



UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE CONCEPCIÓN – REY BALDUINO DE BÉLGICA

***Propuesta metodológica para la determinación
de selenio total en biomasa microbiana
productora de nanopartículas de selenio
mediante HG-MP-AES.***

Trabajo de Titulación para optar al Título de
Ingeniería de Ejecución en Química,
Mención Control.

Alumna: Tamara Vera L.

Profesor: Juan Pablo Inostroza



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE
MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☒ Memoria o trabajo de título; ☐ Tesis de Postgrado;

Título del trabajo: Propuesta metodológica para la determinación de selenio total en biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio mediante HG-MP-AES.

Nombre del candidato(a): Tamara Vera

Carrera / Grado: Ingeniería de ejecución en química mención control

Campus: Concepcion ; Departamento: Química y medio ambiente.

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Juan Pablo Inostroza Saldías, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL

☒ El trabajo **NO contiene información que amerite confidencialidad** y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por:

☐ 6 meses; ☐ 12 meses; ☐ 2 años; ☐ 3 años; ☐ 5 años; ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha:

; Firma:

Estudiante o Candidato(a):

Fecha:

; Firma:

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Dedicatoria.

A mis padres, Sylvia Rubilar y Mario Vera, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida. Gracias por su amor incondicional y el apoyo en cada etapa de mi vida.

A mi madre, Karina Vera, a quien le agradezco por a pesar de todo siempre estar presente, por sus palabras de aliento y recordarme, incluso en mis momentos más difíciles, de que soy capaz de lograr todo lo que me proponga. Gracias por creer en mí cuando yo dudé, por sostenerme emocionalmente y por impulsarme siempre a seguir adelante sin rendirme.

A mi madrina, Elizabeth Robles, quien siempre me brindó su amor y apoyo incondicional y sé que lo sigue haciendo desde el cielo.

Siempre han sido un ejemplo de esfuerzo y fuente de motivación.

Agradezco a mi profesor guía y jefe de carrera, Juan Pablo Inostroza, por su orientación, disposición y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de distintas formas estuvieron presente brindando apoyo y palabras de motivación durante este proceso.

Este logro no es solo académico, sino también profundamente personal, y es el resultado de mi esfuerzo y dedicación, sumándole el cariño, apoyo y confianza de quienes han estado a mi lado en cada paso de este camino.

Resumen.

El selenio es un elemento químico presente en bajas concentraciones en el ambiente, pero de gran relevancia desde el punto de vista biológico, ambiental e industrial. Su comportamiento, movilidad y toxicidad dependen directamente de su especiación química, siendo las formas oxidadas más solubles y potencialmente tóxicas, mientras que el selenio elemental presenta mayor estabilidad y menor biodisponibilidad. En este contexto, diversos microorganismos poseen la capacidad de reducir biológicamente especies oxidadas de selenio hasta selenio elemental, formando nanopartículas como parte de mecanismos metabólicos de detoxificación, lo que representa además una alternativa de síntesis verde con interés creciente por sus aplicaciones potenciales.

Este trabajo propone, de manera teórica y basada en una revisión bibliográfica, un método para la determinación de selenio total en biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio mediante generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica (HG-AES). La propuesta metodológica considera la preparación y acondicionamiento de la biomasa, la digestión oxidante de la matriz biológica para asegurar la completa solubilización del analito, y la posterior conversión del selenio a una especie adecuada para la formación de hidruros. Asimismo, se definen los parámetros instrumentales y las estrategias de calibración necesarias para garantizar una adecuada sensibilidad, selectividad y confiabilidad de los resultados analíticos.

Adicionalmente, se plantea un plan de validación metodológica conforme a los lineamientos de la norma ISO/IEC 17025, incorporando la evaluación de parámetros de desempeño analítico y procedimientos de control de calidad. Finalmente, se incluye una estimación de los costos asociados al método, evidenciando que su viabilidad económica mejora significativamente cuando el análisis se realiza en modalidad de lotes de muestras. En conjunto, el proyecto entrega una base teórica sólida que puede servir como referencia para la futura implementación y validación experimental del método en laboratorios analíticos.

Índice.

Introducción:..... 1

Objetivos: 2

- **Objetivo General:** 2
- **Objetivos específicos:** 2

Alcance: 2

Carta Gantt del proyecto:..... 3

Capítulo 1: Fundamentos del selenio y su reducción biológica a nanopartículas...... 4

- 1.1. **Especies de selenio y su comportamiento en sistemas biológicos.**..... 5
- 1.2. **Reducción microbiana del selenio y formación de nanopartículas.**..... 5
 - 1.2.1 **¿Cómo realizan las bacterias la reducción del selenio?** 6
 - 1.2.2. **Formación de nanopartículas de selenio** 7
 - 1.2.3. **Condiciones que influyen en la formación de SeNPs.** 7
- 1.3. **Importancia científica y tecnológica**..... 9
- 1.4. **Importancia de cuantificar el selenio total en biomasa microbiana.** 10

