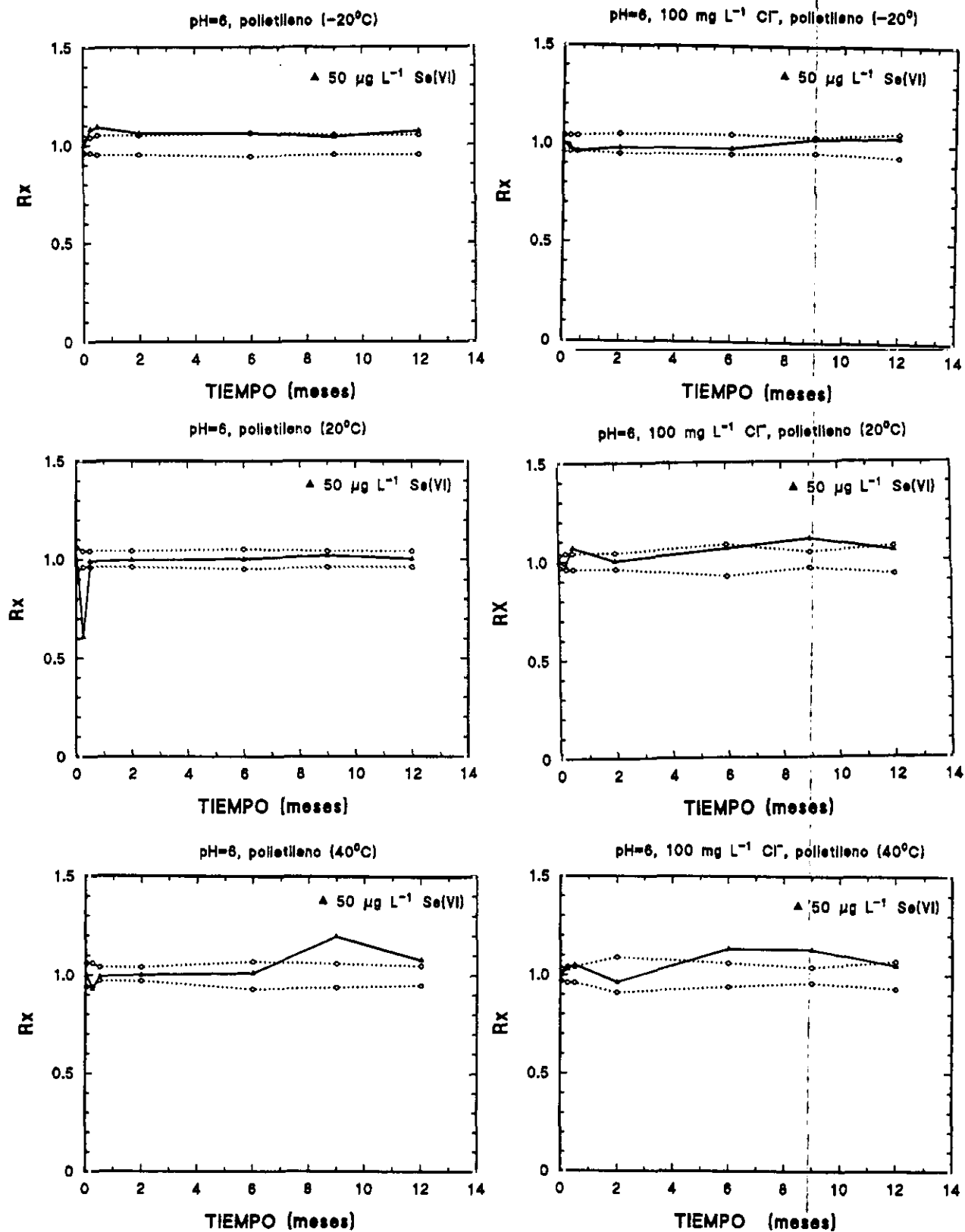


FIGURA 5

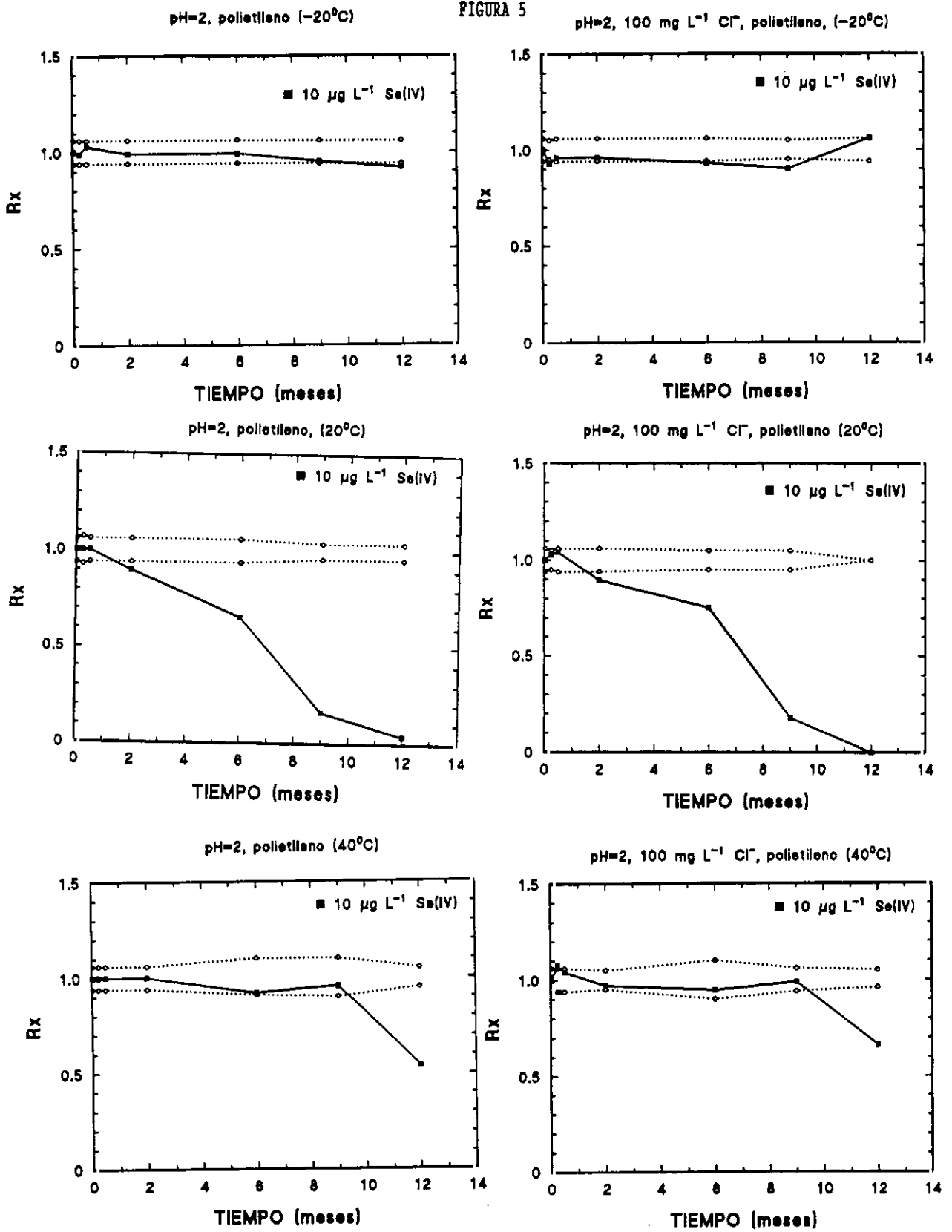


FIGURA 6

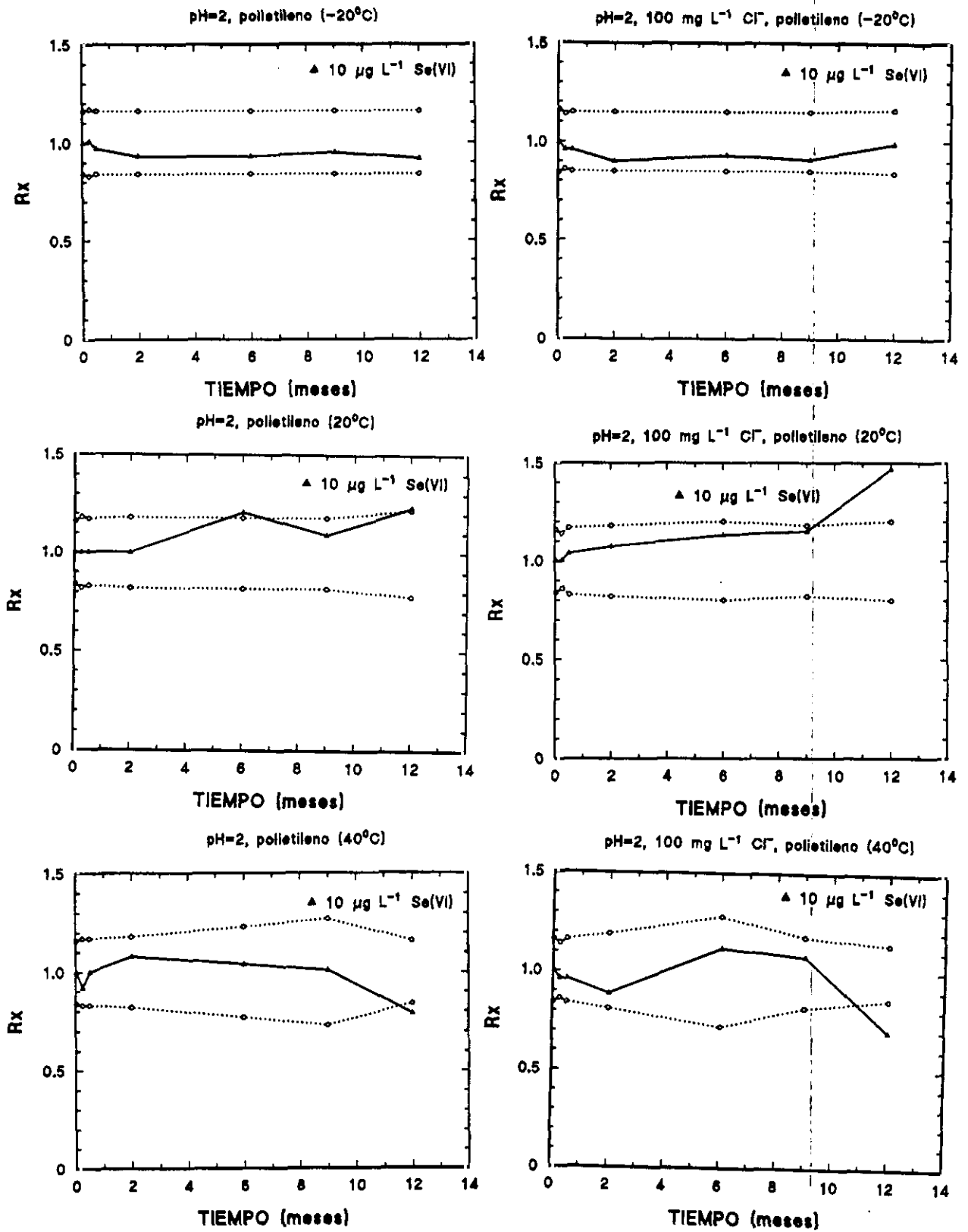


FIGURA 7

