

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica



**Determinación de selenio en suero por espectrofotometría de
absorción atómica**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Victoria Seijas Martínez-Echevarría

Director

Rafael Lozano Fernández

Madrid 2005

ISBN: 978-84-8466-943-2

© María Victoria Seijas Martínez-Echevarría, 1992

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

**DETERMINACION DE SELENIO EN SUERO
POR ESPECTROFOTOMETRIA DE
ABSORCION ATOMICA**

**Memoria que para optar al Grado de
Doctor en Farmacia
presenta**

M^a VICTORIA SEIJAS MARTÍNEZ-ECHEVARRÍA

Madrid, Junio 1992



FACULTAD DE FARMACIA

QUIMICA INORGANICA Y BIOINORGANICA

Rafael Lozano Fernández, Profesor Titular del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que Dña. Victoria Seijas Martínez-Echevarría ha realizado en el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y en el Servicio de Bioquímica del Hospital Ramón y Cajal de la Seguridad Social de Madrid, bajo mi dirección, el trabajo que para optar al grado de Doctor en Farmacia presenta con el título:

**DETERMINACION DE SELENIO EN SUERO POR
ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA**

Y para que así conste, firmo el presente certificado.

Madrid, Mayo 1.992

A mis padres, por su continuo buen ejemplo.

A Luis, por ser mi mejor apoyo y estímulo.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Rafael Lozano que desde cuando me impartía clases en la Licenciatura y durante todo el tiempo de este trabajo ha sabido contagiar su interés y entusiasmo y su acertada visión y entendimiento del campo de Investigación en Química Bioinorgánica y el estudio de los oligoelementos. Su conocimiento ha sido claro en todas las preguntas, críticas y orientaciones. Tengo que agradecerle la dedicación de su ya muy comprometido tiempo, y de una forma muy especial su carácter y simpatía que han facilitado el trabajo.

A Asunción Gil, a quien le debo mi primer interés en la Absorción Atómica. Nunca olvidaré que sin su empeño desinteresado nunca hubiese podido realizar este trabajo en el Hospital Ramón y Cajal.

A M^a Teresa Muñoz por su apoyo.

Así mismo agradezco la comprensión y el estímulo que me han prestado en todo momento los compañeros del Servicio de Bioquímica del Hospital Ramón y Cajal de la Seguridad Social de Madrid.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A pesar de haber sido descubierto el selenio en 1817, no es hasta el año 1957 cuando dicho elemento suscita un gran interés.

Anteriormente, el selenio era considerado un elemento que poseía propiedades tóxicas en incluso mortales para la vida animal, sin embargo, a partir de la publicación del artículo "El selenio como parte integral del factor 3 contra la degeneración necrótica hepática" por Schawrz y Foltz en el cual informan de que una determinada dosis de selenio era capaz de prevenir la degeneración necrótica del hígado, numerosos investigadores caracterizan diversos estados carenciales de selenio en el hombre, tanto de origen nutricional como patológico, y la implicación como factor de riesgo en el desarrollo de cánceres, de afectaciones cardiovasculares y de diversas enfermedades degenerativas.

Esta importancia que presenta el selenio en la vida humana, implica necesariamente el poder disponer de algún método que permita analizarlo con gran exactitud.

Son muchos los métodos descritos para la determinación de selenio en materiales biológicos y que permiten alcanzar los bajos niveles de selenio en suero o en sangre, con excelentes límites de detección.

De todos ellos, el que presenta mayores garantías de exactitud y precisión es el análisis de activación de neutrones, pero que no es practicable en un laboratorio clínico por precisar un reactor nuclear.

Otros de los métodos publicados para el análisis de selenio en material biológico requieren una digestión ácida del material orgánico, seguida por fluorometría o absorción atómica con generación de hidruros, para las cuales son necesarias grandes cantidades de suero poco practicable en la bioquímica clínica rutinaria y, desde luego, inapropiadas para las determinaciones procedentes de poblaciones pediátricas.

Una de las técnicas analíticas que más auge ha tenido en los laboratorios de análisis clínicos en los últimos años es la espectrofotometría de absorción atómica. Sin embargo, los reducidos niveles de selenio en suero humano se encuentran muy por debajo del rango analítico de la espectrofotometría de absorción atómica en llama, cuyo límite de detección es de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$ en solución.

Respecto a los métodos electrotermos de determinación de selenio en suero con espectrofotometría de absorción atómica, entre los cuales está la técnica del horno de grafito, se pueden encontrar publicaciones contradictorias y confusas, probablemente más que para ningún otro elemento químico.

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito consigue descender los límites de detección al rango de partes por billón (p. p. b.) con una instrumen-

tación relativamente simple y sin los esfuerzos y pérdidas de tiempo que conllevan las técnicas de extracción previa.

Por todo ello, uno de los objetivos que se han marcado en esta tesis doctoral ha sido el de poner a punto una metodología que permita determinar el contenido de selenio en suero o sangre, mediante espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito, y que conduzca a la obtención de unos resultados precisos y repetitivos.

Una vez puesta a punto la metodología analítica necesaria y obtenidos los resultados, y en consecuencia haberse logrado nuestro primer objetivo, y con el fin de poder dar un uso clínico a las concentraciones halladas de selenio en suero humano, segundo objetivo de la presente tesis doctoral, se han debido establecer primero los valores de referencia entre una población supuestamente sana.

Sin embargo, la salud no es una condición bien definida, las fronteras entre la salud y la enfermedad son difusas, especialmente en el envejecimiento.

Para seleccionar una muestra de la población de referencia hemos seguido los criterios del Comité de Expertos de la Federación Internacional de Química Clínica.

Los individuos de referencia seleccionados provienen del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Ramón y Cajal.

Se han descartado todos aquellos individuos que sufren enfermedades sistémicas o alteraciones fisiopatológicas como la insuficiencia renal, enfermedad cardíaca congestiva, enfermedad crónica respiratoria, enfermedad hepática o síndromes malabsortivos. en entrevista.

Otros criterios de exclusión han sido la obesidad, hipertensión y el alcoholismo.

PARTE GENERAL

PARTE GENERAL

I.- IMPORTANCIA NUTRICIONAL DEL SELENIO

I.1.- INTRODUCCION

Descubierto en 1817 por Berzelius, el selenio ha sido considerado durante mucho tiempo como un elemento carente de toda propiedad biológica. Es en 1957 cuando Schwarz y Foltz (1) establecen su papel esencial en la nutrición animal, y en 1973 Rotruck lo identifica como el centro activo del enzima glutathion peroxidasa de los mamíferos (2). A partir de este momento, el elemento no deja de suscitar un vivo interés entre los científicos que caracterizan diversos estados de deficiencia humana en selenio, de origen nutricional o patológico, y la implicación como factor de riesgo en el desarrollo de cánceres, de afectaciones cardiovasculares y de diversas enfermedades degenerativas.

Algunos países como Finlandia (3), China (4)(5) y Nueva Zelanda (6) decidieron aportar suplementos de selenio a la población como profiláctico, y surgió la necesidad urgente de reunir de forma crítica y exhaustiva toda la información sobre las implicaciones probadas o potenciales del selenio en nutrición y en medicina humana.

I.2.- IMPLICACIONES PROGRESIVAS DEL SELENIO EN BIOLOGIA

Antes de 1957, el selenio era considerado un elemento que poseía propiedades tóxicas. Varios autores lo identificaron como el responsable de **intoxicaciones agudas o crónicas** mortales para los animales que pastaban en zonas con concentraciones particularmente elevadas de selenio en los forrajes. La forma **aguda** de intoxicación fue descrita en animales que ingerían selenio en cantidad de **50 $\mu\text{g/g}$** . Los síntomas son: hipersudación, taquicardia, hipertermia, cólicos y diarreas, caída de las crines y de la cola y lesiones en la córnea que pueden causar ceguera.

La forma **crónica** o "**enfermedad alcalina**"(se le atribuyó a la alcalinidad de las aguas) resulta del consumo de dosis más moderadas de selenio (**10 - 30 $\mu\text{g/g}$**). Se traduce en el ganado ovino y bovino por : piel rugosa, lasitud, hipertrofia del hígado, del bazo, del páncreas, inflamación de los vasos linfáticos, anemia, hiperbilirrubinemia y leucopenia.

Es en 1957 cuando Schwarz y Folz (1) publican su famoso artículo: "El selenio como parte integral del factor 3 contra la degeneración necrótica hepática". Estudiando la etiología de una enfermedad de carencia nutricional, descubrieron que el selenio era de hecho el llamado factor 3, el cual, asociado a la vitamina E y a los aminoácidos azufrados, era capaz de prevenir la degeneración necrótica del hígado.

Se puede asegurar una protección total de todos los animales con la administración oral de **0, 0133 mg** de selenito de sodio pentahidratado **por 100 mg de alimento**(de hecho 0, 04 $\mu\text{g/g}$

de alimento). Esta dosis es 100 veces menor que la dosis tóxica crónica situada entre 3-4 ppm de selenio. En ciertos casos la **vitamina E** se revela eficaz (7) pero a una dosis 500 veces superior a las de selenio (8). Lo mismo sucede para la **L-cistina**, pero a dosis 25. 000 veces superior (9).

El descubrimiento de Schwarz y Foltz supuso una revolución en la profilaxis y el tratamiento de un cierto número de afecciones animales relacionadas con la deficiencia de vitamina E (10). La importancia económica de estos descubrimientos es considerable. En un primer plano de estas afectaciones se sitúan las **distrofias musculares** de jóvenes rumiantes, de caballos, de cerdos, así como **cardiomiopatías**. Se encuentran igualmente **lesiones hepáticas** en el cerdo, **pancreáticas e intestinales** (11), así como el **edema exudativo**.

En 1966 estudios veterinarios informan de que un 50 -80% de las vacas francesas sufrían el "síndrome de la miopatía" que afecta principalmente a los músculos de la región lumbar.

La responsabilidad del selenio quedó claramente establecida por Klaus Schwarz en 1973 (12). Se estableció que una alimentación equilibrada en vitamina E, con un mínimo de 1 $\mu\text{g/g}$ de selenio es suficiente para evitar la aparición de la enfermedad.

Por el momento, la incorporación de selenio a los forrajes está prohibido, el elemento figura en la tabla de sustancias tóxicas. Sin embargo, la inyección de 3 mg de selenio como selenito sódico a las vacas jóvenes, asociado a 250 mg de α -tocoferol, aporta una buena protección.

Durante todo este período, el modo exacto de acción no era conocido. Por analogía con la vitamina E se estimaba su papel como antioxidante, particularmente en la peroxidación lipídica. En 1973 Rotruck y cols. (2) demuestran la presencia de selenio en el centro activo del **enzima glutatión peroxidasa** de los mamíferos, interviniendo en el metabolismo del peróxido de hidrógeno y de los peróxidos lipídicos (10)(13)(14).

Posteriores estudios sobre la estructura, síntesis y función de la glutatión peroxidasa han sido publicados por Sunde y Hoekstra (15). Este descubrimiento clarifica las relaciones metabólicas (16) entre el selenio y la vitamina E : el elemento asegura la destrucción de los peróxidos que no pueden ser prevenidos por la vitamina E (17), demostrándose así su actuación sinérgica en la quimioprevención del cáncer (18).

Un informe publicado en 1973 por el Comité de expertos de la OMS señala que **"el selenio es un oligoelemento esencial que no puede ser reemplazado por otros nutrientes, la vitamina E por ejemplo "**.

A partir de este momento el selenio despierta un vivo interés en la alimentación humana.

I.3.- NECESIDADES Y APORTES DE SELENIO EN HUMANOS.

En los alimentos, el selenio se encuentra presente exclusivamente en forma de compuestos orgánicos (fundamentalmente **selenometionina, selenocisteína y selenocistina**). La

cantidad de selenio que se consume es función de la concentración y de la disponibilidad biológica del elemento en suelo. Muchas regiones del mundo producen alimentos que contienen cantidades del elemento perfectamente adecuadas para satisfacer las necesidades de los animales y del hombre (19), pero otras regiones producen nutrientes cuyo contenido en selenio es **insuficiente para la prevención de síntomas de deficiencia (inferior a 0, 1 $\mu\text{g/g}$)**. Estas regiones incluyen ciertas zonas de Estados Unidos (20), Finlandia (21), Noruega (22), Nueva Zelanda (6)(23) y algunas provincias de la República Popular China (24)(25)(26) (zonas que sufren la enfermedad de Keshan).

En muchos países del mundo, la nutrición de los animales lleva aportes de selenito o selenato sódico (27)(28) que implican un aumento mínimo en el aporte nutricional humano.

En las regiones donde el selenio del suelo no sobrepasa en mucho la concentración mínima, o es poco disponible, el contenido en selenio de los alimentos va generalmente a la par con su riqueza en proteínas.

Los granos y los productos cereales son particularmente ricos en selenio, pero solamente en ciertas regiones. Algunos autores dan una relación directa entre la concentración en selenio de los cereales y la concentración sanguínea media en los consumidores de estos productos (29).

De una forma general las **carnes, pescados y los mariscos**, así como las **nueces y los huevos**, son muy buenas fuentes de selenio. Por el contrario, las frutas y las legumbres (salvo

los **champiñones y los ajos**), la leche y los productos lácteos (salvo **ciertos quesos**), las materias grasa y las aguas de bebida son fuentes muy pobres **(30)**.

En lo que concierne a las carnes, los contenidos varían entre 0, 10 y 0, 30 $\mu\text{g/g}$, según las publicaciones. En los animales que son convenientemente aprovisionados de selenio, sus proteínas presentan aproximadamente $1\mu\text{g/g}$.

La leche de vaca sólo aporta 0, 02 μg de selenio por litro **(31)**.

Los pescados y mariscos tienen un contenido en selenio significativo desde el punto de vista alimentario; sin embargo, la disponibilidad biológica del elemento (20 a 50%) es limitante, y varía en función de la unión al mercurio y otros metales pesados.

Contrariamente, **la disponibilidad del selenio en los cereales, la cerveza y la mayor parte de los productos vegetales es elevada (85 a 100%)**.

El contenido de selenio es particularmente elevado en **el ajo y la cebolla (0, 5 a 3 $\mu\text{g/g}$)**, **los champiñones (1, 5 a 2 $\mu\text{g/g}$)**, **las coles y los frutos secos (32)**. Estos diversos factores dan origen a importantes variaciones en la cantidad de selenio consumida por los hombres en las distintas regiones del mundo.

Estas diferencias se reflejan directamente en las tasas sanguíneas de los individuos, como refleja la tabla siguiente.

TABLA DE CONCENTRACIONES SERICAS
EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL MUNDO:

PAISES	REF. BIBLIO.	CONC. Se $\mu\text{g/l}$	n
China	4, 5, 33, 34	< 20	-
Nueva Zelanda	6, 23	30 - 50	50
Finlandia	3, 21, 29, 35	45 \pm 20	24
Noruega	22	55 - 107	30
Bélgica	36	88 \pm 17	15
Francia	37	78 \pm 14, 9	30
Japón	38	151 \pm 34	240
Polonia	39	78	199
E. E. U. U.	20	60 - 220	-

Las necesidades de selenio en humanos ahora son relativamente conocidas. En 1980, el "Consejo Nacional de Investigación de E. E. U. U. para la Comida y la Nutrición" publicó las recomendaciones concernientes al aporte óptimo (inofensivo y adecuado) de selenio.

TABLA DE APORTES DIARIOS OPTIMOS DE SELENIO

	EDAD (AÑOS)	APORTE OPTIMO $\mu\text{g}/\text{día}$
Niños jóvenes	0 - 0, 5	10 - 40
	0, 5 - 1	20 - 60
	1 - 3	20 - 80
	4 - 6	30 - 120
	7 - 10	50 - 200
Adolescentes	11 - 20	50 - 200
Adultos		50 - 200

El trabajo publicado por Levander (40) demuestra que los norteamericanos necesitan una dosis diaria de 1 μg de Se por kilo de peso corporal para mantener constante su "balance de selenio"(en hombres unos 75 μg ; en mujeres unos 57 μg). Las necesidades humanas de selenio marchan paralelas a la masa corporal media. Sin embargo, hay marcados contrastes con los consumos habituales de las regiones pobres en selenio (por ejemplo los 24 μg de las mujeres neozelandesas) (6)(41)(42) lo cual sugiere que la necesidad humana de selenio depende de la ingesta anterior del elemento.

La necesidad humana mínima de selenio, necesaria para evitar las manifestaciones de deficiencia, se deben estudiar en las personas que viven en regiones selenoprivadas, como la población neozelandesa, que consume de **28 a 32 μg de Se por día**, y no presenta signos clínicos de deficiencia (43).

Se puede establecer que la necesidad mínima en este país es de **20 $\mu\text{g}/\text{día}$** .

En **China (24)(25)(26)**, la enfermedad de Keshan (enfermedad cuya etiología es la deficiencia de selenio) no aparece si el aporte alimentario medio es superior a **30 μg por día**.

Los conocimientos son más numerosos en lo que concierne al aporte alimentario en países europeos, en los que se estima una ingesta de **50 a 60 μg por día**.

Estos valores deben ser transplantables a España, que, pese a tener un régimen alimentario distinto, en una primera estimación, no está expuesta a una carencia de selenio.

Esta afirmación debe ser reexaminada a la luz de los resultados de las investigaciones de diversos factores que estudien el "estado selénico" (8), que serán más sensibles a una evidencia de déficit marginal.

Uno de estos parámetros estudiados debe ser, según la bibliografía la actividad de la glutatión peroxidasa plaquetaria, después de un aporte suplementario de selenio (13)(44)(45).

I.4.- METABOLISMO DEL SELENIO

La mayor parte de las formas alimentarias de selenio (aminoácidos selénicos y selenio inorgánico de los complementos nutricionales), son eficazmente **absorbidos a nivel duodenal y en el ileon anterior (46)**. Esta constatación sugiere que los seres vivos no poseen mecanismo regulador de la absorción. El **selenito (11)** no es distinguido del **sulfito** por los sistemas biológicos. El **selenato y el sulfato** podrían entre ellos entrar en competición en la absorción. Existe una competición semejante para el transporte de la **metionina y de sus análogos selénicos** (transporte activo).

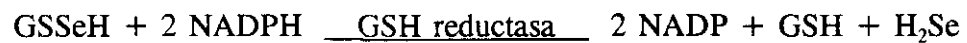
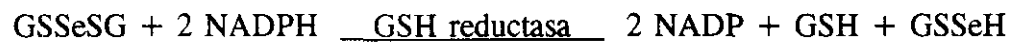
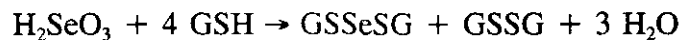
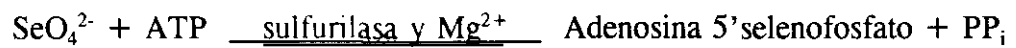
En los animales monogástricos, como los hombres, la absorción de la selenometionina es generalmente más elevada que la del selenito (80% frente al 50%). En estos demuestran que la absorción entérica del selenito está influenciada por las concentraciones alimentarias de **vitamina A, E y C (47)**. El selenito, como la selenocisteína, no sigue transporte activo, y su absorción no está inhibida por análogos azufrados (23).

El selenio absorbido es rápidamente captado por el hígado y los eritrocitos y retorna al plasma como forma metabolizada (12).

En el plasma, el selenio está unido a proteínas plasmáticas no específicas: no se han descrito por ahora portadores propios (albúmina, globulinas, lipoproteínas). Sólo una pequeña fracción del selenio plasmático se encuentra en forma de **glutathion peroxidasa (1 - 2 %)** (6)(20)(48).

El contenido total de selenio en el cuerpo humano se ha estimado entre 13 y 20 mg para los americanos y entre 4 y 10 mg para los neozelandeses.

El metabolismo del selenio se opera en el organismo por **reducción**: esto constituye una **diferencia** importante con respecto al **azufre**, dado que sus compuestos tienden a estar oxidados. El metabolismo hace intervenir reacciones enzimáticas y no enzimáticas utilizando el glutatión reducido:



El **seleniuro de hidrógeno** producido en la reacción, lo mismo que los intermediarios de tipo **selenopersulfuro** (R-S-Se-S-R) o **selenodiglutation** (G-S-Se-S-G), se encuentran como base de los compuestos selénicos biológicamente activos. La síntesis de aminoácidos selénicos a partir de selenito o selenato alimentario parece poco probable.

Ciertos autores se inclinan más hacia una incorporación post-transduccional de seleniuros en los residuos de aminoácidos azufrados dejándolos unidos a las proteínas. (49)

La selenocisteína es la forma más corriente de presentarse el selenio en las proteínas de actividad enzimática (**glutatión peroxidasa y proteínas bacterianas**).

La selenometionina es una forma importante de selenio alimentario, sobre la base metabólica de la metionina. Puede sustituir a este aminoácido en las proteínas.

La **excreción de selenio** se realiza como seleniuro. Por metilación, vía metiltransferasas, dando compuestos tipo ion trimetilselenonio ($\text{Se}(\text{CH}_3)^+$) y dimetilseleniuro ($\text{Se}(\text{CH}_3)_2$). Se convierte por tanto en una importante vía de **destoxificación**, el seleniuro es más tóxico que los derivados metilados.

El **trimetilselenonio**, muy soluble, se elimina por **vías fecales y urinarias**, que son las principales vías de eliminación, mientras que el **dimetilseleniuro**, que es una sustancia volátil, con olor a ajo, se elimina por los pulmones.

Cuando el aporte alimentario no es exagerado, la excreción **urinaria** representa el **55 al 60 %** del total; la excreción por el **sudor** el **5 %**, y por los **pulmones** menos del **1 %**. Desde el punto de vista homeostático la eliminación por vía urinaria parece intervenir de manera significativa(50)(51)(52).

I.5.- TOXICIDAD DEL SELENIO

La **toxicidad** del selenio está particularmente bien documentada en los animales, en parte por los síndromes tóxicos antes descritos (la enfermedad alcalina, ceguera, . . .) y de otra parte por la puesta a punto de especialidades farmacéuticas de uso **terapéutico** y profiláctico en la

medicina veterinaria. Las necesidades de los animales son de 0, 1 a 0, 2 $\mu\text{g/g}$ de materia seca alimentaria. El límite de tolerancia se fija entre 2 y 5 $\mu\text{g/g}$, situándose el nivel tóxico entre 7 y 15 $\mu\text{g/día}$.

Estos valores dependen de la vía de administración y de la forma química, de la edad del animal.

En el hombre, se han descrito **intoxicaciones profesionales**, así como **intoxicaciones medicamentosas**(se ha usado el sulfuro de selenio como antimicótico y antiseborreico).

Los problemas clínicos son variables: dermatitis, alergias urticarias, edema pulmonar con el hidruro de selenio, y sintomatología cardíaca, hepática y gastrointestinal en ciertos casos. Las caries dentales son también hallazgos frecuentes en habitantes de zonas seleníferas (20).

El tratamiento de las intoxicaciones se basa en el aporte de metionina, de vitamina E, de sulfato y de arseniato.

Los síntomas de **seleniosis** crónica en el hombre aparecen cuando las concentraciones de selenio en los alimentos son de 10 a 200 veces más elevadas que las normales. (53)(54) (20)(55).

Una ingesta de 500 μg de selenio por día puede fijarse como máximo aceptable para la protección de la salud humana.

En humanos la DL 50 por vía oral se estima entre 0, 5 y 1 g en forma de selenito o de selenato de sodio.

I.6.- PAPEL ESENCIAL DEL SELENIO

Aunque la esencialidad del selenio para animales quedó establecida en 1957 por Schwarz y Folz, en los hombres tuvo que esperarse a 1979 para que se demostrara su necesidad vital.

En este año, los investigadores chinos informaron del **efecto profiláctico del Se en la enfermedad de Keshan(24)(26)**. Se presenta como una cardiomiopatía congestiva con desenlace fatal por la insuficiencia cardíaca, el aumento de tamaño del corazón, la arritmia y las modificaciones electrocardiográficas. Afecta principalmente a niños y a las mujeres jóvenes que viven en ciertas regiones de China (bien delimitadas geográficamente). Descubrieron que los valores de selenio estaban disminuidos en todos los pacientes. Esos investigadores consiguieron prevenir totalmente la enfermedad en los niños dando comprimidos de selenito sódico en una dosis de 150 a 300 μg de selenio por semana. Aunque la carencia de selenio explica numerosas manifestaciones de la enfermedad, hay otros factores igualmente implicados, como el posible déficit de yoduros. (23)

Otros investigadores chinos han establecido una relación causal entre la carencia de selenio y otra enfermedad endémica, la enfermedad de Kashin-Beck caracterizada por una necrosis del cartílago y una distrofia del músculo esquelético.

Una segunda evidencia del papel esencial del elemento en el hombre se describió por primera vez en 1981, pacientes con **nutrición parenteral a muy largo plazo (56)**.

Dado el contenido insignificante de selenio en las nutriciones artificiales de uso intravenoso, aparecen numerosos síntomas que responden a una ingesta suplementaria de selenio: el malestar muscular (53)(57) que se manifiesta a los 30 días de alimentación parenteral, la cardiomiopatía congestiva (58) y su desenlace fatal.

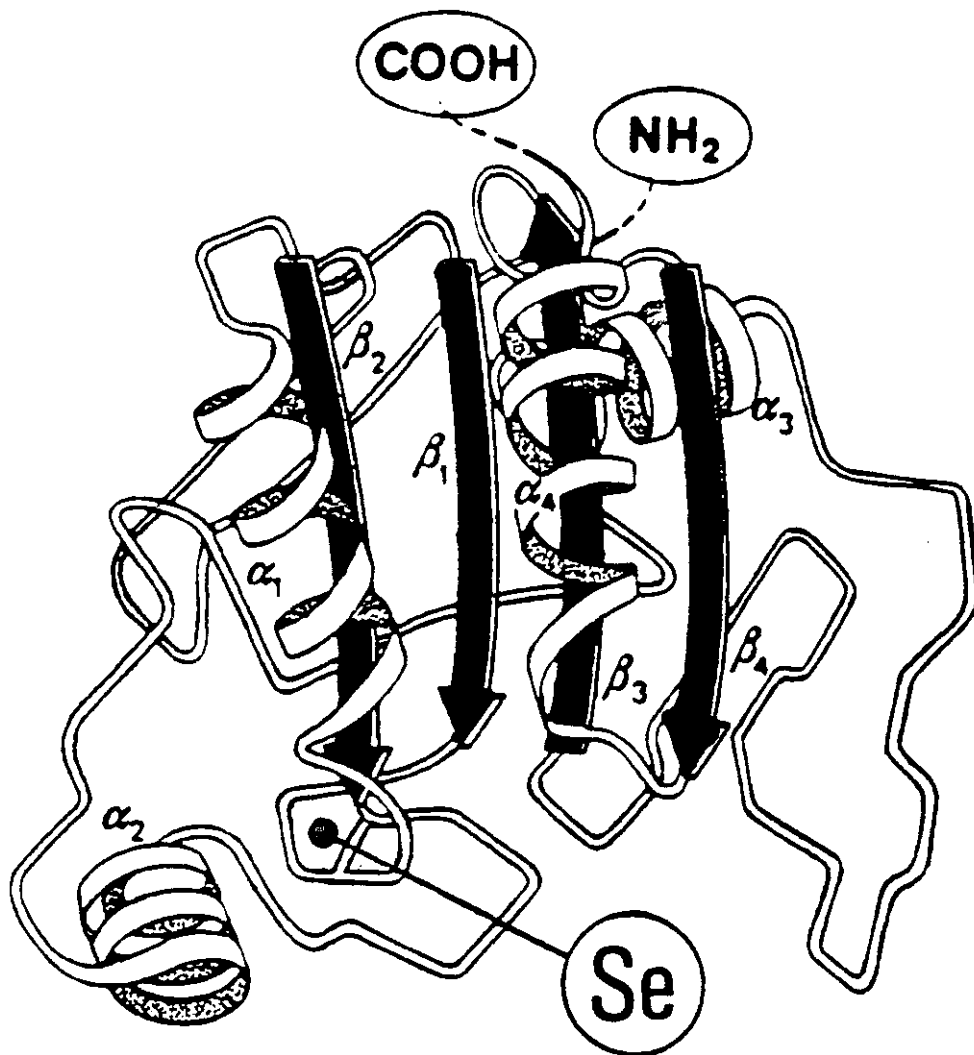
Hasta el momento actual se han descrito **siete casos** de muertes en el mundo occidental por déficit de selenio en la nutrición parenteral **(59)(60)(61)(62)(63)(64)(65)**. Cada día son más numerosos los signos descritos de deficiencia de selenio en humanos **(66)(67)**.

I.7.- FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL SELENIO

- 1- Constitución de enzimas.
- 2- Interacción con diversos metales.
- 3- Intervención en el metabolismo hepático de xenobióticos.
- 4- Intervención en la espermatogénesis.
- 5- Otros derivados selénicos biológicamente activos.

La mayoría de las enzimas selénicas han sido descritas en las bacterias (fórmico deshidrogenasa, glicina reductasa, xantino deshidrogenasa, ácido nicotínico hidroxilasa, tiolasa)

SELENOENZIMA GLUTATION PEROXIDASA



Esquema de una subunidad

En los mamíferos, la enzima conocida es la **glutation peroxidasa**, que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno por el glutatión y así protege a los eritrocitos de la oxidación de la hemoglobina y la hemólisis consecuente.

Rotruck en 1973 (2) descubrió que contenía selenio como elemento esencial.

Posteriores estudios realizados por Sunde y Hoekstra (15) han mostrado que la **glutation peroxidasa** posee 4 subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un átomo de selenio. El átomo de selenio ocupa el centro activo del enzima en forma de selenocisteína.

En el hombre existe una elevada actividad en el hígado y en los eritrocitos. (7)(10)(14).

El enzima toma parte del equipo celular comprendido por la catalasa, la superóxido dismutasa y el α -tocoferol (9)(10)(68).

En una deficiencia de selenio la actividad glutatión peroxidasa está disminuida en numerosos tejidos.

La subsistencia de derivados oxigenados tóxicos en la célula, causa daños característicos: **peroxidación de los lípidos de membrana** y otros compuestos sensibles a la peroxidación. La mayoría de las manifestaciones clínicas de la deficiencia de selenio se explican por los fenómenos de : hemólisis, necrosis hepática, degeneración del páncreas, las cataratas y la modificación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria.

I. 8. - EL SELENIO EN LAS ENFERMEDADES HUMANAS

I.8.A. - LOS DESORDENES MUSCULARES

La enfermedad de Keshan es la primera afectación muscular en la que la responsabilidad de una carencia de Se de origen alimentario ha sido demostrada de una manera definitiva.

Diversos casos de cardiomiopatía congestiva atribuibles a una carencia del elemento se han ido describiendo con posterioridad.

Las investigaciones sobre el papel del selenio en la etiología de cardiomiopatías humanas ofrecen resultados discordantes.

Oster y cols. (58) han observado una correlación positiva entre la concentración de selenio en suero y la fracción de eyección ventricular derecha.

En los pacientes que sufren infarto agudo de miocardio, estos mismos autores observan valores muy bajos de selenio en sangre. Esto coincide con los datos de Salonen (69) que afirma que las personas con un selenio en sangre inferior a 45 $\mu\text{g/l}$ tiene un riesgo 2,9 veces superior de sufrir una enfermedad de la arterias coronarias. Estas mismas conclusiones son obtenidas por Moore (70) y por Aro (71).

Por el contrario la Dra. Robinson (6) así como Ikran (72) señalan que Nueva Zelanda, que tiene un ambiente pobre en selenio, y cuyos sus habitantes presentan bajas tasas de selenio en suero, no presenta un patrón de incidencia de enfermedades cardiovasculares diferente al que existe en Europa o en Estados Unidos.

Para Nève (73)(74) la deficiencia de selenio implica defectos cardiovasculares no sólo por proteger el endotelio, sino también por intervenir en la síntesis de ácido araquidónico. Johnson publicó uno de los casos de muerte por cardiomiopatía (59) tras recibir alimentación parenteral prolongada.

En la misma línea se incluye el estudio de Ringstod (75) sobre la incidencia de cardiomiopatías en población deficitaria de selenio.

Otros investigaciones, como las de Kok (76), Nan (77), Bukkens (78) y Schaffer (79) establecen también el carácter de factor de riesgo para la cardiomiopatía para la población con niveles bajos de selenio en suero.

También demuestran (80)(81) que las personas que padecieron un infarto de miocardio tenían menores concentraciones de selenio.

La distrofia miotónica es otro desorden muscular muy característico que puede ser tratada con selenio, en asociación con vitamina E. También se ha observado un cierto éxito en el tratamiento de la Distrofia muscular tipo Duchenne (82).

I.8.B.- LOS DESORDENES SANGUINEOS

La deficiencia de selenio puede jugar un cierto papel en la patogénesis de la **anemia hemolítica** en cierto tipo de niños con desnutrición calórico-proteica.

I.8.C.- LAS ENFERMEDADES NEUROLOGICAS DEGENERATIVAS.

La administración de selenio (al mismo tiempo que vitamina E, B₆ y B₁₂) permite mejorar ciertos síntomas de la lipofuscinosis ceroides neuronal.

La trisomía 21 (**mongolismo o Síndrome de Down**) está también asociada a un proceso oxidativo que causa un envejecimiento creciente y una demencia con degeneración cerebral. La acción oxidativa se explica por la generación aguda de peróxido de hidrógeno en las células debido a un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa que está portada genéticamente por el cromosoma 21.

Un aporte marginal de selenio limita su actividad **(83)(84)**.

Para explicar el proceso del **envejecimiento** muchos autores han emitido hipótesis sobre una generación aumentada de radicales libres **(85)**. El recurso del selenio y otros antioxidantes es tentador.

En las enfermedades psiquiátricas se ha tratado de buscar una relación entre la depresión neurótica y el déficit de selenio sin que los resultados sean muy claros por ahora (37)(86).

I.8.D.- LOS DESORDENES DIGESTIVOS

Los pacientes que sufren **malabsorción** de etiologías diversas presentan generalmente un déficit de selenio.

En la **fibrosis quística**, la malabsorción es debida a un déficit de la secreción pancreática y biliar y entraña una carencia marginal en selenio. (37)(87).

La **enfermedad celiaca** y la **enfermedad de Crohn** también influyen de forma negativa en el balance de selenio.

De las enfermedades hepáticas tiene particular interés la **cirrosis**, en la que el balance de selenio es **poco adecuado(88)**.

El aumento de la lipoperoxidación hepática que resulta contribuye al agravamiento de la enfermedad (19)(21).

En la **cirrosis biliar primaria** se repite esta misma situación (89).

Existe una posible correlación entre el selenio y las proteínas de síntesis hepática (albúmina, transferrina, etc...)(90).