Capítulo 2: Preparación y tratamiento de biomasa microbiana. 11

- 2.1. **Proceso de obtención de la biomasa microbiana.**..... 12
- 2.2. **Condiciones de cultivo y producción de nanopartículas de selenio.** 13
- 2.3. **Métodos de recolección, lavado, secado y acondicionamiento de la biomasa.** 15
 - 2.3.1. **Recolección de la biomasa.** 15
 - 2.3.2. **Lavado de la biomasa.** 15
 - 2.3.3. **Secado de la biomasa.** 16
 - 2.3.4. **Homogeneización y acondicionamiento de la muestra seca.** 17
- 2.4. **Método de digestión oxidante y liberación del selenio total.** 17
 - 2.4.1. **Principios generales de la digestión oxidante.** 17
 - 2.4.2. **Otras estrategias de tratamiento y consideraciones especiales.** 19
- 2.5. **Control de calidad previo al análisis.** 19
 - 2.5.1. **Trazabilidad de la muestra.**..... 19
 - 2.5.2. **Limpieza y control de contaminación.** 20
 - 2.5.3. **Control de blancos y pruebas de recuperación.** 20
- 2.6. **Consideraciones de seguridad y manejo en la etapa previa al análisis.**..... 21
 - 2.6.1. **Seguridad en el manejo de cultivos microbianos.**..... 21
 - 2.6.2. **Manejo seguro de compuestos de selenio.** 21
 - 2.6.3. **Seguridad en el uso de ácidos y digestión oxidante.** 22

2.6.4. Gestión de residuos.	22
<i>Capítulo 3: Parámetros instrumentales y estrategias de calibración en HG-MP-AES</i>	
.....	223
3.1. Descripción del instrumento MP-AES con generador de hidruros.	24
3.1.1. Estructura general del MP-AES con generador de hidruros.....	24
3.1.2. Principio de la generación de hidruros para selenio.....	24
3.1.3. Ventajas del acoplamiento HG-MP-AES.	25
3.2. Parámetros instrumentales críticos del MP-AES.	25
3.2.1. Potencia de microondas.	26
3.2.2. Flujos de gas.	26
3.2.3. Selección de la longitud de onda para selenio.....	26
3.2.4. Sistema de introducción de muestra.	27
3.2.5. Tiempo de lectura, réplicas y modo de medición.....	27
3.3. Parámetros críticos del generador de hidruros.	28
3.3.1. Medio ácido.	28
3.3.2. Reactivo reductor.	28
3.3.3. Caudales de muestra y reactivos.	28
3.3.4. Separador gas-líquido.....	29
3.4. Preparación de estándares y curva de calibración.....	29
3.4.1. Solución madre de selenio.....	29
3.4.2. Preparación de estándares de trabajo.....	29
3.4.3. Blanco y verificación del cero.	30
3.4.4. Construcción de la curva de calibración.	31
3.4.5. Calibración externa, adiciones estándar y ajuste a matriz.	31
3.5. Condiciones para asegurar sensibilidad y repetibilidad.	32
3.5.1. Optimización de la señal.	32
3.5.2. Repetibilidad y control de la deriva instrumental.	33
3.5.3. Mantenimiento preventivo y cuidado del sistema de introducción de muestra... 33	
3.6. Manejo de interferencias y ajuste del método a matrices orgánicas.	34
3.6.1. Interferencias espectrales.	34
3.6.2. Interferencias de matriz: efectos físicos y químicos.....	35
3.6.3. Pruebas de recuperación y robustez del método.	36
3.6.4. Ajuste final del método a la biomasa microbiana.....	36
<i>Capítulo 4: Plan de validación del método según ISO/IEC 17025.</i>	<i>37</i>
4.1. Conceptos clave de la validación de métodos en ISO/IEC 17025.	38
4.2. Plan de validación para el método MP-AES de selenio total.....	39
4.3. Ensayos necesarios y su ejecución.	40
4.3.1. Selectividad y blancos de método.....	40
4.3.2. Linealidad y rango.....	40

4.3.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)..... 41

4.3.4. Precisión: repetibilidad y precisión intermedia..... 42

4.3.5. Veracidad y recuperación..... 43

4.3.6. Robustez..... 43

4.4. Evaluación integrada de los parámetros de desempeño..... 44

4.5. Procedimiento para estimar la incertidumbre de medida. 44

4.5.1. Identificación de las fuentes de incertidumbre..... 45

4.5.2. Cuantificar componentes de incertidumbre. 45

4.5.3. Combinar las contribuciones..... 45

4.5.4. Obtener la incertidumbre expandida. 46

4.6. Alcances y limitaciones del método propuesto..... 46

4.6.1. Alcances. 46

4.6.2. Limitaciones. 47

4.7. Estimación de costos asociados al método. 48

4.7.1. Equipamiento adicional. 48

4.7.2. Costos de reactivos por muestra..... 48

4.7.3. Costo de materiales y consumibles por muestra. 49

4.7.4. Costo de mantención de equipos por muestra. 49

4.8. KPI financiero del método analítico. 49

Conclusión..... 51

Bibliografía..... 52

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 4-1. “Costos de equipamiento adicional”..... 48

Tabla 4-2. “Costos de reactivos por muestra” 48

Tabla 4-3. “Costos de materiales y consumibles por muestra” 49

Tabla 4-4. “Costos de mantenimiento de equipos por muestra” 49

Sigla y simbología.