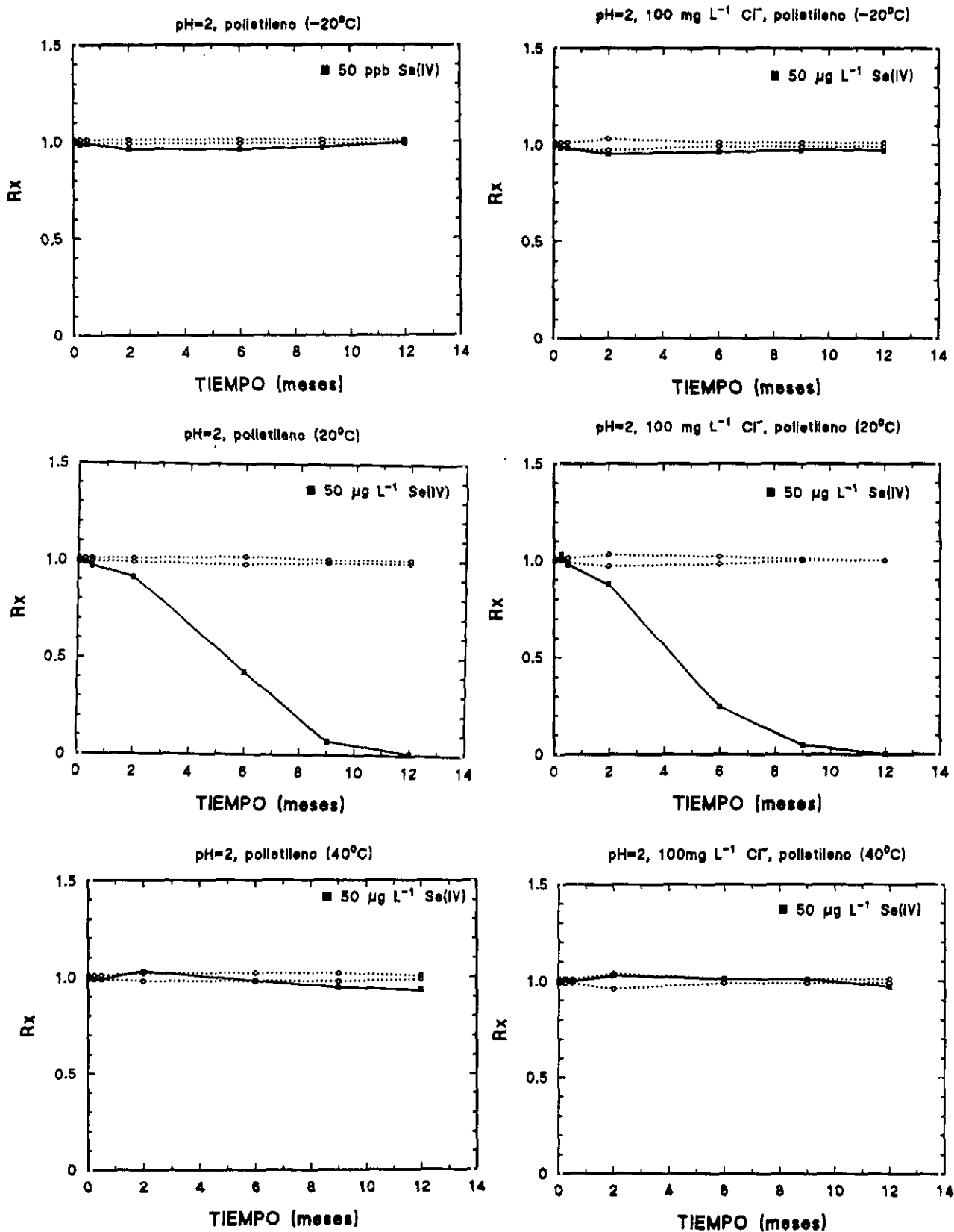


FIGURA 8

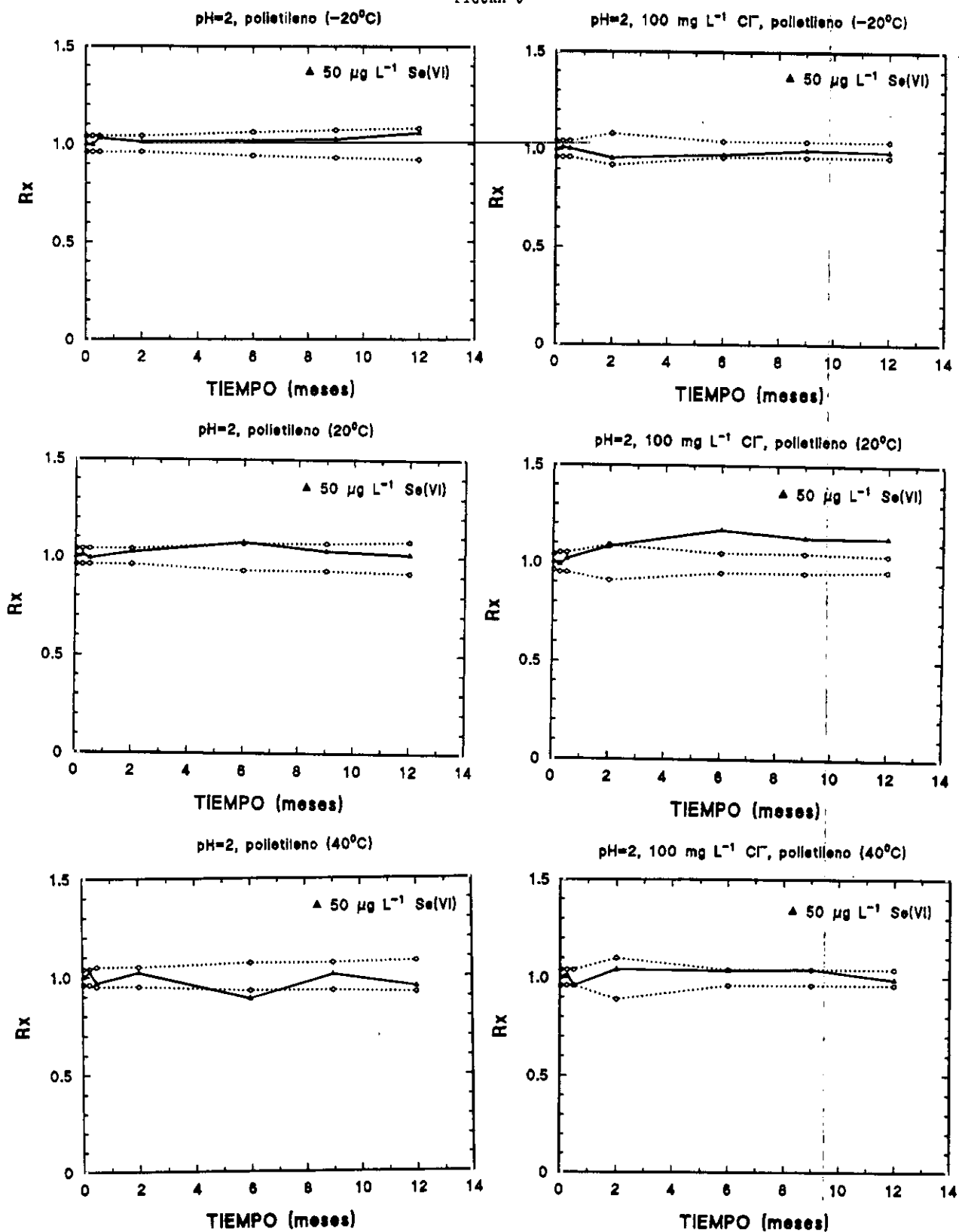


FIGURA 9

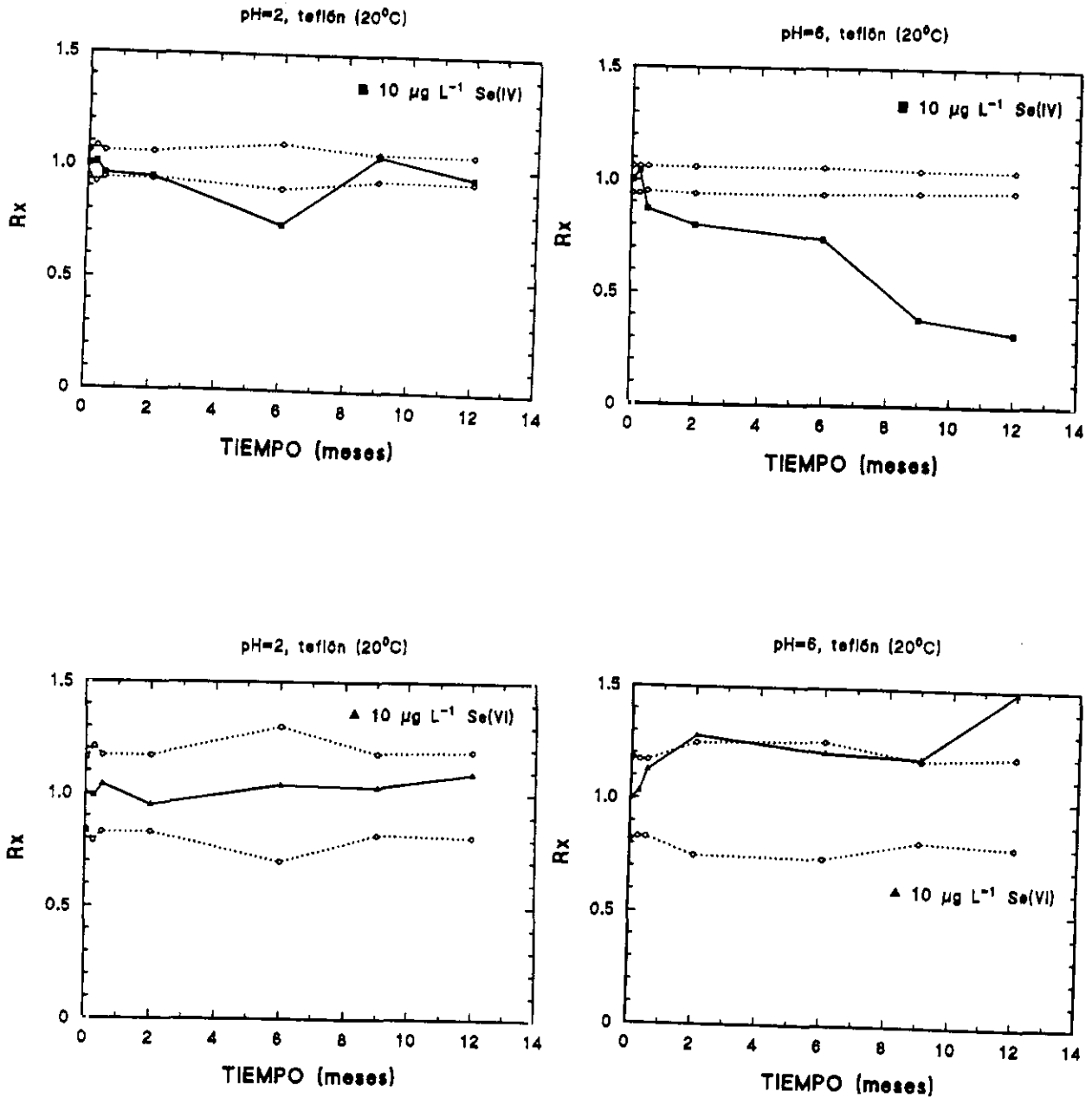


FIGURA 10

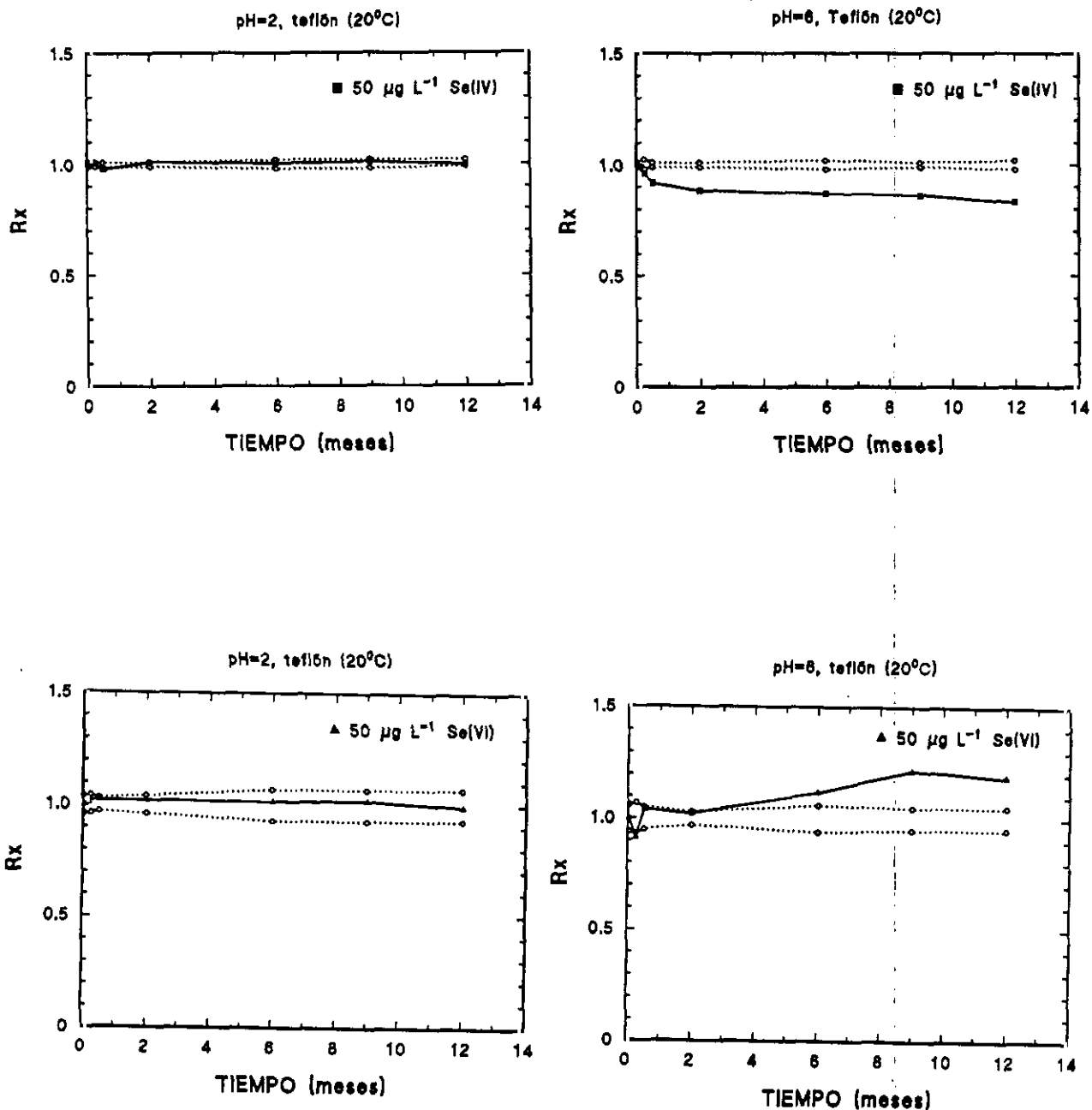


