

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA ESPECIACIÓN DE SELENIO EN MUESTRAS DE CERVEZA

MSc. Jenifer Smith¹, Dra. Marinela Colina^{1,2*}, Dr. Gilberto Colina³ y Lic. Brinolfo Montilla¹

¹Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias Departamento de Química, Maracaibo 4011, Zulia, Venezuela.

²Innovación Ambiental Quitosano CA, San Francisco No 29-25, Maracaibo, Zulia, VENEZUELA

³Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental DISA. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

*Autor para la correspondencia. E-mail: colinamarinela@gmail.com

Recibido: 6-12-2017 / Aceptado: 26-3-2018

RESUMEN

Se desarrolló un método por cromatografía iónica (CI) para la especiación de selenio en muestras líquidas de cerveza, empleando H_2O_2 y luz UV como sistema oxidante. Las especies aniónicas de selenio fueron separadas utilizando una columna aniónica AS4A y un guarda columna AG4 Dionex, la fase móvil empleada fue de 1,7 mM NaHCO_3 /1,8 mM Na_2CO_3 , para la cuantificación se empleó un detector de conductividad iónica. El tiempo de retención del ión Se(IV) fue de 7,8 min y para Se(VI) de 15,7 min. Los límites de detección obtenidos para Se(IV) y Se(VI) fueron de 0,15 y 0,28 mgL^{-1} , respectivamente. Se establecieron las condiciones óptimas de análisis del proceso de oxidación de los compuestos puros de selenio: selenito y selenio-DL-metionina, mediante el estudio de diferentes parámetros como cantidad de peróxido adicionado, tiempo de digestión y pH. La separación de los iones Se(IV) y Se(VI) en muestras de cerveza se realizó empleando una fase móvil de 2,0 mM de carbonato de sodio y 1,0 mM de hidróxido de sodio, ésta mezcla separa los iones de selenio sin tener problemas de interferencias de nitrato, fosfato y sulfato. Los límites de detección determinados para Se(IV) y Se(VI) fueron 0,08 y 0,07 mgL^{-1} , respectivamente. El método desarrollado se comparó con un método referencial ICP AES, obteniéndose excelentes resultados.

Palabras clave: Especiación, selenio, cerveza, cromatografía iónica.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE SPECIATION OF SELENIO IN BEER SAMPLES

ABSTRACT

A method was developed by ion chromatography (IC) for the speciation of selenium in liquid samples of beer, using H_2O_2 and UV light as an oxidant system. The anionic selenium species were separated using an anionic column AS4A and a guard column AG4 Dionex, the mobile phase used was 1.7 mM NaHCO_3 /1.8 mM Na_2CO_3 , for the quantification an ionic conductivity detector was used. The retention time of the Se(IV) ion was 7.8 min and for Se(VI) was 15.7 min. The detection limits obtained for Se(IV) and Se(VI) were 0.15 and 0.28 mgL^{-1} , respectively. The optimal conditions of oxidation process analysis of the selenium pure compounds: selenite and selenium-DL-methionine were established, with the study of different parameters such as amount of peroxide added, time of digestion and pH. The separation of the Se(IV) and Se(VI) ions in beer samples was carried out using a mobile phase of 2.0 mM sodium carbonate and 1.0 mM sodium hydroxide, this mixture separates the selenium ions without interference problems of nitrate, phosphate and sulfate. The detection

limits determined for Se(IV) and Se(VI) were 0.08 and 0.07 mg L⁻¹, respectively. All developed was compared with a reference method ICP AES, obtaining excellent results.

Key words: Speciation, selenium, beer, ionic chromatograph.

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA A ESPECIAÇÃO DO SELENIO EM AMOSTRAS DE CERVEJA

RESUMO

Um método foi desenvolvido por cromatografia iônica (CI) para a especiação de selênio em amostras líquidas de cerveja, usando H₂O₂ e luz UV como um sistema oxidante. espécies de selênio aniônicos foram separados utilizando uma coluna aniônica AS4A e pré-coluna Dionex AG4, a fase móvel utilizada esteve constituída de 1,7 mM de NaHCO₃/1,8 mM Na₂CO₃ enquanto um detector de condutividade iônica para quantificação foi utilizado. O tempo de retenção do íon Se(IV) foi de 7,8 min e para Se(VI) de 15,7 min. Os limites de detecção obtidos para Se(IV) e Se(VI) foram de 0,15 e 0,28 mg L⁻¹, respectivamente. Foram estabelecidas as condições ótimas de análise do processo de oxidação de compostos de selênio puros: selenito e metionina selênio-DL-, através do estudo de diversos parâmetros, como a quantidade de peróxido adicionado, e a digestão pH tempo. A separação dos íons Se(IV) e Se(VI) nas amostras de cerveja foram realizadas utilizando uma fase móvel de carbonato de sódio 2,0 mM e hidróxido de sódio 1,0 mM, esta mistura separa os íons de selênio sem problemas de interferência de nitrato, fosfato e sulfato. Os limites de detecção determinados para Se(IV) e Se(VI) foram 0,08 e 0,07 mg L⁻¹, respectivamente. O método desenvolvido foi comparado com um método de referência ICP AES, obtendo excelentes resultados.

Key words: Especiação, selênio, cerveja, cromatografia iônica.

1. INTRODUCCIÓN

El selenio es un elemento esencial para el organismo humano, debido a sus funciones atribuidas en los procesos biológicos, encontrándose en diversas formas orgánicas (Rodríguez, Sanz & Diaz, 2009). En el ambiente, este elemento se encuentra en una variedad de compuestos inorgánicos, existiendo en diferentes estados de oxidación (-2, 0, +4, +6). El selenito (Se(IV)) y el selenato (Se(VI)), dos formas oxidadas del selenio (oxianiones), presentan una elevada solubilidad en agua y sus compuestos son muy estables, sin embargo, el Se(IV) es más tóxico que el Se(VI) (Hatfield, Schweizer, Tsuji, Gladyshev, 2016).

El selenio en forma elemental es insoluble en agua y no es tóxico en condiciones normales, el selenuro de hidrógeno (H₂Se) es un gas altamente tóxico, pero se oxida rápidamente a selenio elemental en presencia del aire (Townshend, 1995).

La levadura de cerveza y el germen de trigo son ricas fuentes de selenio y son considerados “alimentos sanos”. De igual forma este elemento se traslada en las aguas de drenaje agrícola y en aguas naturales, en el régimen de concentraciones de miligramos por litros, y de allí ingresa a la cadena alimenticia (Zárate, Lundquist, Brent & Bailey, 1998). Entre los métodos analíticos para la determinación de selenio total se encuentran: la

espectrofluorimetría (Cáceres & Gardiner, 2000), la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) (Johansson, Bordin & Rodríguez, 2000; Ipolyi, Stefánka & Fodor, 2001; Frankenberger, Zhang & Moore, 1999), la espectroscopía de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) (Bou, Guardiola, Padró, Pelfort & Codony, 2004; Machat, Otruba & Kanicky, 2002), los cuales han sido frecuentemente empleados para su análisis elemental en laboratorios. La espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS) (Larsen & Sloth, 2000; Larsen, Sloth, Bügel & Moesgaard, 2003; Caruso, Ponce de León, De Nicola & Montes, 2003), es una técnica empleada para la cuantificación de selenio en muestras ambientales, ofreciendo bajos límites de detección. Sin embargo, debido al alto costo y a la poca disponibilidad de estos equipos, es necesario la determinación de éste elemento utilizando otras técnicas.

La determinación de selenio en muestras ambientales usualmente requiere la digestión de la matriz de la muestra, dado que ocurre la transformación de todas las especies de selenio a formas inorgánicas, usando un procedimiento de digestión con oxidantes tradicionales, formándose de esta forma dos oxianiones de selenio (Se(IV) y Se(VI)). Sin embargo, cuando se requiere cuantificar la cantidad total de este elemento en la muestra, el selenato puede ser producido al emplear una digestión con oxidantes fuertes, como; ozono (O_3), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), peroxodisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), como también ácido nítrico (HNO_3), la mezcla de H_2O_2/H_2SO_4 o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros. Mientras que el Se(IV) se puede obtener por reducción con el empleo de un ácido (Wang, Gao & Belzile, 2001).

La levadura de cerveza es un hongo constituido por el género *Saccharomyces Cerevisiae*, se consume seca y se utiliza como organismo responsable para la fermentación y es un valioso alimento para el ser humano. Está considerada como el cultivo más antiguo realizado por el hombre y el comienzo de la biotecnología (Mejía-Barajas, Montoya-Pérez, Cortés-Rojo & Saavedra-Molina, 2016). Presenta concentraciones de selenio alrededor de $0,13 \mu g g^{-1}$ (Lobinski, McSheehy, Pannier, Szpunar & Potin-Gautier, 2002). Además, cerca de treinta compuestos diferentes de selenio se encuentran en los extractos acuosos de levaduras.

La selenometionína es la especie química predominante en levaduras. Frecuentemente se usa como fuente de algunos suplementos nutricionales, éste compuesto muestra menos toxicidad que las especies inorgánicas de selenio, además que se encuentra en la mayoría de las plantas. Por esta razón, se han reportados métodos sensibles y selectivos para la determinación de éste compuesto en diferentes matrices (Guyon, Pradeau, Robinet & Do,

2001; Rosen, Hartman, Ho, Hiserodt & Tsai, 1998; Chatterjee, Shibata & Morita, 2000). La selenocisteína es otra forma orgánica del selenio de importancia, ya que se encuentra en las proteínas de los humanos y animales.