La ingesta de alcohol (**etilismo crónico**) agrava el fenómeno por aumento de la producción de peróxidos e inducción de una depleción de glutatión reductor en las células (37)(91).

I.8.E.- LOS DESEQUILIBRIOS ALIMENTARIOS

Los **prematuros y los neonatos** son un grupo de población expuesta a carencias diversas en selenio en razón de la pobreza de este elemento en los alimentos que consumen (leche en polvo, fórmulas preparadas)(31)(56), alimentación parenteral(92).

En lo que concierne al selenio, se aconseja **la alimentación maternal de los neonatos** según el informe de la OMS (93).

Un aporte suplementario de selenio a las madres lactantes mejora ostensiblemente el "status selénico" de sus hijos (94)(95)

Los niños tratados por enfermedades metabólicas como **la fenilcetonuria y la enfermedad del jarabe de arce** son sometidos a regímenes excluyentes de proteínas habituales, reciben mezclas pobres en selenio, por lo que su estado selénico puede estar deprimido. (96).

I.8.F.- EL CANCER

Paradójicamente el selenio ha sido considerado durante mucho tiempo como un elemento capaz de inducir cáncer.

De 1960 a 1970 se operó un cambio en la manera de pensar de los investigadores, paralelamente a la puesta en evidencia de su carácter esencial.

Las primeras indicaciones a partir de Schrauzer (97)(98) que mostraron que el contenido de selenio en el suelo, los alimentos y la sangre humana estaban inversamente correlacionados con la tasa de mortalidad debida al cáncer.

En investigación animal estos autores demostraron las fuertes relaciones entre el cáncer de mama y una dieta carente de selenio.

Estos estudios fueron ampliamente discutidos por haberse realizado en animales.

En el año 1981 aparecieron numerosos estudios que demostraban que se podía reducir la incidencia de diversos tumores animales mediante un aporte de selenio: los que son espontáneos reduce la incidencia entre un 10 y un 45, en la rata el tumor de mama inducido por virus (99) o químicamente con dimetilhidrazina (100)(101) son casi totalmente prevenidos (88%) y además demuestran una disminución de la velocidad de crecimiento del tumor mamario trasplantado en rata (98)(102)(103)(104)(105).

En el hombre, se ha comprobado después de años, que los pacientes con cáncer habían tenido concentraciones sanguíneas de selenio inferiores a las normales; sin embargo es delicado afirmar que tasas pobres de selenio sean la causa de la enfermedad.

Existen estudios prospectivos epidemiológicos mucho más edificantes publicados a partir de 1987, presentan el hecho de que **tasa sanguíneas de selenio en cantidades biológicas elevadas previenen el diagnóstico del cáncer.**

El primer estudio fue publicado en 1987 por Willet (106) en la Universidad de Harvard, EEUU, comenzó en 1973 sobre 10940 sujetos con aparente buena salud procedentes de 14 regiones de los EEUU. La sangre se guardó congelada. Durante cinco años aparecieron 111 casos de cáncer. El análisis de selenio en suero de los pacientes comparados con los que no desarrollaron cáncer pareció demostrar que de una forma general existe una asociación entre las concentraciones sanguíneas de selenio y el riesgo de cáncer.

Esta asociación entre bajo contenido de selenio en sangre y riesgo de cáncer es particularmente significativa para ciertos cánceres (107). Parece clara la relación con el cáncer de cuello (54), el cáncer de mama en mujeres (108), el cáncer de colon (109), el de páncreas (110), el de cavidad oral (111), la leucemia no linfocítica aguda (112) y el de tiroides (113).

Otros estudios epidemiológicos como el de Salonen de 1984 (114) sobre 8113 personas, el de Clark (115) y el de Virtamo (116) demuestran que concentraciones de selenio inferiores a 35 $\mu\text{g/l}$ están asociadas a un riesgo relativo de cáncer de 3. 0.

Según ciertos autores, la cantidad de selenio habitualmente conseguida por la alimentación es **insuficiente** en la profilaxis nutricional del cáncer(117)(118).

La acción de prevención del selenio se debe a su poder antioxidante, su acción potenciaría la de la vitamina E (18)(119)(120).

Sin embargo hace falta todavía algún estudio serio que demuestre científicamente que la ingesta suplementaria de selenio tenga un efecto protector frente al cáncer.

I.8.G.- EL SELENIO EN LAS AFECCIONES REUMATICAS

Las concentraciones elevadas de productos de peroxidación que se encuentran en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide parecen estar relacionadas con la patogénesis de estas afecciones reumáticas. El carácter antioxidante del selenio explica la correlación que algunos autores encuentran entre el numero de articulaciones afectadas y las tasas de selenio en sangre (121)(122), pese a que no se han encontrado efectos terapéuticas en el aporte de selenio.

I.8.H.- OTRAS ENFERMEDADES

En los últimos años, 1990, se han publicado diversos trabajos que encuentran niveles reducidos de selenio en suero en pacientes con ASMA (123), así como en el ACNE (124).

Otra línea de investigación importante es la referente a la alteración del nivel de selenio en pacientes sometidos a hemodiálisis (125) en los que la concentración de selenio está muy reducida comparándola con los controles (126), estudiándose las diferencias entre los pacientes hemodializados con y sin cáncer (127), parece claro que en la insuficiencia renal crónica casi todos los elementos traza se encuentran alterados (51), así como es posible su corrección con aportes extras (125).

Ortos autores están estudiando la influencia del aporte de selenio a las mujeres GESTANTES dado que sus niveles suelen ser reducidos (95)(128)(129) de esta forma parece disminuir algunos problemas que se presentan en neonatos hijos de madres con baja concentración de selenio en sangre (28)(31)(92).

En las enfermedades INFECCIOSAS el selenio como otros elementos traza (cobre, zinc, hierro...) se encuentra modificado, en el caso del selenio hay una disminución de su concentración (128)(130).

1.9.- EL SELENIO EN LA TERAPEUTICA Y PROFILAXIS NUTRICIONAL

Los compuestos selénicos han sido relativamente poco utilizados en la terapéutica humana hasta los últimos años. El **sulfuro de selenio** se usó en el tratamiento de la pitiriasis versicolor y de la seborrea del cabello. También se conoce su actividad contra la blefaritis escamosa como ungüento oftálmico.

En el tratamiento de las enfermedades carenciales humanas se recurre a:

- **Selenito sódico.** Es bien absorbido, fácilmente disponible para la síntesis de glutatión peroxidasa, no se acumulan en el organismo. Es inestable en solución para vía oral o enteral.

- **Selenato sódico.** Se trata de un derivado muy estable, pero sin embargo, no se usa en terapéutica humana.

- **DL- o L-selenometionina.** Es un derivado bien absorbible, más eficaz que los compuestos de selenio inorgánicos. Sin embargo, tiene tendencia a acumularse en tejidos orgánicos.

- **Formas naturales.** En la mayoría de los estudios consultados recurren al pan confeccionado con cereales ricos en selenio para el aporte suplementario de selenio a humanos.

- **Levadura enriquecida con selenio.** La forma predominante es la seleniometionina (50%), el resto es selenioglutatión, seleniodiglutatión y selenocisteína. Da una excelente respuesta biológica.

II.- ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

II.1.- INTRODUCCION

Hasta 1955 no se obtuvieron las primeras aplicaciones reales de la EAA que fueron realizadas por Alan Walsh en Australia y Alkemade en Holanda (131)(132).

Alan Walsh empezó sus trabajos en Absorción Atómica completamente solo, en 1952 con un equipo formado por un mechero de laboratorio, el atomizador de un fotómetro de llama, una lámpara de sodio y un monocromador que le prestaron.

En el año 1954, en el Instituto de Física de Melbourne, en Australia, realizó la primera demostración del equipo de absorción atómica que había diseñado. Desde ese año, la espectrofotometría de absorción atómica se ha desarrollado fundamentalmente en Australia, Estados Unidos, Inglaterra y Alemania (133)(134)(135)(136)(137).

La gran popularidad y el rápido desarrollo de esta técnica analítica se deben a las ventajas que ofrece (138)(139)(140)(141)(142):

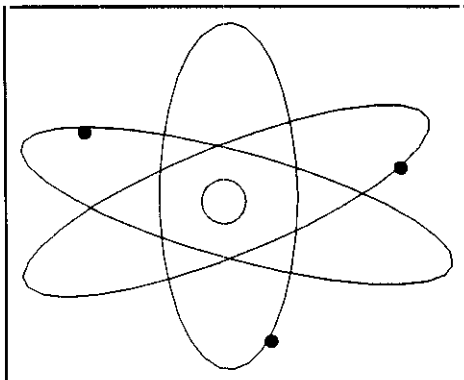
- Puede analizar directamente **82 elementos**
- Sus límites de detección son inferiores a la **p. p. m.**
- Tiene una **precisión** del orden del 1 % de C. V.
- Su **manejo** es sencillo

De todas estas ventajas, se debe destacar la gran sencillez de operación.

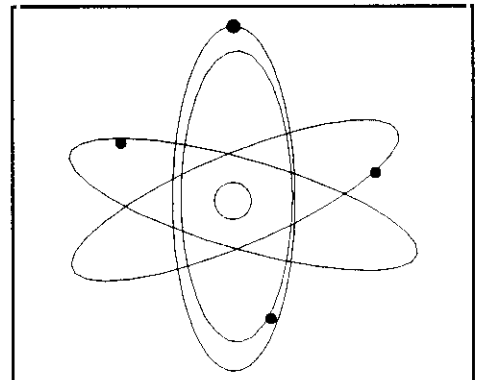
II.2.- PRINCIPIOS BASICOS

De todos es conocido que cuando se suministra una determinada cantidad de energía a un átomo cualquiera, que se encuentre en su estado fundamental (estado energético que llamaremos E_0), esta energía es absorbida por el átomo, de tal forma que se incrementará el radio de giro de sus electrones de la capa externa, pasando el átomo a un nuevo estado energético E_1 al que se denomina estado excitado:

Atomo en estado fundamental



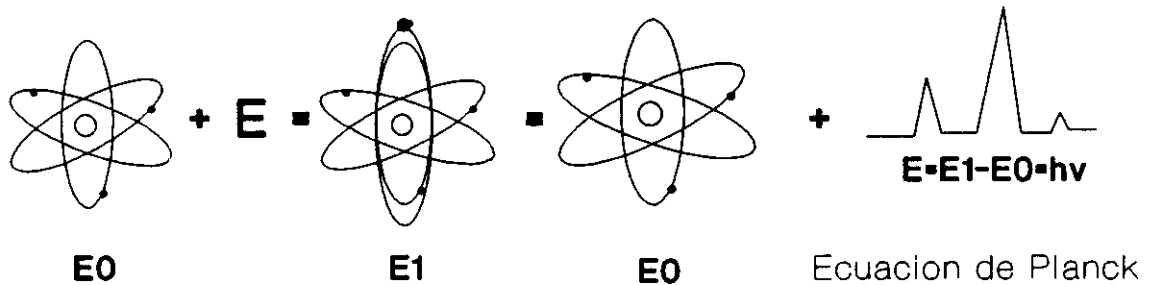
Atomo en estado excitado



La cantidad de energía necesaria para llevar un átomo de su estado fundamental al excitado la llamamos energía de excitación E , y será:

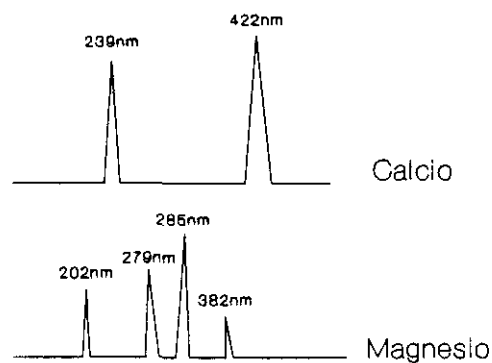
$$E = E_1 - E_0$$

Cuando un átomo excitado vuelve nuevamente a su estado fundamental, éste cede una energía cuantitativamente idéntica a su energía de excitación, emitiendo una radiación a longitudes de onda determinadas:



La representación gráfica de la intensidad de emisión de estas radiaciones, en función de la longitud de onda, se llama espectro de emisión.

Estudiando los espectros de emisión de todos los elementos del sistema periódico, se observa que presentan los máximos de energía a diferentes longitudes de onda:



Experimentalmente se demuestra que la intensidad de emisión de cada elemento, a su longitud de onda característica, es mayor, cuanto mayor sea su concentración (143).

II.3.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA

Este principio que hemos expuesto, la **ecuación de Planck**, es un equilibrio reversible, y lo podemos desplazar en un sentido o en otro, fundamentalmente en función de la temperatura o dicho de otro modo de la cantidad y forma de energía que suministremos.

Si el aporte de energía es grande, la mayoría de los átomos se encontrarán en estado excitado. Si se mide la energía que emiten los átomos a su longitud de onda característica, se obtendrá un análisis cuantitativo o cualitativo denominado **espectroscopía de emisión** (144)(145).

Sin embargo, cuando sobre una nube de átomos en estado fundamental incide una radiación de frecuencia definida (luz cuantizada $h\nu$), se absorbe una cantidad de energía por unidad de tiempo y volumen que es proporcional al número de átomos libres por unidad de volumen, es decir, es proporcional a la concentración de esos átomos en la muestra. Los aparatos diseñados para realizar esta medida son los **espectrofotómetros de absorción atómica**.

La proporcionalidad entre el número de átomos libres por unidad de volumen y la energía absorbida está regida por la ecuación de Einstein:

$$E_{abs} = B_{jk} \cdot N \cdot S \cdot h \cdot \nu_{jk}$$

donde B_{jk} es el coeficiente de probabilidad de absorción de Einstein para la transición $j \rightarrow k$. El producto $B_{jk} \cdot S$, es una expresión para la fracción de átomos en estado fundamental capaces de absorber un fotón de energía por unidad de tiempo. S , es la intensidad de la radiación espectral.

Como fundamento de la técnica de espectroscopía de absorción atómica, queda establecido que la energía absorbida depende :

- de la frecuencia de la línea de resonancia ν_{jk}
- de la intensidad de radiación de dicha línea

La intensidad de radiación de la línea de resonancia no es constante, pues se produce un ensanchamiento de la línea de forma natural debido al efecto Doppler y al efecto Lorenz. Para coseguir que la energía absorbida sea proporcional al número de átomos presentes es preciso referirse a anchos de línea comprendidos entre **0, 0005 nm y 0, 005 nm**.

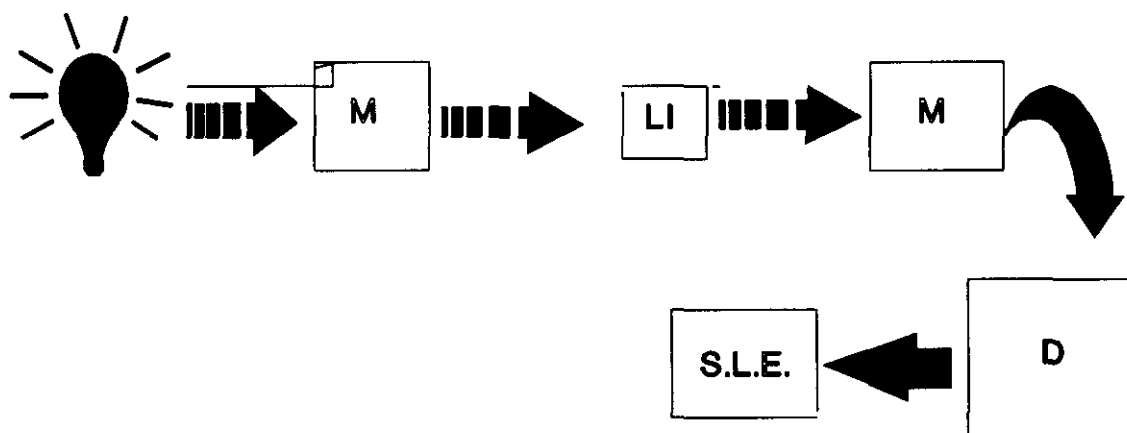
Esta especificación afecta de forma definitiva al tipo de fuentes de emisión que se pueden usar en absorción atómica. Aunque las lámparas de espectro continuo producen una gran intensidad a lo largo de todo el espectro, es imposible separar una zona de 0, 0005 nm. Es preciso por tanto, usar una fuente de radiación que emita el espectro del elemento analizado **(146)(147)(148)(149)**.

La medida de la absorbancia se basa en la ley de Lambert-Beer, siendo ésta proporcional a la concentración, a la longitud (l) y al coeficiente de extinción molar (ϵ):

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

II.4.- INSTRUMENTACION

La construcción general de un espectrofotómetro de absorción atómica es simple como se muestra en el siguiente esquema (131)(132)(133):



Consta de una **fente de radiación**, que emite el espectro del elemento analito; un **atomizador**, como la llama o el horno de grafito, en el cual se forman los átomos de la muestra que se va a analizar; un **monocromador** para seleccionar la línea de resonancia; un **detector** que permita la lectura de la intensidad de radiación, seguido por un **amplificador y sistema eléctrico de lectura**.

Este esquema es muy parecido al de un espectrofotómetro de emisión de llama con una fuente de emisión (132)(135). Sin embargo, en absorción atómica, la llama debe ser una célula de absorción en la cual se atomiza la muestra y sólo se producen átomos en estado fundamental.

Aunque el número de átomos excitados en este tipo de llama es menor que el número de átomos en estado fundamental, en muchos casos los espectros de emisión de la llama interfieren con las medidas de absorción. Se producen de esta forma las llamadas **interferencias espectrales** que afectan a la determinación de muchos elementos (150).

Para eliminar estas interferencias debidas a la emisión de la llama, el espectrofotómetro de Absorción Atómica actúa con un "chopped" o radiación pulsátil. El haz de radiación se modula mecánica o eléctricamente a una frecuencia fija y el amplificador electrónico se empareja a esa misma frecuencia. Así, sólo la radiación de la fuente primaria se amplifica mientras que la emisión de la lámpara, no modulada, aparece como desechable.

Otro sistema de eliminar las interferencias es el Espectrofotómetro de "doble-haz" que veremos más adelante.

II.4.A. - FUENTES DE RADIACION

Muchas de las ventajas de la Espectrofotometría de Absorción Atómica pueden relacionarse directa o indirectamente con el estrecho ancho de las líneas de resonancia del espectro, pues la absorbancia del elemento tiene lugar dentro de un rango espectral muy limitado.

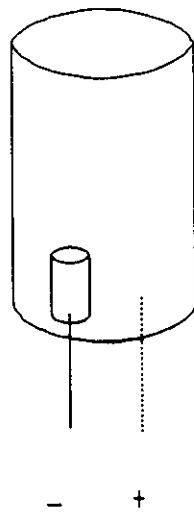
Esta ventaja es todavía mayor si la fuente de radiación usada emite líneas todavía más estrechas que las líneas de absorción.

Las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos son particularmente adecuadas para estos propósitos:

LAMPARAS DE CATODO HUECO

Actualmente son las más usadas por su eficacia. Su tecnología es antigua, pues datan de 1916, si bien las actuales presentan bastantes modificaciones.

Una lámpara de cátodo hueco consiste en un cilindro de cristal, con un cátodo y un ánodo, lleno de un gas inerte (neón o argón) a una baja presión. No se debe de utilizar nunca xenón como gas de llenado porque emite un espectro continuo. Igualmente, se debe evitar la contaminación con hidrógeno por esta misma razón.



ESQUEMA DE LCH

El ánodo es un alambre fino de níquel o tungsteno. Al aplicar una corriente eléctrica entre los electrodos, tiene lugar una descarga. Si el cátodo consiste en un cilindro hueco, en las condiciones adecuadas, la descarga tendrá lugar casi exclusivamente dentro del cátodo.

En el gas interno de llenado, se genera una corriente de iones positivos que golpean la superficie del cátodo y liberan átomos del material que constituye ese cátodo. Estos átomos, al atravesar la zona de intensa descarga se excitan y emiten radiaciones de sus líneas espectrales. Dado que la mayoría de la radiación se emite dentro del cátodo el resultado es un haz relativamente bien enfocado.

Como la presión del gas de llenado es prácticamente 0, la temperatura no afecta el ancho de línea, y al estar las líneas de absorción en la llama sometidas a la presión atmosférica se consigue que las líneas de excitación sean menores que las de absorción.

LAMPARAS DE DESCARGA DE VAPOR

Son las más adecuadas para metales volátiles como el Hg, Tl, Zn y metales alcalinos. Se ofrecen comercialmente a bajo precio, si bien presentan la desventaja de que emiten líneas muy ensanchadas (151)(152).

LAMPARAS DE DESCARGA SIN ELECTRODOS

Emiten una altísima intensidad radiante y presentan el menor ancho de líneas espectral en comparación con otras posibles fuentes de radiación (153)(154).

Su principal ventaja es que aumentan la intensidad de la radiación varios cientos de veces en comparación con las lámparas de cátodo hueco (LCH).

Consisten en tubos de cuarzo sellados de varios centímetros de largo y 5-10 mm de diámetro, lleno con unos miligramos del elemento analito bajo una baja presión de argón.

Ese tubo se monta dentro de un generador de alta frecuencia (2400 MHz) y se excita con unos 200 vatios.

Este tipo de lámpara es el adecuado para el rango del UV vacío, debido a las enormes pérdidas que se presentan por la absorción del aire, de la llama y de las lentes.

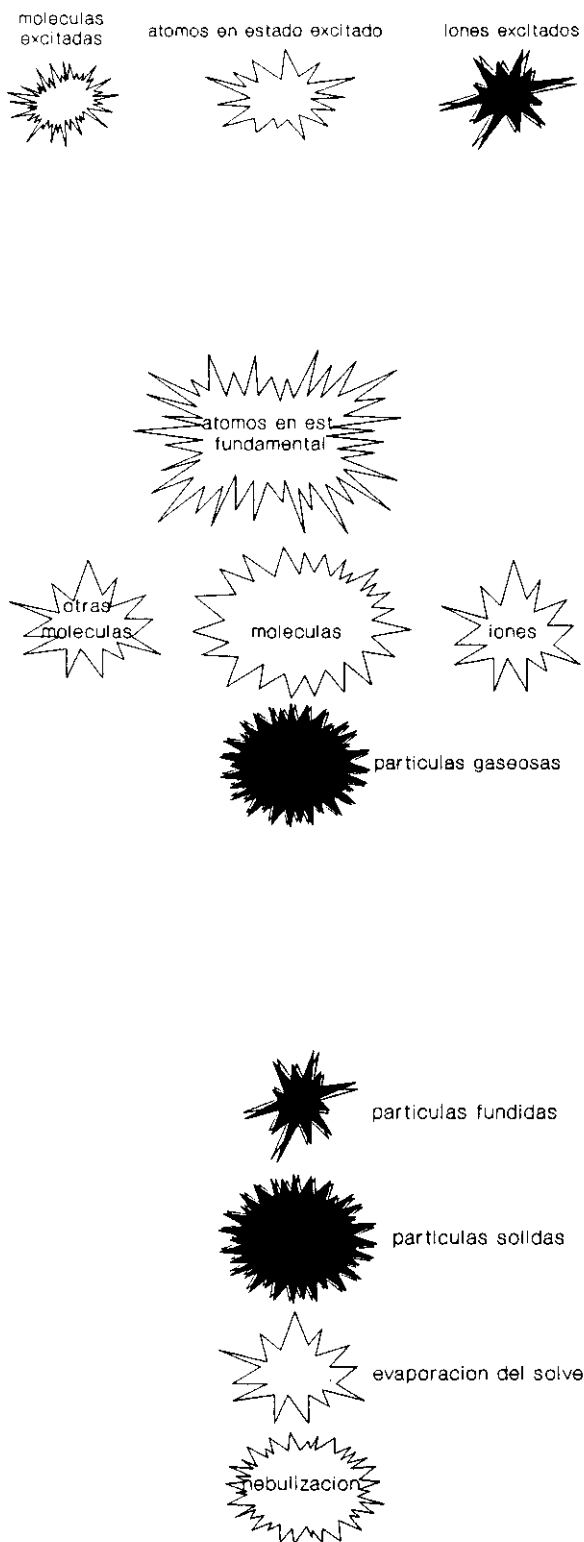
Sus principales desventajas son que sus vidas medias son relativamente cortas y además, que requieren calentarse un largo período.

Se usan rutinariamente para elementos como el arsénico, el cesio y el rubidio.

II.4.B.- ATOMIZADORES

Para conseguir átomos en estado fundamental es necesario suministrar a la muestra una dosis de energía para disociar las moléculas, romper sus enlaces y llevar los átomos al estado fundamental procurando no rebasar este estado energético.

En el siguiente esquema, se refleja la obtención de átomos en estado fundamental a partir de la nebulización de la muestra líquida.

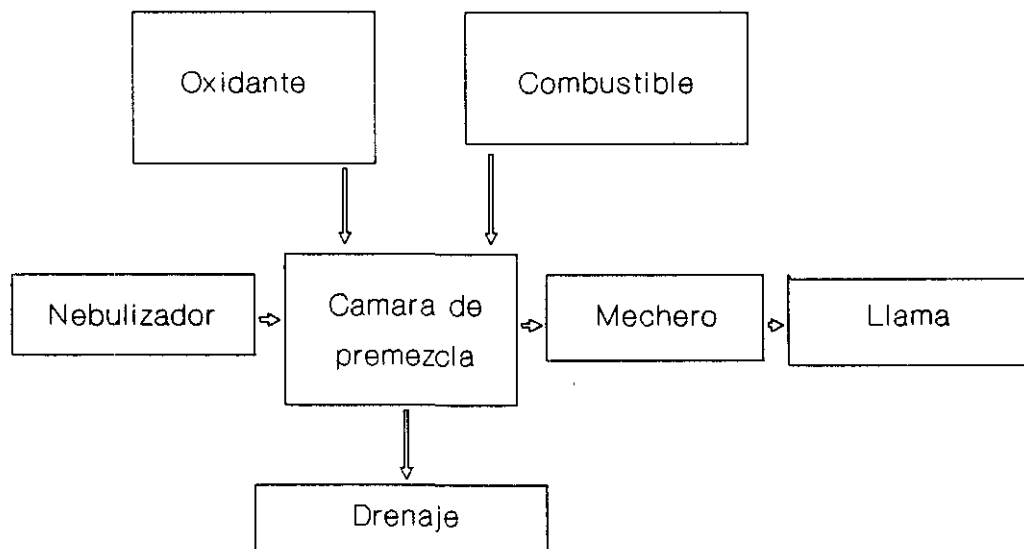


Las técnicas desarrolladas para la atomización de las muestras y obtención de átomos en estado fundamental son:

- Técnica de llama
- Horno de grafito
- Generación de hidruros
- Técnica del vapor frío.

TECNICA DE LLAMA

Los constituyentes de un atomizador de llama son:

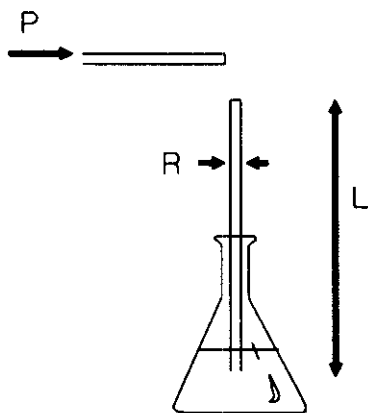


Nebulizador

Es el dispositivo necesario para convertir la muestra líquida en una disolución en vapor, con un tamaño de gota muy pequeño, con objeto de que pueda mezclarse perfectamente con el oxidante y el combustible antes de alcanzar la llama.

La muestra se aspira por efecto Venturi a través de un tubo debido al gas que circula perpendicularmente a gran velocidad.

El caudal de aspiración viene dado por la ley de Poiseuille (155):



Q = Caudal de aspiración

R = Radio del capilar

ΔP = Incremento de presión

L = Longitud del capilar

η = Viscosidad

$$Q = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8 \eta L}$$

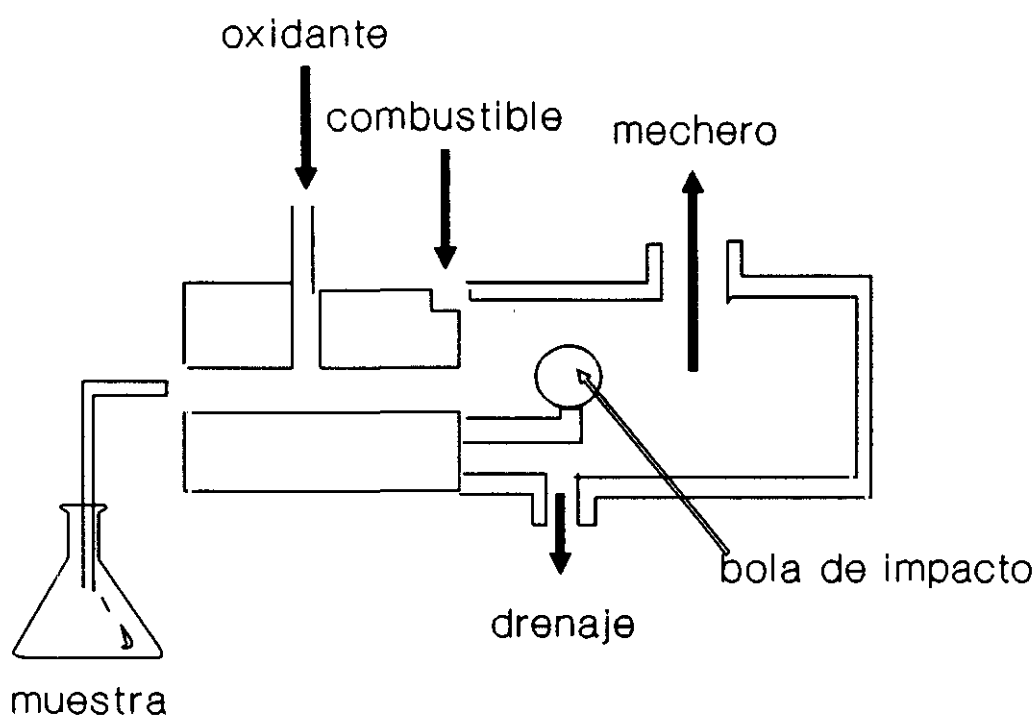
El rendimiento de la aspiración depende tanto de la longitud y diámetro del capilar, como de la viscosidad de la disolución.

El nebulizador tiene una geometría calculada para que el diámetro medio sea lo menor posible.

Experimentalmente se comprueba que las lecturas aumentan según aumenta el caudal de aspiración hasta un cierto valor, y después se mantienen prácticamente constantes (156).

Trabajar a caudales de aspiración altos significa una mayor estabilidad, aunque no una mayor lectura. En contrapartida, el adicionar mayor cantidad de muestra a la llama equivale a enfriarla sensiblemente.

Cámara de premezcla



Nada más salir del nebulizador el fino vapor de la muestra, penetra dentro de un recinto cerrado llamado cámara de premezcla.

En la cámara, se separan la fase en estado de vapor de la fase en estado líquido, mezclándose la primera con el oxidante y combustible íntimamente, de tal forma que pueda alcanzar este conjunto el mechero, cuya llama suministrará la energía necesaria para romper las moléculas en sus átomos y llevarlos al estado fundamental.

Casi todas las cámaras de premezcla están fabricadas de polipropileno, que es muy inerte, no contamina de elementos inorgánicos y es muy resistente a la mayoría de los disolventes orgánicos.

Para evitar mayores problemas suele existir un dispositivo de seguridad por si explota la mezcla de oxidante y combustible. Cuando la geometría de la cámara puede permitir estas explosiones, los fabricantes colocan un anclaje al mechero para que no dañe al operador.

Debido a que el rendimiento del nebulizador es del orden del 10% para la mayoría de los disolventes orgánicos, el 90% restante se elimina por un drenaje, para evitar que la parte no nebulizada alcance la llama.

El drenaje más habitual es el hidrostático, consistente en tubo de 1,3 cm de diámetro exterior conectado por una parte a la cámara y por otra a un recipiente de plástico, que mantiene constante un nivel de agua.

La bola de impacto, donde se produce la separación de las fases es de cuarzo o teflón, y se encuentra situada a 0.5 mm del nebulizador.

Mechero

Generalmente están contruidos de titanio pues es una metal que posee un coeficiente de dilatación lineal a altas temperaturas (157).

El camino óptico es uno de los términos fundamentales de la ecuación de Lambert-Beer.

Del mismo modo que en espectroscopía de Ultravioleta-Visible la muestra es contenida en una cubeta de longitud dada, en absorción atómica la muestra es contenida de forma dinámica en la llama.

El mechero más utilizado es el de llama de aire-acetileno. Su camino óptico es de unos 10 cm de largo consiguiendo una máxima sensibilidad.

Otro de los mecheros frecuentemente utilizados es el mechero de óxido nitroso, y está diseñado para trabajar a altas temperaturas.

Su camino óptico es de 5 cm de largo. En determinadas ocasiones, puede usarse también para aire/acetileno pero su sensibilidad es menor.

Llama

Son muchas las etapas que se realizan en la llama para obtener el mayor número de átomos en estado fundamental a partir de una disolución (157)(158), evitando al mismo tiempo que se formen átomos en estado excitado.

Existen diferentes tipos de llamas:

- aire/gas ciudad
- aire/butano
- aire/propano
- aire/acetileno
- oxígeno/acetileno
- oxido nitroso/acetileno
- oxido nitroso/hidrógeno
- argón/hidrógeno

A la hora de elegir la más conveniente, hay que tener en cuenta varios factores:

- fácil disponibilidad
- manejo sencillo
- temperatura adecuada
- gran transparencia
- espectro de pocas líneas
- suficientemente seguras

Oxidante	Combustible	Temperatura K	Kilocalorias
Aire	Gas ciudad	1980	108. 5
Aire	Butano	2170	687. 9
Aire	Propano	2200	530. 5
Aire	Acetileno	2600	106. 5
Oxígeno	Acetileno	3300	106. 5
N ₂ O	Acetileno	3220	1106. 5
Aire	Hidrógeno	2275	58. 0
Oxígeno	Hidrógeno	2825	58. 0

Para trabajar entre 190 y 850 nm la llama de aire/acetileno es la más ventajosa. Para elementos refractarios como el silicio, molibdeno, vanadio, cromo, aluminio y titanio a veces se recomienda la llama de nitroso/acetileno pues aporta más cantidad de oxígeno que el aire, proporcionando por tanto una temperatura superior.

En determinados casos, como por ejemplo en la determinación de arsénico y selenio, debido a que la llama de aire/acetileno presenta una fuerte absorción a la longitud de onda característica de estos elementos, es necesario recurrir a otras llamas alternativas.