Sigla.

CPL : Peso chileno.

GSH : Glutación reducido.

GH-MP-AES : Generación de hidruros acoplada a la espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas.

IEC : International Electrotechnical Commission (Comisión Electrotécnica Internacional).

ISO : International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización).

MP-AES : Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas.

RSD : Desviación estándar relativa.

SeNPs : Nanopartículas de selenio.

Simbología.

Kg : Kilogramo.

Mg : Miligramos.

mM : Mili molar.

L : Litro.

Se⁰ : Selenio elemental.

SeO₃²⁻ : Selenito.

SeO₄²⁻ : Selenato.

Introducción:

El selenio es un elemento químico que, aunque se encuentra en bajas concentraciones en el ambiente, cumple un rol importante en ámbitos biológicos, ambientales e industriales. En los seres vivos forma parte de selenoproteínas con funciones antioxidantes esenciales. Sin embargo, su impacto depende de la forma química en que se encuentre, ya que especies oxidadas como el selenito y el selenato son solubles y potencialmente tóxicas, mientras que el selenio elemental es más estable y presenta una biodisponibilidad mucho menor. Por esta razón, existe un gran interés en los procesos que permiten transformar las formas tóxicas de selenio en especies más seguras.

Algunos microorganismos son capaces de reducir biológicamente selenito o selenato hasta selenio elemental, formando nanopartículas de selenio como mecanismo de detoxificación. Este proceso no solo disminuye la toxicidad del elemento, sino que además representa una alternativa de síntesis verde con aplicaciones potenciales en áreas como la biomedicina, la agricultura y la remediación ambiental.

Para estudiar estos procesos es necesario contar con métodos analíticos que permitan determinar el selenio total presente en biomasa microbiana, sin importar su forma química original. Esto requiere un tratamiento previo adecuado de la muestra, que incluya una digestión oxidante completa, junto con una técnica instrumental sensible y selectiva.

En este contexto, la generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica (HG-AES) se presenta como una técnica especialmente adecuada para la determinación de selenio a nivel traza, ya que permite separar el analito de la matriz, reducir interferencias y mejorar la confiabilidad de los resultados. Este proyecto propone, de manera teórica y basada en revisión bibliográfica, un método para la determinación de selenio total en biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio mediante HG-AES, incorporando el tratamiento de la muestra y un plan de validación conforme a la norma ISO/IEC 17025, como base para una futura implementación experimental.

Objetivos:

- **Objetivo General:** Proponer método para la determinación de selenio total en biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio mediante generación de hidruros acoplado a espectrometría de emisión atómica con plasma inducida por microondas (MP-AES) para futura validación bajo ISO/IEC 17025.

- **Objetivos específicos:**
 1. Describir el proceso de preparación y tratamiento de biomasa microbiana para la obtención de nanopartículas de selenio, considerando las condiciones necesarias para la posterior determinación analítica.
 2. Definir parámetros instrumentales y las estrategias de calibración para HG-MP-AES.
 3. Proponer un plan integral de validación metodológica bajo ISO/IEC 17025.

Alcance:

El presente trabajo propone, de manera teórica, un método analítico para determinar el selenio total en biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio, utilizando espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MP-AES). Esta investigación se desarrollará durante cuatro meses en el segundo semestre de 2025 y se basará exclusivamente en revisión bibliográfica, sin realizar trabajo experimental en laboratorio.

El estudio abarca tres ejes principales: la preparación y tratamiento de la biomasa, la definición de parámetros instrumentales y estrategias de calibración para MP-AES, y la propuesta de un plan de validación alineado a la ISO/IEC 17025. De esta manera, este proyecto busca entregar una base teórica sólida que facilite la futura implementación y

validación del método en laboratorios chilenos acreditados, contribuyendo al desarrollo de protocolos estandarizados para la determinación confiable de selenio en biomasa microbiana.

Carta Gantt del proyecto:

A continuación, se muestra la planificación del trabajo de título a través de una carta Gantt durante el semestre 2-2025.

			Tiempo de trabajo															
			Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
Nº	Actividad	Sem	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Revisión bibliográfica																	
2	Inicio de trabajo de título																	
3	Plantear objetivos																	
4	desarrollar alcance y carta gantt																	
5	Presentación nº 1 trabajo de título																	
6	Preparación y tratamiendo de biomasa																	
7	Definir parametros instrumentales																	
8	Propuesta metodologica																	
9	Plan de validación																	
10	Presentación nº2 trabajo de título																	
11	Redacción final de trabajo de titulo																	
12	Presentación final de trabajo de título																	

Capítulo 1:
***Fundamentos del selenio y su
reducción biológica a
nanopartículas.***

El selenio es un elemento químico que, aunque se encuentra en muy bajas concentraciones en la naturaleza, cumple funciones esenciales tanto en organismos vivos como en diversos procesos ambientales y tecnológicos. Este aparece en varias formas químicas, también conocidas como especies o especiación, que determinan su comportamiento, su toxicidad y su disponibilidad en los organismos.