FIGURA 11

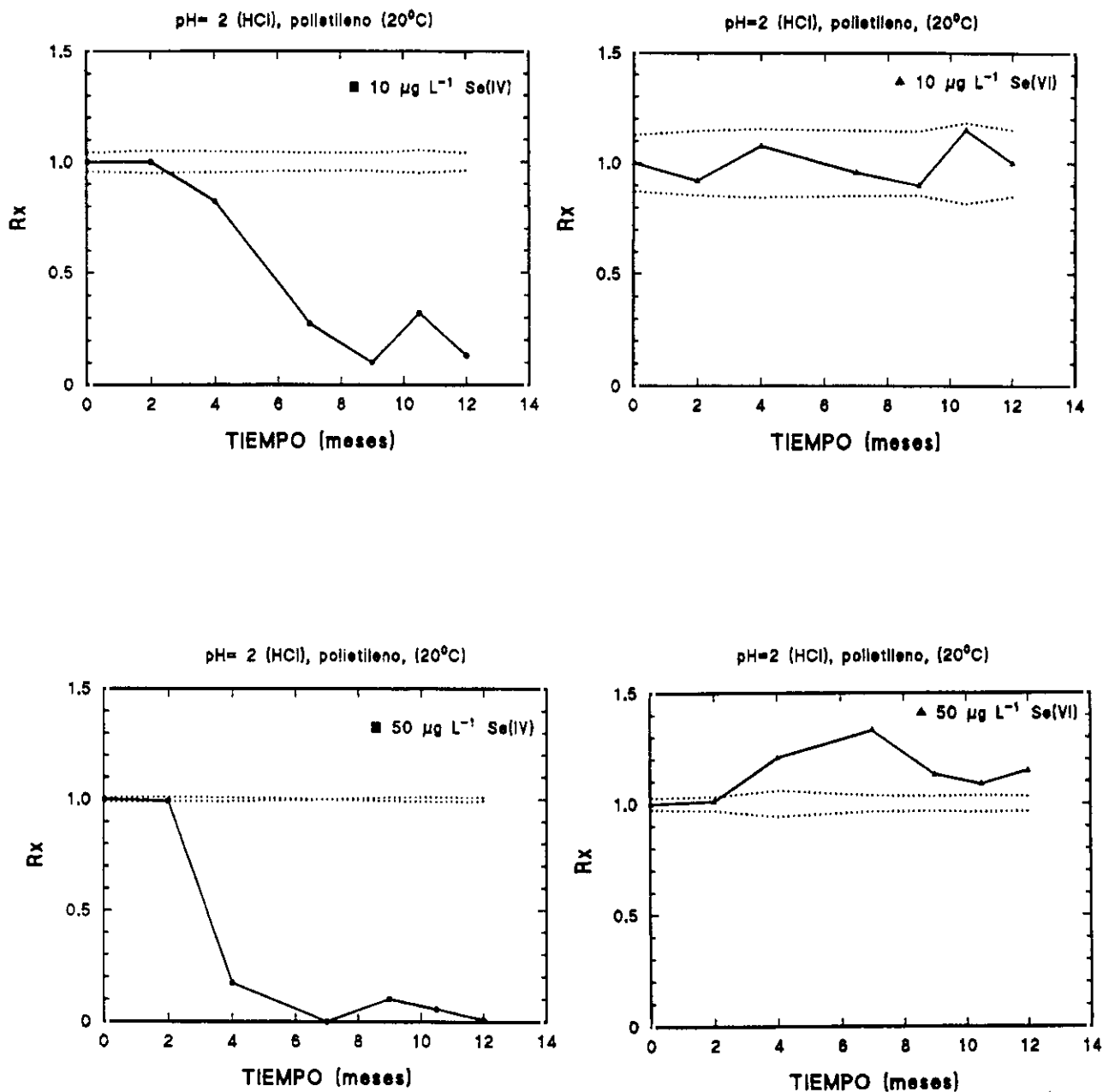


FIGURA 12

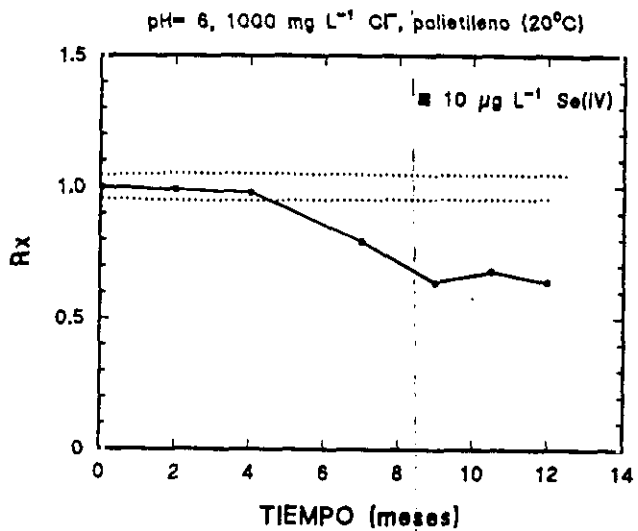
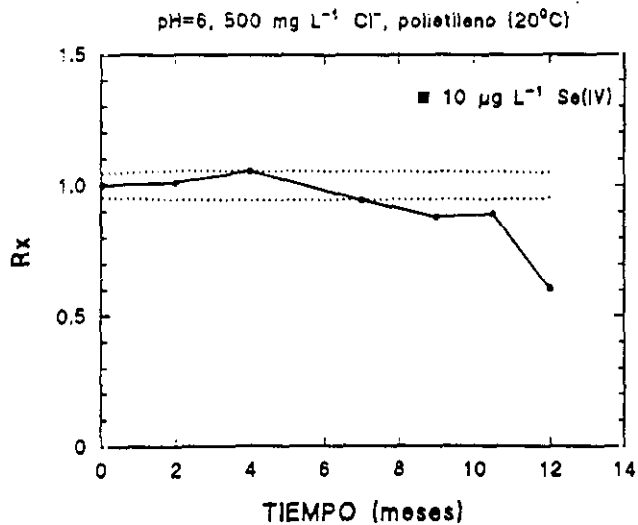