En la llama se distinguen perfectamente tres partes (142): la zona interna próxima al mechero, de temperaturas relativamente bajas, aquí es donde se volatiliza el disolvente; la zona

de reacción es donde se produce la atomización y donde hay una mayor proporción de átomos en estado fundamental; y la zona externa, que es la parte más fría de la llama, y donde hay más cantidad de oxígeno que se combina dando óxidos refractarios poco convenientes para absorción atómica.

HORNO DE GRAFITO

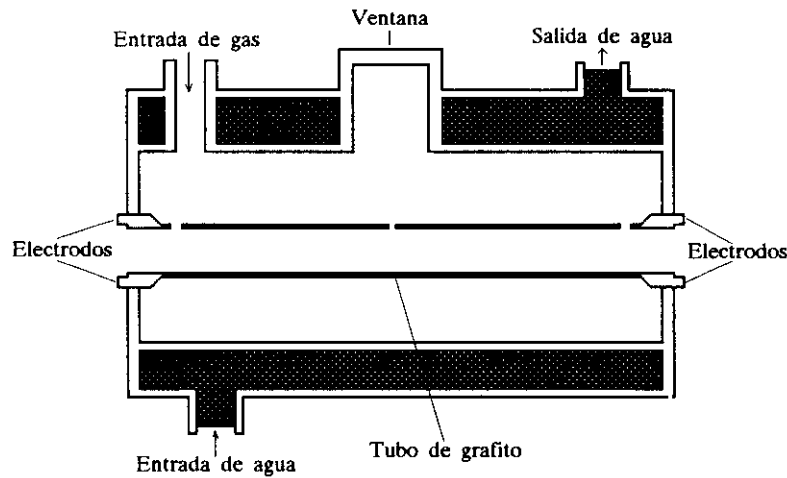
Los hornos de grafito son unos recintos en donde se produce la atomización y que están calentados por resistencias eléctricas (159)(160)(161)(162). Tienen una eficiencia de atomización mayor que la llama, y en consecuencia, los límites de detección absoluta son mejorados 100 ó 1000 veces en comparación con los métodos de llama.

Los hornos más utilizados son:

- Horno de L'Vov (137).
- Cubeta de Massman (162).
- Cubeta de Manning (156).

De todos ellos, el que se utiliza más a menudo es el horno o cubeta de Massman.

Consta de un cilindro hueco de grafito situado en la trayectoria del haz luminoso procedente de la lámpara de cátodo hueco, que está en contacto con unos electrodos, también de grafito, situados en sus extremos, entre los que se aplica una corriente eléctrica de 500 amperios y de 1000 voltios.



Horno de Massman

El cilindro de grafito está encerrado en una caja metálica con una ventana superior por la que se introduce la muestra (1-100 μ l) la cual va a parar directamente al centro del interior del tubo de grafito.

Por efecto de la corriente eléctrica aplicada, la muestra primeramente se deseca a unos 100 °C, luego se incinera, se atomiza y finalmente se volatiliza. Todo ello se logra programando temperaturas creciente a intervalos de tiempo previamente determinados. Terminado el ciclo del programador, que dura unos pocos minutos, el circuito se desconecta automáticamente.

Durante todo el proceso circula por el interior de la caja metálica un flujo continuo de gas inerte (argon o nitrógeno), para prevenir la oxidación del grafito a las altas temperaturas y

también para evitar la formación de óxidos refractarios, y por una camisa exterior a la caja metálica circula agua, refrigerando todo el sistema, para evitar el excesivo calentamiento del horno.

Los hornos de grafito generalmente proporcionan límites de detección absoluta muy buenos (del orden de 10^{-12} g) y son capaces de vaporizar muestras muy pequeñas. Han sido una solución satisfactoria para un conjunto de problemas analíticos para los cuales los límites de detección eran inadecuados con los atomizadores de llama, pero no son la panacea.

Sus principales inconvenientes son la menor precisión y la presencia de mayores interferencias que en los atomizadores de llama. La falta de precisión es consecuencia de la utilización de micromuestras.

GENERADOR DE HIDRUIROS

Se emplea este método de atomización en aquellos elementos que originan fácilmente hidruros volátiles y que mediante un pequeño calentamiento producen átomos en estado fundamental, como son arsénico, selenio, telurio, antimonio, bismuto y estaño.

Generalmente se trata la muestra con una solución de borohidruro sódico que genera los hidruros volátiles correspondientes. Se conducen los hidruros mediante un gas inerte hasta una célula de cuarzo, que se calienta eléctricamente hasta unos $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que se sitúa en el camino óptico del haz procedente de la lámpara.

La ventaja que presenta este método en comparación con la atomización de llama es que se consiguen resultados más reproducibles por no existir pérdidas ocasionadas en la atomización por la formación de compuestos volátiles.

TECNICA DE VAPOR FRIO

Utilizada con exclusividad para la determinación de mercurio, por la elevada volatilidad que presenta este elemento.

En esquema, la técnica de vapor frío es muy semejante a la técnica de atomización por generación de hidruros.

En esencia, el mercurio presente en la muestra es químicamente reducido a su forma elemental mediante borohidruro sódico, y es arrastrado por una corriente de aire a través de una célula de absorción de cuarzo de unos 15 cm de longitud colocada en el haz de muestra del espectrofotómetro de absorción atómica.

La célula se calienta a 100 °C electricamente para evitar la condensación del agua e incrementar la sensibilidad analítica.

La ventaja de la técnica de vapor frío es que permite determinar cantidades de mercurio menores de un microgramo.

II.4.C.- SISTEMA OPTICO

CONSTITUYENTES

El sistema óptico de un espectrofotómetro de absorción atómica está formado por los siguientes componentes:

- Espejos
- Lentes
- Láminas plano paralelas
- Red de difracción

Lentes y espejos

Conducen y concentran la energía emitida por la lámpara

En cualquier sistema óptico se intenta siempre simplificar al máximo el número de componentes, pues consumen una considerable cantidad de energía.

Los espejos tienen una pérdida de la energía incidente de aproximadamente un 4% por reflexión, y de un 6% al atravesar su superficie. La lente pierde también un 10% de la energía incidente.

Los espejos presentan el inconveniente de que se deterioran fácilmente, especialmente cuando en las proximidades está situada la lámpara de deuterio, pues genera ozono que daña el aluminizado del espejo. Sin embargo, a las lentes no les afecta el ozono.

Igualmente, cuando se trabaja en la zona UV un espejo disminuye considerablemente su reflexividad al cabo de un año, lo cual afecta considerablemente a elementos como el zinc, el selenio, el plomo, etc. y en general, a todos aquellos elementos que presentan líneas características por debajo de 250 nm.

Por el contrario las lentes no sufren deterioro y además, pueden limpiarse con facilidad.

La enorme ventaja de los espejos es que son muchísimo más baratos que las lentes y también, que no precisan corrección en la distancia focal con el paso del tiempo cosa que si que es necesaria para las lentes.

Láminas plano paralelas

Están formadas por una lámina de cuarzo transparente al U. V., y limitadas por dos superficies planas y paralelas.

Consumen un 10% de la energía y se utilizan en los sistemas a base de espejos con objeto de protegerlos del polvo y de los agentes externos.

Redes de difracción

Se utilizan en todos los tipos de espectrofotometría para separar las distintas longitudes de onda de un haz policromático.

Generalmente consisten en una lámina de aluminio en la que se practican unos surcos iguales y paralelos. La superficie reflectante se recubre de aluminio, oro o platino según los rangos de longitud de onda en que se desee trabajar.

Para usarlas en absorción atómica es preciso que tengan el suficiente número de líneas para trabajar en el espectro U.V., pero no demasiadas para que cubra también el visible.

Cuando se utilizan espejos, debido a que presentan un ángulo sólido mayor y en consecuencia el haz de iluminación es más ancho que el de las lentes, es preciso que el tamaño de la red sea mayor que en el caso de que se utilizaran lentes, para que recoja totalmente el haz de iluminación.

RENDIMIENTO DE UN SISTEMA OPTICO

Es la relación entre la energía emitida por la lámpara y la cantidad de energía que llega al monocromador durante un ciclo completo de modulación. En la siguiente tabla, se observan los rendimientos ópticos para los diferentes sistemas de espectrofotometría de absorción atómica que existen actualmente.

RENDIMIENTO OPTICO		
	ESPEJOS	LENTEs
HAZ SIMPLE	43, 0%	72, 9%
HAZ DOBLE	4, 4%	14, 7%

Se puede apreciar que son los aparatos con haz simple y con un sistema óptico de lentes los que presentan un mayor rendimiento óptico. Por ello, en la actualidad la mayor parte de los equipos que se comercializan poseen estas características.

Sin embargo, en los primeros años de la absorción atómica solo se disponía de haz doble porque las lámparas, la fuente de alimentación y modulación, eran en general bastante inestables y el doble haz eliminaba gran parte del problema.

II.5.- ¿QUE ELEMENTOS PUEDEN ANALIZARSE POR AA?

Existen condicionantes instrumentales que hacen que en el momento actual se puedan determinar 82 elementos.

Desde el punto de vista técnico es perfectamente factible la fabricación de cualquier lámpara de cualquiera de los elementos del sistema periódico. Desgraciadamente, no puede

decirse lo mismo de los detectores, los cuales sólo presentan una sensibilidad aceptable en un determinado intervalo de longitudes de onda.

Por otra parte, el sistema de obtención de átomos en estado fundamental, es decir la llama, presenta una fuerte absorción a longitudes de onda inferiores a 200 nm, lo cual impide trabajar por debajo de esas frecuencias, salvo con otras técnicas como el horno de grafito.

Además, a estas bajas frecuencias el oxígeno del aire absorbe radiaciones UV, por lo que para trabajar en este rango es preciso purgar todo el sistema con gases inertes.

Los equipos de absorción atómica actuales trabajan en el rango de frecuencias de 190 a 850 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

III.- MATERIALES Y METODOS

III.1.- INSTRUMENTACION

Para la ejecución de este trabajo se ha empleado un espectrofotómetro de absorción atómica **VARIAN SPECTRAA 30**, con corrección de fondo con lámpara de deuterio, de fabricación australiana, importado por la empresa Ces Analítica. El funcionamiento del espectrofotómetro y el procesamiento de los datos se ha realizado mediante el procesador **DATA STATION 12** suministrado igualmente por Varian.

El horno de grafito empleado ha sido el modelo **GT 45** manufacturado también por Varian. Los tubos de grafito utilizados son de Varian y presentan cubierta pirolítica.

La lámpara de cátodo hueco para el selenio proporcionada por Varian resultó ser inestable. Se ha conseguido mejor reproducibilidad usando una lámpara **Juniper** (S&J Juniper & Co., Harlow, Essex, UK) trabajando a una intensidad de corriente de 7 mA, en la línea de 196,0 nm, y con una rendija de 1,0 nm.

III.2.- REACTIVOS Y ESTANDARES

Acido clorhídrico concentrado. Merck "Suprapur", Darmstadt, F.R.G.

Solución estándar de selenio. Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A. Preparada a partir de la solución de dióxido de selenio que contiene 990 μg de selenio por ml disuelto en HCl concentrado. Se preparó una solución "madre" de $10^4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ diluyendo con agua desionizada.

Cloruro de paladio. Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A. Disuelto en HCl 5 N.

Yoduro potásico. Merck "Suprapur", Darmstadt, F.R.G.

Seleno DL-metionina. Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

El agua usada fue desionizada, destilada y filtrada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.)

Las muestras de sangre fueron extraídas en jeringas desechables de polietileno con aguja de acero inoxidable.

Las muestras se centrifugaron a 100g durante 5 minutos, y el suero obtenido se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis.

III.3.- LIMPIEZA DEL MATERIAL.

Todo el material de vidrio usado en el trabajo se ha tratado con solución detergente ACATIONOX (distribuido por Scientific Products), que contiene menos de 0,002% de sodio, potasio, calcio o magnesio, estando libre de metales no iónicos, recomendado para el lavado de material en el que se sospecha la presencia de metales.

Después se limpió por inmersión en agua regia (tres volúmenes de ácido clorhídrico concentrado con uno de ácido nítrico concentrado; es un enérgico oxidante, debido a la acción del nítrico sobre el clorhídrico se producen dos sustancias oxidantes el cloro y el cloruro de nitrosilo; por esta fuerte acción oxidante actúa disolviendo a metales que no son atacados por otros ácidos, y disuelve también sulfuros muy insolubles).

Por último, se enjuagó todo el material dos veces en agua destilada y en agua desionizada y secados a 70 °C.

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

IV.- METODO DE DETERMINACION

IV.1.- PROBLEMAS DE LA DETERMINACION DE SELENIO EN SUERO

Los reducidos niveles de selenio en suero humano se encuentran muy por debajo del rango analítico de la espectrofotometría de absorción atómica en llama, cuyo límite de detección es de aproximadamente $0,5 \mu\text{g/ml}$ en solución, con llama de aire-hidrógeno.

Son muchos los métodos descritos para la determinación de selenio en materiales biológicos, que pueden alcanzar mejores límites de detección, de todos ellos, el que presenta mayores garantías de exactitud y precisión es el análisis de activación de neutrones, pero que no es practicable en un laboratorio clínico por precisar un reactor nuclear. Muchos de los métodos publicados para el análisis de selenio en material biológico requieren una digestión ácida del material orgánico, seguida por fluorometría o absorción atómica con generación de hidruros, para las cuales son necesarias grandes cantidades de suero poco practicables en la bioquímica clínica rutinaria y, desde luego, inapropiadas para las determinaciones procedentes de poblaciones pediátricas.

Respecto a los métodos electrotérmicos de determinación de selenio en suero con espectrofotometría de absorción atómica, entre los cuales está la técnica del horno de grafito (EAAHG), se pueden encontrar publicaciones contradictorias y confusas, probablemente más que para ningún otro elemento químico.

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito consigue descender los límites de detección al rango de partes por billón (p.p.b.) con una instrumentación relativamente simple y sin los esfuerzos y pérdidas de tiempo que conllevan las técnicas de extracción previa.

Los problemas analíticos asociados a la determinación de selenio en suero pueden dividirse en dos clases :

- interferencias espectrales
- pérdidas térmicas pre-atomización.

IV.1.A.- INTERFERENCIAS ESPECTRALES

Se conocen dos tipos de interferencias espectrales para el selenio :

- a) Interferencia debida al hierro.
- b) Interferencia del fósforo

INTERFERENCIA DEL HIERRO EN LA SEÑAL DE ABSORBANCIA DEL SELENIO.

El hierro, presente en la sangre total en una concentración de 500 mg/l, exhibe líneas espectrales próximas a los 196,0 nm (línea de resonancia del selenio) que pueden provocar interferencias.

Aproximadamente catorce líneas del espectro del hierro (163) pueden encontrarse en una región de $196,0 \text{ nm} \pm 1$, de ellas las más próximas son la de 196,014 nm y la de 196,32 nm. Es obvio que aunque seleccionemos monocromadores con rendijas muy pequeñas no podremos excluir la totalidad de ellas, sin degradar la relación señal-ruido hasta perder la utilidad.

Esta presencia de hierro provoca una absorción de radiación continua dentro de la ventana espectral del monocromador.

La línea secundaria del selenio a 204,0 nm está libre de cualquier interferencia espectral del hierro. Sin embargo, esta línea secundaria presenta aproximadamente seis veces menos sensibilidad que la línea principal de 196,0 nm, haciéndola inapropiada para las valoraciones en suero, además aunque no interfiera el hierro, si lo hacen el cromo y el níquel (frecuentemente usado como corrector de matriz).

Las líneas de absorción del hierro entre $196,0 \pm 1 \text{ nm}$ provocan una distorsión de la señal detectada de tal forma que no corresponde a la absorción de los átomos de selenio de

la muestra, si no que aparecen señales falsamente aumentadas. Hemos diseñado un protocolo experimental para comprobar esta hipótesis en el que añadimos elevadas cantidades de hierro sobre una misma cantidad de selenio (y paladio como modificador de matriz como establecemos más adelante).

En todas las inyecciones colocamos en el horno:

-5 μ l de estándar de selenio de 200 μ g/l

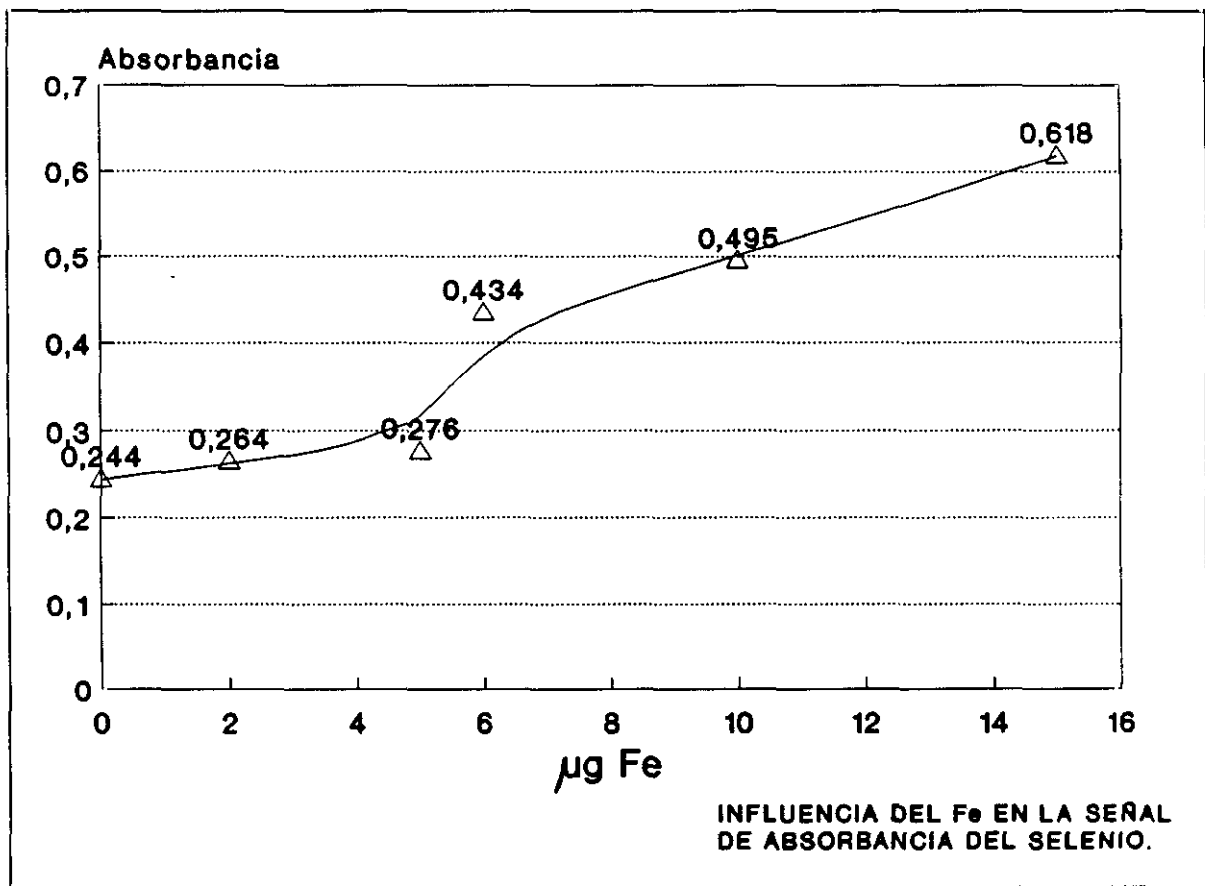
-3 μ l de modificador de 50 mg de paladio/l

que corresponden a :

-1 ng de selenio

-1,5 μ g de paladio

μ g de hierro	absorbancias
0	0,244
2	0,264
5	0,276
6	0,434
10	0,495
15	0,618



Cuando la relación Fe/Se supera la proporción 5000/1 la señal de lectura registrada se encuentra aumentada en un 78% erróneamente. Si la relación es de 2000/1 el aumento de la señal de lectura es de un 8%.

Afortunadamente en las muestras biológicas que estudiamos (suero) la cantidad de hierro existente es menor: admitiendo una concentración media en sangre total de 5000 µg de hierro por litro y de 100 µg de selenio, es decir una proporción de 50/1. En suero la proporción disminuye a 10/1.

En cualquier caso queda demostrada la necesidad de establecer un programa de tratamiento térmico que elimine la mayor parte posible de hierro. La temperatura en la que empieza a perderse el hierro en el horno de grafito es de 800°C.

INFLUENCIA DEL FOSFORO EN LA SEÑAL DE ABSORBANCIA DEL SELENIO.

El aumento del fondo de absorción continua provoca una absorbancia calculada que no corresponde realmente al selenio presente en el tubo, sino que disminuye su magnitud.

Modelo experimental:

En todas las inyecciones colocamos en el horno:

-5 μ l de estándar de 200 μ g de selenio/l

-3 μ l de modificador de 50 mg de paladio/l

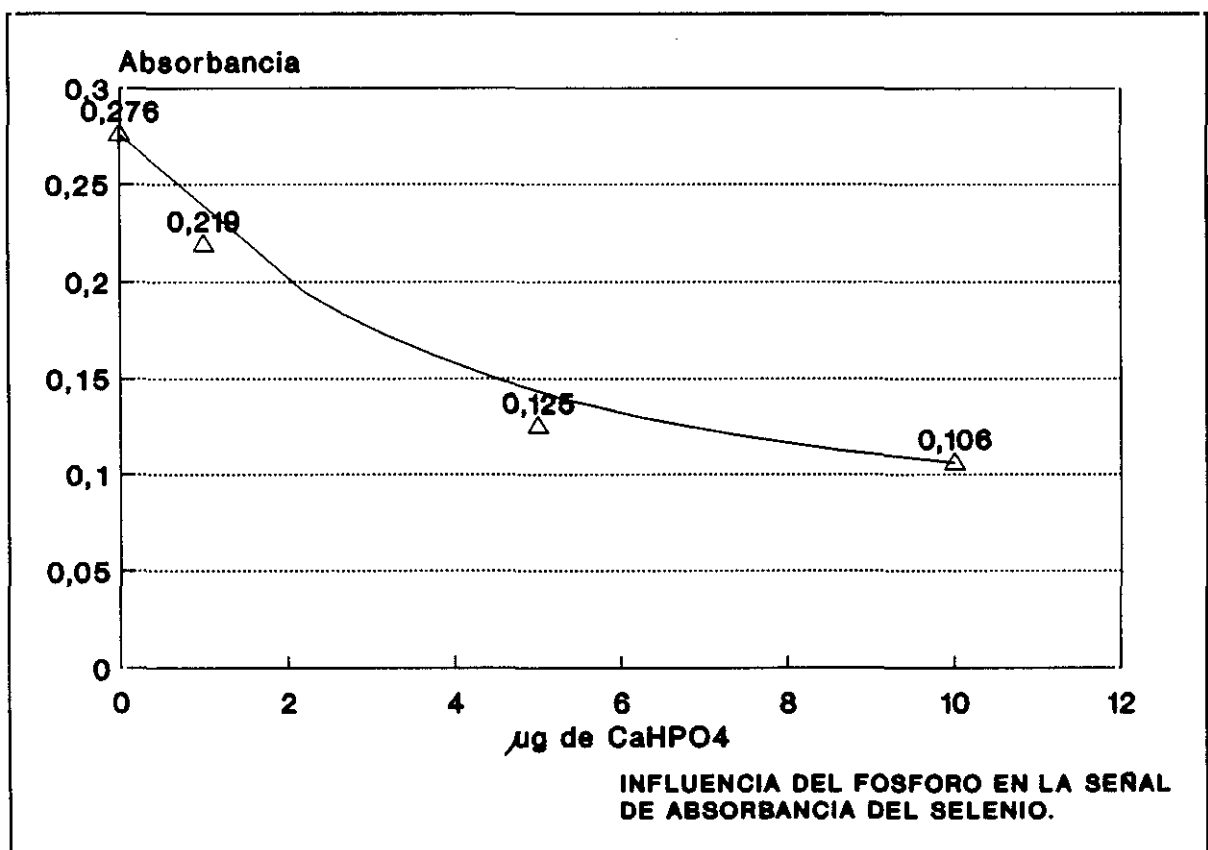
que corresponden a:

-1 ng de selenio

-1,5 ng de paladio.

μ g CaHPO ₄ (μ l)	Absorbancias
0 (0)	0,276
1 (4)	0,219

$\mu\text{g CaHPO}_4 (\mu\text{l})$	Absorbancias
5 (20)	0,125
10 (40)	0,106



La interferencia espectral causada por la presencia de fosfatos en la sangre se ha atribuido (164) a la absorción del P_2 y PO^+ originados en la descomposición térmica del fosfato cálcico.

El ortofosfato cálcico y el hidrógeno ortofosfato cálcico causan interferencias en la línea de 196 nm del selenio, la absorción inespecífica del fondo provoca problemas de sobrecompensación, siendo tanto mayores cuanto más compleja es la matriz del suero, provocando señales "negativas" que no son representativas del contenido de selenio.

IV.1.B. - PERDIDAS TERMICAS PRE-ATOMIZACION:

El selenio es un elemento relativamente volátil (punto de ebullición 685 °C) que se une al azufre dando diversos compuestos estables.

La medida de selenio con EAAHG en matrices difíciles requiere una estabilización previa del elemento. Sin esta estabilización el selenio se pierde en numerosas formas a bajas temperaturas de calcinación.

FORMA	PUNTO DE EBULLICION °C
SeO ₃	180 (se descompone)
Se ₂ Cl ₂	130 (se descompone)
SeCl ₄	288 (se descompone)
SeOCl ₂	176 (se descompone)

IV.2.- ABSORCION DE FONDO DEL SUERO

IV.2.A.- CURVAS DE ABSORCION DE RADIACION CONTINUA CAUSADAS POR LA MATRIZ SERICA.

Para estudiar la absorción del fondo (matriz sérica) se inyectan **15 μ l de suero** en el horno de grafito, se programa una lectura a 196,0 nm (línea de resonancia del selenio) atomizando a 2700° C, previamente se incluye un paso de secado del tubo y otro paso de calcinación de la matriz orgánica, estudiándose el efecto del uso de temperaturas crecientes en este paso de calcinación (expresadas en grados centígrados)

PARAMETROS DEL MUESTREADOR

VOLUMENES (μ l)

ESTANDAR (500 μ g/l)	BLANCO	MODIFICADOR	MUESTRA
3	24	-	15

Para estudiar las absorciones del fondo el espectrofotómetro se programa para que sólo registre las absorbancias de la lámpara de deuterio que emite un espectro continuo.

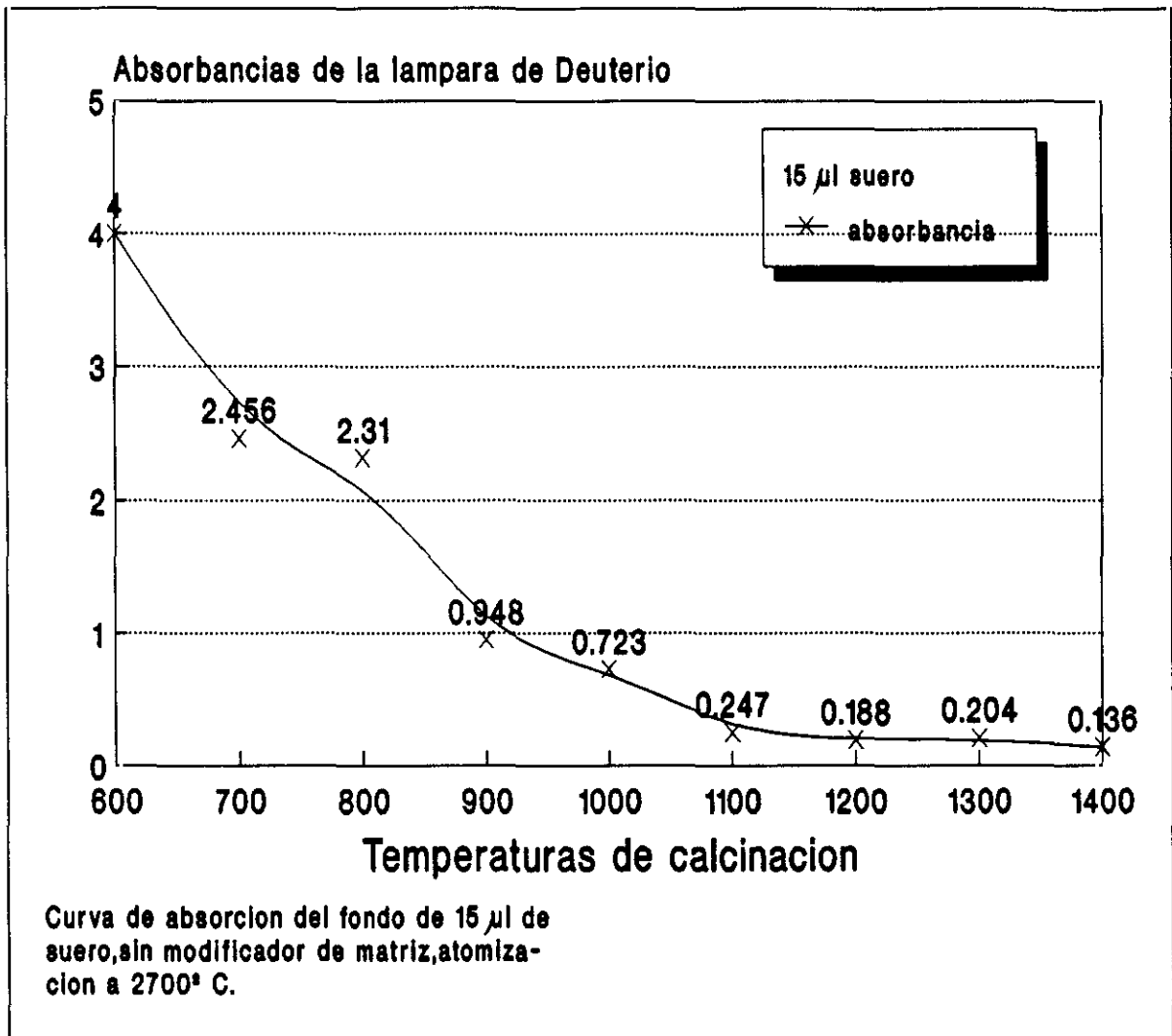
Se añade el estándar de selenio para homogeneizar las condiciones analíticas, y evitar errores al comparar resultados.

El blanco (HCl 0,5%) se utiliza para igualar los volúmenes inyectados en el tubo de grafito.

Las absorbancias consignadas en la tabla representan las absorbancias medias (3 réplicas) registradas en la lámpara de deuterio.

El asterisco indica que la lectura de la lámpara de deuterio sobrepasa el valor de corrección permitido para esta fuente continua, en este aparato.

Temperaturas (°C)	Absorbancias
600	4,000*
700	2,456*
800	2,310*
900	0,948*
1000	0,723
1100	0,247
1200	0,188
1300	0,204
1400	0,136



La corrección de fondo con lámpara de deuterio es practicable cuando la atenuación del fondo es independiente de la longitud de onda.

Sin embargo, éste no es el caso de la absorción de fondo que surge de este espectro de absorción.

IV.2.B.- LIMITACIONES DE LA CORRECCION DE FONDO CONTINUA

1- Las atenuaciones fuertes de fondo conllevan un aumento del ruido, debido a la segunda fuente de radiación y el manejo de la señal, el ruido aumenta dos o tres veces.

2- Debe mantenerse la absorción del fondo por debajo de 0,5 unidades de absorbancia, valores superiores a 0,7 ó 0,8 unidades no son completamente corregidos.

3- Hemos dado por supuesto que el fondo absorbe de forma continua dentro del paso de banda del monocromador.

Los correctores de fondo que emplean fuentes continuas son incapaces de corregir atenuaciones de fondo de espectros de excitación electrónica, porque estos comprenden muchas líneas muy estrechas. Así son, en general, los espectros derivados de transiciones electrónicas entre niveles rotacionales y vibracionales de un estado electrónico a otros estados electrónicos diferentes de una molécula.

El espectro de excitación electrónica de la molécula de fósforo estudiado con una elevada resolución espectral (165) está formado por un conjunto de líneas muy estrechas.

La línea de resonancia del selenio está exactamente en la mitad de dos líneas rotacionales de la molécula de fósforo.

Debido a esto, existirá poca atenuación sobre la intensidad de la lámpara de cátodo hueco de selenio que emite exactamente a 196,0 nm.

Sin embargo, en la lámpara de deuterio si existirá una atenuación por absorción detectada como continua.

Si la intensidad de la lámpara de cátodo hueco (I_{LC}) disminuye en mayor proporción que la intensidad de la lámpara de deuterio (I_{LD}) se registrará una señal menor que la que corresponde a la concentración real de selenio, dado que la señal es la relación de intensidades : $I_{LC} / I_{LD} = \text{señal}$.

En el caso de la absorción de fondo del hierro suponemos que alguna de sus líneas coincide exactamente a 196,0 nm, con lo que las lecturas obtenidas son cada vez mayores a medida que aumentan las cantidades de hierro presentes.

Para ciertos autores estas interferencias sólo son salvables con efecto Zeeman para corregir la absorción del fondo, sin embargo el método empleado por nosotros permite el empleo de una corrección rutinaria con lámpara de deuterio, exigiendo una adecuada optimización en el uso de modificadores de matriz, y en los parámetros programados para el calentamiento del horno.

Por otro lado se sitúan algunos analistas que confían ciegamente en la corrección con lámpara de deuterio.

En esta memoria se demuestra que la corrección de fondo con lámpara de deuterio no es infalible. Sin embargo, conociendo sus limitaciones podemos establecer un método que permita reducir la señal del fondo hasta conseguir un determinación exacta y fiable.

IV.3.- OPTIMIZACION DEL PROGRAMA DE TEMPERATURAS

En el horno de grafito, sometemos a la muestra a una serie de pasos o rampas de temperatura creciente para liberar al selenio (elemento analito) de los diversos concomitantes hasta el máximo posible antes de pasar a la atomización final mediante un rápido incremento de la temperatura.

Cuanto mejor sea la separación de elementos concomitantes de nuestro analito antes de la atomización, la determinación estará más libre de interferencias. La eficiencia de la separación depende de la volatilidad del selenio en comparación con los concomitantes.

IV.3.A.- PRE-TRATAMIENTO TERMICO. GAS DE PURGA.

Para la vaporización del agua plasmática, hemos comprobado experimentalmente que elevando la temperatura justo debajo del punto de ebullición (90°C) y manteniéndola un tiempo prolongado (70 segundos) conseguimos llevar a sequedad la muestra sin que los problemas de chisporroteo y evaporación brusca nos hagan perder muestra, consiguiendo con este tiempo

Manteniendo el horno 70 segundos a 90 °C se consigue una sequedad completa en el interior del tubo de grafito.

A 120 °C se eliminan completamente las sales más volátiles.