A nivel biológico, el selenio es un micronutriente fundamental, que forma parte de enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa, que ayudan a proteger a las células del daño oxidativo. Sin embargo, su ventana de seguridad es estrecha, ya que, en cantidades ligeramente superiores a las necesarias pueden resultar tóxicas para los microorganismos, animales e incluso seres humanos. Esta dualidad entre su utilidad y su riesgo provoca que comprender su comportamiento sea esencial para cualquier aplicación que involucre este elemento químico.

1.1. Especies de selenio y su comportamiento en sistemas biológicos.

El selenio puede transformarse fácilmente entre sus diferentes especies dependiendo del pH, de la presencia de agentes reductores u oxidantes, y de la actividad microbiológica del medio, esta capacidad de transformación influye directamente en su movilidad y en la forma en que puede ser aprovechado por los microorganismos.

Especies de selenio:

- Selenato (Se^{6+}): es la forma más oxidada y soluble en ambientes oxigenados.
- Selenito (Se^{4+}): este presenta mayor reactividad y puede ingresar más rápido a las células microbianas, pero también es más tóxico.
- Selenio elemental (Se^0): es insoluble, de baja toxicidad y tiende a precipitar formando partículas de distintos tamaños.

1.2. Reducción microbiana del selenio y formación de nanopartículas.

La reducción biológica del selenito y del selenato es un proceso natural mediante el cual algunos microorganismos convierten estas especies solubles y potencialmente tóxicas en selenio elemental (Se^0), el cual es mucho más estable y menos tóxico. Este proceso ocurre de diferentes formas siendo el más utilizado la reducción intracelular, la cual ocurre como

parte del metabolismo celular, donde los microorganismos utilizan el selenio como receptor de electrones o como mecanismo para disminuir su toxicidad interna.

Durante esta reducción, la célula microbiana genera pequeñas partículas de selenio elemental las cuales, dependiendo de las condiciones de cultivo, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y otros factores, pueden organizarse en nanopartículas de selenio (SeNPs), las cuales pueden formarse dentro de la célula (intracelulares) o en el medio circundante (extracelulares) y presentan propiedades muy atractivas como:

- Mayor estabilidad química.
- Alta biocompatibilidad.
- Actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Potencial aplicación en biotecnología, agricultura, medicina y biorremediación.

1.2.1 ¿Cómo realizan las bacterias la reducción del selenio?

Las bacterias poseen sistemas enzimáticos capaces de utilizar compuestos oxidados del selenio como receptores de electrones y esto ocurre especialmente en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. A continuación, se describe el proceso de reducción del selenio.

a) Entrada del selenito o selenato a la célula.

El primer paso para que una bacteria pueda reducir selenio es que el ion selenato o selenito entre en la célula, y esto ocurre aprovechando ciertos sistemas de transporte ya existentes para otros compuestos. Este paso es clave debido a que determina cuánto selenio disponible llega al interior de la bacteria y en qué forma. Una mayor entrada de selenato o selenito aumenta el desafío de detoxificación para la célula, pero al mismo tiempo ofrece más “materia prima” para la formación de nanopartículas de Se^0 .

b) Reducción de selenato a selenito.

Una vez dentro de la célula, el selenato generalmente no se convierte directamente en selenio elemental, sino que, primero es reducido a selenito. Este proceso suele realizarse mediante enzimas llamadas selenato reductasas, que son proteínas especializadas en

transferir electrones hacia el ion selenato. El resultado de esta etapa es la acumulación de selenito (SeO_3^{2-}) dentro o alrededor de la célula, el cual será posteriormente reducido a selenio elemental.

c) Reducción del selenito a selenio elemental (Se^0): etapa clave en la formación de nanopartículas

La transformación de selenito a selenio elemental es la fase fundamental en la formación de nanopartículas. El selenito es más reactivo y, en concentraciones altas, puede generar estrés oxidativo y dañar proteínas, lípidos y ADN, es por esto que muchas bacterias han desarrollado estrategias para reducirlo rápidamente a Se^0 , que es menos tóxico y soluble.

1.2.2. Formación de nanopartículas de selenio

Una vez que el selenio elemental (Se^0) empieza a formarse, no queda disperso de forma totalmente homogénea, sino que este tiende a agruparse en pequeñas estructuras. El proceso de formación de nanopartículas puede dividirse en dos etapas conceptuales: nucleación y crecimiento.

a) Nucleación: aparición de los primeros “núcleos” de Se^0

La nucleación ocurre cuando un grupo inicial de átomos de Se^0 se agrupa y alcanza un tamaño crítico que le confiere estabilidad.

Al finalizar la etapa de nucleación, ocurre inmediatamente el proceso de estabilización y este se extiende durante toda la fase de crecimiento de la nanopartícula. Es una etapa clave que se sitúa entre la reducción del selenito y la maduración final del Se^0 , asegurando que las nanopartículas mantengan su forma, tamaño y estabilidad química.

b) Crecimiento: incorporación progresiva de más Se^0

Después de la nucleación, más átomos de Se^0 resultantes de la reducción del selenito se van incorporando a los núcleos ya existentes, de esta forma, los cúmulos aumentan de tamaño y dan lugar a nanopartículas bien definidas.