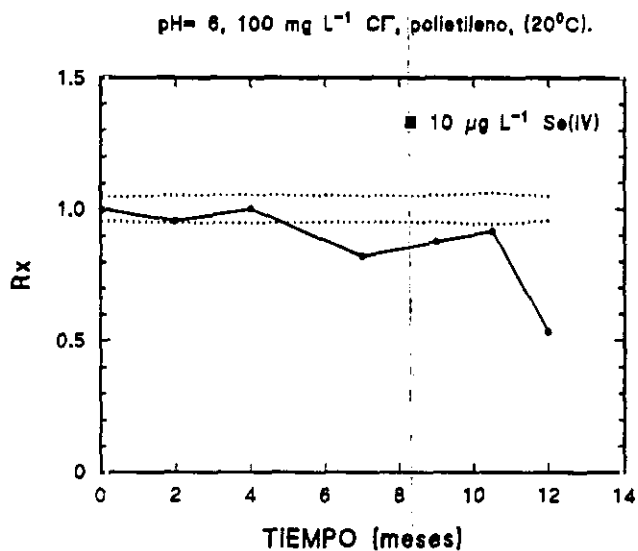
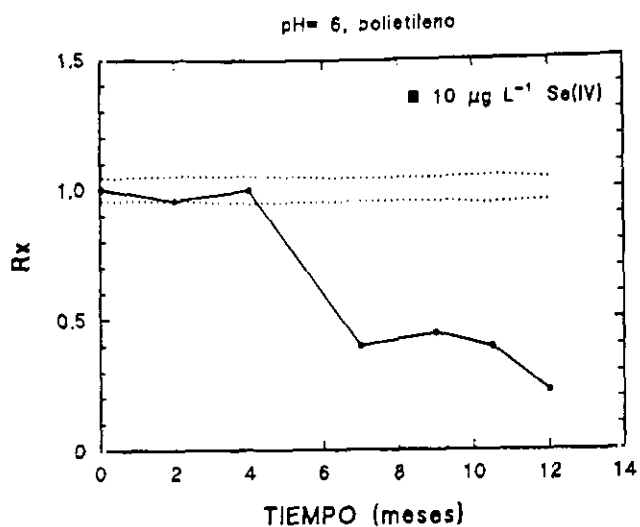
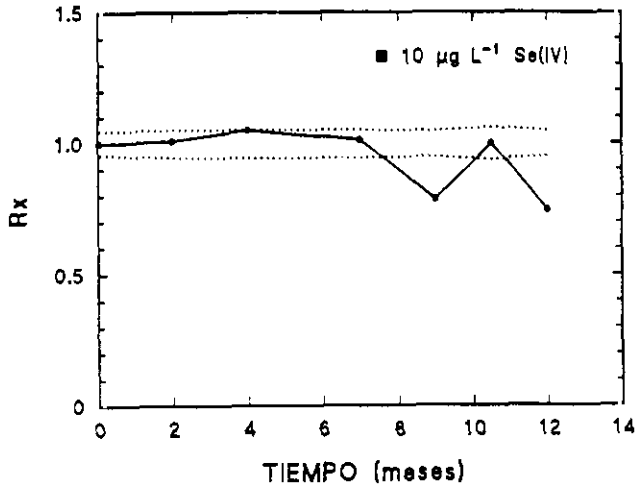
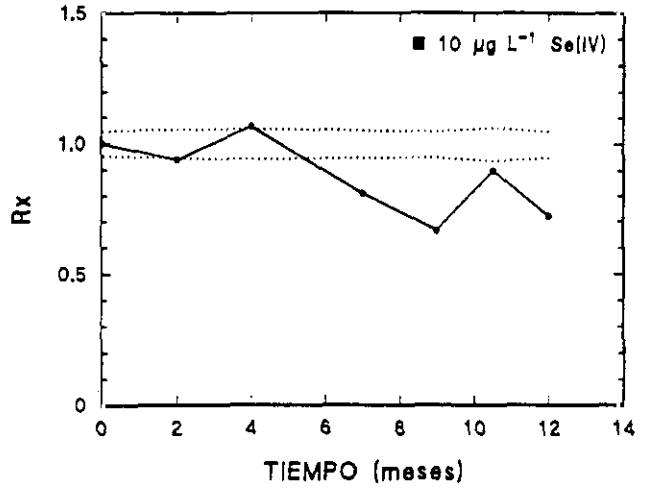


FIGURA 12 (continuación)