Elevando la temperatura a 300 °C y manteniéndola durante 20 segundos favorecemos la eliminación de componentes con altas temperaturas de ebullición como los oxoácidos (166).

GAS DE PURGA

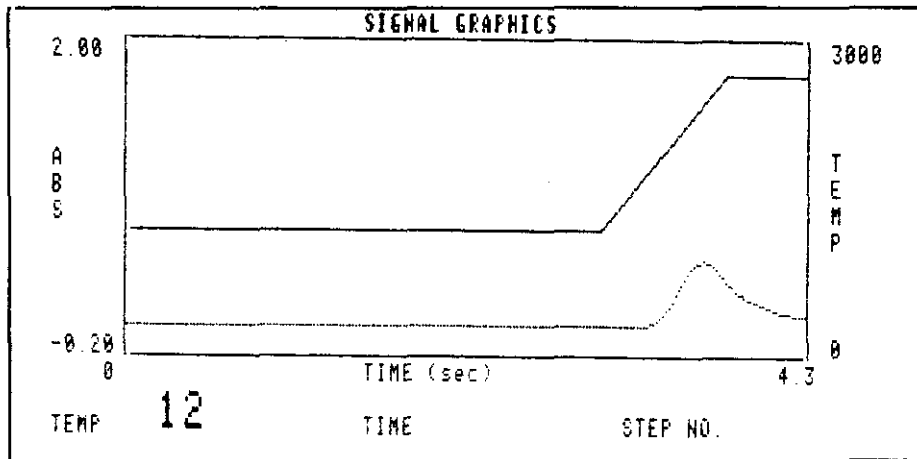
El gas de purga inerte (argón) juega un papel significativo en el rendimiento del horno de grafito.

Su función primaria es prevenir el contacto del oxígeno atmosférico con los componentes del grafito calientes que provocarían su combustión. Dado que el selenio atómico reacciona rápidamente con el oxígeno a altas temperaturas, la atmósfera de gas inerte se hace imprescindible.

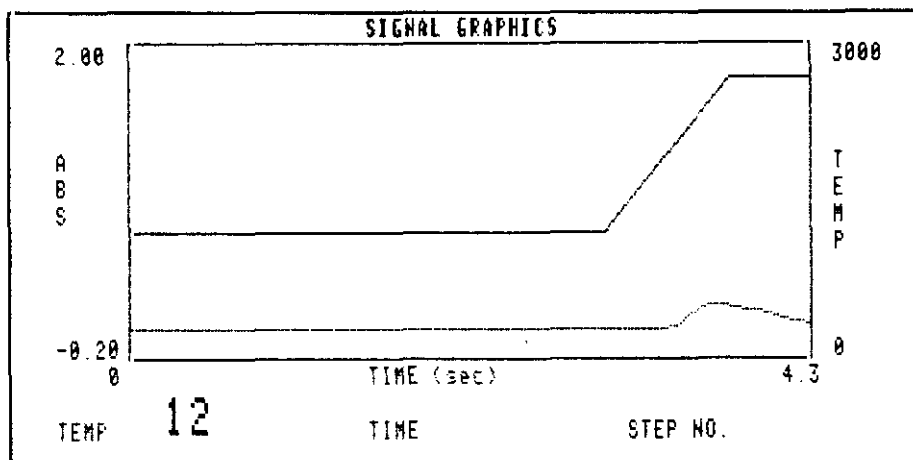
Además de esta función de protección, el argón transporta los concomitantes vaporizados durante los pasos previos de pretratamiento térmico, evitando que se condensen en zonas frías.

Una corriente de gas bien controlada nos ha permitido reducir la atenuación debida a la absorción del fondo.

SEÑAL DE FONDO PRODUCIDA POR 10 μ L DE SUERO, MIDIENDO LA ABSORBANCIA DE LA LAMPARA DE DEUTERIO:



1 FLUJO DEL GAS DE PURGA DE 0,5 L/MINUTO



2 FLUJO DEL GAS DE PURGA DE 3,0 L/MINUTO

El flujo de argón dentro y alrededor del tubo de grafito sirve para eliminar los componentes volatilizados en cada paso del análisis, el flujo durante los pasos previos programados es el máximo permitido, de 3,0 l/minuto, para que la eliminación de productos sea más eficiente. Así lo hemos comprobado:

Inyectamos 40 μ l de suero diluido (1 parte de suero + 3 partes de KI 10 mM), con flujo de **3,0 l/minuto**.

Produce una **absorbancia = 0,164** registrada únicamente en la lámpara de espectro continuo de deuterio. Corresponde por tanto a la absorción molecular inespecífica.

Durante los pasos de atomización el gas debe reducirse a un flujo de **0 l/minuto** como veremos más adelante para mejorar la sensibilidad del analito.

Si inyectamos igual cantidad de suero diluido en igual proporción, con un flujo de **0,5 l/minuto** de argón, la **absorbancia = 0,461** registrada también en la lámpara de deuterio.

En ambos casos se emplea una temperatura de calcinación de 1200 °C y un estado de atomización de 2700 °C.

El gas usado durante este proceso de altas temperaturas debe ser de la máxima pureza posible, para evitar reacciones con los elementos de la matriz.

IV.3.B.- CALCINACION. MODIFICADORES DE MATRIZ.

Se han publicado diversos trabajos sobre la estabilidad térmica del selenio (163)(167). La técnica más popular es la que adiciona una solución de níquel a la muestra antes del análisis o en el horno de grafito.

Gracias al níquel se consigue evitar en cierto modo que el selenio se volatilice en los pasos previos.

CURVA DE VOLATILIDAD PARA 2,5 NG DE SELENIO EN SOLUCION ACUOSA.
SIN MODIFICADOR DE MATRIZ.

Para este estudio hemos empleado el muestreador automático programado para inyectar 5 μ l de una solución patrón de selenio de 500 μ g/l (equivale a 2,5 ng de selenio en el tubo) y 25 μ l de HCl 0,5%. Se han realizado 5 réplicas por punto.

PARAMETROS DEL MUESTREADOR

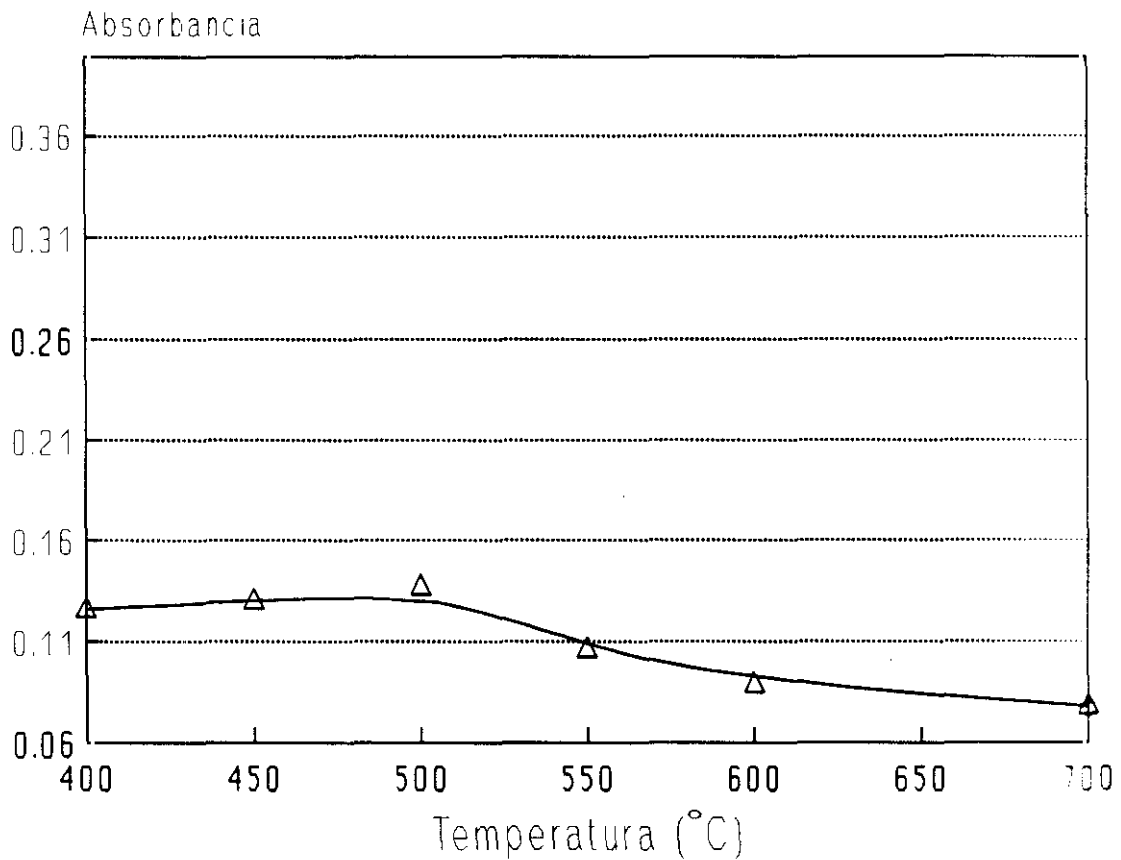
VOLUMENES (μ l)

ESTANDAR	BLANCO	MODIFICADOR	MUESTRA
5	25	-	-

ABSORBANCIAS MEDIAS DE LA LAMPARA DE CATODO HUECO

(5 réplicas)

Abs. Medias	C. V. (%)	T ^a Calcinação (°C)
0,126	17,4	400
0,130	10,8	450
0,137	5,3	500
0,106	5,9	550
0,089	8,2	600
0,078	9,8	700



Curva de calcina:
2,5 ng de selen
Atomización a 2

Sobre una solución acuosa, el selenio se pierde del tubo a temperaturas tan bajas como 600 °C, a las cuales, veíamos antes, la absorbancia debida al fondo de la matriz sérica es muy elevada, impidiendo la corrección adecuada con una lámpara de deuterio.

ESTABILIZACION TERMICA DEL SELENIO USANDO SOLUCIONES DE NIQUEL.

Hemos programado las inyecciones automáticas de 2 μ l de solución estándar de selenio de 1000 μ g/l corresponde a 2,0 ng de selenio en el tubo de grafito) y 22 μ l de HCl 0. 5% como blanco.

La influencia del tipo de sal de níquel empleada para la estabilización térmica se evidencia comparando las absorbancias obtenidas al usar:

- Solución de cloruro de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 16,82 M que contiene 4 gramos de níquel por litro; inyecta 5 μ l que corresponde a 20 μ g de Ni.
- Solución de nitrato de níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 19,80 M que contiene también 4 gramos de níquel por litro; inyecta 5 μ l que corresponden a 20 μ g de Ni.

PARAMETROS DEL MUESTREADOR

VOLUMEN (μ l)

ESTANDAR	BLANCO	MODIFICADOR	MUESTRA
2	22	5	-

Número de réplicas por inyección = 10

Se ha usado una temperatura de calcinación de 1000 °C y de atomización de 2700 °C.

	Absorbancias ($x \pm S.D.$)
Modificador $NiCl_2$	$0,35 \pm 0,014$
Modificador $Ni(NO_3)_2$	$0,72 \pm 0,077$

Se comprueba que en presencia de cualquiera de las sales de níquel el selenio se estabiliza a la temperatura de calcinación empleada (1100 °C), siendo significativamente superior ($p < 0,001$) la cantidad de selenio que permanece sin volatilizarse al emplear $Ni(NO_3)_2$ que cuando se emplea la misma cantidad de níquel (20 μg) en forma de cloruro.

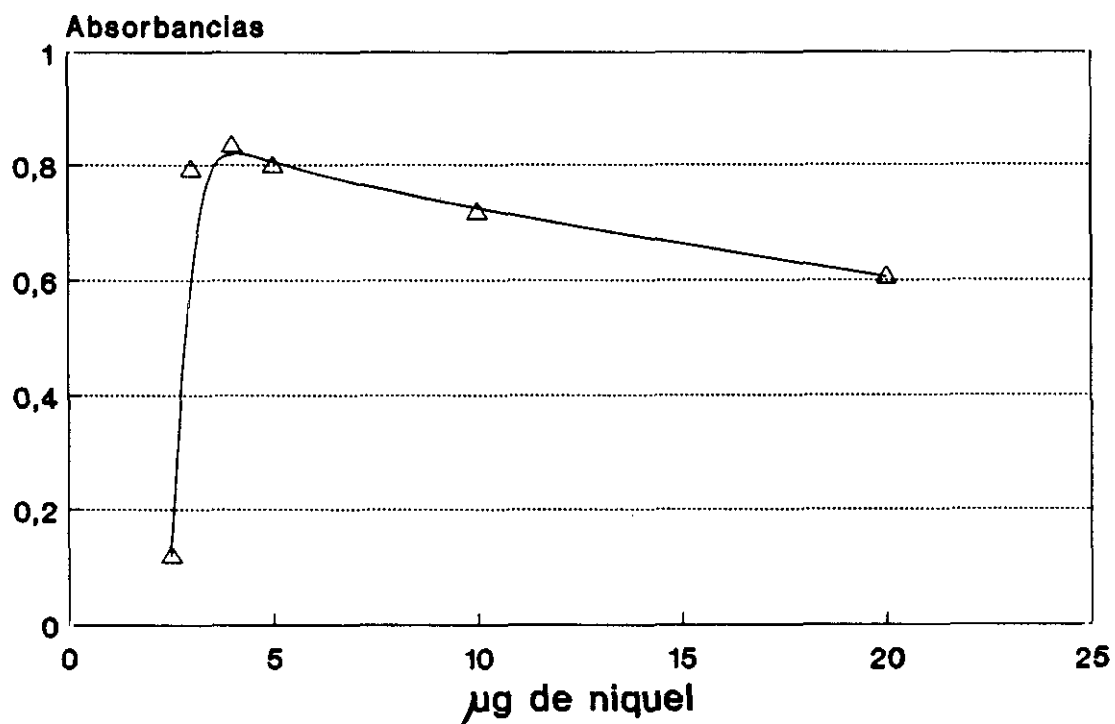
CANTIDAD OPTIMA DE $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ PARA ESTABILIZAR 2,5 μg DE SELENIO.

Inyectamos automáticamente 5 μl de una solución de estándar de selenio de 500 μg Se/l que corresponde a 2,5 ng del metal.

Empleamos, como blanco, HCl 0,5% y como modificador, nitrato de níquel.

Se han realizado 10 réplicas por medida.

$\mu\text{g Ni}$	Abs. ($\bar{x} \pm \text{s. d.}$)	Nº réplicas
20	$0,606 \pm 0,019$	10
10	$0,719 \pm 0,011$	10
5	$0,799 \pm 0,022$	10
4	$0,835 \pm 0,088$	10
3	$0,793 \pm 0,063$	10
2,5	$0,119 \pm 0,016$	10



Cantidad optima de nitrato de niquel
para estabilizar 2,5 ng de selenio

Empleando soluciones que permitan una presencia de 4 μg de níquel en el tubo de grafito se estabilizan los 2,5 ng de selenio a los 1100° C empleados como temperatura de calcinación.

CURVA DE CALCINACION DE 2,5 NG DE SELENIO CON MODIFICADOR DE NIQUEL.

Para su estudio hemos programado una inyección automática de 5 μl de estándar de selenio de 500 $\mu\text{g/l}$ de concentración que corresponde a 2,5 ng de selenio), con 10 réplicas por punto, 4 μl de una solución de nitrato de níquel que contiene 1 g/l de níquel corresponde a 4ng de níquel.

Como blanco empleamos HCl 0,5 %.

PARAMETROS DEL MUESTREADOR

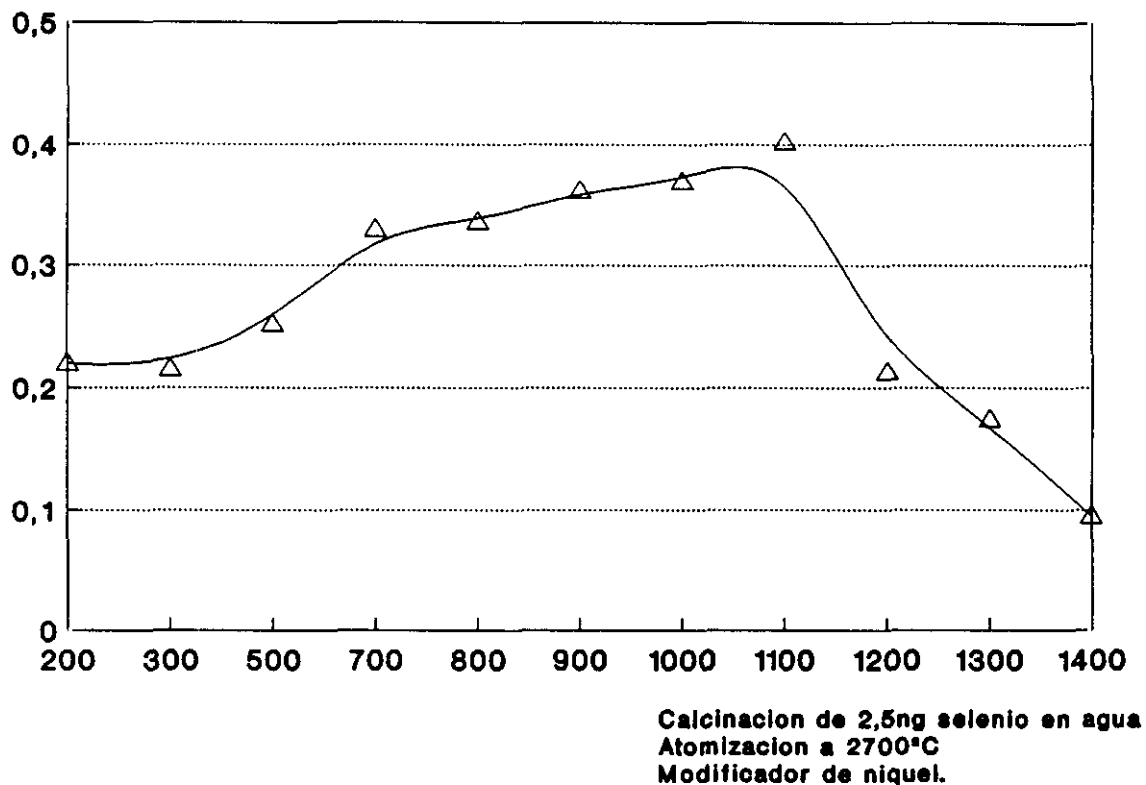
VOLUMEN(μl)

ESTANDAR	BLANCO	MODIFICADOR	MUESTRA
3	19	4	-

El níquel en el tubo de grafito el selenio forma compuestos termoestables que le permiten permanecer en él sin volatilizarse hasta temperaturas muy superiores, incluso calcinando a 1100 °C hay absorbancias de energía apreciables a 196,0 nm, debidas a los átomos de selenio liberados al elevar la temperatura del horno de grafito a 2700 °C.

Esta temperatura de atomización es la misma que la empleada en el experimento anterior.

Abs. Medias	C. V. %	T ^a Calcinación (°C)
0. 220	4,6	200
0,215	7,5	300
0,252	2,8	500
0,329	4,4	700
0,335	5,9	800
0,361	6,6	900
0,369	3,2	1000
0,402	2,1	1100
0,213	3,2	1200
0,174	6,0	1300
0,095	4,2	1400



El níquel estabiliza al selenio consiguiéndose un óptimo en la relación señal/fondo cuando se calcina 1100 °C, pero a temperaturas superiores la pérdida del analito es considerable.

Aunque estos resultados obtenidos con el níquel como modificador son satisfactorios y permiten la determinación de selenio en solución acuosa, la señal de absorbancia de fondo debida a la matriz sérica es todavía muy elevada a 1100 °C (0,247 unidades de absorbancia para 15 μ l de suero).

Esta elevada señal, dificulta la determinación, provocando una sobrecorrección del fondo, dado que la lámpara de deuterio no puede corregir correctamente la señal.

Otro dato importante es que el níquel pierde su función de estabilizador de los compuestos de selenio cuando está presente la glucosa (40 μg). Según el estudio publicado por Weibust (168) en 1981 hay diecinueve metales, incluidos el níquel y el cobre, que estabilizan térmicamente el telurio inorgánico. De ellos sólo nueve muestran efecto sobre la matriz orgánica. El paladio y el platino producen los mejores resultados, proveyendo una estabilidad a 1200 °C.

Sobre la base de que el telurio es químicamente similar al selenio hemos estudiado este efecto estabilizador térmico del paladio sobre el selenio:

CANTIDAD OPTIMA DE PALADIO PARA ESTABILIZAR 2,5 NG DE SELENIO.

Inyección automática de **5 μl de estándar** de selenio de 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ de concentración (2,5 ng del metal). Empleamos como blanco **HCl 0,5 %** y **cloruro de paladio (PdCl_2)** como modificador.

Las masas crecientes de paladio provocan un cierto retraso en el tiempo de aparición de los átomos de selenio, así como un ensanchamiento de la señal de selenio. Hemos intentando emplear las cantidades mínimas de este elemento para modificar la matriz.

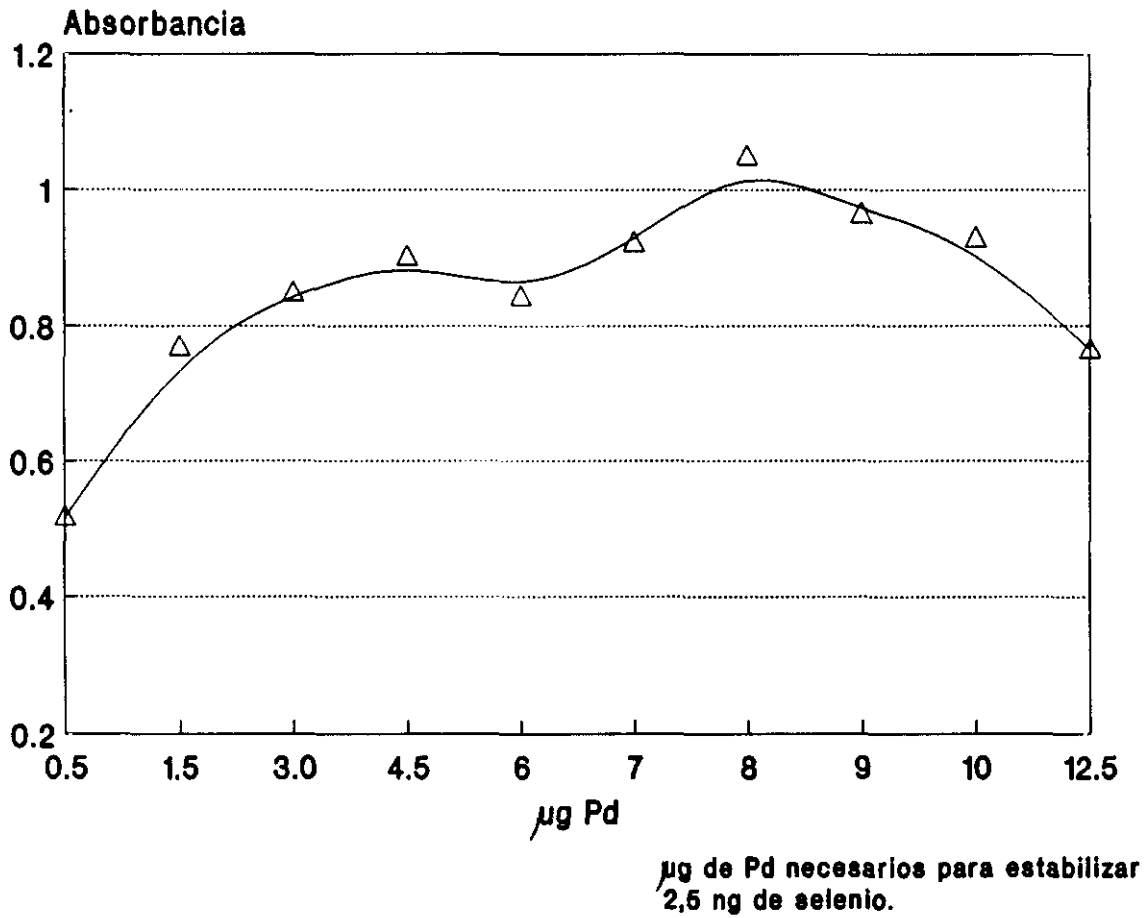
Preparamos una solución de cloruro de paladio que contiene **Pd 50 mg %**, y programamos el muestreador automático para la inyección de cantidades variables de modificador y blanco, igualando siempre el volumen final a **45 μl** .

Cada punto se estableció con 4 réplicas.

El programa de temperaturas establece una calcinación a 1200 °C y la temperatura que alcanza para atomizar al selenio es 2700 °C.

μl de solución	μg de paladio	Abs.(x \pm s.d.)
1	0,5	0,517 \pm 0,042
3	1,5	0,768 \pm 0,040
6	3,0	0,848 \pm 0,037
9	4,5	0,901 \pm 0,021
12	6,0	0,843 \pm 0,041
14	7,0	0,921 \pm 0,033
16	8,0	1,049 \pm 0,026
18	9,0	0,963 \pm 0,022
20	10,0	0,928 \pm 0,038
25	12,5	0,764 \pm 0,052

De esta forma establecemos una óptima sensibilidad (máximo de absorbancia) con **16 μl de modificador de paladio 50 mg% (8 μg de paladio).**



CURVA DE CALCINACION DE 2,5 NG DE SELENIO EN SOLUCION ACUOSA,
CON MODIFICADOR DE PALADIO, ATOMIZANDO A 2700 °C.

Inyección automática de 5 µl de estándar de selenio de 500 µg/l de concentración(2,5 ng de selenio) con 16 µl de modificador de Pd 50 mg%(8 µg de Pd).

Se utiliza como blanco HCl 0,5 %.

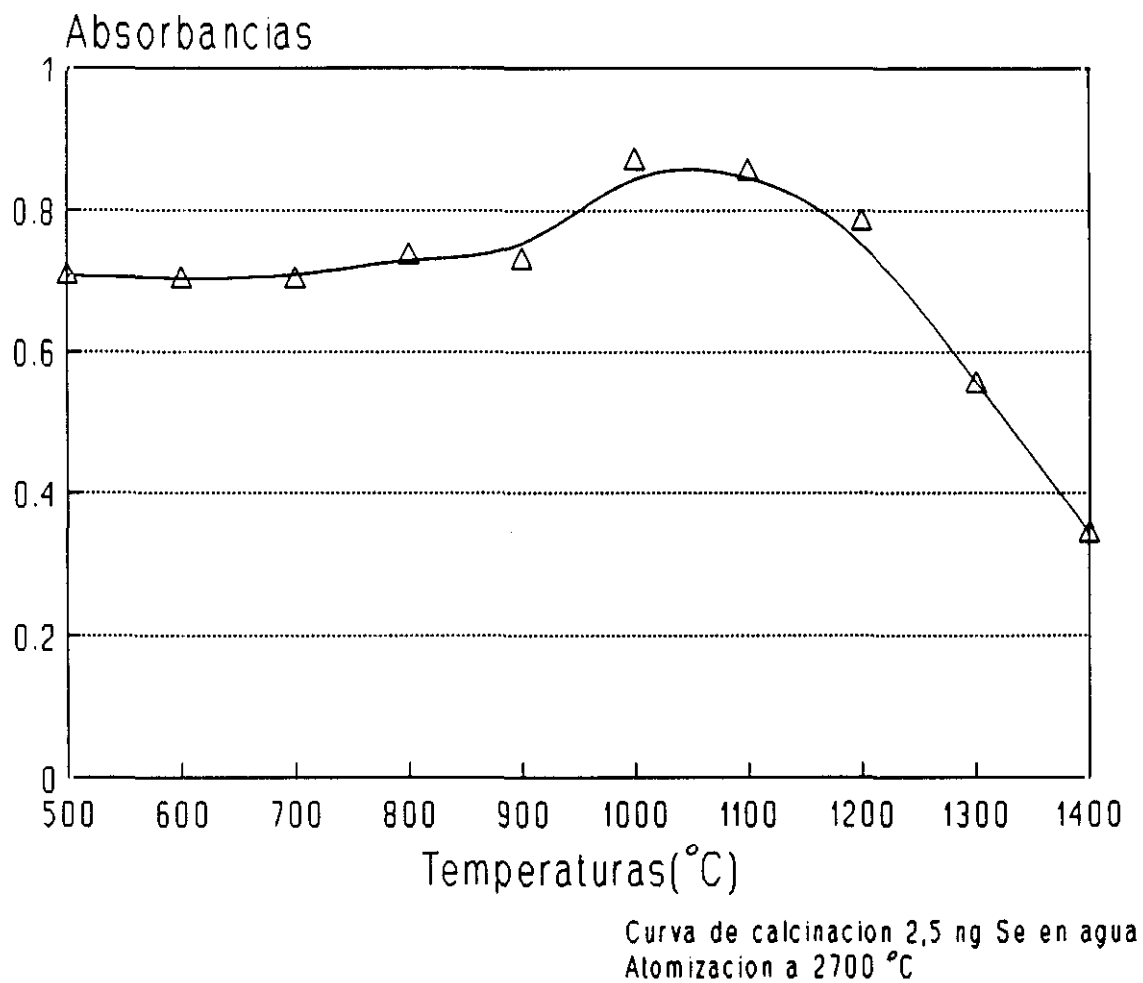
PARAMETROS DEL MUESTREADOR

VOLUMEN (μ l)

ESTANDAR	BLANCO	MODIFICADOR	MUESTRA
3	26	16	-

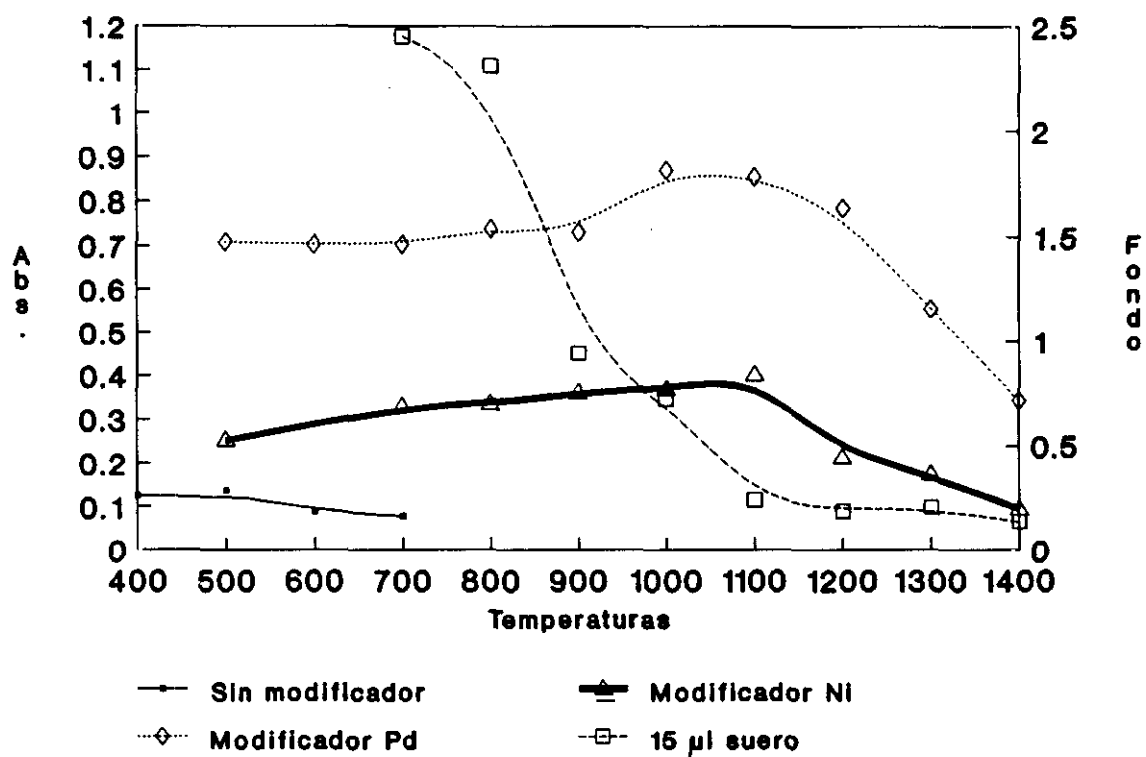
Las absorbancias de la nube de átomos de selenio formada al atomizar a 2700 °C, con 4 réplicas por punto son:

Abs.Medias	C.V. %	Temperaturas(°C)
0,708	5,5	500
0,703	6,3	600
0,703	10,5	700
0,737	6,5	800
0,730	8,1	900
0,870	16,3	1000
0,855	7,5	1100
0,785	8,4	1200
0,555	18,4	1300
0,343	7,1	1400



Elegimos como temperatura óptima de calcinación los 1200 °C, con modificador de 50 mg% de paladio.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA (°C) DE CALCINACION SOBRE LA ABSORBANCIA DE 2,5 NG DE SELENIO.



El tiempo necesario para alcanzar la temperatura de calcinación de 1200 °C se fija en 10 segundos, lo cual implica una velocidad de calentamiento de 90 °C por segundo, que permite la eliminación de los compuestos volatilizados, manteniendo a 1200 °C durante 35 segundos.

El empleo de tiempos inferiores deteriora la reproducibilidad de la técnica; aunque al prolongar los tiempos disminuye ligeramente la sensibilidad, hemos aceptado esos niveles de sensibilidad, obteniendo así una reproducibilidad aceptable para el método.

Tiempo de calcinación	Abs.2,5 ng Se	C.V. %
20 segundos	1,204	15.6
	1.569	
	1.217	
25 segundos	0,863	13.0
	0,941	
	1,109	
30 segundos	1,045	9,0
	0,958	
	1,033	
35 segundos	0,933	3,1
	0,978	
	0,992	
40 segundos	0,958	3,8
	0,968	
	0,901	

REACCIONES DEL SELENIO EN EL HORNO DE GRAFITO.

Existe una correlación entre la estabilidad térmica de los seleniuros que se forman en el horno de grafito con los datos termodinámicos disponibles, probablemente debido a la formación

de más de un seleniuro con el modificador de matriz (169). La formación de los seleniuros es función de la temperatura, lo cual explica la discrepancia entre los resultados expuestos por los distintos autores al emplear modificadores de matriz con compuestos de níquel o de magnesio.

No debe de olvidarse la influencia capital del estado de valencia del elemento selenio:

El estándar de selenio que hemos empleado es una solución inorgánica de Se(IV). Se observa una pérdida en la señal de absorbancia a temperaturas relativamente bajas de 300° a 600°C. Estos menores valores indicarían o que parte del analito no está atomizada, lo cual es muy improbable pues a una temperatura de atomización de 2700 °C es prácticamente imposible el que permaneciesen compuestos estables de selenio-paladio; o bien significa que una parte del selenio(IV) introducido en el horno se volatiliza como molécula a temperaturas inferiores.