1.2.3. Condiciones que influyen en la formación de SeNPs.

La formación de nanopartículas de selenio (SeNPs) por bacterias depende de un conjunto de condiciones ambientales, fisiológicas y químicas que modifica tanto la velocidad de reducción del selenio como las características finales de las nanopartículas

Las principales condiciones que controlan la formación de SeNPs en sistemas microbianos son:

a) Concentración inicial de selenito o selenato

La concentración del sustrato (SeO_3^{2-} o SeO_4^{2-}) es uno de los factores más determinantes, debido a que concentraciones bajas suelen generar nanopartículas más pequeñas y uniformes, ya que la tasa de nucleación es más baja y controlada. Por otra parte, concentraciones moderadas a altas incrementan la presión de detoxificación, provocando una nucleación rápida y un mayor número de partículas, mientras tanto que concentraciones muy altas pueden ser tóxicas para la bacteria, inhibiendo su metabolismo y reduciendo la eficiencia de reducción, o incluso generando nanopartículas muy agregadas.

La concentración ideal depende de la especie bacteriana, pero generalmente se trabaja en rangos entre 0.5 y 5 mM en estudios biotecnológicos.

b) Fase de crecimiento bacteriano:

El estado fisiológico de la bacteria influye fuertemente en las siguientes fases:

- En la fase exponencial, la actividad metabólica es alta, lo que favorece una mayor velocidad de reducción y una producción sostenida de Se^0 .
- En la fase estacionaria, las bacterias pueden seguir reduciendo selenito, pero las nanopartículas suelen ser más irregulares o extracelulares.
- En la fase de muerte, la actividad reductora disminuye drásticamente.

Generalmente, la fase exponencial es la más eficiente para la formación controlada de SeNPs.

c) pH del medio:

El pH modifica tanto la solubilidad del selenio como la actividad enzimática:

- pH neutro a ligeramente alcalino favorece la actividad de muchas reductasas involucradas en la reducción del selenito.
- pH ácido puede generar estrés celular y ralentizar la reducción.
- Cambios de pH también pueden modificar la carga superficial del Se^0 , influyendo en la estabilización y en el tamaño de las nanopartículas.

d) Temperatura de incubación:

La temperatura es un factor clave para el metabolismo y la cinética de reducción:

- La mayoría de las bacterias mesófilas generan SeNPs de manera óptima entre 25 y 37 °C.
- Temperaturas más bajas desaceleran la reducción.
- Temperaturas altas pueden desnaturalizar enzimas involucradas en el proceso.

Además, la temperatura puede influir en el crecimiento y forma de las nanopartículas.

e) Tiempo de incubación:

El tiempo de incubación influye en:

- Tiempos cortos → Produce la formación de núcleos pequeños.
- Tiempos intermedios → Favorecen el crecimiento controlado.
- Tiempos prolongados → Pueden causar por posible agregación o liberación al medio.

Por lo tanto, la cinética de reducción condiciona la evolución morfológica de las SeNPs.

1.3. Importancia científica y tecnológica

La reducción microbiana del selenio es valiosa porque las siguientes razones:

a) Permite bioremediar ambientes contaminados: Las bacterias eliminan el selenio tóxico transformándolo en formas insolubles más fáciles de retirar.

b) Produce nanopartículas de calidad y bajo impacto ambiental: Es una forma de síntesis verde: no requiere solventes orgánicos, temperaturas extremas ni reactivos peligrosos.

c) Genera nanopartículas con aplicaciones prometedoras.

1.4.Importancia de cuantificar el selenio total en biomasa microbiana.

Para evaluar la eficiencia de la reducción biológica y la producción de nanopartículas, es indispensable medir cuánta cantidad de selenio queda retenida en la biomasa microbiana, independientemente de la especie química inicial. Sin esta cuantificación, es imposible determinar:

- La eficiencia del proceso de reducción.
- El porcentaje del selenio convertido a nanopartículas.
- La relación entre selenio intracelular y extracelular.
- El rendimiento del proceso para aplicaciones industriales o de laboratorio.

Además, la cuantificación del selenio total es fundamental para comparar resultados entre distintas investigaciones, ya que las condiciones experimentales pueden variar ampliamente, ya sea, el tipo de microorganismo, la concentración de selenio, la temperatura, el medio de cultivo, el tiempo de incubación, entre otras.

Los antecedentes revisados en este capítulo permiten comprender la complejidad de la biomasa microbiana como matriz analítica y fundamentan la necesidad de un tratamiento de muestra adecuado y de una metodología instrumental robusta para la determinación de selenio total, lo cual se desarrolla en los capítulos siguientes.

Capítulo 2:
Preparación y tratamiento de
biomasa microbiana.

La preparación adecuada de la biomasa microbiana es un paso fundamental en todo proceso que involucre la obtención y el análisis de nanopartículas de selenio generadas de manera biológica, ya que cada etapa, desde el cultivo hasta la digestión oxidante, influye directamente en la eficiencia de reducción del selenio, en la calidad de las nanopartículas formadas y en la confiabilidad de los resultados analíticos posteriores. Debido a esto, es necesario establecer procedimientos claros, coherentes y reproducibles que permitan no solo generar biomasa suficiente, sino también asegurar que esta sea representativa, estable y apta para la extracción y cuantificación del selenio total. Las etapas descritas a continuación corresponden a un diseño metodológico teórico, basado en literatura y manuales técnicos.