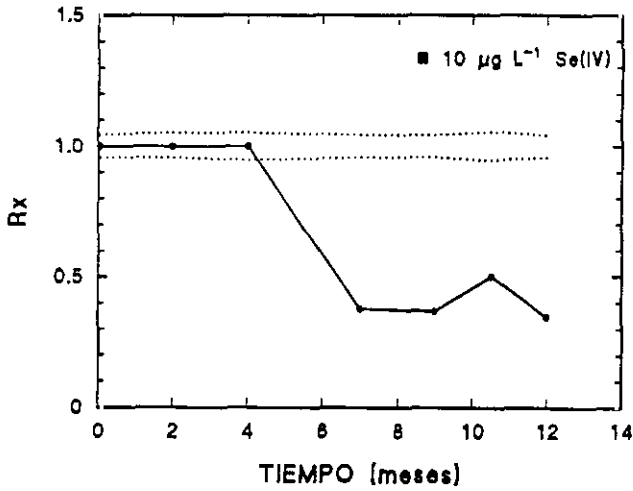
pH= 6, 2000 mg L⁻¹ Cl⁻, polietileno (20°C)



pH= 6, 3000 mg L⁻¹ Cl⁻, polietileno (20°C)



pH= 6, 5000 mg L⁻¹ Cl⁻, polietileno, (20°C).