Existen diferentes técnicas analíticas para la separación y determinación de especies iónicas de selenio, pero la cromatografía iónica ha introducido un amplio campo de aplicación a muestras con diferentes intervalos de concentraciones (Gammelgaard & Jøns, 2000; Niss, Schabron & Brown, 1993; Tirez, Brusten, Van, De Brucker & Diles, 2000). Este hecho ha conducido hasta ahora a convenientes avances, tanto en la sensibilidad, así como en la selectividad de detección para el análisis de muestras ambientales. Además, que el empleo de una columna supresora ha sido reconocido para la determinación de aniones en aguas naturales (Cole & Evrovski, 1997). El Se(IV) y el Se(VI) son las especies inorgánicas predominantes en aguas naturales y en extractos húmedos, presentando una concentración que varía entre 0,1 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Sanz & Conde, 1997; Yan, Lu, Zhang, Wang, & Liu, 2004)). Sin embargo, recientes estudios han demostrado la existencia de selenocianato (SeCN^-) en aguas residuales industriales (Wallschläger & Bloom, 2001). Sin embargo, el agua escasa en sólidos selenoférricos en áreas semiáridas pueden contener a unos cientos o miles de microgramos disueltos de selenio por litro (Clesceri, Greenberg & Rhodes, 1989).

Cromatografía iónica

La cromatografía iónica (CI) (Sarzanini, Mentasti & Bruzzoniti, 1998) se basa en la separación y cuantificación de iones, por medio de su distribución de equilibrios entre dos fases inmiscibles; una fase estacionaria y otra móvil. La fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil. La separación de los componentes de la muestra es basada en la carga y tamaño de los iones (Skoog, Holler & Nieman, 2001). La composición de la fase móvil proporciona una gran flexibilidad para la manipulación del analito retenido, ya que se logra una deseada separación y optimización del análisis (Janos, 1997).

Colina & Gardiner (1999), estudiaron la oxidación de azufre, fósforo y nitrógeno usando microondas para la digestión con peróxido de hidrógeno (Wilson, 1994; Craig, 1999), activado con ácido fórmico y determinando los iones sulfato, fosfato y nitrato correspondientes por cromatografía iónica. La cromatografía iónica (Goyal, 1997). puede ser aplicada para muestras de un amplio rango de especies iónicas de interés ambiental y de elevadas trazas de concentraciones, debido al especial progreso que ha presentado en las técnicas de detección (Buchberger & Haddad, 1997; Woods & Rowland, 1997). Sin

embargo, el uso de HG-AAS (Camara, Perez & Moreno, 2000) y ICP-MS han sido las técnicas más empleadas para el análisis de muestras líquidas (biológicas y ambientales). En este trabajo, se desarrolló un método para la determinación y especiación de selenio en muestras de cerveza utilizando cromatografía iónica y digestión con peróxido de hidrógeno.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y reactivos

En el desarrollo del método para la especiación de selenio por cromatografía iónica se empleó peróxido de hidrógeno con luz ultravioleta y se utilizaron los siguientes reactivos: Estándar certificado de selenio (Aldrich, $980 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se en 1% de HNO_3), Selenito de sodio (Na_2SeO_3) y selenato de sodio (Na_2SeO_4) (AnalaR BDH), Seleno-DL-Metionina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2\text{NSe}$) (MP Biomedicals), Sulfato de sodio (Merck, 99% de pureza) y sulfito de sodio (J.T. Baker Analyzed, 99% de pureza), Nitrato de sodio (Merck, 99,9% de pureza) y nitrito de sodio (J.T. Baker Analyzed, 99% de pureza). Cloruro de sodio (Merck, 99,5% de pureza), Peróxido de hidrógeno al 30% v/v (Merck), Ácido clorhídrico 37% (Fisher Scientific Company), Ácido orto-fosfórico 85% (Riedel-deHaën), Hidróxido de sodio (Baker Analyzed, 99% de pureza), Ácido nítrico 65% (Riedel-deHaën), Carbonato de sodio (Merck, 99,9% de pureza) y carbonato ácido de sodio (Riedel-deHaën 99,7%), Agua destilada y desionizada, Material volumétrico de plástico y vidrio, Bombas de alta presión del tipo Parr N °4745 con envases de politetrafluoruro de etileno (PTFE).

2.2. Equipos

Cromatógrafo iónico marca Dionex; modelo LC20, equipado con una bomba cuaternaria; modelo GP40, una columna aniónica Ion Pac AS4A Dionex (4x250 mm), un guarda columna aniónica Ion Pac AG4A Dionex (4x50 mm), con un sistema de supresión Dionex ASRS-Ultra 11 (4mm) y detector de conductividad modelo CD20. Interfase marca Hewlett Packard, modelo 35900E para el análisis de los datos se utilizó el software HP Chem. En la **Tabla 1** se muestran las condiciones operacionales empleadas por el cromatógrafo iónico para la determinación de los iones Se(IV) y Se(VI). Espectrofotómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) marca Perkin Elmer; modelo óptima 2000DV.

En la **Tabla 2** se muestran los parámetros operacionales usados en ICP-AES para la determinación de selenio total. Una lámpara de vapor de mercurio a baja presión con una potencia de 400 watts, marca UVP modelo TMW-20 Transiluminador UV-VIS para la

digestión vía UV. Potenciómetro marca WPA CD500 para medición de pH. Sonicator marca Branson modelo 2210 para la homogenización de la muestra.

Tabla 1. Condiciones operacionales empleadas en Cromatografía Iónica (CI) para la determinación de los iones Se(IV) y Se(VI).

Condiciones	Datos
Fase Móvil	1,8 mM Na ₂ CO ₃ /1,7 mM NaHCO ₃
Velocidad de flujo	1 mL min ⁻¹
Sensibilidad del detector	50 µS
Volumen de muestra	50 µL
Solución regenerante	Agua desionizada

Tabla 2. Parámetros operacionales usados en espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) para la determinación de selenio.

Parámetros	Datos
λ	196,06nm – 203,985 nm
Gas	Argón
Flujo de plasma	15 mL min ⁻¹
Flujo de gas de arrastre	0,2 mL min ⁻¹
Flujo del nebulizador	0,8 mL min ⁻¹
Réplicas	2

2.3. Procedimiento experimental

2.3.1. Preparación de las soluciones de selenio

Los compuestos puros de selenio empleados para establecer las condiciones experimentales óptimas para el proceso de digestión, selenito y selenato de sodio se calentaron en una estufa durante 4 horas a 110 °C y luego fueron colocados en un desecador por 48 horas para eliminar la posible humedad existente, y posteriormente fueron pesados. Se prepararon soluciones de trabajo de 1000 mg L⁻¹ (332,978 mg) de selenio a partir de selenito de sodio y 25 mg L⁻¹ (6,2056 mg) de solución de selenio a partir de seleno-DL-metionina. La solución de selenito de sodio se preparó diariamente para evitar que el contenido de selenito presente se oxidara a selenato, mientras que la solución concentrada de seleno-DL-metionina fue guardada en envase plástico y refrigeradas a 4°C.

2.3.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

La fase móvil empleada consiste en una mezcla buffer de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio 1,8 mM y 1,7 mM respectivamente, en agua desionizada. La fase móvil fue filtrada a través de filtros de éster de celulosa por un tiempo de 15 min antes de ser utilizados para el análisis cromatográfico. Se utilizó un flujo de 1 mL min⁻¹ en todos los análisis cromatográficos, el cual proporcionó una buena selectividad y resolución en la separación

cromatográfica. Todas las soluciones de trabajo fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm de PTFE antes de la inyección en el cromatógrafo iónico.

2.3.3. Sistema de calibración

Se prepararon soluciones estándares de 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5 y 10,0 mg L⁻¹ de Se(IV) y Se(VI), respectivamente; a partir de una solución de trabajo de 1000 mg L⁻¹. Cada solución estándar se evaluó por triplicado y el tiempo de análisis empleado para el ión Se(IV) fue de 9 min y para el Se(VI) fue de 17,0 min. El sistema de calibración se realizó diariamente con soluciones estándares preparadas (0,5; 1,0 y 3,0 mg L⁻¹ de Se(VI)), para asegurar parámetros instrumentales constantes.

2.3.4. Procedimientos de digestión

Se establecieron las condiciones óptimas del análisis para la digestión de los compuestos puros de selenio empleando, como sistema oxidante, peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta; se variaron diversos parámetros como: cantidad de peróxido de hidrógeno adicionado, tiempo de digestión y pH. De cada una de las soluciones de trabajo de selenito de sodio y seleno-DL-metionina, se prepararon soluciones de trabajo de 5 mg L⁻¹ de las cuales se tomaron 5 mL de cada solución para el estudio de las condiciones experimentales del método propuesto. Se adicionaron diferentes cantidades de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la oxidación completa de los compuestos puros de selenio a selenato. El volumen se varió desde 100 µL hasta 3000 µL.

2.4. Aplicación del método

2.4.1. Validación del método para la determinación de selenio total en muestras de cerveza

Tratamiento analítico de muestras de cerveza: Las muestras de cerveza fueron obtenidas de una empresa cervecera de la localidad. Estas muestras se desgasificaron por un tiempo de 2 horas eliminando de esta forma todo el dióxido de carbono y luego fueron filtradas, para posteriormete guardarse en envases plásticos a una temperatura de 4°C para su posterior análisis (Clesceri, Greenberg & Rhodes, 1989).