2.1. Proceso de obtención de la biomasa microbiana.

La biomasa microbiana que se utilizará como matriz para la determinación de selenio total corresponde a cultivos de bacterias capaces de transformar especies solubles de selenio en formas menos solubles, entre ellas nanopartículas de selenio elemental. Estas bacterias se desarrollan en medios de cultivo apropiados y, tras un periodo de incubación, generan una mezcla compuesta por células, componentes extracelulares, nutrientes remanentes y, en ciertos casos, nanopartículas asociadas a la superficie celular o al medio.

En resumen, el proceso de obtención de biomasa está formado por varias etapas:

1. **Preparación del inóculo:** selección de un cultivo inicial en buen estado fisiológico.
2. **Cultivo en presencia de una fuente de selenio:** incorporación de un oxoanión de selenio u otro compuesto soluble, que las bacterias utilizan o transforman.
3. **Crecimiento y reducción microbiana del selenio:** fase en la que las células metabolizan el selenio y generan nanopartículas.
4. **Recolección de la biomasa:** separación de las células y partículas asociadas del medio líquido.
5. **Lavado y acondicionamiento:** remoción de restos de medio y sales, y preparación de la biomasa para su secado y posterior digestión.

Cada una de estas etapas influye de manera directa en la cantidad de selenio que quedará asociada a la biomasa y en la homogeneidad de la muestra que, finalmente, se someterá al análisis.

2.2. Condiciones de cultivo y producción de nanopartículas de selenio.

a) Selección del medio de cultivo.

Para que las bacterias puedan crecer y al mismo tiempo, reducir el selenio presente en el medio, se requiere un medio de cultivo que aporte fuentes de carbono, nitrógeno, minerales y, en algunos casos, vitaminas o factores de crecimiento.

El medio de cultivo cumple un doble rol:

- Provee los nutrientes necesarios para el metabolismo celular.
- Actúa como fase donde se disuelve la fuente de selenio que las bacterias transformarán.

Para esta propuesta teórica se propone el uso de un medio líquido estándar, con buena capacidad de soporte de crecimiento y que permita una adecuada solubilidad del compuesto de selenio, evitando precipitados iniciales que dificulten la cuantificación posterior.

b). Adición de la fuente de selenio.

La fuente de selenio se agrega al medio en forma soluble, habitualmente como especie oxidada. La concentración debe ser cuidadosamente elegida, ya que una concentración demasiado baja podría generar muy poca formación de nanopartículas, mientras que concentraciones excesivas pueden resultar tóxicas e inhibir el crecimiento microbiano.

La forma en que se agrega el selenio también es relevante. Puede incorporarse desde el inicio del cultivo o bien en una etapa posterior, una vez que la biomasa ha alcanzado una densidad determinada. La adición tardía puede reducir efectos tóxicos iniciales y favorecer que las células se encuentren en una fase metabólicamente activa, lo que podría mejorar la eficiencia de la reducción.

c). Condiciones de incubación: temperatura, pH y agitación.

Las bacterias que participan en la reducción de selenio suelen desarrollarse en condiciones mesófilas, es decir, a temperaturas moderadas, cercanas a la temperatura ambiente o

ligeramente mayores. Una temperatura estable, dentro del rango óptimo de crecimiento, favorece tanto la multiplicación celular como la actividad enzimática responsable de la transformación del selenio.

El pH del medio debe mantenerse en un intervalo cómodo para el microorganismo, ya que cambios bruscos de pH pueden afectar la solubilidad de los compuestos de selenio y la carga superficial de las nanopartículas, además de modificar el estado fisiológico de las células.

La agitación del cultivo cumple dos funciones principales:

- Favorecer la transferencia de oxígeno en cultivos aerobios.
- Mantener las células y las partículas en suspensión, evitando sedimentos que generen gradientes de concentración de selenio.

En general, para el cultivo se debe considerar una combinación de temperatura, pH y agitación que represente un entorno estable y reproducible, favoreciendo la viabilidad bacteriana y la formación de nanopartículas de selenio asociadas a la biomasa.

d). Tiempo de cultivo y etapas de crecimiento.

El tiempo de cultivo es un factor determinante en la cantidad y características de las nanopartículas de selenio producidas. En una primera fase (crecimiento exponencial), el microorganismo prioriza la división celular, mientras que, en fases posteriores, como la fase estacionaria, muchas bacterias redirigen su metabolismo hacia mecanismos de defensa y detoxificación, entre los que puede encontrarse la reducción de compuestos tóxicos y la formación de partículas menos solubles.

Para esta propuesta se deberá contemplar un periodo de incubación que permita:

- Alcanzar una densidad celular suficiente para asegurar un contenido representativo de selenio por unidad de biomasa.
- Otorgar el tiempo necesario para que las rutas metabólicas responsables de la reducción de selenio se expresen de forma observable.

De manera general, se considera que el cultivo se debe monitorear en varios puntos de tiempo y seleccionar un intervalo en el que se logre un equilibrio entre una buena biomasa y una generación significativa de nanopartículas.