Agua de mar, polietileno (20°C)

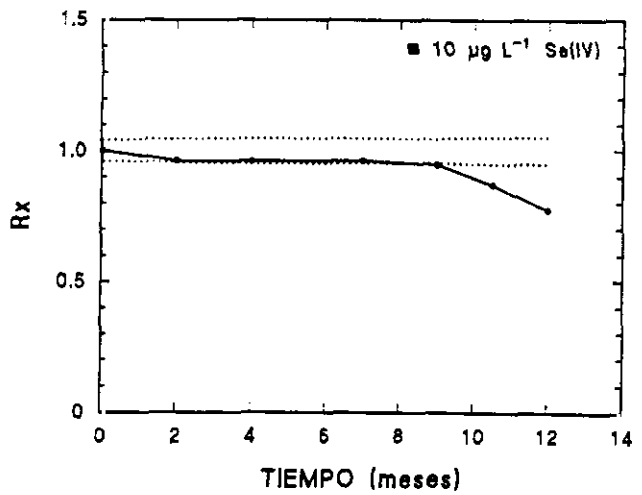


FIGURA 13

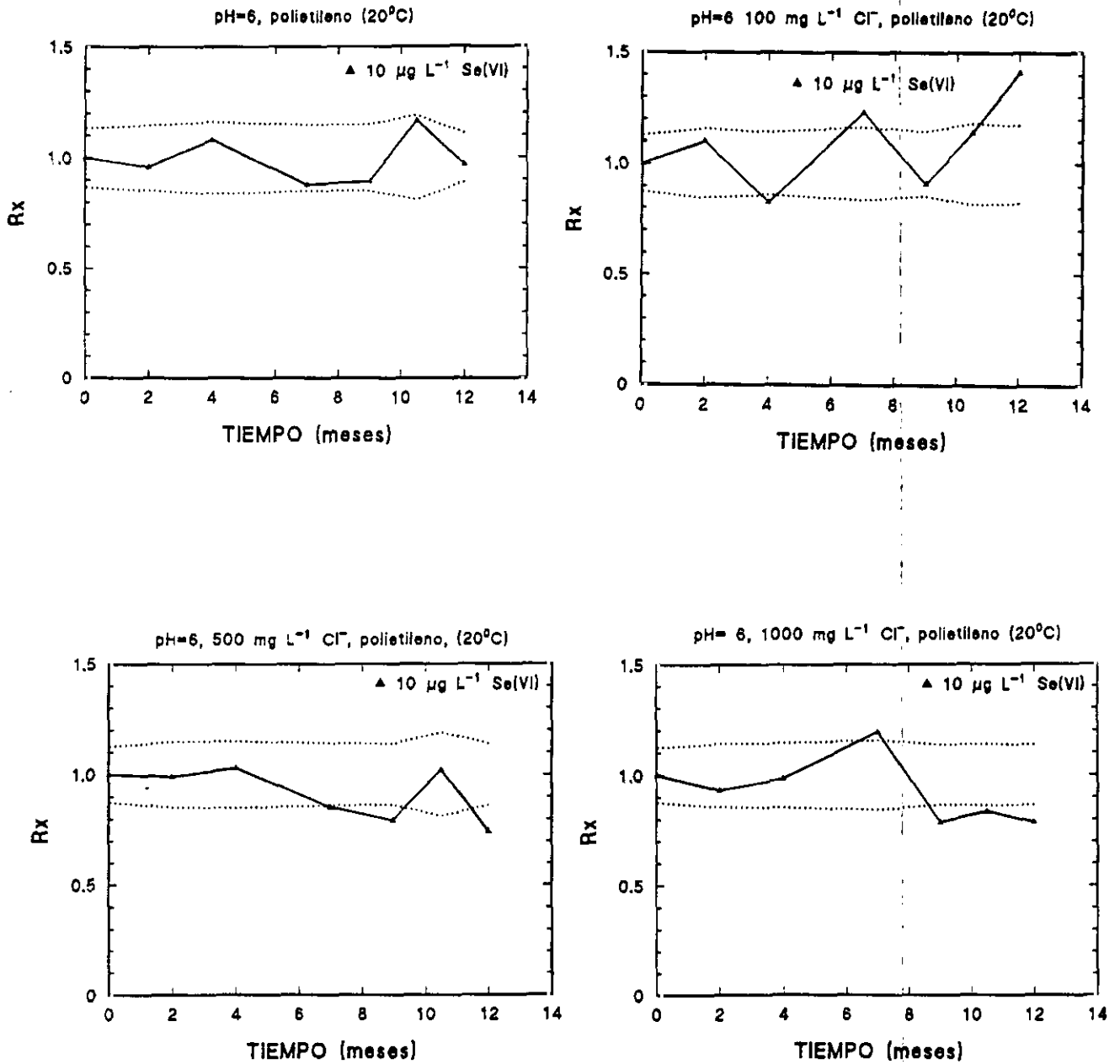
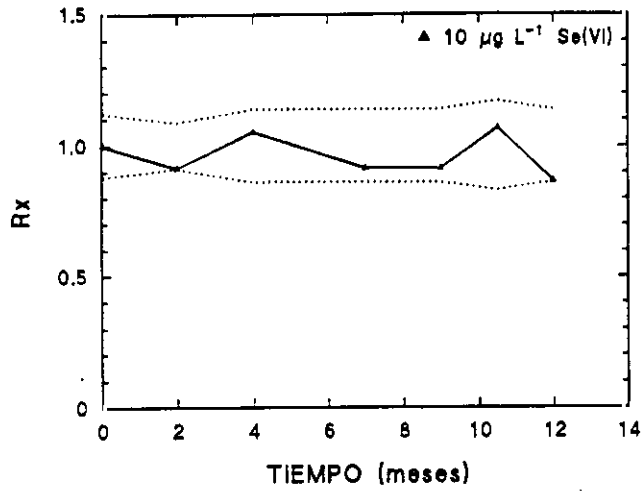
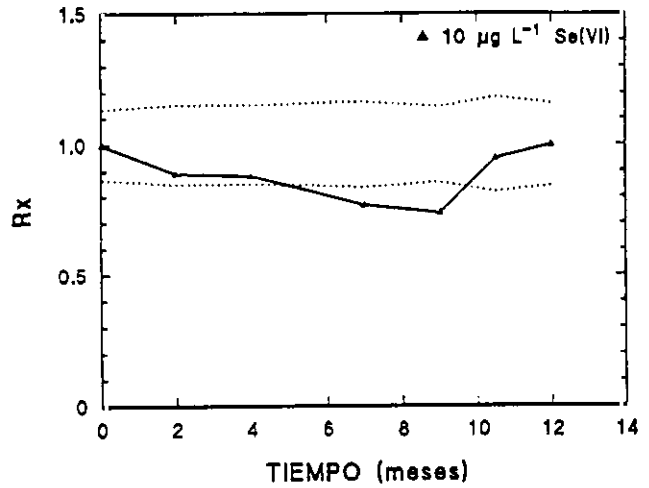