2.4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de muestras de cerveza

Se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas del análisis de la muestra de cerveza, variando las concentraciones de la fase móvil (Na₂CO₃/NaHCO₃) para separar los iones Se(IV) y Se(VI) en presencia de otros iones (NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻). Al emplear el eluente 1,7/1,8 mM de NaHCO₃/Na₂CO₃ en muestras de cerveza, fueron encontrados

interferencias de nitrato, fosfato y sulfato. Para eliminar tales interferencias se varió la concentración de la mezcla de carbonato de sodio/carbonato ácido de sodio en diversas proporciones y se empleó hidróxido de sodio/carbonato de sodio. Las concentraciones de las mezclas se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Variaciones de la fase móvil para la optimización la separación cromatográfica de Se(IV) y Se(VI)

Mezclas	Concentraciones
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	1,3 mM/1,4mM
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	2,0 mM/2,0 mM
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	0,75 mM/1,8 mM
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	0,75 mM/2,7 mM
NaOH/Na ₂ CO ₃	1,0 mM/2,0 mM

De igual forma se empleó un flujo de 1 mL min⁻¹ en todos los análisis cromatográficos y se utilizó agua desionizada como solución regenerante de la columna supresora.

2.4.3. Procedimiento de digestión de muestras de cerveza para la validación del método propuesto.

Las muestras de cerveza fueron digeridas de acuerdo a las condiciones de análisis establecidas. Para ello, se tomó 0,5 mL de muestra donde se le adicionó 1 mL de H₂O₂ al 30% v/v y colocadas en la luz UV durante 30 min. Pasado este tiempo, y esperado a que las muestras estuvieran a temperatura ambiente, se llevaron a un volumen final de 5 mL para luego ser cuantificadas en el cromatógrafo iónico. Cada muestra de cerveza fue digerida por triplicado junto con un blanco y se leyeron por triplicado.

2.4.4. Determinación de selenito y selenato en muestras de cerveza sin la aplicación del sistema oxidante (H₂O₂/UV)

Para la determinación de las concentraciones de los iones selenito y selenato en muestras de cerveza, se tomaron 3 mL de muestra de cerveza y se llevó a un volumen fijo de 10 mL, para luego ser cuantificadas por el cromatógrafo iónico, donde se leyeron por triplicado.

2.4.5. Determinación de selenio total en muestras de cerveza por medio de la técnica ICP-AES

Para evaluar la eficiencia del método propuesto, se determinó el contenido de selenio total presente en las muestras de cerveza mediante ICP-AES. Para ello, se tomaron 3 mL de muestra y se le adicionó 1 mL de HNO₃ directamente dentro de los envases de PTFE de las bombas de alta presión, cada una de las muestras fueron digeridas por un tiempo de 4 horas a una temperatura de 110°C. Cada muestra se analizó por triplicado junto con su

blanco. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante pruebas estadísticas de significancia con los resultados en la determinación de selenio total empleando peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación y cuantificación

En las **Figuras 1 y 2** se muestran los cromatogramas correspondientes a los iones Se(IV) y Se(VI) a diferentes concentraciones, obtenidos a partir de soluciones de trabajo. Como se puede observar tanto el ión Se(IV) como el ión Se(VI) presentan un rango de respuesta lineal lo suficientemente amplio para una buena cuantificación, así como también una alta simetría en las señales cromatográficas, lo que refleja una buena selectividad del sistema cromatográfico (Miller & Miller, 2001).

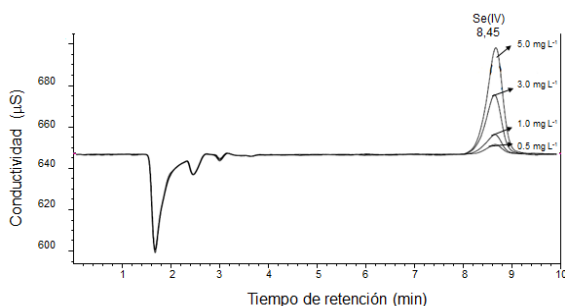


Figura 1. Cromatograma CI de ión Se(IV) a diferentes concentraciones (0.5; 1.0; 3.0 y 5.0 mg L^{-1}). Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

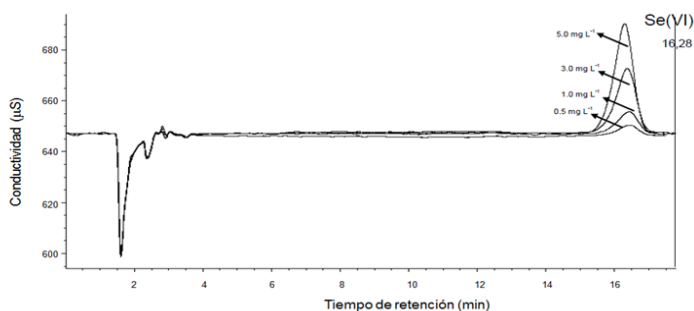


Figura 2. Cromatograma CI de ión Se(VI) a diferentes concentraciones (0.5; 1.0; 3.0 y 5.0 mg L^{-1}). Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Como se puede apreciar en las figuras el ión Se(IV) presenta un menor tiempo de retención con respecto al ión Se(VI) . Esto es debido a la afinidad que presenta la fase estacionaria con los distintos iones, ya que la fase estacionaria es capaz de aumentar la retención de los iones a medida que se incrementa la relación carga/masa de éstos; por tanto, disminuye el radio de hidratación y aumenta la polarizabilidad induciendo un dipolo y la atracción sobre la resina.

Las curvas de calibración para Se(IV) fueron: $y = 263,099x - 30,028$, $r^2 = 0,9993$, $\text{LD} = 0,15 \text{ mg L}^{-1}$ y $y = 402,735x - 34,154$, $r^2 = 0,9998$, $\text{LD} = 0,28 \text{ mg L}^{-1}$ para Se(VI) respectivamente. El análisis de estas figuras permite demostrar la proporcionalidad que existe entre las áreas de picos con respecto a las concentraciones de cada uno de estos iones, reflejándose estas

proporcionalidades en los coeficientes de correlación (r). Los límites de detección obtenidos fueron de 0,15 y 0,28 mg L^{-1} para Se(IV) y Se(VI), respectivamente, se calcularon empleando el método de regresión lineal, ($y - y_B = 2S_B$). En la **Figura 3** se aprecia claramente que no existe solapamiento cromatográfico de los iones Se(IV) y Se(VI).

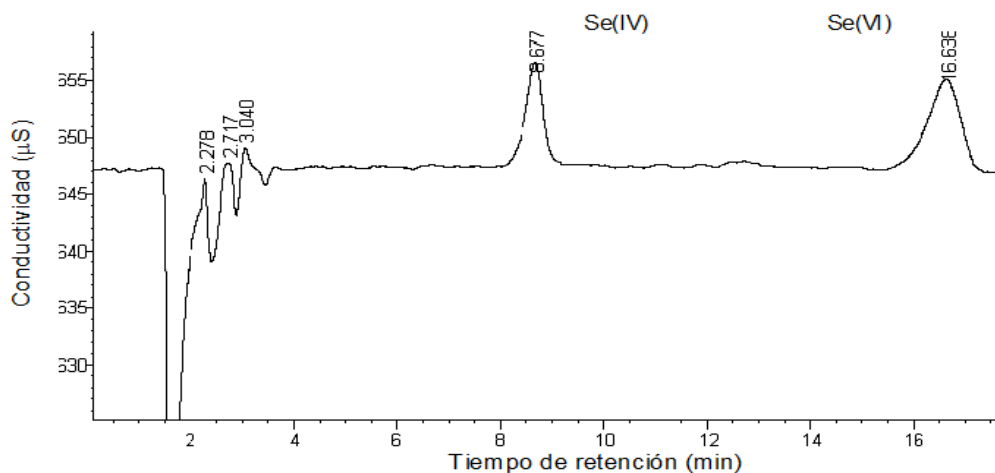


Figura 3. Cromatograma IC de iones Se(IV) y Se(VI) con concentración 1 mg L^{-1} . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

3.2. Desarrollo del método

3.2.1. Estudio de las condiciones experimentales para la digestión de compuestos de selenio

En el proceso de digestión de compuestos de selenio empleando peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta como medio oxidante, se estudiaron diferentes mecanismos para llevar a cabo la oxidación completa tanto del compuesto inorgánico (selenito de sodio) como del compuesto orgánico (selenometionina), variando el volumen de peróxido de hidrógeno adicionado, el tiempo de reacción y el pH.

3.2.1.1. Condiciones experimentales para la digestión del compuesto inorgánico

3.2.1.1.1. Variación de la cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) adicionado

Como el selenito de sodio presenta una alta reactividad al oxidarse completamente a Se(VI), aplicando como medio oxidante peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta, fue el primer compuesto de selenio estudiado. En la **Figura 4** se puede observar que existe un aumento continuo del porcentaje de recuperación de selenio ($71,03 \pm 3,18$ hasta $103 \pm 2,01$), cuya oxidación a iones Se(VI) se realizó en un tiempo de 30 minutos; esto se debe que a medida que se aumenta la concentración de oxidante (H_2O_2), aumenta la formación del radical hidroxilo ($^{\circ}\text{OH}$) (Jackson & Hewitt, 1999). y por consiguiente aumenta el poder

oxidativo. Sin embargo, cuando se adicionan volúmenes de 1000 a 3000 μL de oxidante, no se observan diferencias significativas ($103 \pm 2,01$ a $103,51 \pm 4,87$), ya que se alcanza el equilibrio o límite máximo de oxidación de los iones Se(IV) a Se(VI) .