2.3. Métodos de recolección, lavado, secado y acondicionamiento de la biomasa.

Una vez finalizado el cultivo, se obtiene una suspensión donde coexisten células viables, material celular muerto, restos de nutrientes, productos metabólicos, nanopartículas de selenio y, eventualmente, formas de selenio aún disueltas. Para transformar esta mezcla compleja en una muestra sólida, homogénea y apta para digestión oxidante, es necesario aplicar una serie de pasos cuidadosamente estructurados.

2.3.1. Recolección de la biomasa.

La recolección de la biomasa suele realizarse mediante centrifugación o filtración:

- **Centrifugación:** el cultivo se transfiere a tubos y se somete a fuerzas centrífugas suficientes para sedimentar las células y las nanopartículas asociadas. El sobrenadante se descarta o se guarda para estudios complementarios como, por ejemplo, para evaluar cuánto selenio permanece en el medio.
- **Filtración:** se hace pasar el cultivo a través de filtros con porosidad adecuada para retener bacterias y partículas asociadas, mientras el líquido atraviesa la membrana.

Para esta propuesta, la centrifugación se considera como la mejor opción, por su amplia disponibilidad en laboratorios y su capacidad para manejar volúmenes moderados de cultivo. La velocidad, tiempo de centrifugación y número de ciclos pueden ajustarse de acuerdo con la densidad de la biomasa.

2.3.2. Lavado de la biomasa.

El lavado de la biomasa es un paso crítico para eliminar restos de medio de cultivo, sales libres y formas de selenio que no se encuentran asociadas a la población microbiana o a las nanopartículas de interés. Esto es importante porque el objetivo del método es cuantificar el selenio total contenido en la biomasa, y no el selenio que permanece libre en el sobrenadante.

El lavado se debe realizar de la siguiente manera:

1. Resuspender el pellet de biomasa en una solución de lavado, típicamente agua destilada o una solución salina suave.
2. Mezclar o agitar suavemente para dispersar el pellet.

3. Centrifugar nuevamente para sedimentar la biomasa.
4. Descartar cuidadosamente el sobrenadante.
5. Repetir el procedimiento las veces necesarias hasta obtener una matriz visualmente libre de residuos del medio original.

Es importante destacar que el lavado excesivo puede provocar pérdidas de material, tanto de células como de nanopartículas, por lo que se debe encontrar un equilibrio entre limpiar la muestra y mantener la masa total de biomasa representativa. Para una futura implementación práctica, este equilibrio se deberá evaluar mediante ensayos de recuperación y balance de masa.

2.3.3. Secado de la biomasa.

Una vez lavada la biomasa se deberá secar para facilitar su manejo, almacenamiento y, especialmente, para permitir una pesada precisa al momento de aplicar la digestión oxidante. El contenido de humedad puede variar significativamente entre muestras, por lo que trabajar con biomasa seca permite expresar los resultados de manera más comparable como, por ejemplo, como μg de selenio por gramo de biomasa seca.

Existen varias técnicas de secado aptas:

- **Secado en estufa a temperatura moderada:** En esta técnica la biomasa se extiende en recipientes adecuados y se mantiene a una temperatura que elimine el agua sin degradar significativamente los componentes orgánicos.
- **Liofilización:** es una técnica de secado por congelación y sublimación del agua, que permite conservar la estructura del material, aunque requiere equipamiento especializado.
- **Secado al vacío:** es una técnica que consiste en la eliminación del agua mediante la reducción de la presión, lo que permite evaporar el agua a temperatura más bajas, evitando la degradación térmica de la biomasa y preservando mejor sus componentes sensibles.

Para esta propuesta, se propone como opción óptima el secado en estufa, tanto por su simplicidad como por su mayor viabilidad en un laboratorio. La temperatura debe ser lo suficientemente alta para eliminar el agua en un tiempo razonable, pero sin generar pérdidas significativas de selenio por volatilización de especies intermedias. El secado se prolonga hasta alcanzar peso constante, lo que indica que el contenido de humedad ha llegado a un nivel estable.

2.3.4. Homogeneización y acondicionamiento de la muestra seca.

Una vez seca la biomasa microbiana se presenta como un sólido frágil o en forma de pasta reseca. Para asegurar que las alícuotas que se tomen para la digestión sean representativas, es necesario homogeneizar el material y es puede hacerse mediante:

- Pulverización suave con mortero y pistilo.
- Trituración controlada en un molino de laboratorio adecuado para pequeñas cantidades de muestra biológica.

El objetivo es obtener un polvo relativamente fino y homogéneo, donde las nanopartículas de selenio y el material celular estén lo mejor distribuidos posible. Para luego almacenarlo en frascos limpios y etiquetados, protegidos de la humedad y del polvo ambiental.

Se debe tener un procedimiento claro de etiquetado que contenga el código de muestra, fecha de obtención y condiciones de cultivo, y se registran los pesos obtenidos en cada etapa. Este registro es esencial para reconstruir el historial de la muestra y, eventualmente, relacionar los resultados analíticos con las condiciones de producción de la biomasa.

2.4. Método de digestión oxidante y liberación del selenio total.

Una vez acondicionada la biomasa seca y homogénea, el siguiente paso es transformar el selenio presente en la matriz orgánica en una forma soluble adecuada para su determinación por MP-AES. Esto implica romper la estructura celular, oxidar la materia orgánica y llevar el selenio a una especie estable y cuantificable en solución.