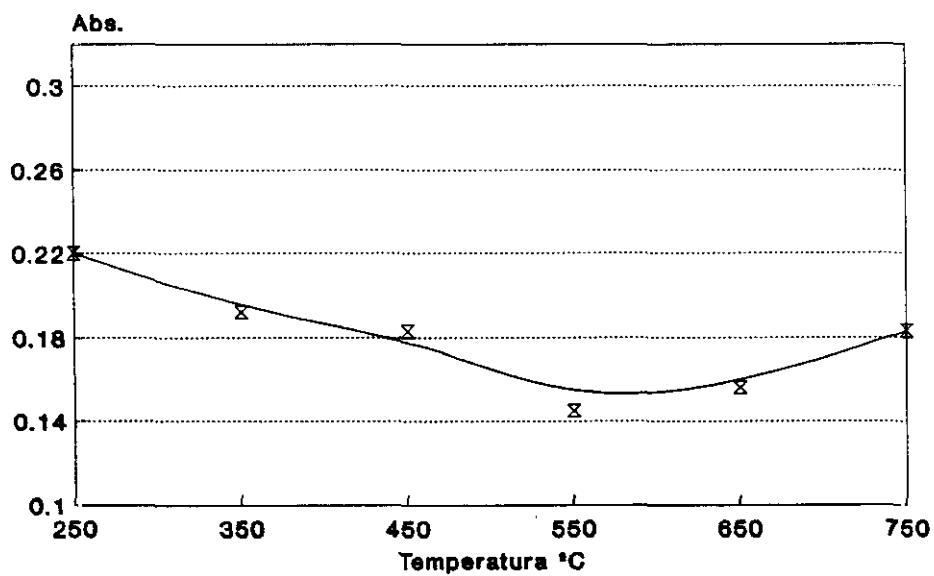
Hemos inyectado automáticamente **5 μ l de estándar de selenio** de 100 μ g/l (para este estudio empleamos 0,5 ng de selenio en cada inyección).

Como modificador hemos empleado **3 μ l de solución de PdCl₂ 50 mg%** (que contiene 1,5 μ g de paladio).

Las temperaturas de atomización en cada punto son las especificadas en la tabla .En todos los casos mantuvimos como temperatura de atomización los 2700 °C.

Se han realizado cuatro réplicas por punto.

Abs. Medias	C.V. %	Temperatura °C
0,22	2,1	250
0,192	3,5	350
0,183	4,4	450
0,145	5,9	550
0,156	3,1	650
0,183	5,6	750



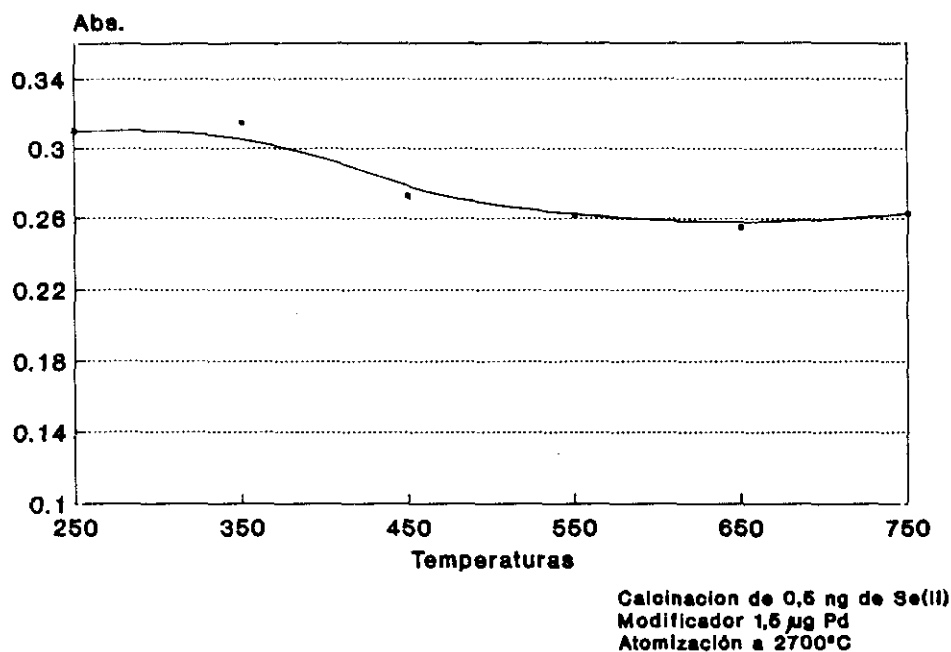
Calcinación de 0,5 ng de Se(IV)
Modificador 1,5 µg de Pd
Atomización a 2700°C

Cuando se añade directamente la muestra de suero que contiene fundamentalmente Se(II) (seleniometionina) y se añade estándar inorgánico con Se(IV), parte del Se(IV) se pierde, mientras que el Se(II) se retiene cuantitativamente.

Inyectamos automáticamente en el horno **5 μ l de selenio(II) como selenio-metionina** (0,5 ng de selenio). Usando el mismo modificador de matriz: **3 μ l de PdCl₂ 50 mg%** (1,5 μ g de paladio).

Realizamos cuatro réplicas por punto, y repetimos las temperaturas de calcinación de la prueba anterior.

Abs. Medias	C.V. %	Temperaturas
0,310	10,0	250
0,315	8,2	350
0,273	5,7	450
0,260	12,4	550
0,255	13,4	650
0,263	6,6	750



Es posible que exista Se(VI) en la muestra, pero su concentración es normalmente muy inferior al Se (II).

Estos comportamientos variables del selenio según el estado de oxidación nos conducen a resultados demasiados altos para el Se(II) de la muestra cuando lo medimos frente a un estándar de Se(IV), aún cuando apliquemos la técnica de adición de estándar.

La cuantificación del analito deberá realizarse en igualdad de condiciones entre el selenio existente en el suero y el selenio inorgánico usado como estándar; proponemos el tratamiento con un reductor potente que transforme todo el elemento dentro del tubo de grafito a un único estado de valencia.

De todos los reductores probables hemos seleccionado el yoduro potásico porque no produce, a la concentración utilizada, precipitación de las proteínas séricas, lo cual se presentaría como un inconveniente, por obstruir el capilar del muestreador automático.

Los selenitos, en medio ácido, pasan a selenio elemental con los siguientes reductores:

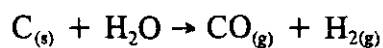
- metabisulfito sódico en caliente.
- sulfato ferroso en solución clorhídrica
- * yoduro potásico en medio clorhídrico en frío
- hidroxilamina en medio ácido caliente
- tiourea en frío.

Otra posibilidad es el empleo de gas reductor: 5% H_2 -95% Ar. Presentan el inconveniente de producir malas réplicas y su delicado manejo para evitar las explosiones, que lo hacen poco adecuado para el laboratorio clínico.

Además, la alta termoestabilidad del H_2Se es otro factor importante en la atomización, haciendo desaconsejable el uso de la mezcla H_2/Ar porque se formaría hidruro de selenio a $1500^\circ C$.

Los compuestos selenorgánicos como la selenometionina y la selenocisteína son eficazmente reducidos por el KI.

De todas formas, en el proceso de calcinación se debe formar hidrógeno en la reacción:



y la cantidad de hidrógeno formada es lo suficientemente grande como para afectar la eficiencia de la atomización, si se usan temperaturas para este proceso inferiores a 1800 °C (temperatura de disociación del H₂Se).

SOLUCION REDUCTORA DE KI.

Diluimos 250 µl de suero con 250 µl de KI a distintas concentraciones; añadiendo 5 µl de estándar de selenio de 500 µg/l, y 16 µl de Pd 50 mg%

La presencia del yoduro aumenta la sensibilidad, pero en concentraciones altas provoca unos coeficientes de variación altos, y un pico de atomización ensanchado.

Conc. KI	Coef. variac. %	Abs.
0,5(M)	28	0,749
0,25(M)	30	0,887
0,125(M)	16	0,822
60(mM)	8	0,876
10(mM)	4,5	1,099

El objeto de añadir KI no es sólo reducir al selenio, si no también al modificador de paladio, ya que es necesario que se encuentre en estado reducido para formar el seleniuro termoestable. Con KI 10 mM tenemos equivalentes suficientes para reducir al selenio y al paladio, depositados en el tubo.

De esta forma, establecemos como diluyente óptimo para los sueros KI 10 Mm.

IV.3.C.- ATOMIZACION.

Para la atomización de selenio necesitamos un rápido incremento de la temperatura, para obtener una densidad de nube de átomos que haga posible una sensibilidad adecuada a las bajas concentraciones del elemento en el suero humano.

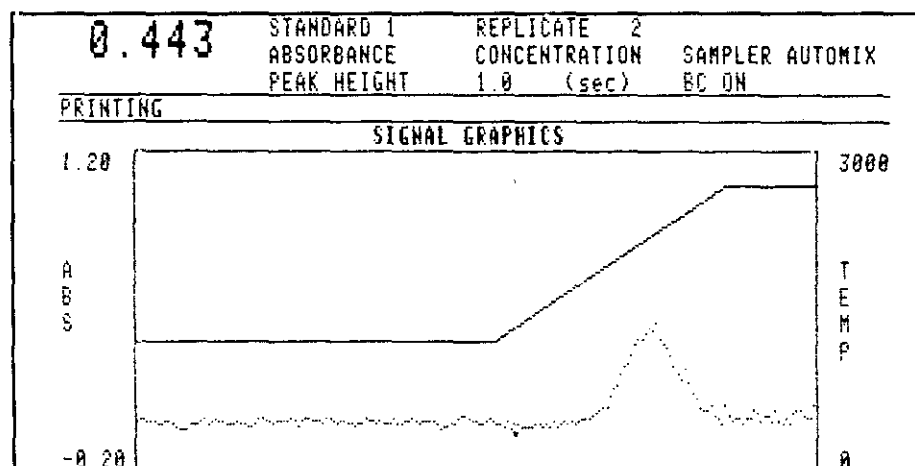
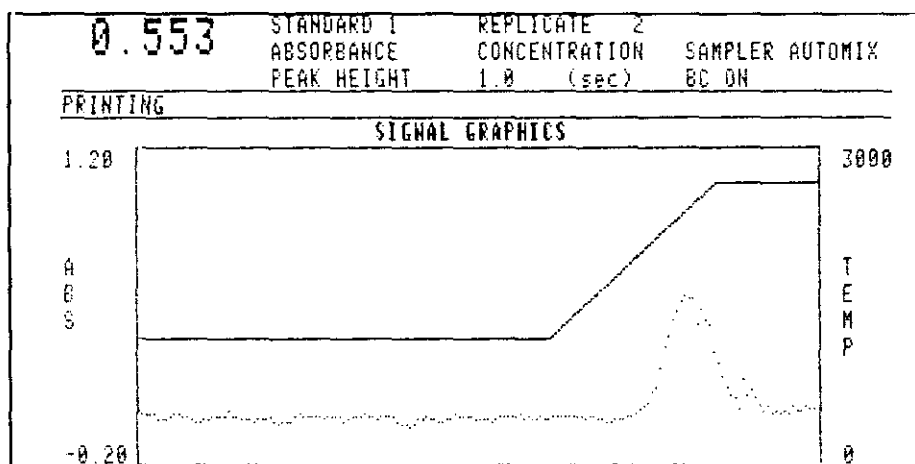
Sin embargo, tampoco es conveniente exceder en mucho la temperatura de atomización, porque a más altas temperaturas la expansión del gas y las pérdidas por difusión en todo el volumen del tubo deterioran la eficiencia de la medida.

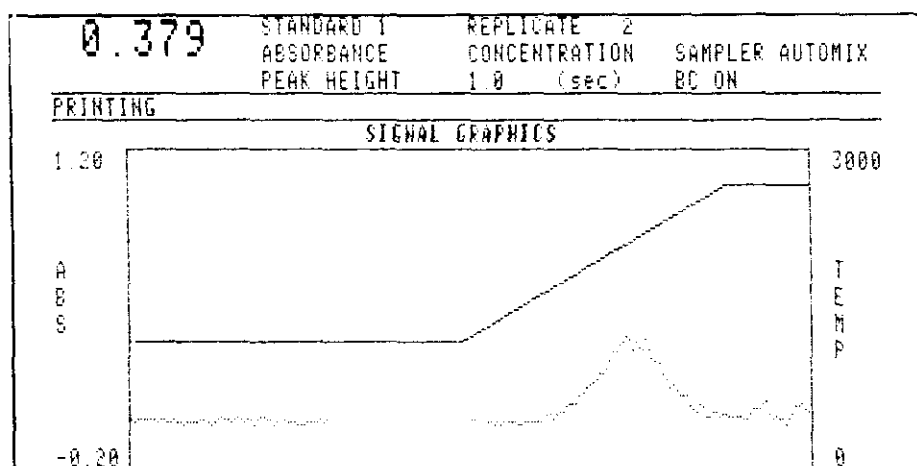
En todo caso se recomienda que la velocidad de aumento sea tan rápida como permita el instrumento; el Varian AA30 permite una velocidad máxima de 2000 °C/segundo.

La principal ventaja de un calentamiento rápido es que permite menores temperaturas de atomización y aumenta la sensibilidad.

El modelo experimental diseñado estudia el efecto de la velocidad para alcanzar la temperatura de atomización (2700 °C) a partir de una temperatura de calcinación de 1200 °C, sobre 1 ng de selenio.

Tiempo(segundos)	Absorbancia
0,8 (mínimo permitido)	0,553
1,3	0,443
1,6	0,379





Esta disminución de la señal de absorbancia registrada supone un deterioro en la sensibilidad de la técnica a todas las temperaturas de atomización ensayadas.

CURVA A DE CALENTAMIENTO RAPIDO.

A partir de la temperatura de calcinación de 1200 °C se ensayaron distintas temperaturas de atomización a una velocidad de 2000 °C por segundo.

Los parámetros del muestreador fueron:

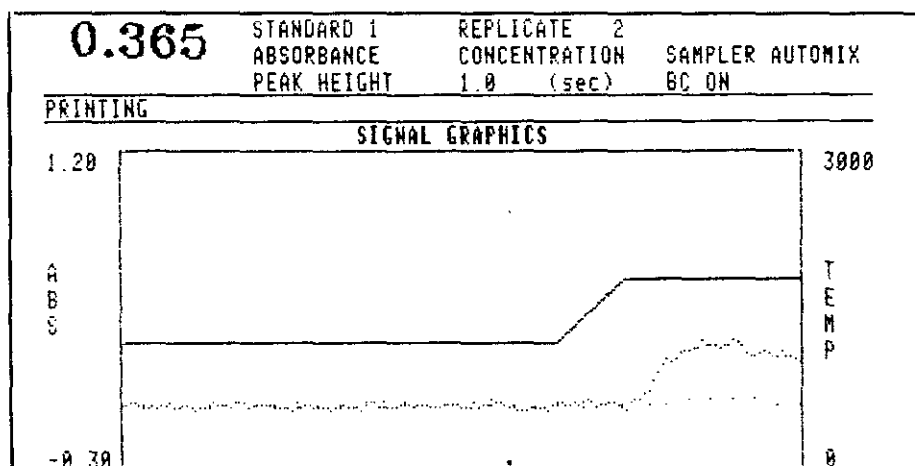
VOLUMEN (μ l)

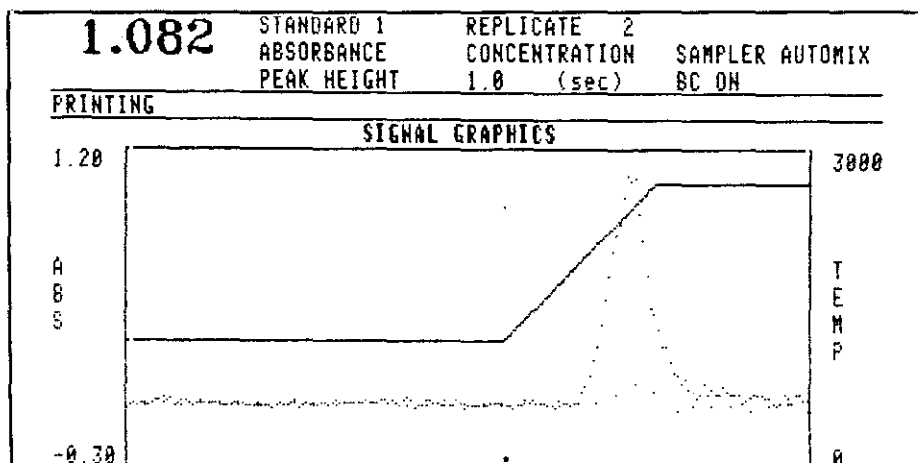
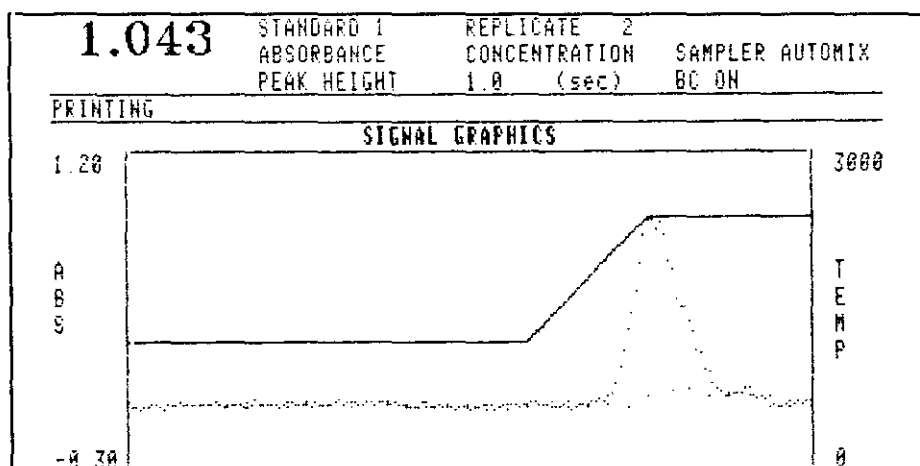
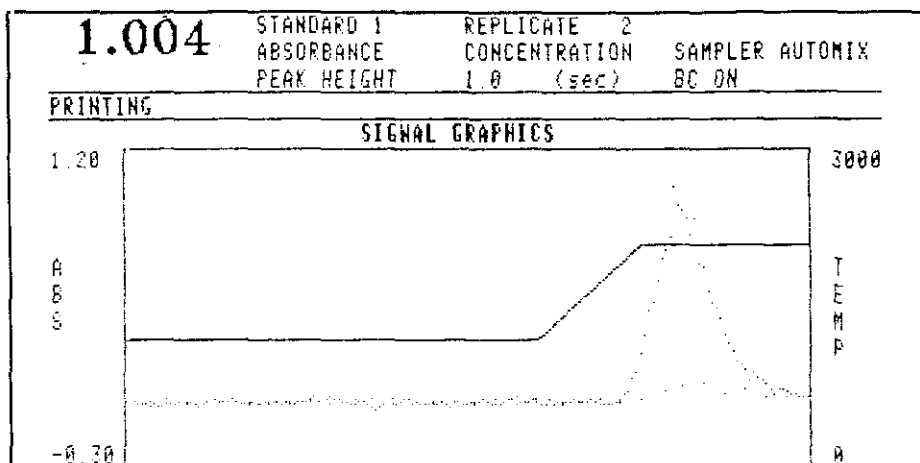
ESTANDAR	BLANCO	MODIFICADOR	MUESTRA
12	19	16	--

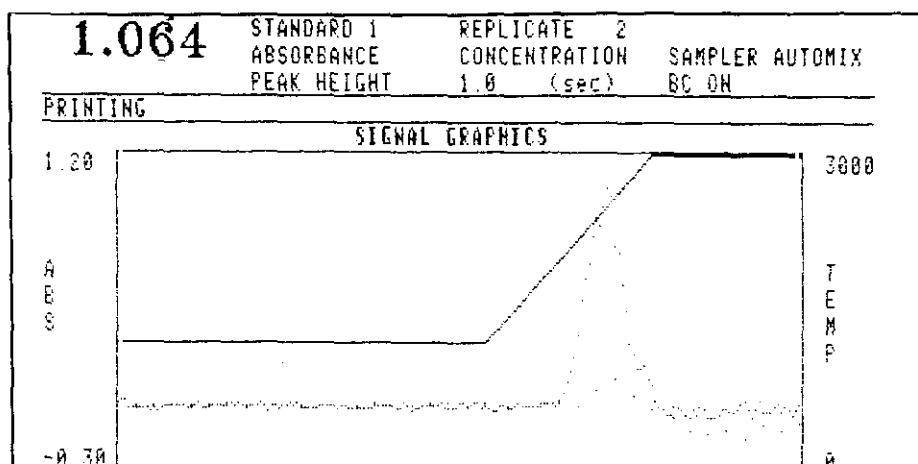
Programamos la inyección automática de 12 μl de estándar de 500 $\mu\text{g/l}$ de selenio, 16 μl de modificador de 50 mg de paladio % y 19 μl de blanco HCl 0,5% M/V. Con 4 réplicas por punto.

T ^a de calcinación (°C)	Absorbancia ($\bar{x} \pm \text{s.d.}$)
1800	0,365 \pm 0,006
2100	1,004 \pm 0,003
2400	1,043 \pm 0,002
2700	1,082 \pm 0,006
3000	1,064 \pm 0,010

Los perfiles de absorbancia/tiempo muestran que a baja temperatura de atomización (1800°) la nube de átomos se origina más dispersamente dando un pico de absorbancia ensanchado en el tiempo:



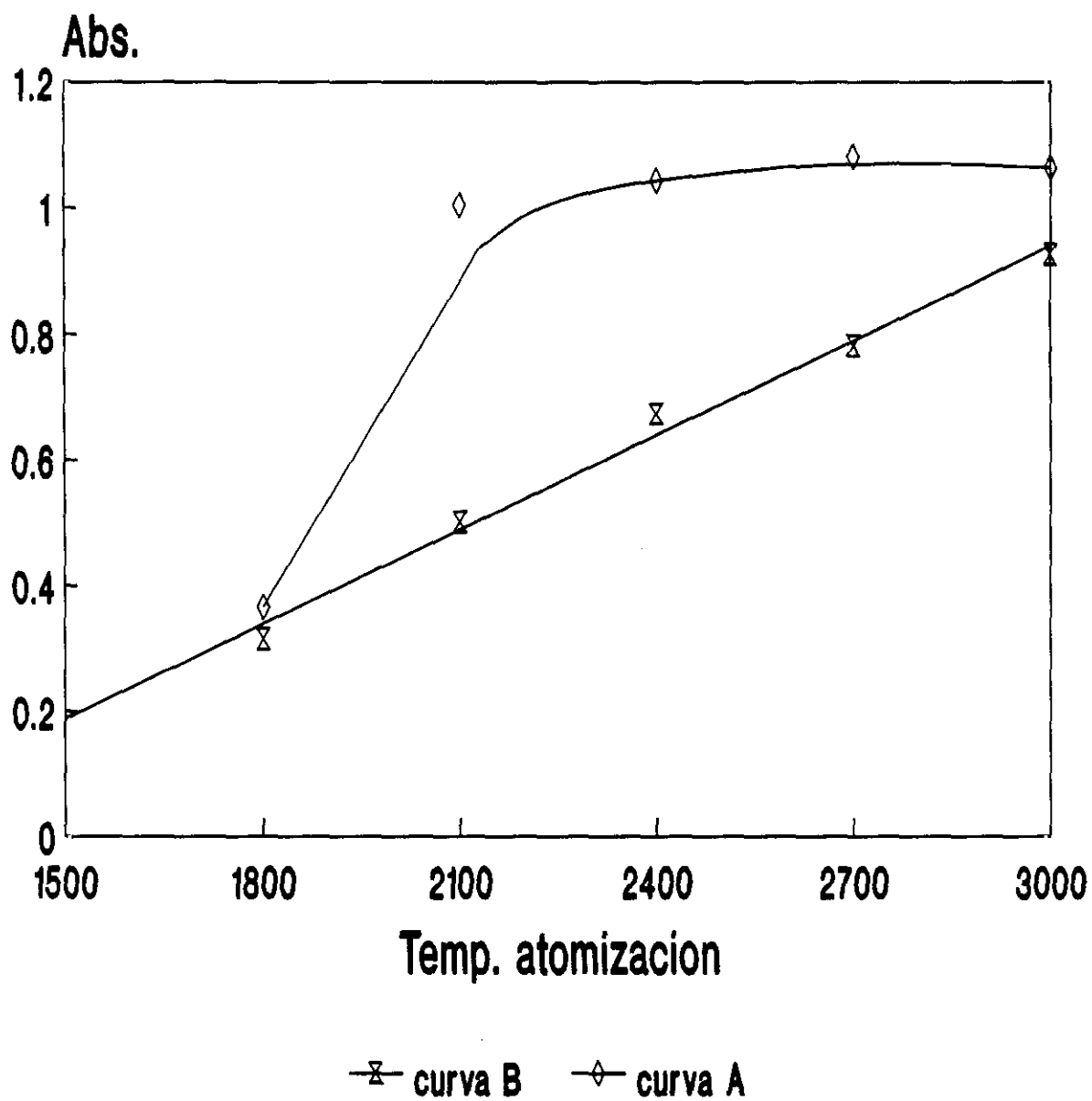




CURVA B DE CALENTAMIENTO LENTO.

Conservando los mismos parámetros del muestreador que en la curva A, aplicando una velocidad de calentamiento de 1000 °C por segundo:

T° de atomización (°C)	Absorbancia ($\bar{x} \pm s.d.$)
1800	0,315 \pm 0,010
2100	0,501 \pm 0,008
2400	0,673 \pm 0,009
2700	0,782 \pm 0,012
3000	0,926 \pm 0,011



Influencia de la rampa de atomizacion

El calentamiento a una máxima velocidad consigue unas máximas sensibilidades, mientras que con un calentamiento lento no se alcanzan esas absorbancias.

El selenio pertenece a los elementos que forman dímeros estables (Se_2) a muy altas temperaturas (163). Claramente, se requieren temperaturas mucho más elevadas para conseguir la disociación.

Seleccionamos como temperatura óptima de atomización 2700 °C, alcanzados en 0,8 segundos (velocidad de calentamiento de 2000 °C por segundo) a partir de la temperatura de calcinación de 1200 °C.

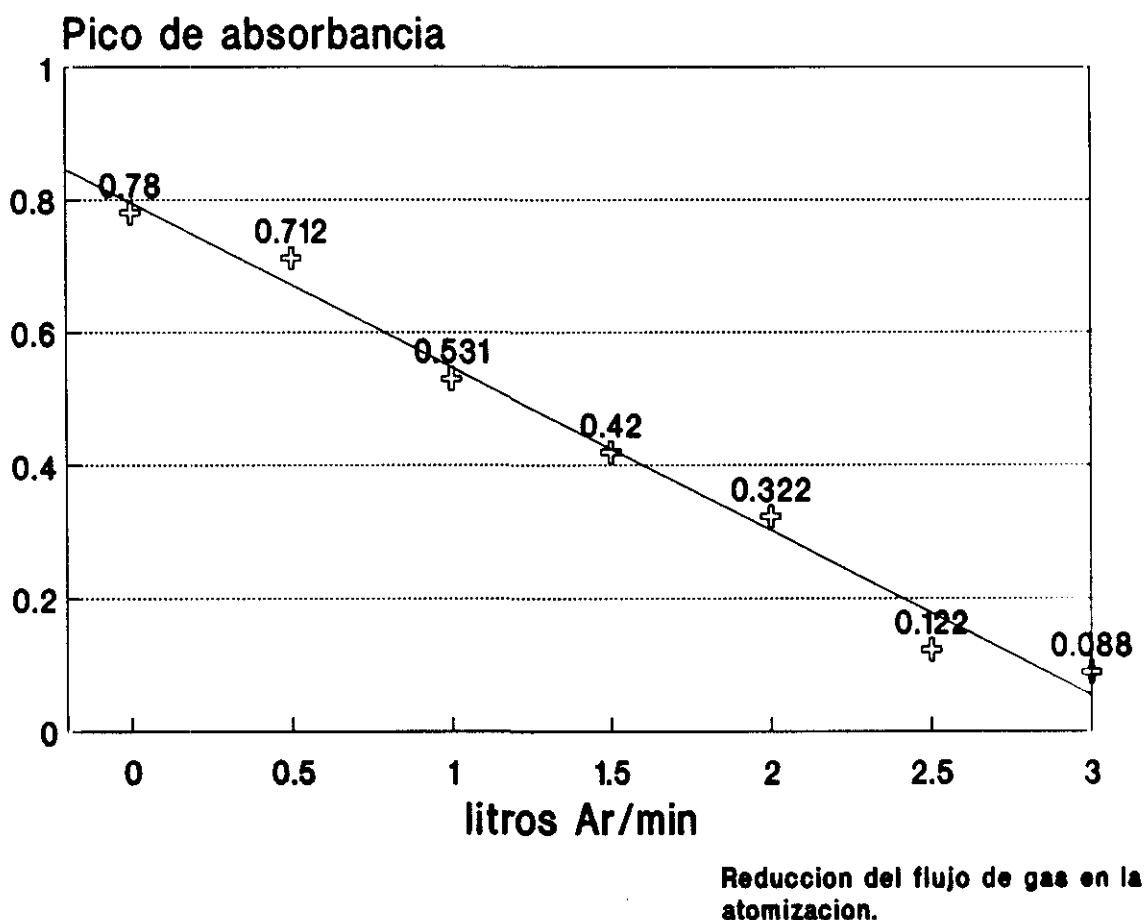
En el paso siguiente mantenemos a 2700 °C durante 0,5 segundos, tiempo necesario para que se complete la atomización del analito.

Es en estos dos pasos del programa a 2700 °C, uno de rampa y otro de meseta, cuando establecemos el comando de lectura que permite al detector integrar las señales recibidas durante estos 1,3 segundos, evitando la lectura el resto del proceso.

Incluimos un último paso a 2700 °C durante dos segundos para limpiar los posibles residuos del tubo y dejarlo preparado para una nueva inyección, durante estos dos segundos reinstauramos el flujo de gas inerte a 3 litros/minuto.

REDUCCION DEL FLUJO DE GAS DURANTE LA ATOMIZACION.
VARIACIONES DEL PICO DE ABSORBANCIA CON EL FLUJO DE ARGON DURANTE
LA ATOMIZACION.

Valores obtenidos para 2,0 ng se de selenio modificados con paladio. Empleamos una temperatura de calcinación de 1200 °C y una atomización a 2700 °C.



Debemos ser conscientes de que la reducción del flujo de gas durante la atomización puede acortar los tiempos de vida del tubo, debido a la exposición al oxígeno atmosférico, por tanto es deseable que el flujo de gas sea reducido el menor tiempo posible.

Dado que el pico de atomización se produce en la rampa (0,8 seg) de elevación de temperatura, y existe un retraso en la interrupción del flujo, hemos intercalado un paso de 1 segundo a 1200 °C con un flujo de 0,0 litros por minuto, para permitir la interrupción completa antes de la atomización.

PROGRAMA COMPLETO DEL HORNO OPTIMIZADO

PASO Nº	TEMPERATURA °C	TIEMPO s	FLUJO GAS l/min	LECTURA
1	75	5.0	3.0	-
2	90	70.0	3.0	-
3	120	5.0	3.0	-
4	300	20.0	3.0	-
5	1200	10.0	3.0	-
6	1200	34.0	3.0	-
7	1200	1.0	0.0	-
8	2700	0.8	0.0	SI
9	2700	0.5	0.0	SI
10	2700	2.0	3.0	-

IV.4.- OPTIMIZACION DEL MUESTREADOR

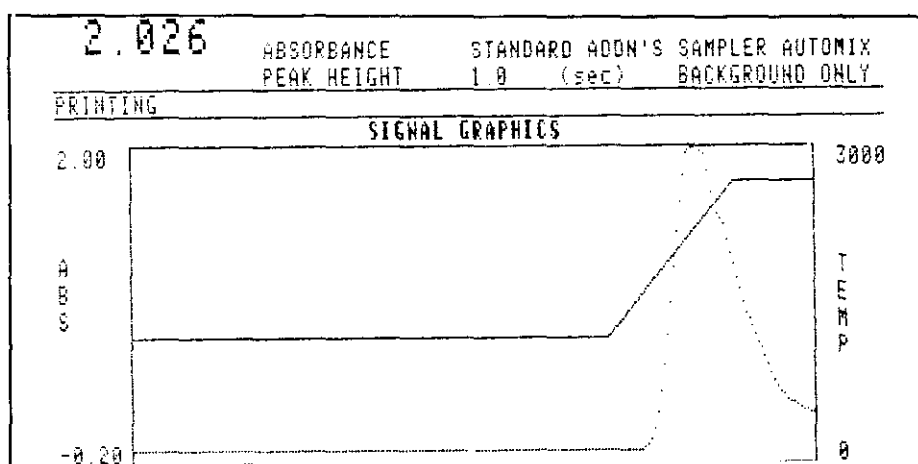
Determinamos la concentración de selenio en suero directamente, tras diluirlo con el agente reductor (KI 10 mM) en una proporción de suero:KI de 1:3 .

El suero deja un residuo en el interior del tubo de grafito tras repetidas inyecciones, el factor de dilución de la muestra sérica puede minimizar el residuo encontrado en el tubo, este residuo de carbón aparece después de 30 a 40 inyecciones y de esta forma afecta al secado de la gota, y a la reproducibilidad. El tubo debe ser limpiado rutinariamente cada 7-8 muestras (167).

El máximo permitido de dilución es el límite de detección de la técnica por llegar a señales por debajo de las que es capaz de distinguir del cero de concentración.

Esta dilución establecida permite que la cantidad de sangre extraída al paciente sea mínima, (precisamos tan solo 100 μ l de suero) haciendo este método perfectamente adaptable a la población pediátrica y a enfermos de cuidados intensivos.

Algunos autores describen el uso de Tritón X100 como diluyente al 0,5 % para facilitar el pipeteo en el horno de grafito. Es necesario en análisis de sangre total, pero no para suero, y además, precisa añadir antiespumante (en nuestra experiencia Antifoam B de Sigma). La mezcla de estos dos componentes aumenta considerablemente la señal de fondo, como observamos en la gráfica siguiente, por lo que lo hemos rechazado su uso.



IV.5.- PRE-INYECCION

Si el paladio se añade directamente a la muestra se observa una precipitación de componentes orgánicos con posible pérdida de analito, esto puede ser debido o bien al propio Pd o bien porque el modificador contiene ácido clorhídrico al 0,5% y supone una acidez excesiva para las proteínas séricas.