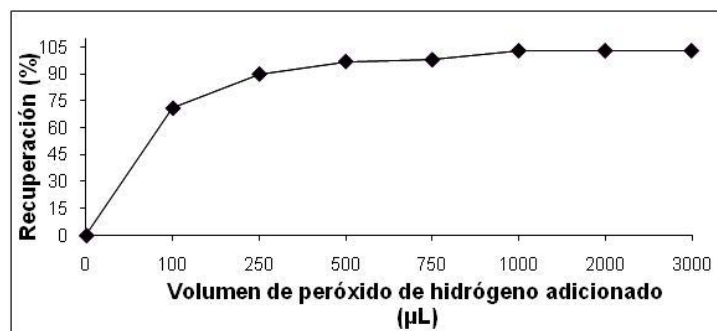


Figura 4. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de selenito de sodio, digerido con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV.

También se puede apreciar en esta figura que cuando la solución de selenito de sodio se expone a la luz UV por un tiempo de 30 min, sin agregar volumen de peróxido de hidrógeno, no se produce oxidación, indicando que la irradiación con luz UV es insuficiente para originar la oxidación de los iones Se(IV) a Se(VI) . En la **Figura 5**, se muestra el cromatograma correspondiente a estos análisis, donde los dos picos que aparecen a tiempos de 2,0 y 2,9 min probablemente pertenezcan al radical hidróxilo formado por la exposición del peróxido de hidrógeno a la radiación UV, los picos que aparecen a 6,3 y 12,5 min corresponde al ión nitrato y sulfato respectivamente; la presencia de estos dos últimos iones en el cromatograma se debe a las impurezas que se encuentran presente en el peróxido de hidrógeno, mientras que el pico asignado al ión Se(VI) aparece a un tiempo de retención de 16,4 minutos.

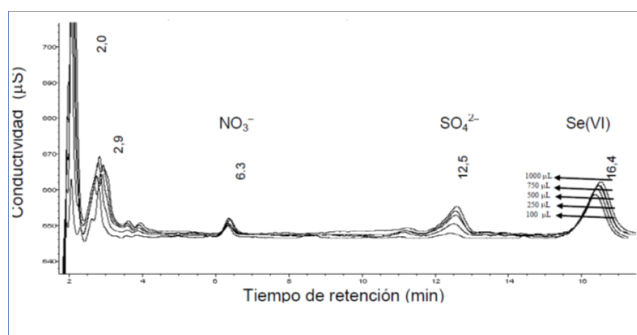


Figura 5. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de selenito de sodio digerido con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

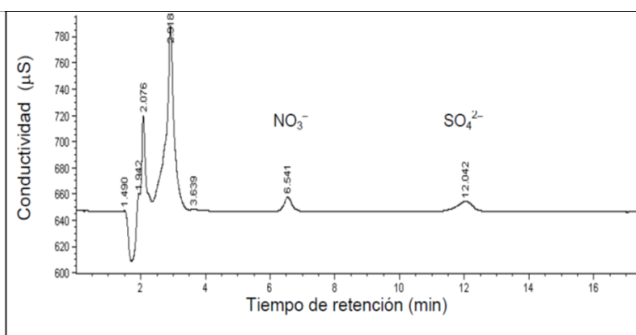


Figura 6. Cromatograma CI obtenido a partir de agua desionizada digerida con $1000 \mu\text{L}$ de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

En este cromatograma, se puede apreciar un incremento continuo del pico del ión Se(VI) cuando se varía la concentración de (0,12%; 0,3%; 0,6%; 1,2%), es decir, al aumentar la cantidad de peróxido de hidrógeno adicionado (100, 250, 500, 750 y 1000 μL). Sin embargo, al agregar volúmenes mayores de 1000 μL la altura del pico se mantiene constante. Cabe destacar en la **Figura 5** que la presencia del ión Se(VI) en este cromatograma es únicamente proveniente del selenito de sodio digerido con peróxido de hidrógeno, ya que el peróxido de hidrógeno no genera señal cromatográfica en los tiempos de retención del Se(IV) y Se(VI), es decir no causa interferencia, esto se puede observar en la **Figura 6** que muestra el cromatograma correspondiente al agua desionizada con 1000 μL de peróxido de hidrógeno (blanco), donde se observa la presencia de los iones nitrato y sulfato.

3.2.1.1.2. Variación del tiempo de exposición con UV

Cuando la solución de selenito de sodio se digiere empleando un volumen de 1000 μL de peróxido de hidrógeno, se obtienen porcentajes de recuperación de $103,00 \pm 2,01$, considerando que este volumen es el necesario para garantizar la oxidación completa de los iones Se(IV) a Se(VI). No obstante, a pesar de los óptimos resultados obtenidos en un tiempo de digestión de 30 minutos, se procedió a disminuir el tiempo de exposición con luz UV, encontrándose resultados similares. En la **Figura 7**, se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos a partir de la digestión de la solución de selenito de sodio con 1000 μL de H_2O_2 , a diferentes tiempos de exposición a luz UV.

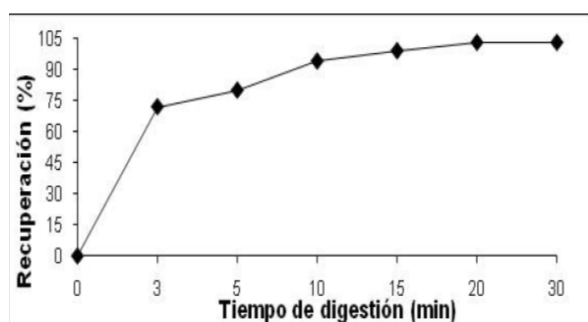


Figura 7. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de selenito de sodio digerido con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v a diferentes tiempos con luz UV.

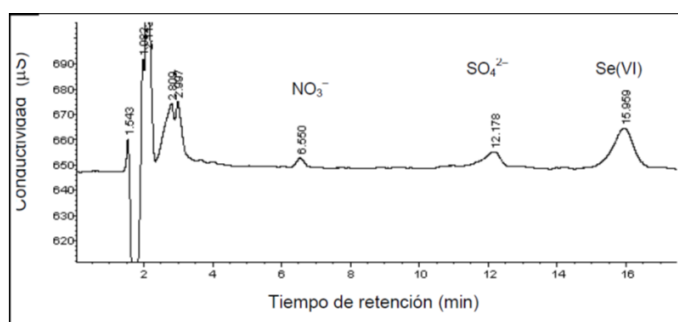


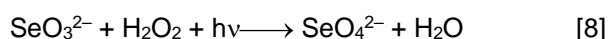
Figura 8. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de selenito de sodio digerido con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 15 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Como se puede apreciar en la **Figura 7**, a un tiempo de 15 min de exposición con radiación UV empleando 1000 μL de peróxido de hidrógeno se obtienen porcentajes de recuperación de $99,03 \pm 1,35$, representando este tiempo el óptimo para la oxidación de los iones Se(IV)

a Se(VI). A tiempos mayores de 15 min de digestión se obtuvieron recuperaciones de selenio mayores al 99%. Cabe destacar que la optimización de un método analítico consiste en el empleo de la menor cantidad de reactivo en el menor tiempo posible. La **Figura 8** muestra el cromatograma de la oxidación del selenito de sodio a iones Se(VI) empleando estos parámetros.

El ión Se(VI) aparece a un tiempo de retención de 15,9 min. Este cambio del tiempo de elución del ión Se(VI) se debe a cambios en la columna, debido a la limpieza de la misma o la elución de otro tipo de solvente. Por esta razón diariamente fue evaluado el sistema de calibración para los iones en estudio, asegurando de esta forma que los resultados obtenidos sean los más reproducibles.

Establecidas las condiciones experimentales para la digestión del selenito de sodio, el proceso químico que ocurre en dicha oxidación empleando peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta puede describirse mediante la siguiente ecuación (Liao, C. & Gurol, M., 1995):



En la **Tabla 4** se resumen las condiciones experimentales obtenidas en el estudio de optimización de la digestión de la solución de iones Se(IV).

Tabla 4. Condiciones experimentales obtenidas en el proceso de digestión de iones Se(IV) a Se(VI)

Cantidad de H ₂ O ₂ al 30% (μL)	Tiempo de exposición UV (min)	pH del medio
1000	15	ácido

3.2.1.2. Condiciones experimentales para la digestión del compuesto orgánico

El estudio del compuesto orgánico (seleno-DL-metionina) se analizó empleando las mismas condiciones experimentales obtenidas en el proceso de digestión del selenito de sodio (**Figura 9**).

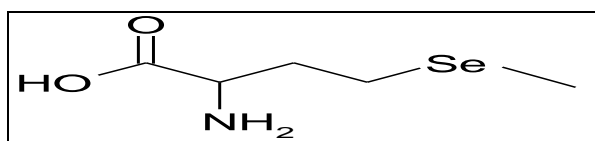


Figura 9. Estructura química del compuesto orgánico seleno-DL-metionina.