FIGURA 13 (continuación)

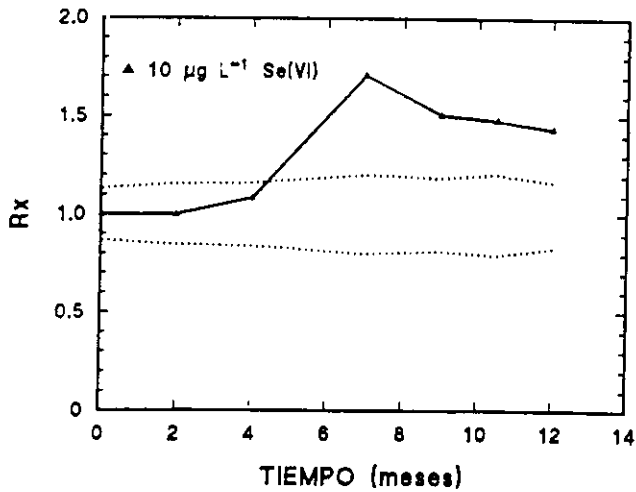
pH=6, 2000 mg L⁻¹ Cl⁻, polietileno, (20°C)



pH= 6, 3000 mg L⁻¹ Cl⁻, polietileno (20°C)



pH=6, 5000 mg L⁻¹ Cl⁻, polietileno (20°C)



Agua de mar, polietileno (20°C)

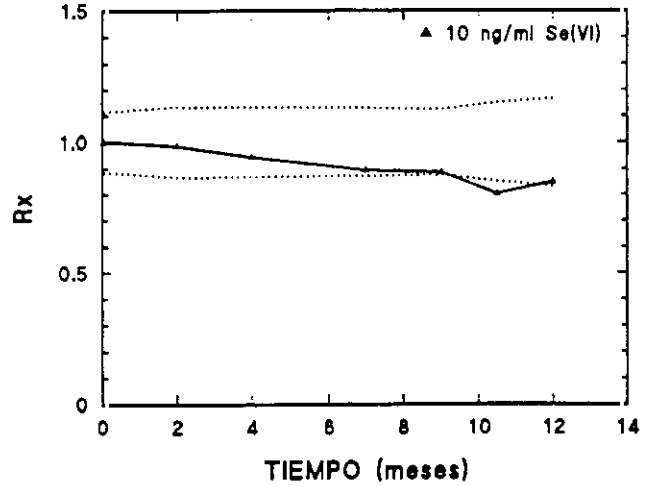


FIGURA 14

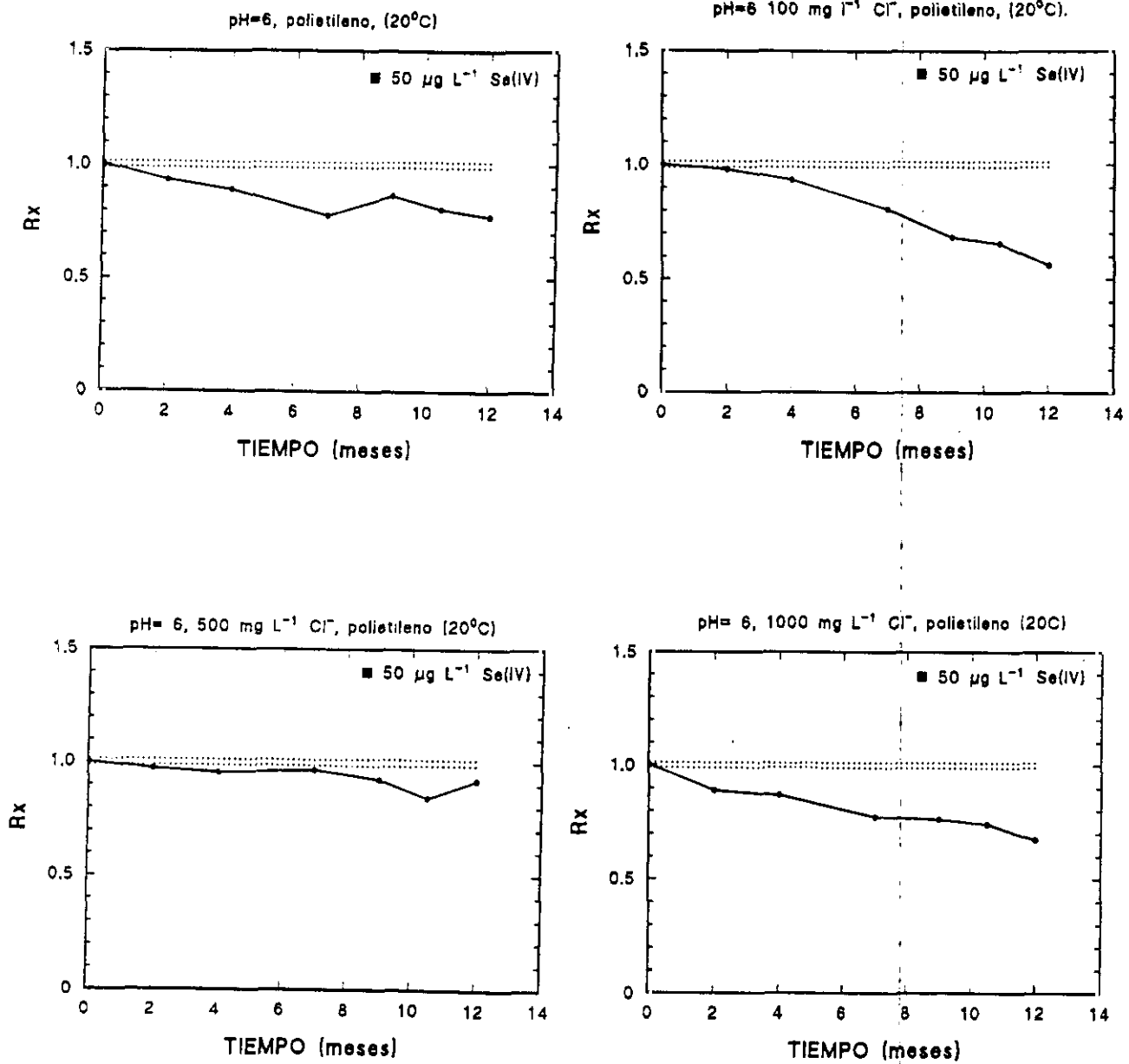


FIGURA 14 (continuación)