El modificador (16 μ l) es pre-inyectado en el tubo de grafito y sometido al primer paso del programa, en 5 segundos alcanza los 90 °C, el paladio se expande sobre la superficie de grafito y así promueve una mezcla del modificador con la muestra en la siguiente inyección.

El programa del horno comienza de nuevo con el primer paso cuando inyecta el suero diluido y el estándar.

La principal mejora introducida con la pre-inyección es evitar la precipitación de la muestra, pero también alarga la vida de los tubos; mediante comparación visual del interior del tubo, tras una serie de inyecciones, se demuestra una menor existencia de residuos.

El empleo de la pre-inyección no conlleva diferencias analíticas: Inyectamos 3 ng de selenio, con 16 μl de PdCl_2 que contiene 50 mg% y ajustamos un volumen total de inyección de 45 μl con HCl 0,5%

Datos obtenidos:

	Sin pre-inyección	Con pre-inyección
Coefficiente de variación	9,1%	9,1%
Absorbancia media	0,564	0,585
Nº de lecturas	10	10
Desviación estándar	0,052	0,053

IV.6.- EMPLEO DE PLATAFORMA

Según los principios de espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito, el uso de plataforma de grafito es beneficioso para obtener eficiencias de atomización mayores, ya que el analito se vaporiza a la fase gaseosa a temperaturas menores.

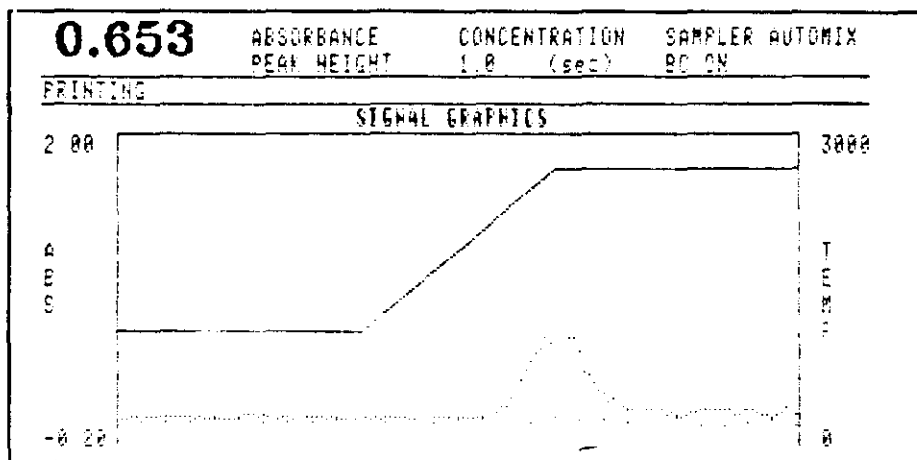
Al emplear la plataforma, las temperaturas son más uniformes en toda la muestra que cuando se usa el tubo directamente, en el que la parte de la muestra que está en contacto con la pared se calienta más rápidamente.

Al realizar el experimento, para 2,5 ng de selenio, con 16 μ l de PdCl₂, con plataforma de grafito, hemos comprobado que el pico de atomización del selenio se retrasa unas décimas de segundo.

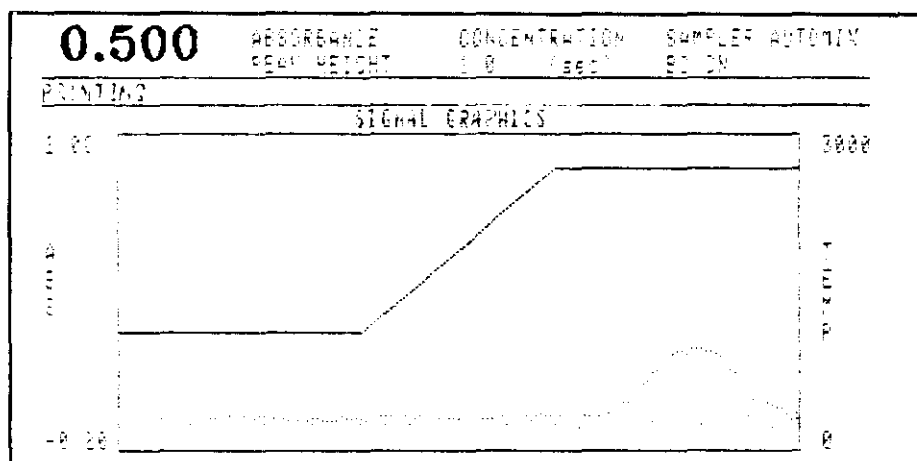
Esto conlleva la ventaja de presentar una mejor separación del máximo de absorción del fondo, sin embargo, los inconvenientes son más numerosos:

- 1.- Disminuye ligeramente la precisión: pasa de 6,7% sin plataforma a 7,6% con plataforma al repetir cinco aplicaciones
- 2.- Disminuye la sensibilidad pasando de una absorbancia media de 0,653 sin plataforma a 0,500 con plataforma
- 3.- Disminuye el volumen total que puede ser depositado sobre la plataforma sin desbordarse, con lo que disminuye el límite de detección del método.

Estos inconvenientes, añadidos al hecho de que conseguimos calcinaciones a 1200 °C sin pérdida del analito, nos inclina a no usar las plataformas de grafito para el análisis de selenio en suero humano.



Sin plataforma



Con plataforma

IV.7.- MEDIDA ANALITICA Y LECTURA

De la EAA se pide velocidad, alta precisión y los menores límites de detección.

Estos dos últimos puntos pueden alcanzarse con el sistema de medida eléctrica capaz de registrar mínimas diferencias en la absorción. Pero estas, sólo tienen significado si las señales son

estacionarias y estables. La estabilidad depende primeramente de la estabilidad de la fuente de radiación y de la calidad del sistema óptico.

Para medir cambios de absorbancia que dependen del tiempo (este es el caso del horno de grafito) se suele registrar el máximo valor (**altura de pico**) generado durante la medida; o a un tiempo de respuesta dado, o después de una serie de ciertas integraciones.

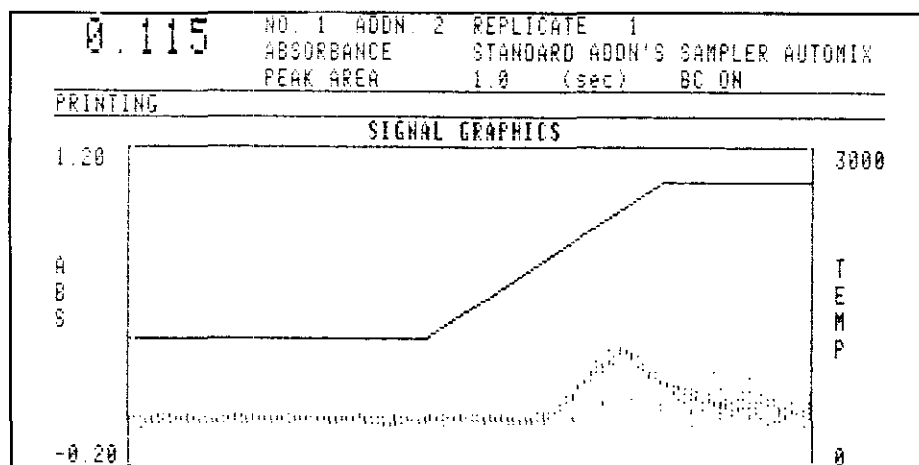
La otra posibilidad, es registrar valores integrados calculados de medidas instantáneas durante un período de tiempo seleccionado (**área de pico**).

Las medidas de área de pico (absorbancias integradas) suelen ser las preferidas. Dado que la matriz influye en la velocidad de atomización del analito, las medidas hechas de la altura de pico variarán al modificarse la matriz, mientras que la absorbancia integrada estará menos afectada, siendo mejor la precisión alcanzada con medidas en área de pico.

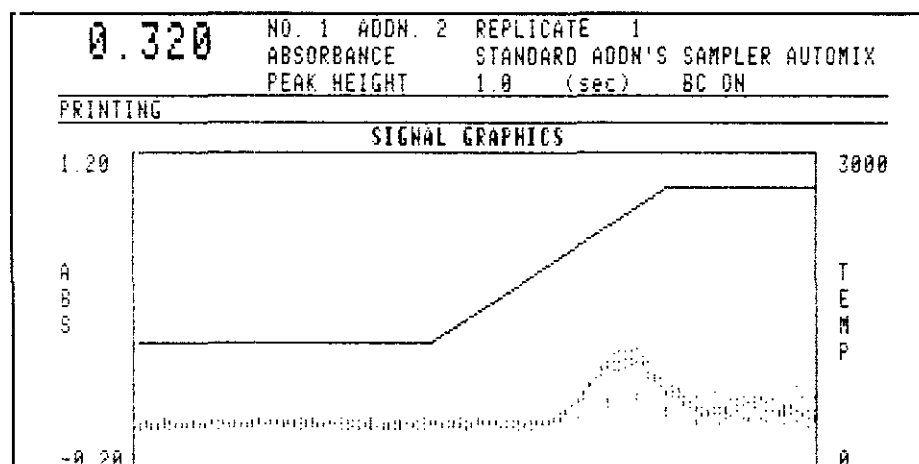
Sin embargo, cuando se analizan señales bajas, cerca del límite del método, la experiencia demuestra que el más razonable usar la altura de pico porque el ruido electrónico influye más directamente en el área de pico durante la integración total.

En nuestras experiencias, las medidas en altura de pico son, para la mayoría de las muestras, mayores y más precisas. La exactitud, sin embargo, es mejor para el área de pico y hace seguro que el instante de formación de la nube de átomos quede estrechamente incluido en el paso de lectura, y no se extienda después de la atomización.

Las alturas de pico medidas son mayores, asegurando mayor sensibilidad.



Area de pico



Altura de pico

IV.8.- TECNICA DE CALIBRACION.

Cuando la composición de la muestra afecta directamente a la composición del analito se recomienda realizar siempre la calibración con patrones que sean idénticos a la muestra analizada.

La corroboración de este posible efecto de la matriz sobre la recta de calibración se comprueba cuando se observa que la pendiente de la curva obtenida varía más de un 10-15% al realizarel análisis sobre matriz acuosa o sobre la matriz compleja.

En la determinación de selenio se observan los siguientes resultados:

SOLUCION ACUOSA

-Solución estándar de 250 $\mu\text{l/l}$

-Modificador: Pd, 50 mg %

-Realizada cinco veces, los valores medios obtenidos son:

$$\hat{\alpha} = \bar{a} = 0,044 \quad \hat{\sigma}_a = 0,003$$

$$\hat{\beta} = \bar{b} = 7,13 \cdot 10^{-3} \quad \hat{\sigma}_b = 9,03 \cdot 10^{-4}$$

Siendo $\hat{\alpha}$ y $\hat{\beta}$ los coeficientes de la recta: $Y = \hat{\alpha} + \hat{\beta} X$, en la que la ordenada representa los valores de absorbancia medidos, y las abcisas las concentraciones de selenio ($\mu\text{g/l}$) de los patrones.

El coeficiente de correlación medio obtenido fue de $r = 0,9698$ ($\sigma_r = 0,016$).

MATRIZ SERICA

Se realiza una técnica de calibración por adición de estándares en las que se toman seis

porciones alícuotas de la muestra (suero) previamente diluido 1:3 con KI 10mM, se añaden cantidades crecientes conocidas del analito (alícuotas de una solución de referencia) y se diluyen las muestras con igual volumen con solvente (HCl 0.5% m/V). Una porción alícuota de la muestra se trata únicamente con el solvente (y por tanto contiene 0 $\mu\text{g/l}$ de selenio).

De esta serie de soluciones se obtienen los siguientes valores de calibración, estimados con cinco réplicas de cinco sueros diferentes:

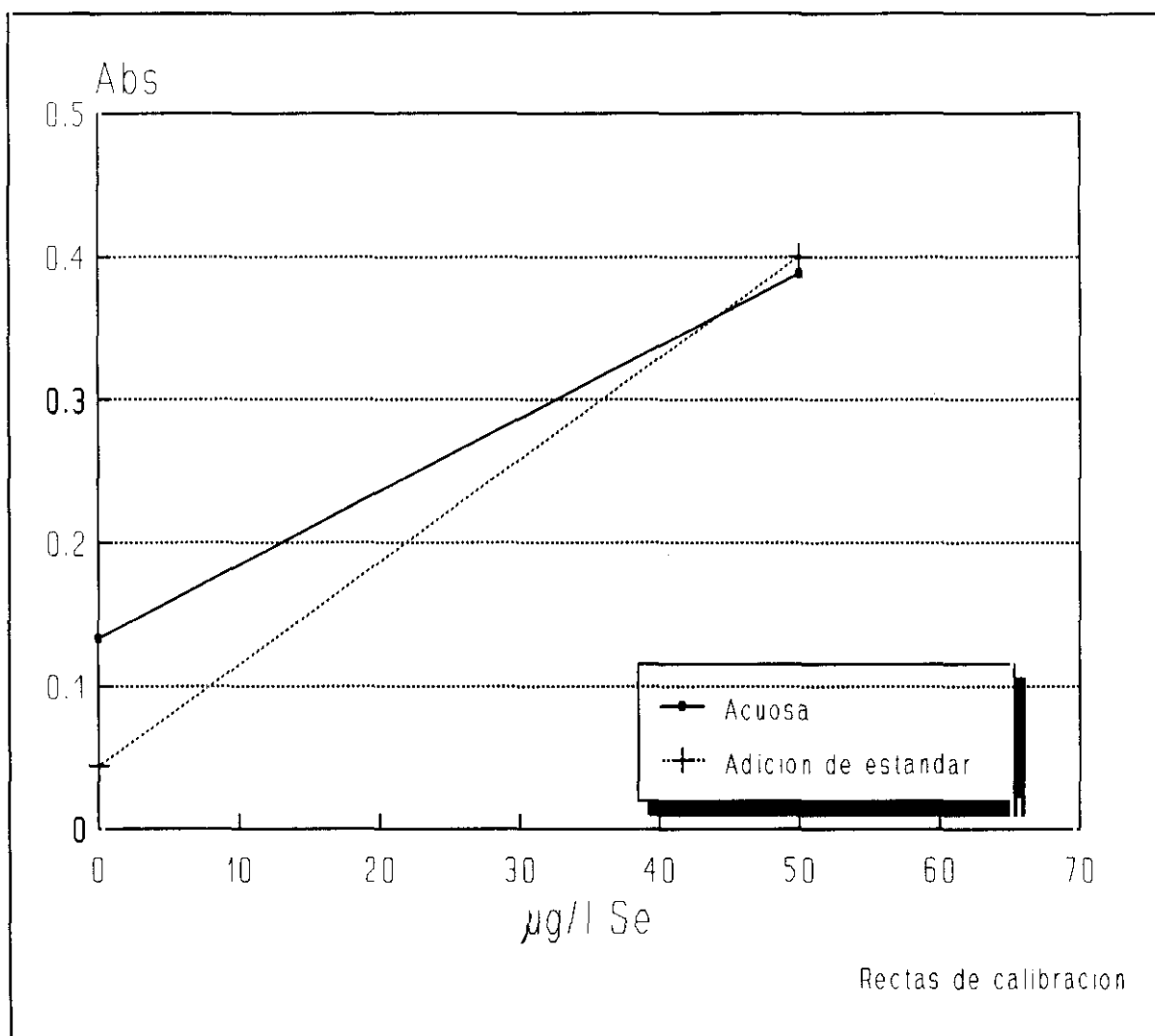
$$\begin{aligned}\hat{\alpha} = \bar{a} &= 0,1334 & \hat{\sigma}_a &= 0,007 \\ \hat{\beta} = \bar{b} &= 5,11 \cdot 10^{-3} & \hat{\sigma}_b &= 6,48 \cdot 10^{-4}\end{aligned}$$

Siendo $\hat{\alpha}$ y $\hat{\beta}$ los coeficientes de la recta: $Y = \hat{\alpha} + \hat{\beta} X$, donde la ordenada son los valores de absorbancia medidos frente a la abscisa, que representa las concentraciones añadidas de patrón de selenio.

El coeficiente de correlación medio obtenido fue: $r=0,9296$ ($\sigma_r=0,023$).

La pendiente de la recta de calibración acuosa ($7,13 \cdot 10^{-3}$) es un **28%** mayor que la de la matriz sérica ($5,11 \cdot 10^{-3}$) por lo que una técnica de calibración sobre una solución de referencia acuosa conduciría a errores de exactitud.

En la siguiente gráfica se representan comparativamente ambas rectas de calibrado apreciándose el aumento de la pendiente para la recta de calibración de la solución acuosa.



Dado que la composición del suero varía de paciente a paciente, es necesario emplear la técnica de adición para cada muestra. El contenido de selenio en la muestra se obtiene por extrapolación al cero de concentración. A continuación se tiene en cuenta la dilución previa del suero en el agente reductor KI 10 mM (dilución 1:3).

La técnica de adición de analito elimina solo las interferencias que afectan al gradiente de la curva analítica, pero no las que provocan una deriva paralela.

Es necesario preparar patrones químicamente emparejados para que el comportamiento durante la descomposición del patrón y el de la muestra sean comparables, y esto afecta a la viscosidad y al contenido de sales disueltas.

La obtención de muestras alícuotas de muestras, así como la adición de cantidades crecientes de patrón de selenio y de solvente (HCl 0,5%) se realizan automáticamente, ajustándose al siguiente programa:

PARAMETROS DEL MUESTREADOR

VOLUMENES(μ l)

	ESTANDAR	MUESTRA	BLANCO	MODIFIC.
Blanco	-	-	45	16
Adición 1	4	40	6	16
Adición 2	6	40	4	16
Adición 3	8	40	2	16
Adición 4	10	40	0	16
Muestra	-	40	10	16

El muestreador automático pipetea exactamente los volúmenes especificados a partir de la siguientes soluciones:

Estándar: 200 μg selenio/l

Modificador: 50 mg paladio/l

Blanco: HCl 0,5% m/V

Muestra: Suero diluido 1:3 en KI 10mM.

Obteniéndose dos réplicas por cada adición.

Las concentraciones a las que corresponden los cuatro puntos de adición son:

- 20 $\mu\text{g}/\text{l}$
- 30 $\mu\text{g}/\text{l}$
- 40 $\mu\text{g}/\text{l}$
- 50 $\mu\text{g}/\text{l}$

Se han elegido estos puntos porque se recomienda que la concentración del patrón sea tal que la tercera adición tenga un máximo de absorbancia de aproximadamente 0,5 unidades.

Con esta técnica de calibración, la gráfica se establece en la porción lineal de la curva analítica.

La aproximación de la regresión de mínimos cuadrados se aplica a los puntos de calibración para producir una gráfica lineal. Por esta razón, es necesario elegir los volúmenes de muestra, longitudes de onda analíticas y parámetros operacionales adecuados para asegurar que las medidas de absorbancia están en la región lineal de la curva analítica.

Las adiciones deben ser de tal magnitud que la adición más alta sea aproximadamente tres veces la de la muestra original.

IV.9.- LINEALIDAD DE LA TECNICA

IV.9.A.- LINEALIDAD EN SOLUCION ACUOSA

Programamos las inyecciones de estándar (selenio), modificador (paladio) y blanco adecuadas para conseguir las siguientes concentraciones:

$\mu\text{g Se/l}$	Abs. Medias	%C.V.(5 réplicas)
0	0,078	3,2
10	0,110	9,2
20	0,187	3,4
30	0,257	9,1
40	0,316	2,0
50	0,391	10,6
60	0,465	2,1

$\mu\text{g Se/l}$	Abs. Medias	%C.V.(5 réplicas)
70	0,525	6,8
80	0,601	6,3
90	0,669	6,5
100	0,746	2,0
110	0,812	10,2
120	0,825	6,3
130	0,853	9,7
140	0,876	6,0
150	0,947	5,6

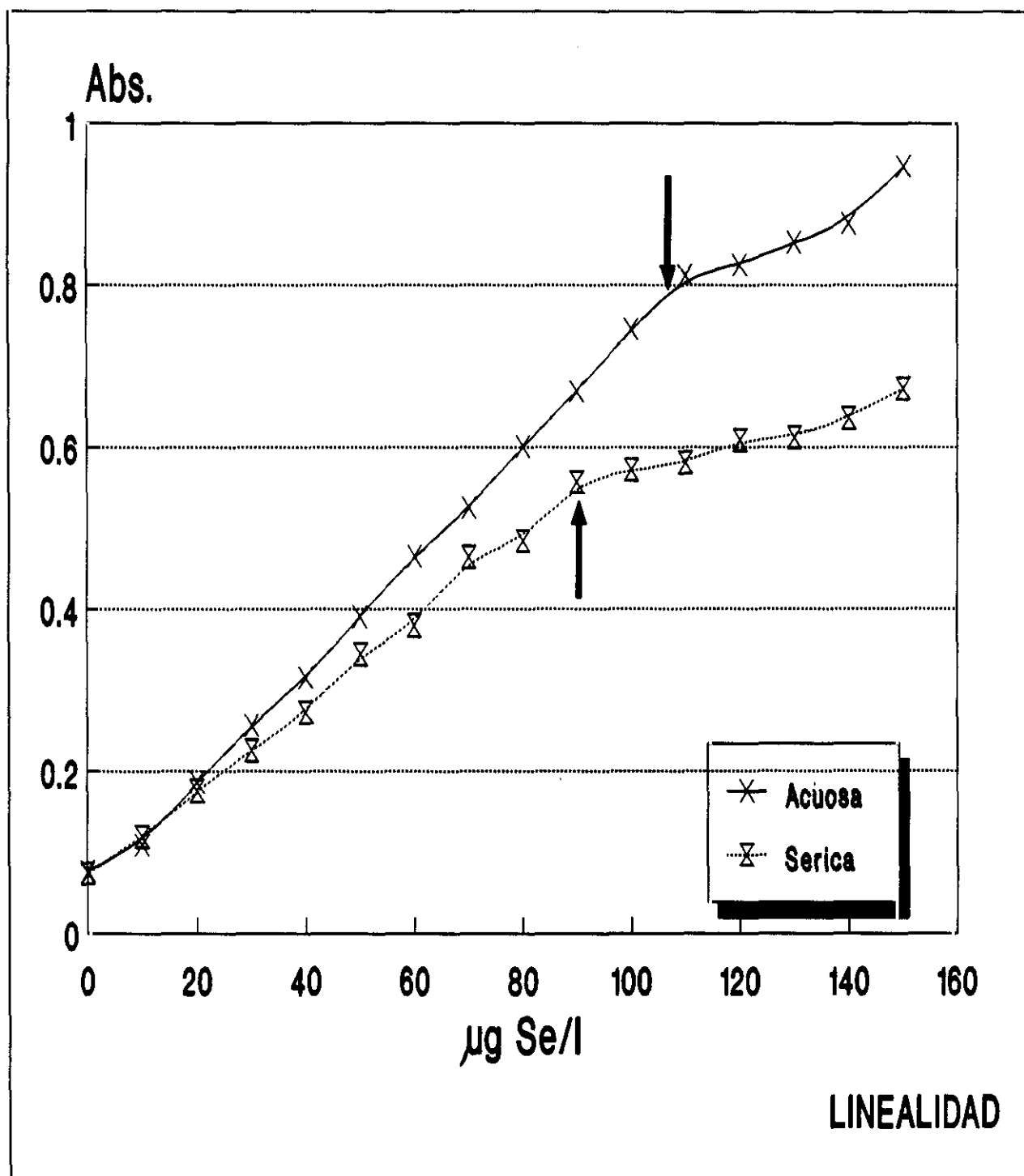
Hasta 110 $\mu\text{g/l}$ la técnica puede considerarse lineal, pues los datos obtenidos presentan un modelo de regresión lineal con un coeficiente de determinación $r^2=0,9914$.

IV.9.B.- LINEALIDAD SOBRE MATRIZ SERICA

Programamos inyecciones con la técnica de adición de estándar sobre un "pool" de sueros para obtener las siguientes concentraciones:

Conc. Se $\mu\text{g/l}$	Abs. medias	%C.V. (5 réplicas)
0	0,075	4,0
10	0,120	12,0
20	0,176	8,0
30	0,226	6,3
40	0,273	11,0
50	0,345	3,2
60	0,380	7,1
70	0,464	6,4
80	0,484	6,3
90	0,557	12,3
100	0,572	8,9
110	0,581	6,2
120	0,609	4,1
130	0,612	6,6
140	0,636	7,8
150	0,673	4,7

Hasta 90 $\mu\text{g/l}$ se presenta como una recta con un coeficiente de correlación $r=0,9948$. Nuestras adiciones de estándar elegidas como técnica de calibración, se mantienen dentro del rango lineal del método, ya que sin este requisito, las concentraciones calculadas para las muestras serían inexactas.

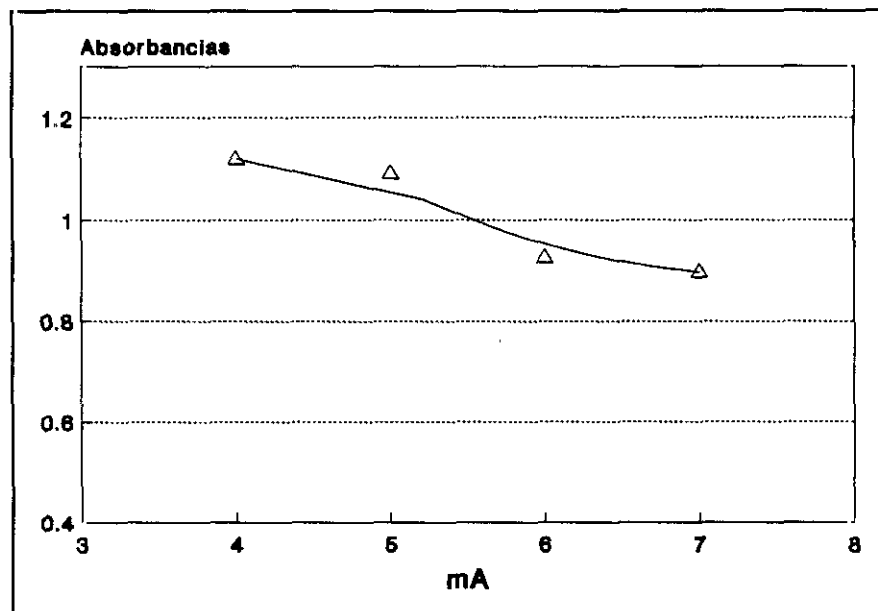


IV.10.- SENSIBILIDAD Y LIMITE DE DETECCION

Sensibilidad o concentración característica.

Aceptando las normas del Grupo de Espectroscopía de Absorción Atómica de la Sociedad de Química Analítica (U.K.): la sensibilidad es un número teórico que equivale a la concentración de analito en solución acuosa que produce un 1 % de absorción.

El factor fundamental que influye sobre la sensibilidad de un equipo de absorción atómica es la intensidad media de la corriente de alimentación de las lámparas. Experimentalmente se demuestra que a medida que disminuye la intensidad media de corriente, aumenta la lectura en absorbancia para una misma muestra (2,5 ng de selenio con paladio):



Intensidad de la lámpara (mA)	Absorbancias medias \pm S.D. (n=3)
4	1,120 \pm 0,089
5	1,092 \pm 0,087
6	0,926 \pm 0,092
7	0,897 \pm 0,097

Sin embargo, pese a esta pérdida de sensibilidad elegimos 7 mA (máximo permitido) como intensidad de corriente, porque a intensidades menores la energía procedente de la lámpara de deuterio era excesivamente grande para aparearla con la energía de la lámpara de cátodo hueco de selenio.

Además, dado que parte de la energía emitida por la lámpara es absorbida por el aire, para que llegue suficiente energía al detector, es necesario incrementar la intensidad media de corriente de la lámpara, pese a la pérdida de sensibilidad.

La concentración característica es por tanto un número teórico que depende de la eficiencia de la lámpara, atomizador y monocromador. Su mayor desventaja es que no tiene en cuenta el nivel de ruido, por eso es de poco valor como guía en la menor cantidad de un elemento que puede ser detectada.

El 1 % de absorción se obtiene de la siguiente forma:

1°- Ajustamos el instrumento con una solución blanco (agua desionizada) y se registra la lectura de cero. Se comprueba que se cumple la ley de Beer (cuando la lámpara se oscurece totalmente, se obtiene una lectura de absorbancia de infinito). Existirá una relación lineal entre las concentraciones y las absorbancias registradas.

2°- Se construye una curva de respuesta a la concentración con una solución de selenio, y la concentración que produce un aumento de la señal equivalente a una absorbancia de 0,1 se lee en esta gráfica. Si la ley de Beer se cumple: $C_{0,1} = K \cdot 0,1$ (K=constante)

3°- La densidad óptica y la absorbancia se definen como: $\log_{10} I_0/I$ donde I_0 es la intensidad de la luz incidente e I la intensidad de la luz transmitida. Si el 1 por ciento de la incidente ha sido absorbida (1% absorción) entonces la absorbancia del medio está dada por:

$$\log_{10} 100/99 = 0,0044$$

Aplicando de nuevo la ley de Beer:

$$C_{1\%} = K \cdot 0,0044$$

donde $C_{1\%}$ es la concentración que produce un 1% de absorción:

$$C_{1\%} = C_{0,1} \cdot 0,044$$

Partiendo de una solución patrón de selenio de 250 $\mu\text{g/l}$ y cloruro de paladio (50 mg% de Pd) obtenemos una recta de calibración:

$$y = 0,044 + 7,13 \cdot 10^{-3}x$$

$$\text{si } y=0,1 \text{ entonces } x=7,79 \mu\text{g/l} \rightarrow C_{0,1}$$

$$C_{1\%} = C_{0,1} \cdot 0,044 = 7,79 \cdot 0,044 = 0,343 \text{ g/l}$$

Hemos inyectado 25 μl de solución, por tanto la sensibilidad absoluta será de 8,57 pg.

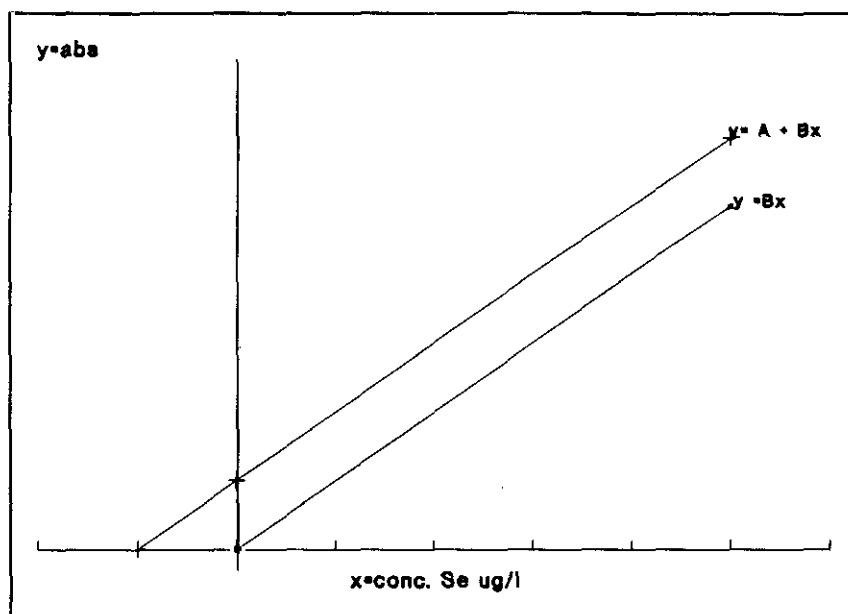
Límite de detección

El límite de detección se define como: "La cantidad mínima de un elemento que puede ser detectada con un 95% de certeza. Esto es, la cantidad de un elemento que da una lectura igual a dos veces la desviación estándar de una serie de al menos 10 determinaciones a/o cerca del nivel del blanco".

Esta definición asume una distribución normal de los errores.

Como la detección de errores no es siempre normal, este procedimiento puede que resulte un límite de detección "optimista".

Tomamos la recta que corresponde a la calibración por adición de estándar sobre suero, $y = 0,1334 + 5,11 \cdot x$, y calculamos la recta paralela que pasa por el origen:



En esas mismas condiciones, y el mismo día que se obtuvo esa recta de calibración, repetimos la lectura del blanco 20 veces:

$$n=20$$

$$y_{\text{med}} = 0,0205$$

$$\sigma = 0,0025$$

$$y_{\text{med}} + 2\sigma = 0.0255$$

$$\text{si } y = 0,0255 \text{ entonces } x = 4,99 \mu\text{g/l}$$

Dado que procede de una dilución 1/4 del suero en KI 10mM, la mínima concentración que el método es capaz de distinguir del cero es de **19 $\mu\text{g/l}$** .

Es preciso recordar que este es el límite de detección establecido para la técnica aquí descrita, es decir, con calibración sobre matriz sérica, con una intensidad de lámpara elevada (7 mA) y corrección con lámpara de deuterio, y que si se calcula este parámetro sobre solución acuosa el límite de detección es aproximadamente 100 veces menor (0,13 ppm).

IV.11.- INEXACTITUD E IMPRECISION

Imprecisión

La imprecisión de la técnica se evaluó analizando el coeficiente de variación intraensayo: "en el día", y el coeficiente de variación interensayo: "en distintos días"

Dado que en España actualmente no existe ningún suero control comercial que tenga valorada la concentración de selenio, hemos preparado un volumen de 50 ml formado por los excedentes de suero extraídos en un día en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, a partir del cual preparamos alícuotas de 250 μl , que se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Estas muestras así obtenidas se procesaron como control con cada serie de sueros analizados.

Todas las muestras se analizaron por duplicado, dando como valor definitivo la media de las dos determinaciones, por tanto la desviación típica real será la de las medias de cada dos:

$k =$ nº de parejas medidas

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}_m - \bar{x})^2}{k}}$$

\bar{x} = media total de las k parejas

\bar{x}_m = media de cada pareja

Imprecisión intraensayo

Determinando la concentración del control 15 veces seguidas, con dos réplicas por determinación, concluimos que el valor promedio del control es de 11,929 $\mu\text{g/l}$ teniendo en cuenta la dilución, correspondería a una concentración en suero de 47,7 $\mu\text{g/l}$.

La desviación típica es de 0,866 $\mu\text{g/l}$ y el coeficiente de variación es de 7,26 %.