Como prueba preliminar, la solución de seleno-DL-metionina fue digerida con 1000 μL de H₂O₂ al 30% v/v y expuesta a la luz ultravioleta durante 15 min, en la cual no se obtuvo un óptimo porcentaje de recuperación, ya que sólo el $37,51 \pm 2,79$ es recuperado. La **Figura 10** muestra el cromatograma correspondiente a este análisis.

Tomando en cuenta la poca recuperación de selenio como Se(VI), a partir de seleno-DL-metionina, se realizaron variaciones en el volumen de peróxido de hidrógeno adicionado y el tiempo de exposición a la luz UV, como se muestra en la **Figura 11**. Como se puede

observar en esta figura, no se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación con la variación del tiempo de exposición a la luz UV ni con el aumento de peróxido de hidrógeno adicionado, ya que la máxima recuperación obtenida fue de $77,02 \pm 2,28$. Una de las posibles causas de que no ocurra una completa oxidación es la compleja estructura del seleno-DL-metionina, pues el selenio se encuentra muy impedido para un ataque directo del radical hidroxilo.

Con la finalidad de mejorar el proceso de digestión para éste compuesto orgánico, se realizó un cambio de pH en el medio de reacción. Para ello, se estudió el comportamiento de la seleno-DL-metionina en medio ácido y básico, empleando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, respectivamente. La **Figura 12**, muestra los resultados obtenidos.

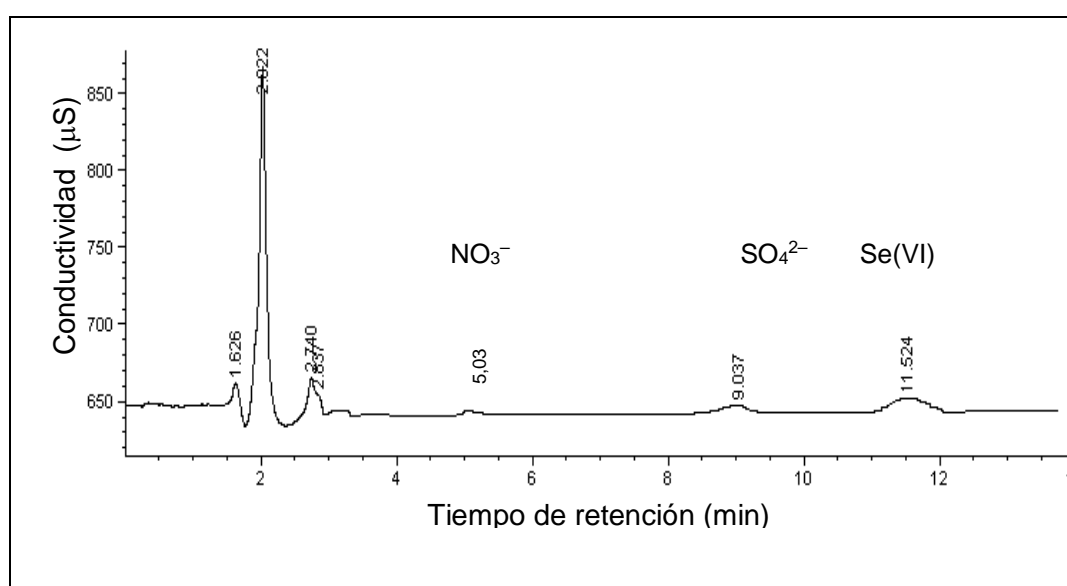


Figura 10. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerido con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 15 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

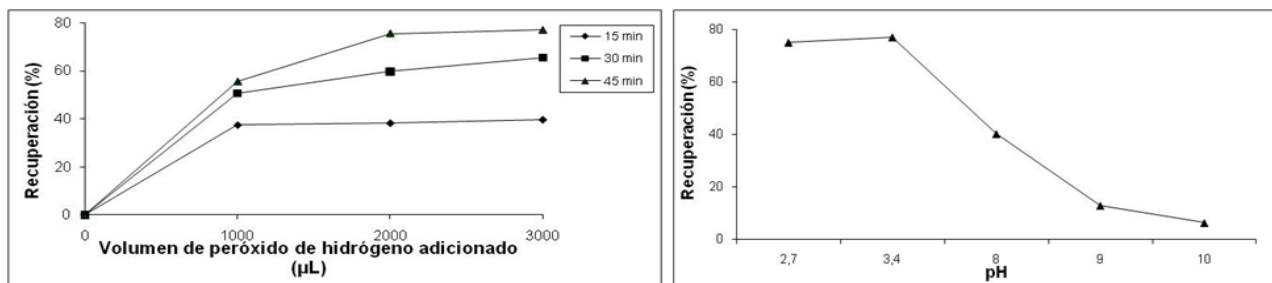


Figura 11. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v a diferentes tiempos con luz UV.

Figura 12. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v a 45 min con luz UV y a diferentes valores de pH.

La seleno-DL-metionina presenta un pH de 5,3, por lo tanto, al agregar 3000 μL de peróxido de hidrógeno, el pH del medio disminuye a 3,4 y con la adición de 50 μL de HCl 0,1 M, el pH varía a 2,7. Al agregar 100; 500 y 3500 μL de hidróxido de sodio 0,1 M a la solución de seleno-DL-metionina, el pH aumenta a 8; 9 y 10, respectivamente.

En la **Figura 12** se puede observar que a pH ácidos existen mayores porcentajes de recuperación que a pH básico, aunque los resultados obtenidos en el proceso de digestión del seleno-DL-metionina no son óptimos debido a que la máxima recuperación de selenio fue de $77,02\% \pm 2,28$. Por otra parte, se puede apreciar que a medida que aumenta el pH existe una disminución continua del porcentaje de recuperación.

Las **Figuras 13 y 14** muestran los cromatogramas correspondientes a la oxidación de seleno-DL-metionina a Se(VI) bajo condiciones ácidas y básicas. El pico que aparece a 2,703 min corresponde al ión Cl^- mientras que el ión Se(VI) aparece a un tiempo de retención de 11,207 min (**Figura 13**).

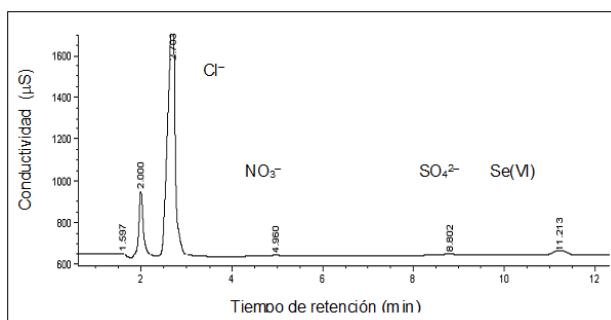


Figura 13. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v y 100 μL de ácido clorhídrico 0,1M (pH=2,7) durante 45 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

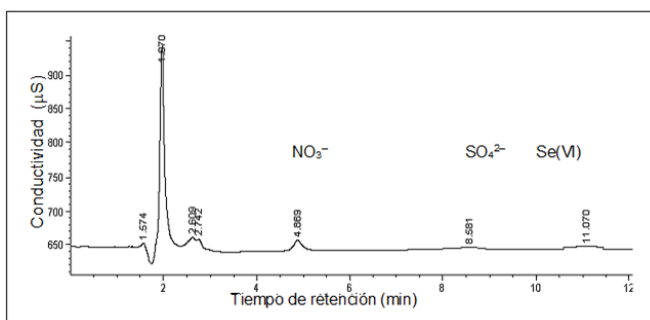


Figura 14. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerido con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v y 3,5 mL de hidróxido de sodio 0,1M (pH=10) durante 45 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

En el cromatograma de la **Figura 14**, el pico que aparece a un tiempo de retención de 11,070 min se le asigna al ión Se(VI). En la **Figura 14** se puede apreciar una pequeña área del pico para el Se(VI) cuando el medio de reacción es llevado a un pH básico.

Después de realizar pruebas preliminares a la seleno-DL-metionina variando los parámetros obtenidos en la oxidación del selenio inorgánico, no se encontró un medio de reacción con resultados lo suficientemente buenos para comenzar una optimización de las condiciones, por lo que se tuvo que realizar la variación de un cuarto parámetro, como lo era la cantidad de analito presente en la solución de trabajo. A partir de los resultados mostrados en la **Figura 15**, se encontró un buen porcentaje de recuperación del contenido

de selenio como Se(VI) a partir del seleno-DL-metionina ($98,61\% \pm 1,13$) al utilizarse una cantidad de muestra de 0,5 mL.

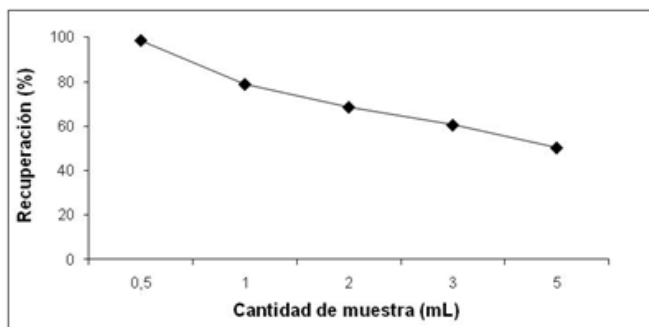


Figura 15. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de diferentes cantidades de seleno-DL-metionina digerida con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v a 45min con luz UV.