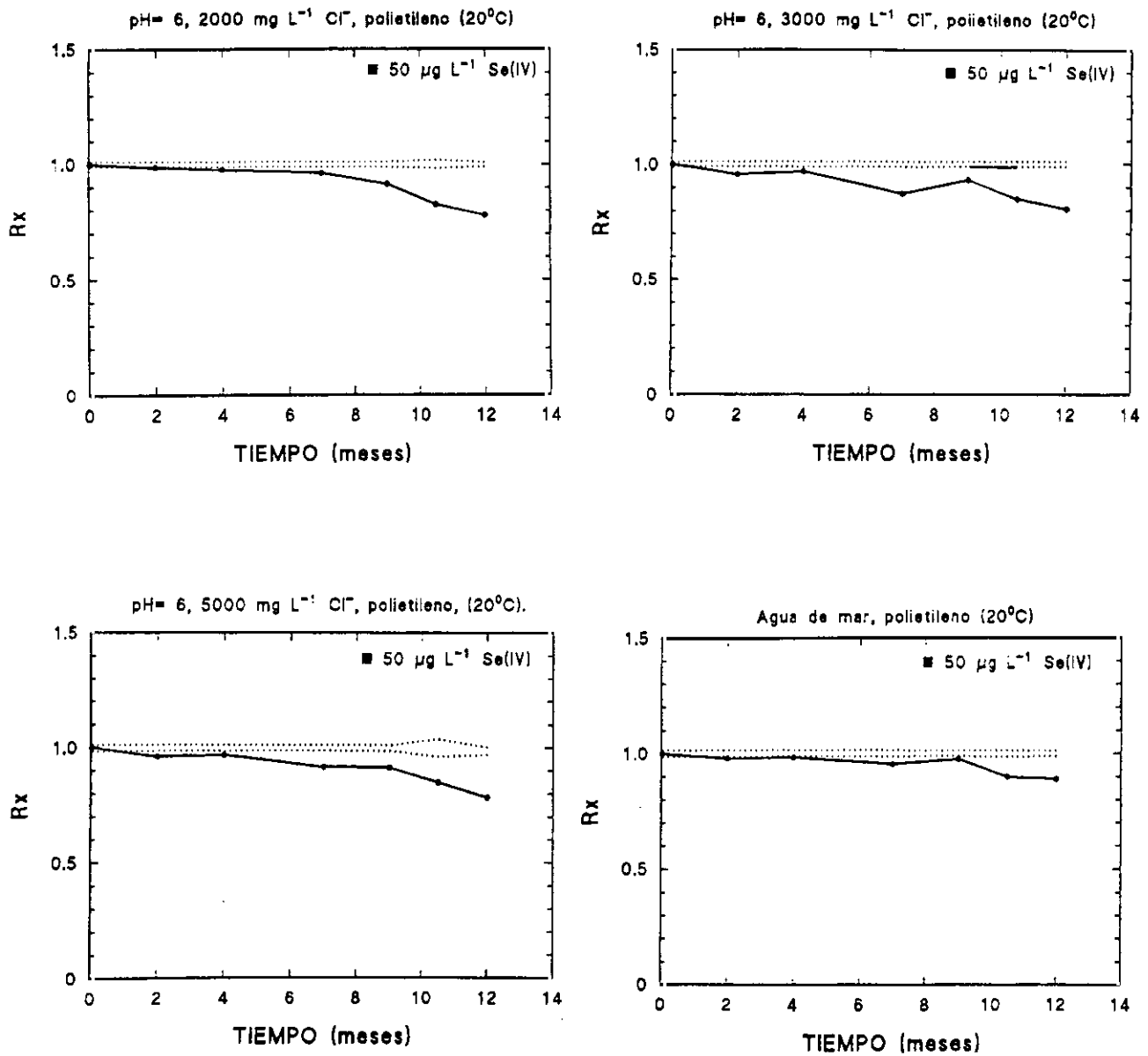


FIGURA 15

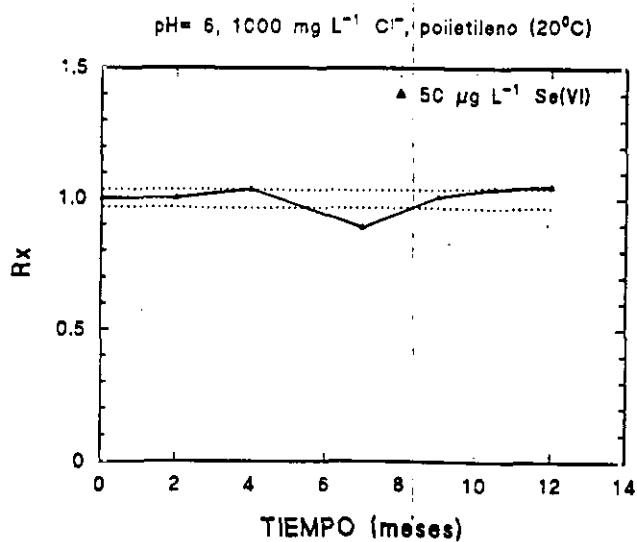
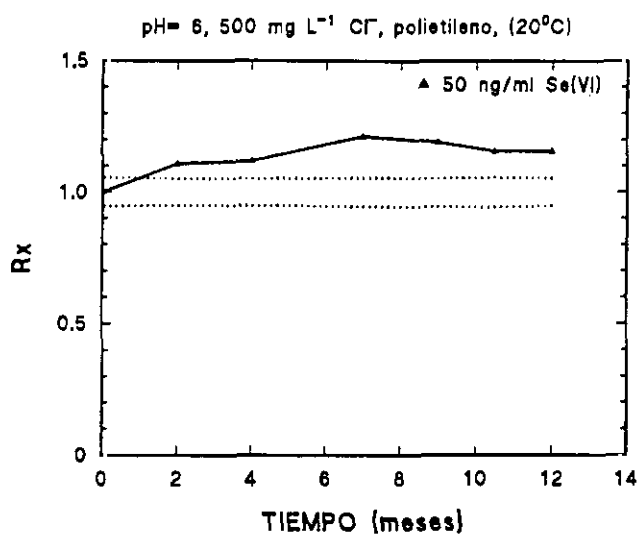
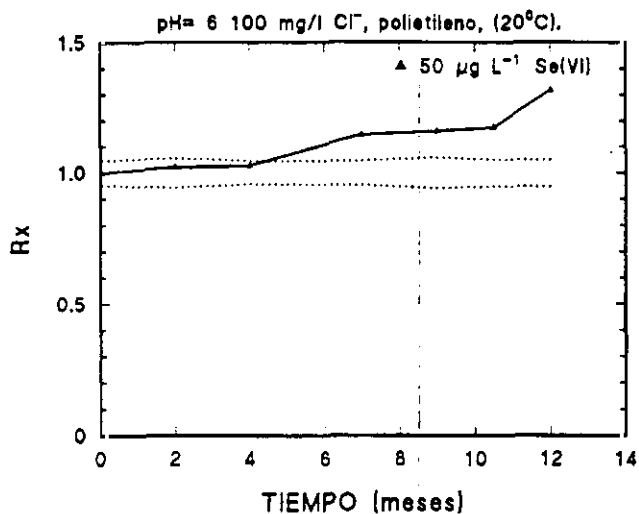
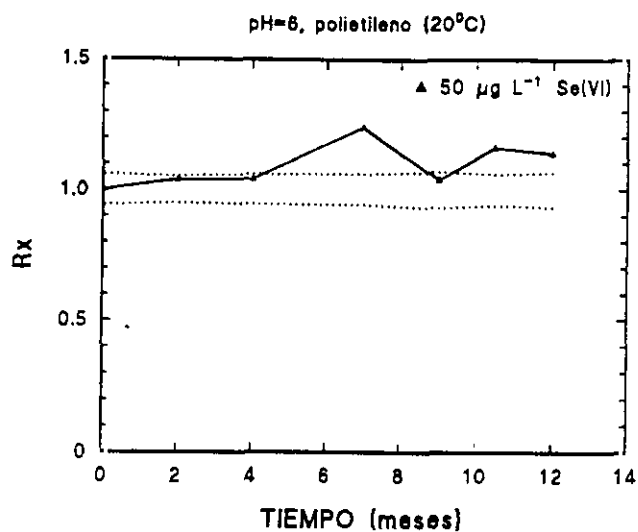


FIGURA 15 (continuación)