Imprecisión interensayo

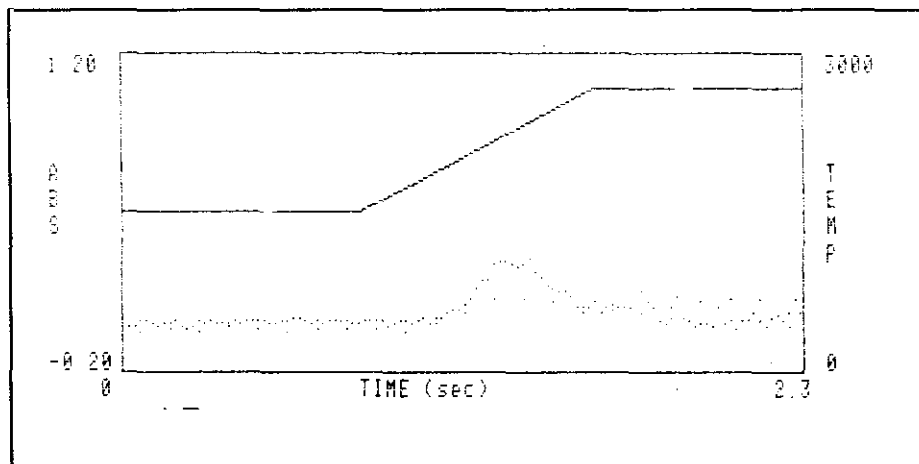
Cada serie de sueros analizados incluía el control por duplicado, obteniendo como resultado:

$$\bar{x} = 11,35 \mu\text{g/l}$$

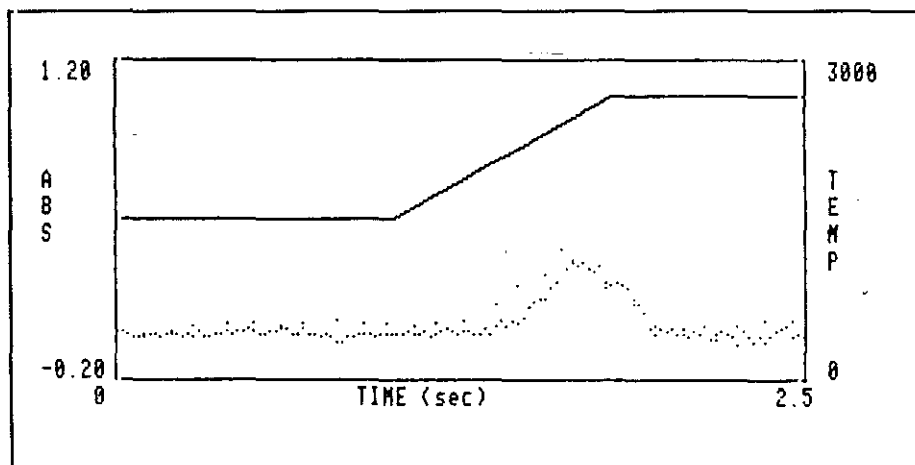
$$\sigma_{n-1} = 0,913$$

$$\text{C.V.} = 8,0\%$$

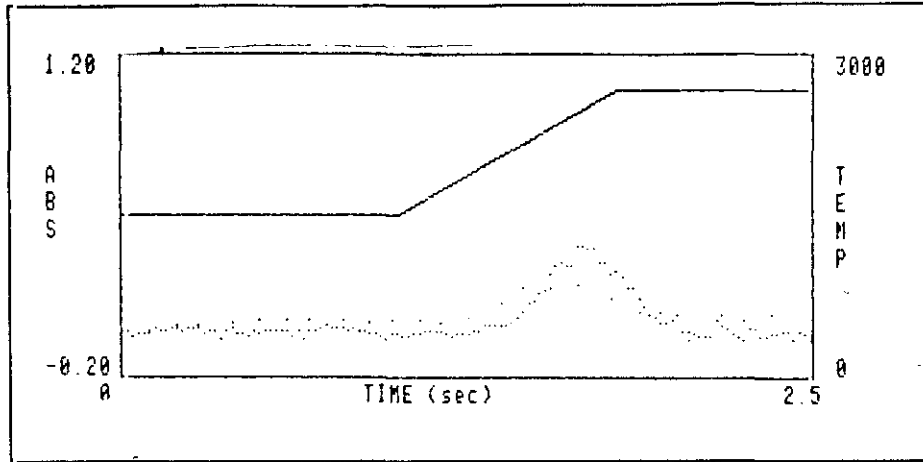
Perfiles absorbancia/tiempo/temperatura obtenidos en el análisis del suero control:



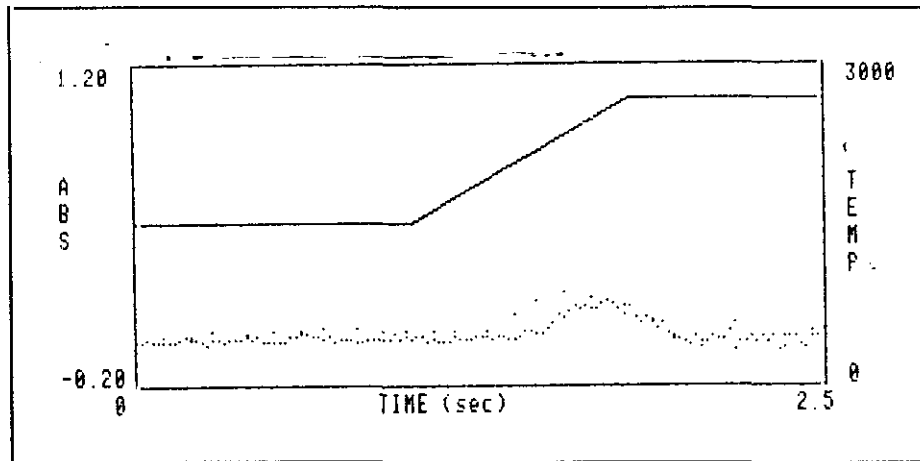
Adición 1



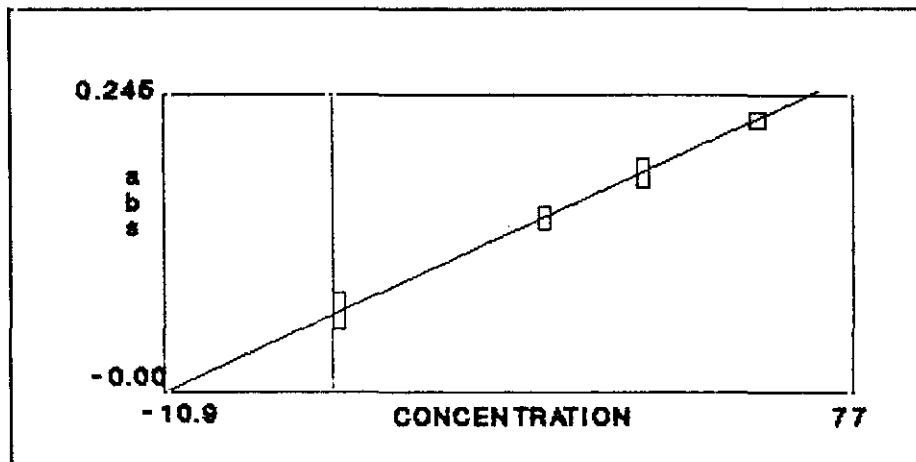
Adición 2



Adición 3



Adición 0



Gráfica de calibración

Inexactitud

Para conocer la inexactitud de la técnica hemos realizado un estudio de recuperación consistente en añadir cantidades conocidas de selenio al suero control valorado y aplicar después el método analítico.

Sobre 500 μl de suero control diluido (contiene una media de 11,9 $\mu\text{g/l}$ de selenio):

1º- Añadimos 50 μl de solución patrón de 250 $\mu\text{g/l}$ (0,0125 μg de selenio)(volumen total de 550 μl). La concentración esperada es :

$$11,9\mu\text{g/l} \rightarrow 5,95 \cdot 10^{-3} \mu\text{g de selenio en } 500\mu\text{l}$$

$$(5,95 + 12,5) \cdot 10^{-3} \mu\text{g} / 550\mu\text{l} \rightarrow 33,5 \mu\text{g/l}$$

2º- Añadimos 100 μl de solución patrón de 250 $\mu\text{g/l}$ (0,0250 $\mu\text{g/l}$)(volumen total de 600 μl). Concentración esperada :

$$(5,95 + 25) \cdot 10^{-3} \mu\text{g} / 600 \mu\text{l} \rightarrow 51,6 \mu\text{g/l}$$

	Conc.teórica	Conc.obtenida (media n=5)	Recuperación
Basal	11,9		
+ 50 μl patrón	33,5	32,88	98%
+ 100 μl patrón	51,6	54,80	106%

IV.12.- COMPARACION CON OTROS METODOS

En la revisión bibliográfica que hemos realizado para el desarrollo de este trabajo ,hemos encontrado otras técnicas instrumentales aplicables al análisis de selenio en fluidos biológicos, en particular en suero humano. Exponemos aquí, razonadamente sus ventajas e inconvenientes:

- Fluorometría.
- HPLC o CLAE (Cromatografía líquida de alta eficacia), con detección de fluorescencia.
- GCMS (Dilución de isótopos estables con cromatografía de gases y espectrometría de masas).
- Fluorescencia de rayos X.
- EAAGH (Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros).
- NAA (Análisis molecular de activación de neutrones).
- ICPMS (espectrometría de emisión con fuente de plasma acoplado por inducción ,junto con espectrometría de masas).
- EAAHG (Espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito), corrección de fondo con efecto Zeeman.

IV.12.A.- FLUOROMETRIA

Este método está entre los más antiguos y depende de las propiedades fluorescentes de los piazoselenoles (combinaciones de Se(IV) con diaminas aromáticas, generalmente

diaminonaftaleno). Es ampliamente usado por los veterinarios, por razones de aplicabilidad y sensibilidad (en medios biológicos y piensos). (50)

Su principal desventaja es su mediocre reproducibilidad, que algunos autores consiguen mejorar. (170)

Precisa personal entrenado, ya que es laborioso. Incluye una fase de extracción, generalmente con ciclohexano. El volumen de suero necesario es de 0,4 mililitros. ES un método muy sensible, con un límite de detección de 0,39 mmol.l⁻¹. Pudiendo usarse muestras de sangre o de orina. (169)

IV.12.B.- HPLC

Esta técnica alcanza un límite de detección de 0,15 ng, con una precisión de un 1% al nivel de 20 ng y de 3% al nivel de 1 ng.

Emplea volúmenes de tan solo 50 μ l de suero.

El inconveniente que presenta para el análisis rutinario, es el complicado proceso de digestión y extracción: somete la muestra a una digestión ácida con ácido nítrico al 70% a una temperatura de 120 °C, después a 150 °C y finalmente a 200 °C. Es preciso una saturación con oxalato amónico, añadir HCl 6M para reducir los selenatos, adicionar ácido fórmico, separar

con pipeta Pasteur las sales amónica formadas y ajustar el pH. por último se pasa a la fase de reacción con el reactivo DAN(diamino naftaleno) con los consiguientes pasos de incubación y extracción con ciclohexano.(171)

IV.12.C.- GCMS

La cromatografía de gases con dilución de isótopos estables y espectrometría de masas (50) es uno de los métodos que permiten exactitud, sensibilidad y precisión en la medida de la concentración de selenio en fluidos biológicos.

Precisa pequeños volúmenes (unos 500 μ l de suero), el coeficiente de variación puede ser de tan sólo un 1%.

Es un método de referencia, pero no es aplicable a los laboratorios clínicos por sus elevados costes y la especialización que requieren del personal.

IV.12.D.- FLUORESCENCIA DE RAYOS X

Hasta la década de los noventa, la fluorescencia de rayos-X no alcanzaba límites de detección adecuados a la valoración de selenio en suero.

El método consiste (172) en irradiar con un tubo de rayos-X de alta potencia (1 Kw para plasma) y usando una cámara de irradiación cuya geometría permita incidir directamente en la muestra sin saturar el detector con los rayos-X que emite el tubo.

El tiempo de análisis de cada muestra es algo superior al que empleamos en Espectrofotometría de Absorción Atómica; con 500 segundos de irradiación se consigue un límite de detección de 20 ng/ml, con un volumen de suero de 50 μ l.

El coeficiente de variación descrito para una concentración de selenio de 100 μ g/l es de aproximadamente 11% (50)

IV.12.E. - EAAGH

La espectrofotometría de absorción atómica con atomización tras generación de hidruros ha sido durante muchos años la alternativa escogida para determinar selenio en orina, pudiendo practicarse en plasma, sangre total y tejido. (50)

Su principal inconveniente es el proceso previo de digestión de la muestra biológica, que en muchas ocasiones es insuficiente.

La obtención del hidruro consigue eliminar las posibles interferencias espectrales, alcanzándose medidas homogéneas entre los diferentes laboratorios.

La cantidad de sangre requerida es de un gramo (173).

Este método requiere que el selenio en la muestra se encuentra como selenio(IV), produciéndose errores cuando no es así (165)(174)

Los resultados obtenidos con generación de hidruros son inferiores a los obtenidos con otras técnicas, por problemas en la digestión previa (175).

Algunos procedimientos de digestión en ácido nítrico, perclórico y sulfúrico consiguen una exactitud aceptable (176).

Se han realizado estudios para comparar resultados obtenidos con técnica de generación de hidruros frente al horno de grafito, obteniéndose una menor contaminación en el horno de grafito (177).

La generación de hidruros se usa frecuentemente para la determinación de selenio, arsénico y mercurio en tejidos biológicos (178).

IV.12.F. - NAA

El análisis molecular de activación de electrones es el procedimiento más exacto y preciso, permite determinar selenio total, el ión trimetilselenio y el ión selenito en suero y orina,

pudiendo cuantificarse todos los selenoaminoácidos de la orina con una cromatografía de intercambio aniónico previa (179).

Esta técnica no es practicable en la mayoría de las instalaciones, por requerir un reactor nuclear para irradiar las muestras.

Es el método considerado de referencia.

IV.12.G.- ICPMS

La espectrometría de emisión con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP) realizada junto con la espectrometría de masas (MS) es una de las expectativas de futuro más prometedoras.

Las primeras referencias emplean una generación de hidruros de selenio previa, que requiere un volumen excesivo de suero (50 ml), siendo el límite de detección de 0,2 a 0,9 ng de ^{74}Se (170).

Posteriores modificaciones que emplean la técnica de nebulización, necesitan volúmenes menores (10 ml) y consiguen una precisión del 1% (180).

Sin embargo, siguen siendo volúmenes altos para la aplicación clínica.

IV.12.H.- EAAHG

Muchos autores consideran la espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito y corrección de fondo con efecto Zeeman como la técnica idónea para cuantificar las concentraciones de selenio en medios biológicos (181)(182)(183)(184)(185)(186).

La absorción atómica con efecto Zeeman es la alternativa a la corrección con luz continua y está disponible en aparatos de las marcas Hitachi y Perkin-Elmer.

El efecto Zeeman consiste en la división de una línea espectral atómica en presencia de un campo magnético. El campo magnético se aplica a la fuente de luz o al sistema de atomización. Si se usa un campo magnético modulado la absorbancia total se mide con el imán encendido y la absorbancia del fondo con él apagado (187).

Ventajas del Zeeman (163):

- 1.- Corrección para longitudes de onda visibles (no aplicable en el caso del selenio).
- 2.- Corrección de absorbancias debidas a fondos estructurados, como la debida al fósforo en nuestro estudio.
- 3.- Corrección de interferencias espectrales, como las debidas a las líneas del hierro.

4.- Unica fuente de luz, sin posibilidad de mal alineamiento.

5.- Corrección de altas absorbancias de fondo.

Desventajas del Zeeman (188)(189)(190):

1.- Pobre sensibilidad, pues la separación de las líneas atómicas es incompleta con las fuerzas del campo prácticas. Con el cobre por ejemplo, se obtiene un 53% de absorbancia.

2.- Las curvas de calibración presentan una curvatura excesiva.

3.- El sistema de corrección no es lo suficientemente rápido para la continua variabilidad del fondo. La medida de absorbancia del fondo y la total están espaciadas unos pocos milisegundos (8-10 milisegundos) con posibles errores originados por las rápidas señales obtenidas en el horno de grafito.

La lámpara de deuterio realiza las dos medidas en dos milisegundos.

4.- Su elevado coste,

Existen técnicas mejoradas para determinar selenio con Zeeman y una digestión ácida previa (35)(191)(192)(193)(194)(195).

V.- VALORES DEL RANGO DE REFERENCIA

V.1.- POBLACION DE REFERENCIA

Para poder dar un uso clínico a las concentraciones halladas de selenio en suero humano deben establecerse primero los valores de referencia.

La IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) define los valores de referencia como aquellos que corresponden al conjunto de la población supuestamente sana. Sin embargo, la salud no es una condición bien definida, las fronteras entre la salud y la enfermedad son difusas, especialmente en el envejecimiento. Para seleccionar una muestra de la población de referencia hemos seguido los criterios del Comité de Expertos de la Federación Internacional de Química Clínica (196)(197)(198).

Los individuos de referencia seleccionados provienen del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Ramón y Cajal, gracias a la colaboración de la Dra. Pilar Rioboo.

Los individuos que sufren enfermedades sistémicas o alteraciones fisiopatológicas como la insuficiencia renal, enfermedad cardíaca congestiva, enfermedad crónica respiratoria, enfermedad hepática o síndromes malabsortivos han sido excluidos por examen clínico, investigación de laboratorio y por cuestionario en entrevista.

Otros criterios de exclusión han sido la obesidad, hipertensión y el alcoholismo.

Para evitar el efecto de las posibles variaciones circadianas (199)(200)(201) las muestras de sangre se recogieron en un tiempo fijo (8:00 a 10:00 horas), en ayunas doce horas, en tubos "Venoject" secos (Terumo Europe NV, Leuven, Belgium) y se centrifugaron a 200g durante 10 minutos) para separar el suero. Las muestras se guardaron congeladas a -20 °C hasta el día del análisis.

Hemos realizado subclasificaciones del grupo siguiendo criterios de edad y sexo.

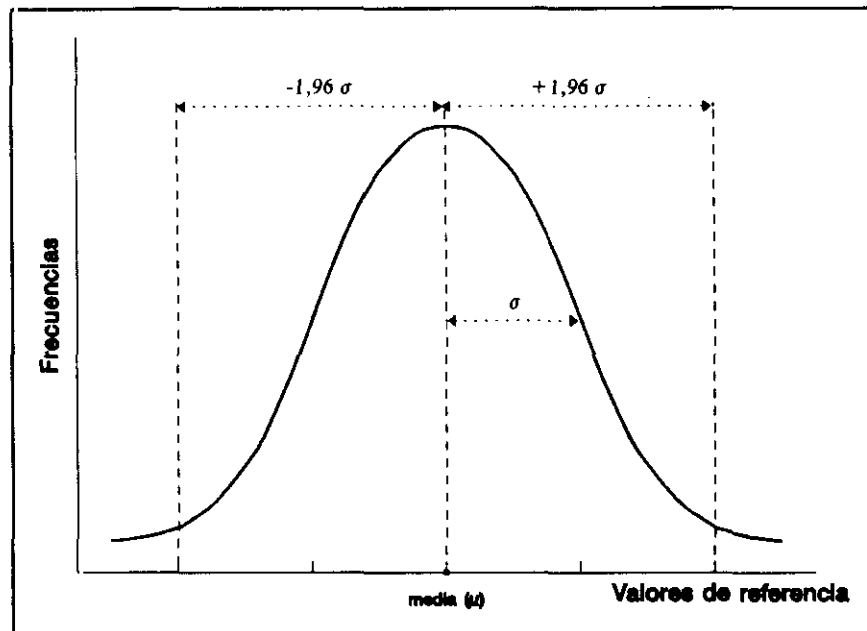
La muestra presenta un total de 118 individuos comprendidos entre 15 y 65 años, 49 varones y 71 hembras.

V.2.- DISTRIBUCION ESTADISTICA. TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV.

Cuando tomamos un número de individuos sanos (n=118) como muestra representativa de toda la población sana, los valores hallados se distribuyen estadísticamente, en la mayoría de los casos, dando lugar a lo que en estadística se denomina "distribución gaussiana" o "distribución normal" (202).

La representación gráfica de esta distribución es la denominada curva de Gauss, cuya ecuación es:

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x-\mu}{2\sigma}}$$



Debido al azar, estos valores de referencia se agrupan en torno a la media, y la medida de la dispersión viene dada por la desviación estándar (σ), de tal forma que se admite que $\bar{x} \pm 1,96\sigma$ es el intervalo que engloba al 95 % de todos los valores de referencia. De forma aproximada, se admite que en distribuciones "normales" o "gaussianas", el intervalo está comprendido entre el límite inferior $\bar{x}-2\sigma$ y el límite superior $\bar{x}+2\sigma$ ($1,96 \approx 2$).

En aquellos casos en que la forma de distribuirse los resultados no es gaussiana, no puede aplicarse este intervalo de referencia.

Para establecer cuales son los límites que encierran al 95 % de la población sana lo que debe hacerse es establecer los fractiles (fracción de población) que dejan por debajo al 2,5 % de la población ($\text{fractil}_{0,025}$) y por encima otro 2,5 % ($\text{fractil}_{0,975}$). Para ello, se ordenan todos los valores y se determinan cuales son los que ocupan estas posiciones.

Para saber si la distribución de los valores de referencia de las concentraciones de selenio en sangre siguen o no una distribución gaussiana aplicamos la prueba de **Kolmogorov-Smirnov**.

Esta prueba se basa en el estudio de las diferencias existentes entre la distribución de frecuencias acumulativas observada en la población y la distribución de las frecuencias acumulativas esperadas si la distribución fuera gaussiana. Para ello, se busca cual es la máxima diferencia observada ($D_{\text{máx}}$) y se compara con el valor teórico $D_{\text{teórico}}$ dado por la tabla de Lilliefors (202).

Esta tabla permite elegir entre varios valores $D_{\text{teóricos}}$; uno de ellos es el $D_{0,05}$ y otro valor de la tabla es el $D_{0,1}$.

Si el valor de $D_{\text{máx}}$ encontrado es mayor que $D_{0,05}$, quiere decir que las diferencias encontradas son mayores que las que el azar explica, y se puede rechazar la hipótesis de curva gaussiana con una probabilidad de error menor de 0,05, es decir, con diferencia estadísticamente significativa.

Si el valor de $D_{\text{máx}}$ es mayor que $D_{0,1}$, la probabilidad de error al rechazar la hipótesis de curva gaussiana sería de hasta 0,1 lo cual es un error algo elevado y si se aceptara la "normalidad" sería con un riesgo de error elevado.

Aplicado el test de **Kolmogorov-Smirnov** a la muestra completa se obtienen los siguientes resultados:

Media	Desv. Tip.	Err. Est.	Mínimo	Máximo	Tamaño
64,2373	19,7232	1,8157	34	116	118

Diferencias teóricas: $D_{0,1} = 0,1252$ ($p < 0,05$)

$D_{0,05} = 0,11231$ ($p < 0,1$)

Diferencia máxima observada: $D_{\text{máx}} = 0,12236$

Como presenta una diferencia máxima observada mayor que la diferencia teórica que el azar explica $D_{0,05}$, rechazamos la distribución normal de las concentraciones de selenio en la población adulta sana. Se considera "aproximadamente normal" ($p < 0,1$) dado que $D_{\text{máx}} < D_{0,1}$.

Los elementos traza que son controlados homeostáticamente (203) siguen una distribución aproximadamente normal; en aquellos elementos cuya concentración depende de factores como las diferencias geográficas (25)(204)(205), composición de los suelos (4), contenido en aguas y alimentos (27)(44)(98), forma mineral (208), contaminantes (206)(207), la distribución se aleja de la curva gaussiana.

Para poder convertir los datos en una distribución "normal" realizamos una transformación logarítmica mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov de bondad de ajuste de la distribución de log(conc. Se) a una curva gaussiana.

Realizando dicha transformación logarítmica los datos obtenidos se agrupan en las siguientes clases:

Clase	d (lim.inf)	(d-x _m)	d /s	área	f _{rel} esp.	f _{abs} esp*	f _{abs} obs.	f _{abs} ⁻ f _{abs} *
1,57	1,55	-0,24	1,89	0,4713	0,03	3,44	5	1,56
1,62	1,60	-0,19	1,50	0,4332	0,04	4,57	10	5,43
1,67	1,65	-0,14	1,10	0,3643	0,07	8,27	13	4,73
1,72	1,70	-0,09	0,71	0,2580	0,11	12,76	22	9,24
1,77	1,75	-0,04	0,32	0,1300	0,16	19,20	16	-3,2
1,82	1,80	0,01	0,08	0,0300	1,97	18,00	16	-2,0
1,87	1,85	0,06	0,47	0,1800	0,13	15,60	11	-4,6
1,92	1,90	0,11	0,87	0,3100	0,08	10,15	9	-1,15
1,97	1,95	0,16	1,26	0,3946	0,06	6,71	4	-2,71
2,02	2,00	0,21	1,65	0,4505	0,03	3,44	8	4,56
2,07	2,05	0,26	2,05	0,4798	0,02	2,42	2	-0,42

Media = 1,79

Desv. tip. = 0,13

$\Sigma x = 214,54$

$\Sigma x^2 = 385,49$

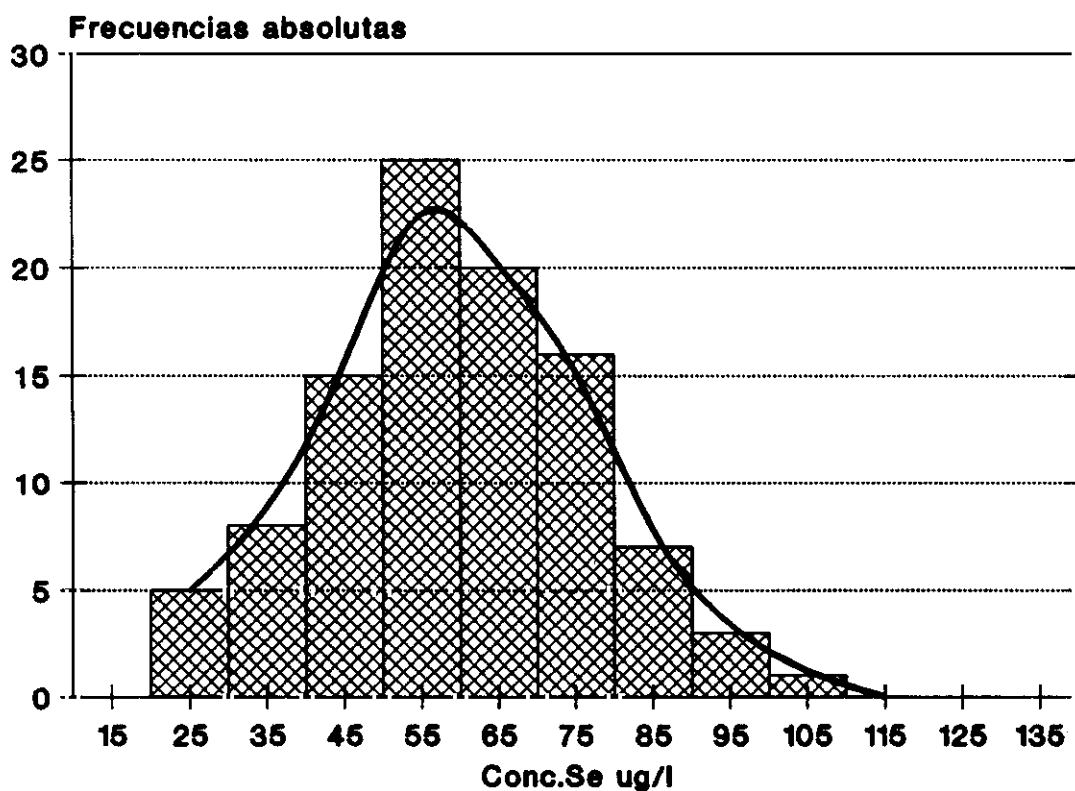
$D_{\text{máx}} = D_{\text{máxima observada}} / n = 9,24/118 = 0,078$

Diferencia máxima teórica: $D_{0,01} = 0,09$ ($p < 0,01$)

Como la $D_{m\acute{a}x}$ es menor que $D_{0,01}$ aceptamos la distribución normal de la transformación logarítmica, con una probabilidad de error menor de 0,01.

Dado que el estudio de los datos estadísticos realizado con el selenio como variable dependiente presenta una distribución no gaussiana para las concentraciones originales, los análisis estadísticos realizados sobre la muestra, se han hecho aplicando métodos no paramétricos en lugar de usar la transformación logarítmica para simplificar los resultados presentados, a pesar de sí ser una distribución normal dicha transformación.

Distribución de las conc.de Se en suero



V.3.- PARTICION EN SUBCLASES SEGUN EL SEXO.

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los resultados procedentes de la población masculina y los de la femenina hemos aplicado el **test de Kruskall-Wallis (202)**, dado que hemos considerado los resultados como no paramétricos. Los resultados obtenidos fueron:

Sexo	Σ Rango	Tamaño
♂	3105	48
♀	3916	71

El test se basa en ordenar crecientemente todos los datos, después sumar los rangos correspondientes a las mujeres ($\Sigma R_{\varphi} = 3916$) y a los hombres ($\Sigma R_{\delta} = 3105$), calcular sus medias mediante las fórmulas $\bar{R}_{\varphi} = \frac{\Sigma R_{\varphi}}{n_{\text{mujeres}}}$ y $\bar{R}_{\delta} = \frac{\Sigma R_{\delta}}{n_{\text{hombres}}}$, calculándose además la media total de los

$$\text{rangos } \bar{R} = \frac{N_{\text{total}}^{\circ} + 1}{2}.$$

A partir de estos datos, se calcula el valor de H que viene dado por:

$$H = \frac{1}{N_{\text{total}}^{\circ}} \frac{\Sigma n_i (\bar{R}_i - \bar{R})^2}{(N_{\text{total}}^{\circ} + 1)/12} = \frac{1}{N} \frac{n_{\varphi} (\bar{R}_{\varphi} - \bar{R})^2 + n_{\delta} (\bar{R}_{\delta} - \bar{R})^2}{(N+1)/12}$$

Como hay empates, es decir a veces hay dos concentraciones de selenio iguales que al ordenarlas crecientemente tendrían el mismo número de rango, se calcula el valor de $H_{\text{corregida}}$ mediante la fórmula $H_{\text{corregida}} = H/\text{Factor de Corrección}$.

$$\text{Factor de Corrección} = 1 - \frac{\sum_1^m T_j}{(\sum_1^a n_i - 1) \sum_1^a n_i (\sum_1^a n_i + 1)}$$

donde $T_j = t_j^3 - t_j$ siendo t_j el número de empates en cada grupo.

Efectuados estos cálculos se obtiene:

$$H = 1,8608$$

$$H_{\text{corregida}} = 2,6249$$

$$\text{Factor corrección} = 0,70891$$

Nº de muestras = 2

Tamaño global = 118

Grados de libertad = 1

Esta $H_{\text{corregida}}$ se compara con un test χ^2 para ver su significación.

$$\text{Probabilidad} = 0,10521 > 0,05$$

Las diferencias respecto al sexo **no son significativas**, pues la probabilidad de error al rechazar la hipótesis de que son dos grupos iguales es $0,10521 > 0,05$.

En los datos procedentes de Nueva Zelanda **(6)(23)(27)(209)**, Grecia **(205)** y Dinamarca **(210)(211)(212)(213)**, tampoco se observan diferencias significativas entre los dos grupos; sin

embargo en Polonia (39) los hombres tienen mayores concentraciones de selenio en sangre que las mujeres.

V.4.- INTERVALO DE REFERENCIA.

El intervalo de referencia lo definimos mediante la fracción que contiene el 0,95 central (ó el 95 por ciento) de la distribución de referencia.

Los límites de referencia estimados son el fractil 0,025 y el 0,975. Estos límites separan una fracción de 0,025 (2,5 %) de los valores en cada cola de la distribución de referencia:

$$\text{Fractil}_{0,025} = 38 \mu\text{g/l}$$

$$\text{Fractil}_{0,975} = 111 \mu\text{g/l}$$

La mediana de la distribución (fractil $_{0,5}$) es $60 \mu\text{g/l}$.

Asumiendo que el intervalo está hallado en unos valores de referencia obtenidos en un simple muestreo aleatorio, debemos acompañar estos fractiles de un intervalo de confianza (0,95 = 95%).

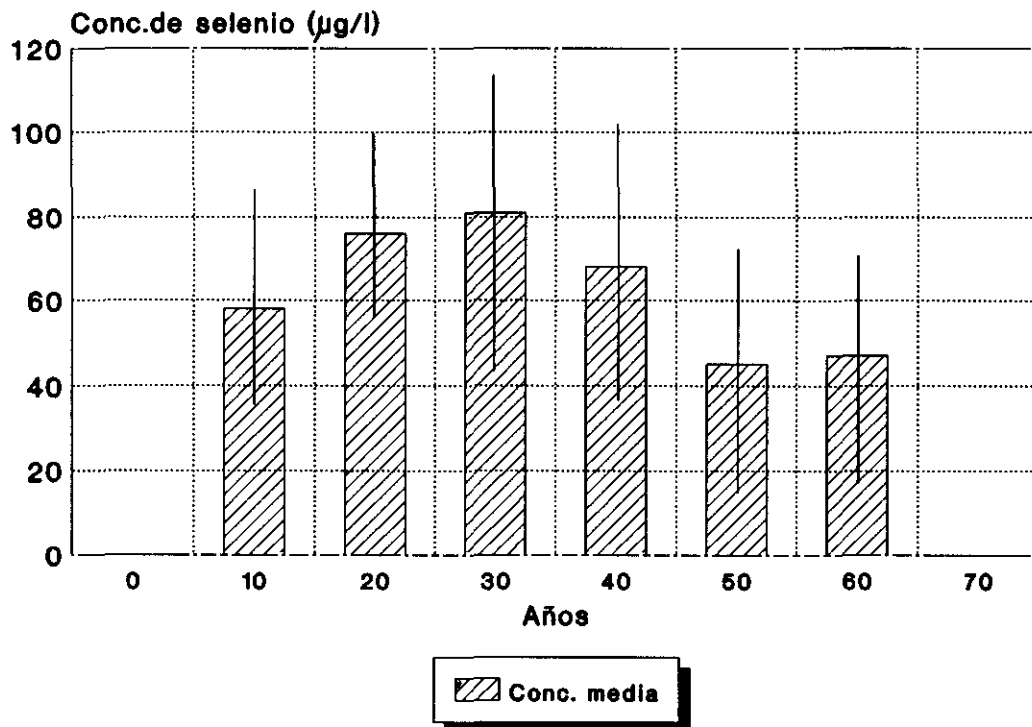
De esta forma el intervalo de referencia de la concentración de selenio en suero en la población adulta española es de **38** ₍₃₆₋₄₂₎ $\mu\text{g/l}$ a **111** ₍₁₀₇₋₁₁₂₎ $\mu\text{g/l}$.

V.5.- VARIACION DE LA CONCENTRACION DE SELENIO EN SUERO CON LA EDAD.