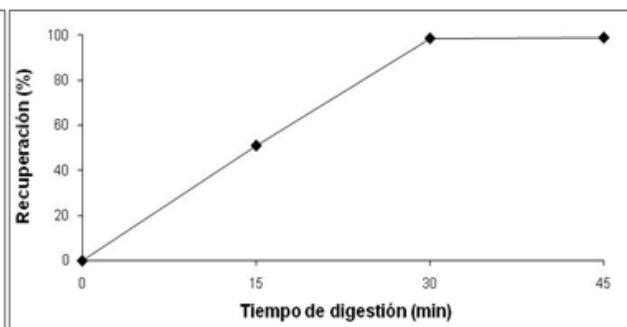


Figura 16. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v a diferentes tiempos con luz UV.

Luego de haber encontrado un medio de reacción donde la oxidación es completa, se procedió a optimizar las condiciones experimentales de oxidación del selenio orgánico a iones Se(VI).

3.2.1.2.1. Variación del tiempo de exposición con UV

Cuando la solución de seleno-DL-metioninase digiere empleando un volumen de 1000 μL de peróxido de hidrógeno a un tiempo de exposición con luz UV de 45 min, se obtienen porcentajes de recuperación de $98,61 \pm 1,13$. No obstante, debido al largo tiempo de análisis se procedió a disminuir el tiempo de exposición con luz UV, encontrándose resultados similares a un tiempo de 30 min. En la **Figura 16**, se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos a partir de la digestión de la solución de seleno-DL-metionina con 1000 μL de peróxido de hidrógeno, a diferentes tiempos de exposición a la luz UV. Como se puede apreciar en esta figura, a un tiempo de 30 min de exposición con radiación UV se obtienen buenos porcentajes de recuperación ($101,17 \pm 1,94$), representando este tiempo el óptimo para la oxidación de seleno-DL-metionina a iones Se(VI). La **Figura 17** muestra el cromatograma correspondiente a este estudio.

3.2.1.2.2. Variación de la cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) adicionado

En la **Figura 18** se puede observar que, al emplear volúmenes de 500 a 1000 μL de peróxido de hidrógeno, existe un aumento del porcentaje de recuperación de selenio ($56,16\% \pm 3,64$ a $101,17\% \pm 1,94$), cuya oxidación a iones Se(VI) se realizó en un tiempo de 30 minutos. Sin embargo, al incrementar el volumen de peróxido de hidrógeno adicionado (1000 a 3000 μL), es decir, al aumentar la concentración de 3% a 9%, se observa que el porcentaje de recuperación se mantiene constante.

En esta **Figura 18** se puede apreciar también que cuando la solución de seleno-DL-metionina se expone a la luz UV por un tiempo 30 min, sin agregar volumen de peróxido de hidrógeno, no se observa oxidación alguna a iones Se(VI).

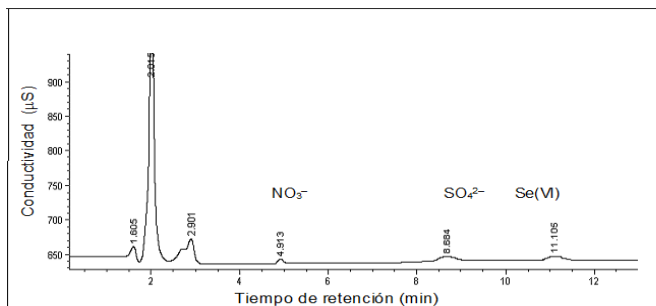


Figura 17. Cromatograma CI de iones Se (VI) obtenido a partir de 0,5 mL de seleno-DL-metionina digerida con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 / 1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

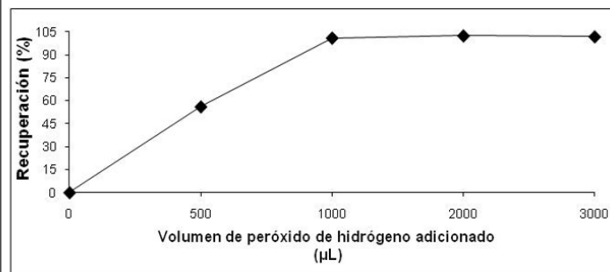


Figura 18. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de 0,5 mL de seleno-DL-metionina digerido con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV.

La **Figura 19** muestra el cromatograma obtenido a partir de la digestión del selenio orgánico, empleando 0,5 mL de muestra con 3000 μL de peróxido de hidrógeno durante 30 min de exposición a la luz UV, este cromatograma muestra que el pico que aparece a un tiempo de retención de 11,071 min es el ión selenato.

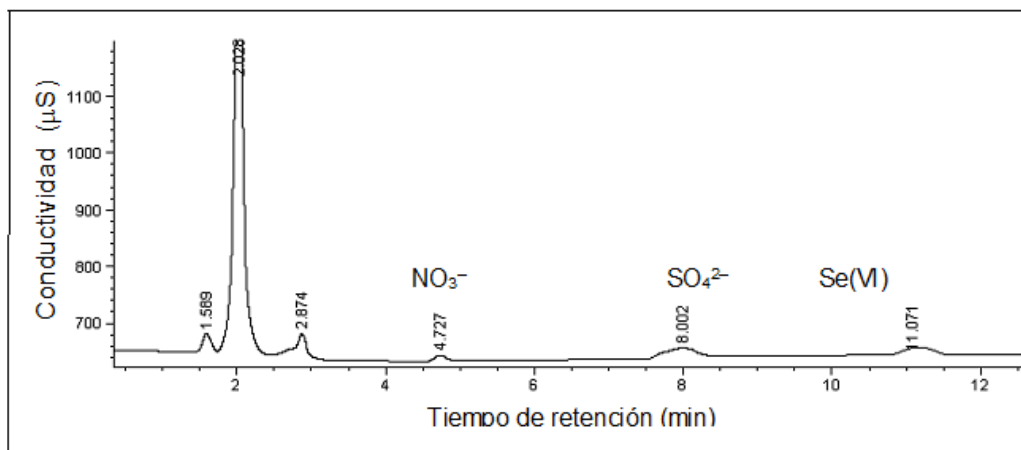


Figura 19. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de 0,5 mL de seleno-DL-metionina digerida con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 / 1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Las condiciones experimentales obtenidas en el proceso de digestión del seleno-DL-metionina a iones Se(VI) fueron las siguientes:

Cantidad de muestra (μL)	Cantidad de H_2O_2 al 30% (μL)	Tiempo de exposición UV (min)	pH del medio
500	1000	30	ácido

De esta manera, el método desarrollado para la determinación de selenio total en muestras de selenio orgánico por cromatografía iónica mediante el empleo de peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta consiste en la digestión de 0,5 mL de muestra, en el cual se adicionó 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v en un tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 30 min

3.3. Estudio de interferencia

Dado que el Se(IV) y el Se(VI) no presentan problemas de interferencias entre sí en la separación cromatográfica por CI empleando como fase móvil 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 , se garantizan los satisfactorios resultados obtenidos en la optimización del método. Sin embargo, para la aplicación del método a una muestra tan compleja como es la cerveza, se estudió la separación de los iones Se(IV) y el Se(VI) en presencia de otros iones (NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} y SO_4^{2-}).

En la **Figura 20** se muestra el cromatograma obtenido a partir de una solución de Se(IV) y Se(VI) contaminada con diversos iones (NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} y SO_4^{2-}) a concentraciones de 1,5 mg L^{-1} , empleando las condiciones cromatográficas establecidas. Estos iones tienen tiempo de retención cercanos a los iones de selenio investigados.

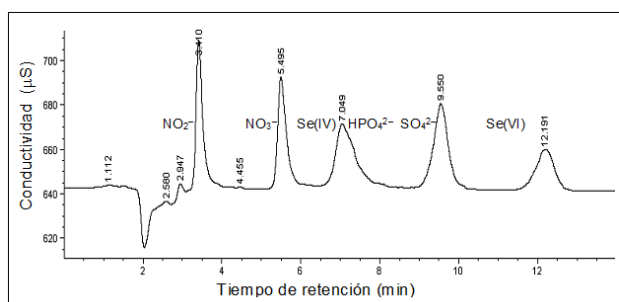


Figura 20. Cromatograma CI de mezcla de iones a concentraciones de 1,5 mg L^{-1} . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

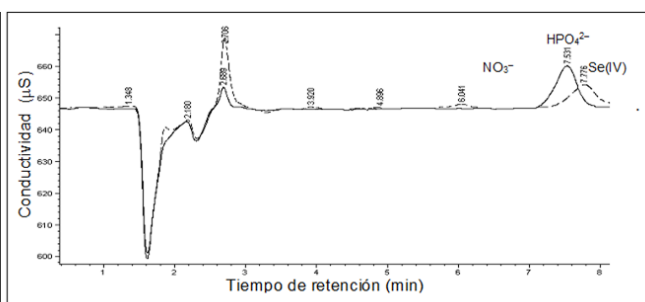


Figura 21. Cromatogramas CI obtenidos a partir de soluciones de selenito de sodio (línea continua) y ácido fosfórico (línea discontinua) 1 mg L^{-1} . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Al analizar esta figura se puede observar que el pico que aparece a un tiempo de retención de 7,49 min es asignado al ión Se(IV). No obstante, este pico aparece solapado con el ión HPO_4^{2-} (previamente estandarizado), causando de esta forma interferencia en la separación y cuantificación del ión Se(IV). Debido a este inconveniente se realizó el estudio de la mínima concentración de HPO_4^{2-} capaz de interferir en la resolución y cuantificación del ión Se(IV). En la **Figura 21** se aprecia tal análisis.