Los análisis de selenio efectuados a los 118 individuos sanos se han agrupado en 6 series, según la edad.

Los resultados encontrados se muestran en la siguiente gráfica, en la cual se incluye el 95% de confianza.

CONCENTRACIONES DE SELENIO POR EDADES



Hemos comparado las concentraciones de selenio halladas en los distintos grupos de edades con el fin de establecer si el factor edad establece diferencias significativas entre los individuos de referencia. Para ello hemos aplicado el test de **Kruskall-Wallis**. Los resultados obtenidos fueron:

Edad	Σ Rango	Tamaño
0-19	260.5	5
20-29	2715.5	43
30-39	2669.5	38
40-49	971	15
50-59	228.5	10
60-	176	7

Esta prueba utiliza como parámetros los siguientes valores calculados:

$$H = 23,3679$$

$$H_{\text{corregido}} = 32,9633$$

$$\text{Probabilidad} = 3,82 \cdot 10^{-6}$$

La probabilidad encontrada es de $3,8 \cdot 10^{-6}$, muy significativa, por lo que podemos deducir que la edad provoca unas diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las concentraciones de selenio de la población sana.

Se observa un aumento progresivo del contenido de selenio en suero hasta los 30-40 años, edad a partir de la cual comienza un descenso. Estos resultados concuerdan con los alcanzados por otros autores (214)(215)(216)(217).

Con el número de individuos estudiados en nuestro trabajo no es posible establecer valores de referencia para cada grupo de edad como sería aconsejable en este caso, ya que algunos grupos, especialmente los más extremos tienen tan solo 5 y 7 individuos, por lo que son claramente insuficientes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1^a.- Se ha puesto a punto un método de análisis mediante espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, que permite determinar selenio en suero humano eliminando las interferencias producidas por otros elementos, principalmente fósforo, presentes en el suero humano (absorción de fondo del suero), y evitando las elevadas pérdidas que se originan frecuentemente por la inestabilidad térmica del selenio.

2^a.- Con objeto de disminuir la elevada volatilidad del selenio, y evitar las pérdidas en el análisis, se ha empleado una solución de nitrato de níquel. Calcinando a 1100 °C, temperatura idónea a partir de la cual la pérdida de analito es considerable, y atomizando a 2700 °C se obtienen resultados satisfactorios pero la elevada señal de fondo no queda anulada y dificulta la determinación.

3^a.- Se ha sustituido el nitrato de níquel como modificador de la matriz por cloruro de paladio. Los resultados obtenidos calcinando a 1200 °C, manteniendo dicha temperatura 35 segundos, y atomizando a 2700 °C muestran una señal de fondo apta para el análisis pero igualmente indican que se pueden originar pérdidas de selenio si éste se encuentra en diferentes estados de oxidación [Se(IV) y Se(II)].

4^a.- Para evitar las pérdidas debidas a los diferentes estados de oxidación que puede presentar el selenio en el suero, se ha utilizado como reductor yoduro potásico que no origina precipitación de las proteínas séricas. La presencia de KI produce no sólo la reducción del selenio sino que también reduce al modificador de paladio originando un seleniuro estable.

5^a.- Empleando Tritón X100 como diluyente del suero y Antifoam B como antiespumante, necesario por la presencia del Tritón, se produce un aumento considerable de la señal de fondo que dificulta la medida, por lo que hemos rechazado su uso. La dilución del suero se realiza directamente con la solución reductora de KI en una proporción 1:3. De esta forma se precisa tan sólo 100 μ l de suero, por lo que el método de análisis es perfectamente adaptable a la población pediátrica o a los enfermos de cuidados intensivos.

6^a.- Empleando el método de las adiciones de estándar se han determinado los rangos de linealidad de la técnica de análisis. Los resultados obtenidos muestran que hasta 110 μ g/l de selenio la técnica es lineal si el ensayo se realiza sobre disoluciones acuosas y hasta 90 μ g/l si se efectúa sobre la matriz sérica.

7^a.- La sensibilidad del método, utilizando una intensidad de corriente de 7 mA para la lámpara, es de 8,57 pg. El límite de detección o cantidad mínima de selenio que el método de análisis puede detectar es 19 μ g/l.

8^a.- La imprecisión entre ensayos realizados en el mismo día "intraensayos" es de 0,866 μ g/l y entre ensayos realizados en días diferentes "interensayos" es de 0,913 μ g/l. La inexactitud

del método, deducida mediante la recuperación de cantidades conocidas de selenio, oscila entre un 2 y un 5 %.

9^a.- Con objeto de poder dar un uso clínico a las concentraciones halladas de selenio en suero humano hemos establecido los valores de referencia, que son aquellos que corresponden al conjunto de la población supuestamente sana. La muestra presenta un total de 118 individuos comprendidos entre 15 y 65 años, 49 varones y 71 hembras.

10^a.- El estudio de los datos estadísticos, realizado con el selenio como variable dependiente mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, presenta una distribución no gaussiana para las concentraciones originales pues la diferencia máxima observada $D_{\text{máx}} = 0,12236$ es mayor que la diferencia teórica que el azar explica $D_{0,05} = 0,11231$.

11^a.- Realizada una transformación logarítmica mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov de bondad de ajuste de la distribución de $\log(\text{conc. Se})$ a una curva gaussiana, con objeto de poder convertir los datos de las concentraciones de selenio en una distribución "normal", se ha encontrado que la $D_{\text{máx}} = 0,078$ es menor que $D_{0,01} = 0,09$. Por tanto, aceptamos la distribución normal de la transformación logarítmica, con una probabilidad de error menor de 0,01.

12^a.- Los análisis estadísticos realizados sobre la muestra, se han hecho aplicando métodos no paramétricos en lugar de usar la transformación logarítmica para simplificar los resultados presentados, a pesar de sí ser una distribución normal dicha transformación.

13^a.- Aplicado el test de Kruskal-Wallis, dado que se han considerado los resultados como no paramétricos, para comprobar si existen diferencias significativas entre los resultados procedentes de la población masculina y los de la femenina, se han obtenido unos resultados que nos indican que las diferencias respecto al sexo no son significativas, pues la probabilidad de error al rechazar la hipótesis de que son dos grupos iguales es $0,10521 > 0,05$.

14^a.- El intervalo de referencia de la concentración de selenio en suero en la población adulta española es de $38_{(36-42)} \mu\text{g/l}$ a $111_{(107-112)} \mu\text{g/l}$, considerando como límites de referencia el fractil 0,025 y el 0,975, que separan una fracción de 0,025 de los valores en cada cola de la distribución de referencia y acompañando a estos fractiles de un intervalo de confianza del 95%.

15^a.- Comparadas las concentraciones de selenio halladas en los distintos grupos de edades y aplicando el test de Kruskal-Wallis, se encuentra una probabilidad de $3,8 \cdot 10^{-6}$, muy significativa, por lo que es posible deducir que la edad provoca unas diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las concentraciones de selenio de la población sana. Se observa un aumento progresivo del contenido de selenio en suero hasta los 30-40 años, edad a partir de la cual comienza un descenso.

16^a.- No ha sido posible establecer valores de referencia para cada grupo de edad como sería aconsejable, pues el número de individuos estudiados en nuestro trabajo no lo ha permitido ya que algunos grupos, especialmente los más extremos tienen tan solo 5 y 7 individuos, por lo que son claramente insuficientes.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schwarz K. y Foltz C.M.; *Nutr. Rev.*, 1989, **47**, 108-110.
- 2.- Rotruck J.T., Pope A.L., Gauther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G. y Hoekstra W.G.; *Science*, 1973, **179**, 588-590.
- 3.- Mussalo-Rauhamaa H. y Lehto J.J.; *J. Am. Col. Nutr.*, 1989, **8**, 588-590.
- 4.- Xia Y., Hill K. y Burk R.; *J. Nutr.*, 1989, **119**, 1318-1326.
- 5.- Young G., Wang S., Zhang R. y Sun S.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, **37**, 872-889.
- 6.- Robinson M.F.; *Nutr. Rev.*, 1989, **47**, 99-107.
- 7.- Burk R.P., Laner J.M., Laurence R.A. y Gregory P.E.; *J. Nutr.*, 1981, **111**, 690-693.
- 8.- McMaster D., Bell N., Anderson P. y Love A.H.G.; *Clin. Chem.*, 1990, **36**, 211-216.
- 9.- Baker S.S. y Cohen H.J.; *J. Immunol.*, 1983, **130**, 2856-2860.
- 10.- Guang L.X. y Diplock A.T.; *Br. J. Nutr.*, 1983, **50**, 437-444.
- 11.- Solbe A.D., Albanes D., Winick M., Taylor R., Nixon D.W. y Levander O.A.; *Nutrition and Cancer*, 1990, **13**, 81-87.
- 12.- Schwarz K.; *N. Y. Acad. Sci.*, 1973, **192**, 200-209.
- 13.- Levander O.A., Deoach D.P., Taylor R., Morris V.C. y Moser P.P.; *J. Nutr.*, 1983, **113**, 55-63.
- 14.- Lee Y.H., Layman D.K. y Bell R.R.; *J. Nutr.*, 1981, **111**, 194-200.
- 15.- Sunde R.A. y Hoekstra W.G.; *Nutr. Rev.*, 1980, **38**, 265-272.

- 16.- Ilian M.A. y Whanger P.D.; *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1989, **3**, 9-16.
- 17.- Falciglia H.S.; *J. Pediatric.*, 1989, **115**, 835-836.
- 18.- Horvath P.M. y Ip C.; *Cancer Res.*, 1983, **43**, 5335-5341.
- 19.- Völimäki M., Alfthan G., Pikkarainen J., Ylikahri R. y Salaspuro M.; *Clin. Chim. Acta*, 1987, **166**, 171-176.
- 20.- Whanger P.D., Belstein M.A., Thompson C.D., Robinson M.F. y Howe M.; *FASEB J.*, 1989, **2**, 2996-3002.
- 21.- Alfthan G.; *Biological Trace Element Research*, 1988, **18**, 137-143.
- 22.- Caygill C.P.J., Lavery K., Judd P.A., Hill M.J. y Diplock A.T.; *Food Additives and contaminants*, 1989, **6**, 359-363.
- 23.- *Nutrition Reviews*, 1980, **38**, 278-279.
- 24.- Kongpu Y., Jiachen H., Gongkan F. y Zhengen M.; *Med. Lab. Sci.*, 1990, **47**, 132-134.
- 25.- Hinkal F., Yetgin S. y Ataçeri N.; *Biological Trace Element Research*, 1989, **20**, 161-167.
- 26.- Kok F.J., Buijin A.M., Hoffman A. y Valkenburg H.A.; *Am. J. Epidem.*, 1987, **125**, 12-16.
- 27.- Thompson C.D., Ang L.K. y Robinson M.F.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985, **41**, 1015-1022.
- 28.- Lockitch G., Jacobson B., Quigley G., Dison P. y Pendray M.; *J. Pediatrics*, 1989, **114**, 865-870.
- 29.- Varo P., Alfthan G., Päivi E., Aro A. y Koivistoinen P.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988, **48**, 234-239.
- 30.- Nève J., Henry M., Peretz A. y Mareschi J.P.; *Cah. Nutr. Diet.*, 1987, **22**, 145-162.
- 31.- Smith A.M., Picciano M.F. y Milner J.A.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982, **35**, 521-526.

- 32.- Burk R.F.; *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 1978, **30**, 88-106.
- 33.- Whanger P.; *Am. Inst. of Nutr.*, 1989, 1236-1239.
- 34.- Ting B.; *The Lancet*, 1979, 189-191.
- 35.- Morisi G., Patriarca M. y Menotti A.; *Clin. Chem.*, 1988, **34**, 127-133.
- 36.- Saint-Georges M.D., Bonnefont D.J., Boureley B.A., Jaudon M.C., Cereze P., Grad C., Chameil J.C y D'Auzac C.L.; *La Presse Médicale*, 1989, **18**, 1195-1198.
- 37.- Simonoff M., Conri C., Fleury B., Berdeu B., Moretto D., Duclox G. y Llabador Y.; *Trace Elements in Medicine*, 1988, **5**, 64-69.
- 38.- Kuroda M., Imura T. y Hasegawa T.; *Trace Elements in Medicine*, 1988, **5**, 97-103.
- 39.- Wasowickz W. y Zachara B.A.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1987, **25**, 409-419.
- 40.- Levander O.A., Sutherland B. y King J.C.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, **34**, 2662-2669.
- 41.- Collip P.J. y Chen M.S.; *N. England J. Med.*, 1981, **304**, 1304-1305.
- 42.- Thompson C.D. y Robinson M.F.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, **33**, 303-323.
- 43.- Thompson C.D., Robinson M.F., Campbell D.R. y Rea H.M.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982, **36**, 24-31.
- 44.- Levander O.A., Alfthan G. y Pikkarainen J.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, **37**, 887-897.
- 45.- Rij A.M., Wade C., Kirk I., Thompson C.D. y Robinson M.F.; *Clin. Sci.*, 1987, **73**, 525-529.
- 46.- King W., Miche. L., Wood R., Malt R., Baker S. y Cohen H.; *N. England J. Med.* , 191, **304**, 1305.
- 47.- *Nutrition Reviews*, 1990, **48**, 290.
- 48.- Swanson C.A., Reamer D.C., Veillon C., King J.C. y Levander O.A.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, **38**, 169-180.

- 49.- Jia X.A., Zhon L.H., Wu X., Xia Y., Xiang L., Yang S., Ji L.H., Wang S. y Zhang R.; *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1989, **3**, 29-34.
- 50.- 2nd. International Congress on Trace Elements in Medicine and Biology (Avoriaz, France 1988). Selenium in Biology and Medicine. Editores Nève and Favier, 1989.
- 51.- Tsukanoto Y., Iwanamis S. y Marmmo T.; *Nephron*, 1980, **26**, 176-179.
- 52.- Levander O.A., Bell J.D., Morris V.C. y Sadler P.J.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, **51**, 517.
- 53.- Kien L.K. y Ganther H.E.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, **37**, 319-328.
- 54.- Westin T., Ahlbom E., Johanssen E., Sandström B., Karlber I. y Edstron S.; *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1989, **115**, 1079-1082.
- 55.- Swanson C.A., Longnecker M.P., Veillon C., Howe S.M., Levander O.A., Taylor P.R., McAdam P.A., Brown C.C., Stampfer M.J. y Willet W.C.; *J. Clin. Nutr.*, 1990, **52**, 858-862.
- 56.- Dahlstrom K.A., Marvine E. y Meurhong S.; *J. Pediatr.*, 1986, **109**, 625-630.
- 57.- Brown M.R., Cohen H. y Klish W.J.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1986, **43**, 549-554.
- 58.- Oster O., Prellwitz W., Kasper W. y Meinertz T.; *Clin. Chim. Acta*, 1983, **128**, 125-132.
- 59.- Johnson R.A., Baker S.S., Fallon J.T., Maynard E.P., Ruskin J.N., Wen Z., Ge K. y Cohen H.; *N. Engl. J. Med.*, 1981, **304**, 1210-1212.
- 60.- Rij A.M., Thompson C.D. y Robinson M.F.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1979, **32**, 2076-2085.
- 61.- Fleming C.R., Lie J.T., McCall J.T., O'Brien J.F., Baille E.E. y Thistle J.L.; *Gastroenterology*, 1982, **83**, 869-893.
- 62.- Baker S.S., Lemon R.H., Krey S.M., Crocker K.S., Hirsh E.F. y Cohen H.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, **38**, 769-771 .
- 63.- Ikram H., Crozier I.G., Welaster M. y Low C.J.S.; *N. Z. Med. J.*, 1989, **102**, 100-102.

- 64.- Young V.R.; *N. Engl. J. Med.*, 1981, **304**, 1228-1230.
- 65.- Lockitch G., Taylor G.P., Wong L.T.K., Davidson A.G.F., Dison P.J., Riddell P. y Massing B.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, **52**, 572-577.
- 66.- *Nutrition Reviews*, 1989, **47**, 117-119.
- 67.- Sánchez P.A.; *Cardiología Pediátrica, Clínica y Cirugía.*, Toray-Masson, Barcelona 1983.
- 68.- Laurence R.A., Parkhill L.K. y Burk R.F.; *J. Nutr.*, 1978, **108**, 981-987.
- 69.- Salonen J., Alfthan G. y Puska P.; *Lancet*, 1982, **II**, 175-179.
- 70.- Moore J.A., Noiva R. y Walls C.; *Clin. Chem.*, 1984, **30**, 1171-1173.
- 71.- Aro A., Alfthan G., Soima Kallis S. y Vantilainem R.; *Clin. Chem.*, 1986, **32**, 911-912.
- 72.- Ikram H., Low C.J.S., Welaster M. y Crozier I.G.; *N. Zeland Med. J.*, 1989, **102**, 581-582.
- 73.- Nève J.; *Pathologie Biologie*, 1989, **37**, 1102-1106.
- 74.- Nève J.; *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, 1990, **85**, 29-33.
- 75.- Ringstad J. y Fønnebø V.; *Am. Clin. Research.*, 1987, **19**, 351-354.
- 76.- Kok F.J., Bruijn A.M. y Valkenburg H.A.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, **47**, 462-468.
- 77.- Nan B., Yuan L., Huadong L., Chunsheng L., Lihua C. y Zhon X.; *J. Applied Cardiology*, 1988, **3**, 363-367.
- 78.- Bukkens S., Nelleke V., Kok F.J., Schanten E.G., Bruijin A.M. y Hofman A.; *J. Am. Coll. Nutr.*, 1990, **9**, 128-135.
- 79.- Schaffer-Kronberger E., Eber B., Wawschienk O., Dusleag J., Friehs R., Gogg R., Petek W. y Klein W.; *Acta Med. Austriac.*, 1990, **17**, 22-24.
- 80.- Virtamo J., Valkeila E., Alfthan G., Punsar S., Hunttimen J. y Karvonen M.J.; *Am. J. Epidemiol.*, 1985, **122**, 276-282.

- 81.- Korpela H., Kumpulainen J., Jussila S., Kemilä S., Kääriäinen T. y Sotaniemi E.A.; *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1989, **65**, 249-252.
- 82.- Jackson M.J., Coakley J., Stokes H.B., Edwards R.H.T. y Oster O. *Neurology*, 1989, **39**, 655-659.
- 83.- Gromadzin'ska J., Wasowickz W. y Sklodowska M.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1988, **26**, 255-258.
- 84.- Annerén G., Gebre M. y Gustavson K.H.; *Acta Paediatr.Scand.*, 1989, **78**, 879-884.
- 85.- Luvec J.; *Ann. Clin. Biochem.*, 1990, **27**, 173-182.
- 86.- Campbell C.A., Peet M. y Ward N.J.; *Lithium, Inorganic Pharmacology and Psychiatric Use* .
- 87.- Foucaud P., Théron P., Marchand M., Brion F., Demelier J.F. y Navarro J.; *Arch. Fr. Pediatr.*, 1988, **45**, 383-386.
- 88.- Dubais F. y Belleville F.; *Pathologie Biologie*, 1988, **36**, 1017-1025.
- 89.- Thuluvath P.J. y Triger D.R.; *Lancet*, 1987, **8552**, 219.
- 90.- Casaril M.; *Clin. Chim. Acta*, 1989, **182**, 221-228.
- 91.- Mussalo-Rauhamaa H., Poikolainen K., Kärkkäinen P. y Letho J.; *Drugs and Alcohol Dependence*, 1987, **29**, 95-103.
- 92.- Van Caillie-Bertrand M., Degenhart H.J. y Fernandez J.; *Acta Paediatr.Scand.*, 1984, **73**, 816-819.
- 93.- Informe de la OMS/OIEA. Elementos Menores y oligoelementos en leche materna, Ginebra 1988.
- 94.- Kumpulainen J., Salmenpera L., Siimesmm.A., Kovistoiven P. y Perheentipa J.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985, **41**, 735-742.

- 95.- Fruik M.A., Hamlin L., Picciano M.F. Prentice A. y Milner J.A.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, **51**, 220-224.
- 96.- Lombeck I., Kasperk K., Bachmann D., Feinendegen L.E. y Brenner M.J.; *Eur. J. Pediatr.*, 1980, **134**, 65-68.
- 97.- Schrauzer G.N.; *Bioinorganic Chemistry*, 1976, **5**, 275-281.
- 98.- Schrauzer G.N., White D.A. y Schneider C.J.; *Bioinorganic Chemistry*, 1978, **8**, 387-396.
- 99.- Ip C.; *Cancer Res.*, 1981, **41**, 4386-4390.
- 100.- Pence B.C. y Buddingh F.; *J. Nutr.*, 1985, **115**, 1196-1202.
- 101.- Jacobs M.M., Forst C.F. y Beaus F.A.; *Cancer Res.*, 1981, **41**, 4458-4465.
- 102.- Ip C.; *Federation Proc.*, 1985, **44**, 2573-2578.
- 103.- Milner J.A.; *Federation Proc.*, 1985, **44**, 2568-2572.
- 104.- Leboenf R.A. y Hoekstra W.G.; *Federation Proc.*, 1985, **44**, 2563-2567.
- 105.- Ip C. y Sinha D.K.; *Cancer Res.*, 1981, **41**, 31-34.
- 106.- Willet W.C., Polk B.F. y Hames C.G.; *Lancet*, 1983, **2**, 130-134.
- 107.- Nomura A., Heilbrun L.K. Morris J.S. y Stemmermann G.N.; *J. Natl. Canc. Inst.*, 1987, **79**, 103-108.
- 108.- Basu T.K., Hill G.B. y Temple N.; *J. Am. Col. Nutr.*, 1989, **8**, 524-529.
- 109.- Schobe S.E., Comstock G.W., Helsing K.J., Salked R.M., Morris J.S., Rider A.A. y Brookmeyer K.; *Am. J. Epidemiol.*, 1987, **126**, 1033-1041.
- 110.- Burney P.G.J., Comstock G.W. y Morris J.S.; *Am. J. Clin.-Nutr.*, 1989, **49**, 895-900.
- 111.- Goodwin W.J., Lane H.W., Bradford K., Marshall M.V., Griffin A.C., Geopfert H. y Jesse R.H.; *Cancer*, 1983, **51**, 110-115.

- 112.- Beguin Y., Bours V., Dellrouck J.M., Robaye G., Roetlande I., Bury J., Fillet G. y Weber G.; *Carcinogenesis*, 1989, **10**, 1089-2091.
- 113.- Glattre J.F.; *Inter. J. Epidem.*, 1989, **18**, 45-51.
- 114.- Salonen J.T., Alfthan G., Huttunen J.K. y Puska P.; *Am. J. Epidem.*, 1984, **120**, 342-349.
- 115.- Clark L.C.; *Federation Proc.*, 1985, **44**, 2584-2589.
- 116.- Virtamo J., Valkeila E., Alfthan G., Pusor S., Huttunen J. y Karvonen M.J.; *Cancer*, 1987, **60**, 145-148.
- 117.- Coates R.J., Weiss N.S., Dalnig J.R., Morris J.S. y Loble K.F.; *Am. J. Epidemiol.*, 1988, **128**, 515-523.
- 118.- Combs G.F. y Clark L.C.; *Nutr.Rev.*, 1985, **43**, 325-331.
- 119.- Keuck P.; *Inter. J. Epidemiol.*, 1988, **17**, 281-288.
- 120.- Meukes M.S., Comstock G.W., Vuilleumier J.P., Helsing K.J., Rider A.A y Brookmeyer R.; *N. Engl. J. Med.*, 1986, **315**, 1250-1254.
- 121.- Tarp R., Grandal N., Avervad R., Thorlig y Hansen W.; *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1989, **3**, 93-95.
- 122.- McBacon, Levender O.A., Morris V.C., Hardison N.W. y White P.M.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, **51**, 509.
- 123.- Stone J., Hinks L.J., Beasley R., Holgate S.T. y Clayton B.A.; *Clin Sci.*, 1989, **77**, 495-500.
- 124.- Michaëlsson G.; *Acta Derm. Venereol. (Stockh)*, 1989, **69**, 29-34.
- 125.- Saint-George M.D., Bonnefont D.J., Bourly B.A., Jaudon M.C.T., Cereze P., Chaunieil P., Gard C. y D'Auzac C.L.; *Kidney International*, 1989, **36**, 274-277.
- 126.- Foote S.; *Clin. Chim. Acta*, 1987, **164**, 323-328.

- 143.- Magyar B.; *Guide-Lines to Planning Atomic Spectrometric Analysis*, Elsevier, Amsterdam 1982.
- 144.- Pickett E.E. y Koirtzohann S.R.; *Anal. Chem.*, 1969, **41**, 28A.
- 145.- Barnett W.B. y Kahn H.L.; *Anal. Chem.*, 1972, **44**, 935.
- 146.- Browing D.R.; *Espectroscopía*, Toray-Masson, Barcelona 1971.
- 147.- Chang R.; *Principios Básicos de Espectroscopía*, AC, Madrid 1977.
- 148.- Banks R.C., Matjeda E.R. y Mercer G.D.; *Introductory Problems in Spectroscopy*, Addison Wesley, Amsterdam 1980.
- 149.- Vanase G.A.; *Spectrometric Techniques*, Academic Press, N. York 1977.
- 150.- Winefordner J.D. y Elser R.C.; *Anal. Chem.*, 1973, **43**, 25A.
- 151.- Murphy J.; *At. Abs. Newsl.*, 1975, **14**, 151.
- 152.- Hatch W.R. y Ott W.L.; *Anal. Chem.*, 1968, **40**, 2085.
- 153.- Barnett W.B., Vollmer J.W. y DeNuzzo S.M.; *At. Abs. Newsl.*, 1976, **15**, 33.
- 154.- Barnett W.B. y Kerber J.D.; *Amer. Lab.*, 1975, **7**, 43.
- 155.- García Santesmases J.; *Física General*, Madrid 1986.
- 156.- Manning D.C.; *At. Abs. Newsl.*, 1975, **14**, 99.
- 157.- Dresser R.D., Mooney R.A., Heithmar E.M. y Pankey F.W.; *J. Chem. Educ.*, 1975, **52**, A-403.
- 158.- Fuwa K., Thiers R.E., Vallee B.L. y Baker M.R.; *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 2039.
- 159.- Dresser R.D., Mooney R.A., Heithmar E.M. y Pankey F.W.; *J. Chem. Educ.*, 1975, **52**, A-451.
- 160.- Dresser R.D., Mooney R.A., Heithmar E.M. y Pankey F.W.; *J. Chem. Educ.*, 1975, **52**, A-503.

- 161.- Sturgeon R.E.; *Anal. Chem.*; 1977, **49**, 1255A.
- 162.- Fuller C.W.; *Electrothermal Atomization for Atomic Absorption Spectroscopy*, The Chemical Society, Londres 1978.
- 163.- Carnick G.R., Manning D.C. y Slavin W.; *Analyst*, 1983, **108**, 1297.
- 164.- Saeed K., Thomasen Y. y Langmyhr F.J.; *Anal. Chim. Acta*, 1979, **110**, 285.
- 165.- Manning D.C.; *At. Abs. Newsl.*; 1978, **18**, 107.
- 166.- Cedergren A.; *Anal. Chim. Acta*; 1977, **88**, 57.
- 167.- Welz B. y Melcher M.; *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 427.
- 168.- Weibust W.; *Anal. Chim. Acta.*; 1981, **128**, 23.
- 169.- Geahchan A y Chambron P.; *Clin. Chem.*, 1980, **26**, 1272.
- 170.- Lalonde L., Roberts K.D., Chapdelane A. y Bleau G.; *Clin. Chem.*, 1982, **28**, 1272.
- 171.- Handelman G.J., Kosted P., Short S. y Dratz E.A.; *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 2244.
- 172.- Rastegar, F., Maier, E.A., Heimbürger, R. y Christopher, C.; *Clin. Chem.*, 1984, **30**, 1300.
- 173.- Clinton O.E.; *Analyst*, 1977, **102**, 187.
- 174.- Welz B., Schlemmer G. y Voellkopf U.; *Spectrochimica Acta*, 1984, **39B**, 501.
- 175.- Welz B. y Melcher M.; *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1983, **271**, 316-321
- 176.- Welz B. y Melcher M.; *3rd International Symposium on Se in Biology and Medicine*, 1984, Beijing, China.
- 177.- Oster O. y Prellwitz W.; *Clin. Chim. Acta*, 1982, **124**, 277.
- 178.- Hansson L., Patterson J., Eriksson L. y Olin A.; *Clin. Chem.*, 1989, **35**, 537.
- 179.- Nève J. y Molle L.; *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1986, **59**, 606.
- 180.- Janghorbani M. y Ting B.T.G.; *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 701.

- 181.- Wibetoe, G. y Langmyer, F.J.; *Anal. Chim. Acta*, 1984, **165**, 87.
- 182.- Welz B.; *Atomic Absorption Spectrometry*, 1976, V.C.H., N. York.
- 183.- Welz B., Melcher M. y Schelmer G.; *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, 1984, Ed. Gruyter, Londres.
- 184.- Saeed K. y Thomassen Y.; *Atomic Spectroscopy*, 1983, **4**, 163.
- 185.- Hilderbrand D.C.; *Atomic Spectroscopy*, 1983, **4**, 164.
- 186.- Cerdegren A., Lindeberg E., Baxter D.C. y Frech W.; *Anal. Chim. Acta*, 1986, **180**, 378.
- 187.- Calmet Fontaner J.; *Técnicas de laboratorio*, 1986, **130**, 272.
- 188.- Poeter B.L., Fuavas V.A. y Sneddon J.; *Atomic Spectroscopy*, 1983, **4**, 185.
- 189.- Knowles M.; *J. Anal. Atom. Spectroscopy*, 1988, **3**, 156.
- 190.- Alfthan G., y Kumpulainen J.; *Anal. Chim. Acta*, 1982, **140**, 221.
- 191.- Nève J., Hancocq M., Molle L. y Lefebvre G; *Analyst*, 1982, **107**, 934.
- 192.- Ting B.T.G., Mooers C.S. y Janghorbani M.; *Analyst*, 1989, **114**, 667.
- 193.- Lund W. y Bye R.; *Anal. Chim. Acta*, 1979, **110**, 285.
- 194.- Blotcky A.J., Ebrahim A. y Rack E.P.; *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2734.
- 195.- Holcombe J.A. y Hassell D. C.; *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 169R.
- 196.- Solberg H.E.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1983, **21**, 749.
- 197.- PettitCherc C. y Wilding P.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1984, **22**, 203.
- 198.- Dybkaer R.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1982, **20**, 841.
- 199.- Oster O.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1986, **24**, 774.
- 200.- Chemical Society; *Society for Analytical Chemistry*, 1973, **3**, 55.
- 201.- Lombeck, K. ; *Das Ärztliche Laboratorium* ,1988, **34**, 244.

- 202.- Sokar, R.R. y Rohlf, F.J.; *Biometry*, 1980, Ed. W.H. Freeman and Co., N. York.
- 203.- Marniemit J., Niskanen j. y Alanen E.; *Trace Elements in Medicine* 1988, **5**, 139.
- 204.- Vinton N., Dahlstrom K.A. y Ament M.E.; *J. Pediatr.* 1987, **11**, 711.
- 205.- Bratakos M.S., Kanaki H.C., Vasiliau-Waite A. y Ioannau P.V.; *Sci. Tot. Environ.* 1990, **91**, 161.
- 206.- Davies T.S.; *Lancet* 1982, **2**, 935.
- 207.- Kok, W.; *Agents and Actions*, 1987, **22**, 3.
- 208.- Levander O.A.; *Federation Proc.* 1985, **44**, 2579.
- 209.- Schrauzer G.N.; *Am. J. Clin. Nutr.* 1980, **33**, 1892.
- 210.- Knekt P., Aronvace A., Maalet J., Alfthan G., Aaron R.J., Hakana M., Hakulinen T., Peto R. y Teppo L.; *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, **82**, 864.
- 211.- Alfthan G.; *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 1986, **56 suppl.**, 142.
- 212.- Alfthan, G.; *Clin. Chem.*, 1985, **31**, 279.
- 213.- Salonen J., Salonen R. y Puska P.; *Br. Med. J.* 1985, **290**, 417.
- 214.- McAlpine C., Martin H., Lyon F y Fell D.; *J. Clin. Exper. Gerontology* 1988-1989, **10**, 149.
- 215.- Salbe A.D., Albanes D., Winick M., Taylor P.R., Nixon D.W. y Levander O.A.; *Nutrition and Cancer* 1990, **13**, 81.
- 216.- Ellis L., Picciano M.F., Smith A.M., Hamosh M. y Mehta N.R.; *Pediatric Research* 1990, **27**, 32.
- 217.- Butler J.A., Whanger P.P. y Tripp M.J.; *Am. J. Clin. Nutr.* 1982, **36**, 15.

INDICE

INDICE

OBJETIVOS	1
PARTE GENERAL	6
<i>I.- Importancia nutricional del selenio</i>	7
I.1.- Introducción	7
I.2.- Implicaciones progresivas del selenio en biología	8
I.3.- Necesidades y aportes de selenio en humanos	10
I.4.- Metabolismo del selenio	16
I.5.- Toxicidad del selenio	18
I.6.- Papel esencial del selenio	20
I.7.- Funciones biológicas del selenio	21
I.8.- El selenio en las enfermedades humanas	23
I.9.- El selenio en la terapéutica y profilaxis nutricional	31
<i>II.- Espectrofotometría de absorción atómica</i>	33
II.1.- Introducción	33
II.2.- Principios básicos	34
II.3.- Espectroscopía de absorción atómica	36
II.4.- Instrumentación	38
II.5.-¿Qué elementos pueden analizarse por AA	58

PARTE EXPERIMENTAL	60
III.- Materiales y métodos	61
III.1.- Instrumentación	61
III.2.- Reactivos y estándares	62
III.3.- Limpieza del material	63
RESULTADOS Y DISCUSION	64
IV.- Método de determinación	65
IV.1.- Problemas de la determinación de selenio en suero	65
IV.2.- Absorción de fondo del suero	73
IV.3.- Optimización del programa de temperaturas	78
IV.4.- Optimización del muestreador	114
IV.5.- Pre-inyección	115
IV.6.- Empleo de plataforma	116
IV.7.- Medida analítica y lectura	118
IV.8.- Técnica de calibración	120
IV.9.- Linealidad de la técnica	126
IV.10.- Sensibilidad y límite de detección	130
IV.11.- Inexactitud e imprecisión	135
IV.12.- Comparación con otros métodos	140
V.- Valores del rango de referencia	148
V.1.- Población de referencia	148
V.2.- Distribución estadística. Test de Kolmogorov-Smirnov	149
V.3.- Partición en subclases según el sexo	155

V.4.- Intervalo de referencia	157
V.5.- Variación de la concentración de selenio con la edad	158
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFIA	166
INDICE	180