El pico que aparece a un tiempo de retención de 7,776 min se le asigna al ión Se(IV) , mientras que el pico asignado al ión HPO_4^{2-} aparece a un tiempo de retención de 7,531 min. Por medio de este análisis se obtuvo que a partir de concentraciones mayores de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ la señal cromatográfica del ión Se(IV) es afectada por el ión HPO_4^{2-} . Para garantizar la separación cromatográfica de los iones Se(IV) y Se(VI) en presencia de otros iones, se varió la concentración de la mezcla del eluente carbonato de sodio y bicarbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) en diversas proporciones.

La mejor separación cromatográfica encontrada de los iones Se(IV) y Se(VI) en presencia de otros iones, se logró empleando la mezcla de $1,0 \text{ mM NaOH}/2,0 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ (Niss *et al.* 1993). En la **Figura 22** se puede observar el cromatograma correspondiente a este estudio. La separación cromatográfica dada en este cromatograma proporciona una buena separación de los iones en estudio, debido a que se obtiene una buena resolución en los picos cromatográficos. El empleo del eluente de carbonato de sodio/hidróxido de sodio elimina la interferencia del ión Se(IV) con el PO_4^{3-} , debido a que el pH del eluente es mayor ($\text{pH}=10$) al formado por la mezcla de carbonato de sodio/carbonato ácido de sodio ($\text{pH}=9$), originando que el fosfato presente en la mezcla se encuentra en la forma PO_4^{3-} , aumentando de esta manera el tiempo de retención y efectivamente la separación con el ión Se(IV) (Niss *et al.* 1993). En la **Figura 23** se muestran los sistemas de calibración de los iones Se(IV) y Se(VI) , donde a partir de éstas se pudo cuantificar la concentración de estos iones en la muestra de cerveza.

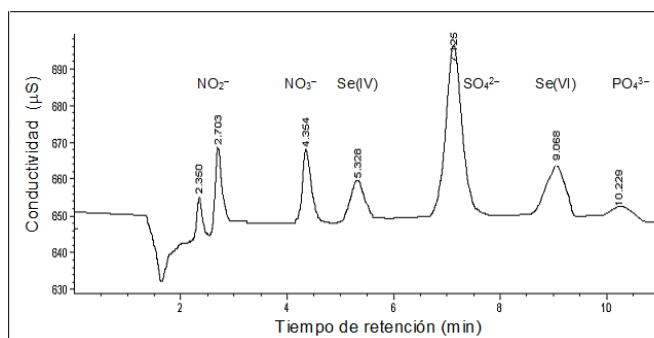


Figura 22. Cromatograma CI de mezcla de iones a concentraciones de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente: $1,0 \text{ mM NaOH}/2,0 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

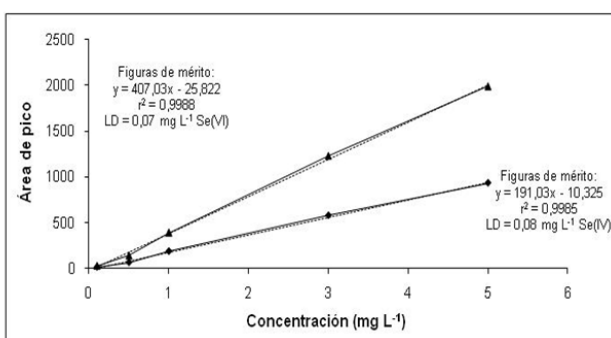


Figura 23. Curva de calibración para determinar niveles de concentración de iones Se(IV) y Se(VI) . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente $1,0 \text{ mM NaOH}/2,0 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Los límites de detección obtenidos empleando esta nueva condición cromatográfica fue de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ para Se(IV) y $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ para Se(VI) . Al comparar estos límites de detección con los obtenidos en la literatura (Niss *et al.* 1993) que fueron de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para los dos

iones, respectivamente; se puede apreciar que existen pequeñas diferencias entre los valores obtenidos y los citados en la literatura, indicando que esta nueva fase móvil permite una mejor cuantificación, además de una buena separación de los iones en estudio

3.4. Aplicación del método

3.4.1. Validación del método para la determinación de selenio total en muestras de cerveza

La metodología establecida se aplicó a tres muestras de cerveza para determinar el contenido de selenio total. Previo a éste análisis, las muestras se analizaron en el CI para cuantificar la cantidad de Se(IV) y Se(VI) presente, y de ésta manera determinar la cantidad de selenio oxidado cuando se aplica el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Cabe destacar que la muestra de cerveza presenta un pH 4,3, lo cual puede considerarse como medianamente ácido. Por lo tanto, el pH del medio de reacción varió a 3,4 al agregar 1000 μL de peróxido de hidrógeno. La **Figura 24** muestra el cromatograma de la muestra de cerveza sin aplicar el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, empleando las condiciones cromatográficas establecidas para la separación de los iones en estudio de los problemas de interferencias de nitrato, fosfato y sulfato.

Como se puede observar en esta figura que el ión Se(IV) se encuentra separado de los iones nitrato, fosfato y sulfato. En este cromatograma no se aprecia la elución del ión Se(VI) que aparece a un tiempo de retención aproximadamente de 9 min, pudiéndose explicar debido a que la concentración de este ión se encuentre por debajo de los límites de detección del CI.

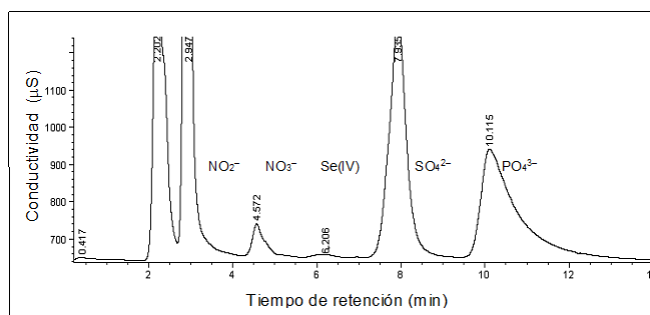


Figura 24. Cromatograma CI obtenido a partir de 3 mL de muestra de cerveza sin digestión. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,0 mM NaOH/2,0 mM Na_2CO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

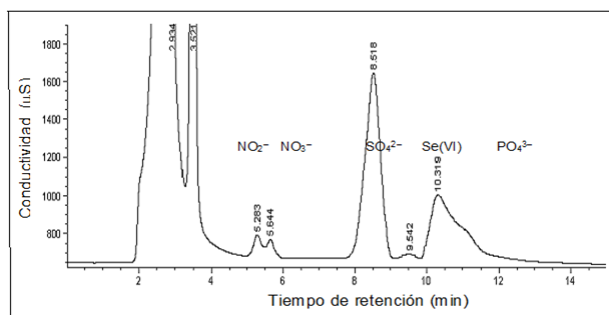


Figura 25. Cromatograma CI obtenido a partir de 0,5 mL de muestra de cerveza digerida con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,0 mM NaOH/2,0 mM Na_2CO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

En la **Figura 25** se aprecia el cromatograma correspondiente al emplear el sistema oxidante a la muestra de cerveza, para evaluar de esta forma la eficiencia del método propuesto. Al

estudiar esta figura se puede apreciar que el empleo del sistema oxidante $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ proporciona buenos resultados para la determinación de selenio, ya que las diferentes especies de selenio fueron oxidadas a iones Se(VI) como producto final; esto se puede confirmar en el cromatograma que aparece la elución del ión Se(VI) a un tiempo de retención de 9,542 min. Para evaluar la eficiencia del método propuesto, se determinó en estas mismas muestras la cantidad de selenio total mediante la técnica ICP-AES. Los resultados obtenidos por las dos metodologías fueron comparados mediante un tratamiento estadístico de pruebas de significancia, en el cual se aplicó la prueba t de comparación de las medias de dos muestras y la prueba F para la comparación de las desviaciones estándar (Miller & Miller, 2001).

En la **Tabla 5** se muestran las concentraciones obtenidas de las diferentes formas del selenio encontradas en la muestra de cerveza y las concentraciones de selenio total obtenidos por las dos técnicas (CI y ICP-AES).

Tabla 5. Resultados de la especiación de selenio en muestras de cerveza (mg L^{-1})

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}^{(a)}$ Se total	ICP-AES ^(b) Se total	$\text{Se(-II)}^{(a)}$ Selenio orgánico	$\text{Se(IV)}^{(a)}$ selenito	$\text{Se(VI)}^{(a)}$ selenato
$0,7838 \pm 0,04$	$0,7801 \pm 0,03$	$0,5795 \pm 0,02$	$0,1977 \pm 0,03$	<LD LD=0,07

(a) La cantidad de selenio total reportada está contenida en 0,005 L de solución (n=3).

(b) La cantidad de selenio total reportada está contenida en 0,01 L de solución (n=3).

Los resultados obtenidos en el estudio estadístico, tanto para la prueba t de comparación de las medias de dos muestras como para la prueba F son menores que el valor crítico establecido para dos grados de libertad y un nivel de confianza de 90% (0,10). Esto significa que la metodología desarrollada para la determinación de selenio total mediante el empleo de peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta proporciona resultados tan precisos y exactos como los obtenidos mediante la técnica ICP-AES. Las especies encontradas en las muestras de cerveza son las esperadas, debido a que la levadura es uno de los componentes de la cerveza, la cual contiene selenio orgánico y que al oxidarse predominará el Se(VI) . El selenio presente en las muestras de cerveza se encuentra en un nivel promedio de $0,7819 \text{ mg L}^{-1}$, lo cual excede el límite de concentración permisible establecido en la Norma Venezolana COVENIN sobre la Clasificación de las aguas envasadas, siendo el nivel de concentración referencial de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de selenio (Norma Venezolana, COVENIN. No. 1431, 1982). En este sentido, el selenio presente en la cerveza puede causar daños para la salud, por lo tanto, se deben tomar medidas preventivas para mejorar el control de calidad.

4. CONCLUSIONES

La oxidación completa de los iones Se(IV) a Se(VI) se llevó a cabo satisfactoriamente con 5 mL de la solución de trabajo, empleando 1000 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% v/v en un tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 15 min. Bajo éstas condiciones experimentales se obtuvo un porcentaje de recuperación de $99,03\% \pm 1,35$.

El medio óptimo de reacción para la oxidación de los iones Se(IV) a Se(VI) fue a pH ácido.

La oxidación completa del contenido de selenio presente en el compuesto orgánico seleno-DL-metionina a iones Se(VI) se llevó a cabo tomando 0,5 mL de muestra, empleando 1000 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% v/v en un tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 30 min.

El medio de reacción óptimo para la oxidación de la seleno-DL-metionina a Se(VI) se llevó a cabo en medio ácido.

El método propuesto se aplicó a muestras de cerveza con el resultado de selenio total de $0,7838 \text{ mg L}^{-1}$. El método propuesto se validó mediante la determinación de selenio total a muestras de cervezas por ICP-AES.

5. REFERENCIAS

- Bou, R., Guardiola, F., Padró, A., Pelfort, E. & Codony R. (2004). "Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 19, 1361–1369.
- Buchberger, W. & Haddad, P. (1997). "Advances in detection techniques for ion chromatography". *Journal of Chromatography A*, 789, 67-83.
- Cáceres, A. & Gardiner, P. (2000). "Automated spectrofluorimetric method for the determination of Se (VI) and Se (IV)". *Sixth Rio Simposium on Atomic Spectrometry*, Pucon-Chile, pp. 33.
- Cámara, C., Pérez-Conde, C. & Moreno, M. (2000). "Speciation of inorganic selenium in environmental matrices by flow injection análisis-hydride generation-atomic fluorescence spectrometric. Comparison of off-line, pseudo on-line extraction and reduction methods". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 681-686
- Caruso, J., Ponce de León, C., DeNicola, K. & Montes, M. (2003). "Sequential extractions of selenium soils from Stewart Lake: total selenium and speciation measurements with ICP-MS detection". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry* 18, 435 – 440.
- Chatterjee, A., Shibata, Y. & Morita, M. (2000). "determination of selenite and selenomethionine by HPLC-HG-high power N2-MIP-MS: a suitable coupling for selenium speciation." *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 913-919.
- Cole, D. & Evrovski, J. (1997). "Quantificación of sulfate and thiosulfate in clinical samples by ion chromatography". *Journal of Chromatography*, 789, 221-232.
- Clesceri, L., Greenberg, A. & Rhodes, R. (1989) "Standard Methods". American Public Health Asociation: Washington, DC., 3-131 – 3-141.
- Colina, M. & Gardiner. (1999). "Simultaneous determination of nitrogen, phosphous and sulphur by means of microwave digestion ans ion chromatography". *Journal Chromatography A*, 847, 285-290.
- Craig, J. (1999). "Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives". RCS, Clean Technology monographs. Cambridge, UK. 209-213.
- Frankenberger, W., Zhang, Y. & Moore, J. (1999) "Measurement of selenite in sediment extracts by using hydride generation atomic absorption spectrometry". *Science of the Total Environment*, 229, 183-193.

- Gammelgaard, B. & Jøns, O. (2000). "Determination of selenite and selenate in human urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 945 – 949
- Goyal, S. (1997). "Applications of column liquid chromatography to inorganic analysis in agricultural research". *Journal of Chromatography*, 789, 519-527.
- Guyon, F., Pradeau, D., Robinet, S. & Do, B. (2001). "Application of central composite designs for optimization of the chromatographic separation of monomethylarsonate and dimethylarsinate and of selenomethionine and selenite by ion-pair chromatography coupled with plasma mass spectrometric detection". *Analyst*, 126, 594-601.
- Hatfield, D., Schweizer, U., Tsuji, P. & Gladyshev, V. (2016). *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. New York, EEUU, Springer Nature.
- Ipolyi, I., Stefánka, Zs. & Fodor, P. (2001). "Speciation of Se (IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography-direct hydride generation-atomic fluorescence spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 435, 367-375.
- Jackson, A. & Hewitt, C. (1999). "Atmosphere Hydrogen and Organic Hydroperoxides: A Review". 188.
- Janos, P. (1997). "Retention models in ion chromatography: the role of side equilibria in ion-exchange chromatography of inorganic cations and anions". *Journal of Chromatography A*, 789, 3-19.
- Johansson, M., Bordin, G. & Rodriguez A. (2000). "Feasibility study of ion-chromatography microwave assisted on-line species conversion hydride generation atomic absorption spectrometry for selenium speciation analysis of biological material". *Analyst*, 125, 273-279.
- Larsen, E. & Sloth, J. (2000). "The application of inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry for measurement of selenium isotopes, isotope ratios and chromatographic detection of selenoamino acids". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 669 – 672.
- Larsen, E., Sloth, J., Bügel, S. & Moesgaard, S. (2003). "Determination of total selenium and ⁷⁷Se in isotopically enriched human samples by ICP-dynamic reaction cell – MS". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 18, 317 – 322.
- Liao, C. & Gurol, M. (1995). "Chemical oxidation by photolytic decomposition of hydrogen peroxide". *Environmental Science and Technology*, 29, 12, 3007-3014.
- Lobinski, R., McSheehy, S., Pannier, F., Szpunar, J. & Potin-Gautier, M. (2002). "Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection". *Analyst*, 127, 223-229.
- Machat, J., Otruba, V. & Kanicky, V. (2002). "Spectral and non-spectral interferences in the determination of selenium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 19, 1096–1102.
- Mejía-Barajas, J., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojó, C. & Saavedra-Molina, A. (2016). *Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante*. *Información Tecnológica*, 27(4), 3-16.
- Miller, J. & Miller, J. (2001) "Estadística para Química Analítica". 2da edición. Editorial Addison – Wesley Iberoamericana. 40-49; 87-103.
- Niss, N., Schabron, J. & Brown, T. (1993). "Determination of selenium species in coal fly ash extracts". *Environmental Science & Technology*, 27, 827-829.
- Norma Venezolana, COVENIN. No. 1431, 1982.
- Rosen, R., Hartman, T., Ho, C., Hiserodt, R. & Tsai, J. (1998). "Determination of volatile organic selenium compounds from the maillard reaction in a selenomethionine-glucose model system". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2541-2545.
- Rodríguez, M., Sanz M. & Díaz (2009). Niveles de selenio en aguas potables de Canarias. *Journal of Food*, 4:2, 109-114,
- Sanz, M. & Conde, J. (1997). "Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters". *Chemical Reviews*, 6, 1979-2004.
- Sarzanini, C., Mentasti, E. & Bruzzoniti, M. (1998). "Simultaneous determination of inorganic anions and metal ions by suppressed ion chromatography". *Analytical Chimica Acta*, 382, 291-299.
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T. (2001). "Principios de Análisis Instrumental". España.; 812-817.
- Tirez, K., Brusten, W., Van, S., De Brucker, N. & Diles, L. (2000). "Characterization of inorganic selenium by ion chromatography with ICP-MS detection in microbial-treated industrial waste water". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 1087-1092.
- Townshend, A. (1995). "Encyclopedia of Analytical Science". Academic Press: San Diego.; 4569-4589.
- Wallschlager, D. & Bloom, N. (2001). "Determination of selenite, selenate and selenocyanate in waters by ion chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (IC-HG-AFS)". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 16, 1322-1328.
- Wang, Z., Gao, Y. & Belzile, N. (2001). "Microwave Digestion of Environmental and Natural Waters for Selenium Speciation". *Analytical Chemistry*, 73, 4711-4716.

- Wilson, S. (1994). "Peroxygen Technology in the Chemical Industry". *Chemistry & Industry*, 255-258.
- Woods, C. & Rowland, A. (1997). "Applications of anion chromatography in terrestrial environmental research". *Journal of Chromatography*, 789, 287-299.
- Yan, X., Lu, C., Zhang, Z., Wang, Z. & Liu, L. (2004). "Flow injection on-line sorption preconcentration coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry using a polytetrafluoroethylene fiber-packed microcolumn for determination of Se(IV) in natural water". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry* 19, 1963-1971.
- Zárate, M., Lundquist, T., Brent, A., Bailey, F. & Oswald, W. (1998). "Remoción de Selenio en Aguas de Drenaje Agrícola Mediante un Sistema Integrado de Lagunas de Diseño Avanzado, SILDA". XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. U.S.A. (<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/peru/boltar002.pdf>).