2.4.1. Principios generales de la digestión oxidante.

La digestión oxidante es un proceso en el cual la muestra sólida se pone en contacto con agentes químicos capaces de degradar la materia orgánica y liberar los elementos de interés. Para el caso del selenio, se busca que el proceso:

- Sea lo suficientemente enérgico como para romper la matriz microbiana.
- Mantenga al selenio en solución, evitando pérdidas por volatilización.
- Genere una solución clara o con mínima turbidez, apta para ser introducida en el sistema de atomización del MP-AES.

La combinación de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno es una de las más utilizadas en la digestión de matrices biológicas, ya que el ácido nítrico aporta un medio fuertemente oxidante y el peróxido de hidrógeno potencia esta acción, favoreciendo la destrucción de restos orgánicos resistentes. En muchos protocolos modernos, este proceso se lleva a cabo en sistemas cerrados asistidos por microondas, lo que mejora la eficiencia de la digestión y reduce el riesgo de pérdidas de analito por volatilización.

El procedimiento teórico para biomasa microbiana consistiría en:

1. Pesar una alícuota de biomasa seca en un vaso de digestión apto para microondas.
2. Agregar una mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno en proporciones definidas.
3. Sellar el vaso y colocarlo en el equipo de digestión.
4. Programar un ciclo de calentamiento controlado, con incrementos de temperatura por etapas, hasta alcanzar un valor objetivo que permita la completa oxidación de la muestra.
5. Mantener esa temperatura durante un tiempo determinado y, luego, enfriar antes de abrir los recipientes.
6. Transferir cuantitativamente el contenido a un matraz aforado y completar con el volumen de dilución deseado.

Posterior a la etapa de digestión oxidante se debe realizar una pre-reducción lo cual es fundamental para asegurar una correcta determinación de selenio mediante generación de hidruros. Durante la digestión, el selenio suele oxidarse a su forma más estable, Se(VI), la cual no genera hidruros de manera eficiente. Por este motivo, es necesario convertirlo a selenio en estado de oxidación +4 que es la especie químicamente activa para este método.

Para llevar a cabo la pre-reducción, la solución digerida se trata con ácido clorhídrico concentrado y se somete a un calentamiento controlado durante un tiempo definido. Este tratamiento permite reducir el Se(VI) a Se(IV) y, al mismo tiempo, eliminar restos de agentes oxidantes que podrían interferir en la posterior reacción de generación de hidruros. Finalizado el calentamiento, la muestra se deja enfriar y se ajusta a las condiciones de acidez requeridas para el análisis instrumental.

La correcta aplicación de esta etapa es esencial para garantizar una formación eficiente y reproducible del hidruro de selenio, mejorando la sensibilidad y la precisión del método. Un control adecuado del tiempo, la temperatura y la concentración de ácido permite obtener resultados confiables y comparables entre muestras.

2.4.2. Otras estrategias de tratamiento y consideraciones especiales.

En algunos enfoques se han utilizado etapas complementarias, como una preoxidación suave o la combinación de distintos agentes oxidantes, con el fin de asegurar la completa liberación del selenio. También puede considerarse, la inclusión de un paso de reducción controlada posterior a la digestión si se requiriese ajustar el estado de oxidación del selenio para una mejor respuesta instrumental, aunque en MP-AES esta necesidad es menos frecuente que en otras técnicas.

Cualquiera sea el protocolo seleccionado, deben definirse claramente:

- La masa de biomasa digerida.
- El volumen y concentración de los reactivos.
- El tiempo y temperatura de digestión.
- El volumen final de la solución, que determinará la concentración de selenio en la muestra lista para ser analizada.

Estos parámetros son fundamentales ya que impactan directamente en la sensibilidad y la exactitud del método propuesto.

2.5. Control de calidad previo al análisis.

Antes de introducir las soluciones digeridas en el MP-AES, es esencial considerar una serie de parámetros de control de calidad que surgen en la etapa de preparación de la biomasa y digestión oxidante. Un método analítico no se sustenta solo en la medición instrumental, sino también en la forma en que se maneja la muestra desde el inicio.

2.5.1. Trazabilidad de la muestra.

La trazabilidad implica poder reconstruir, en todo momento, el recorrido de una muestra desde su origen hasta el resultado analítico final. En el contexto de la biomasa microbiana, esto significa:

- Contar con un sistema de codificación clara para cada cultivo y cada lote de biomasa.

- Registrar las condiciones de cultivo (fechas, tiempos, composición del medio, concentración de selenio agregado).
- Anotar los datos de cada etapa (recolección, lavado, secado y homogeneización) por ejemplo, pesos iniciales y finales, condiciones de secado, número de lavados.

Esta información no solo permite identificar posibles fuentes de variabilidad, sino que también sirve de respaldo para comparar resultados entre distintos ensayos o en diferentes momentos.

2.5.2. Limpieza y control de contaminación.

La contaminación es una de las principales amenazas para la calidad de los resultados analíticos, especialmente cuando se trabaja con elementos traza, debido a esto se debe prestar atención a:

- La limpieza de los recipientes, tubos, matraces y materiales de vidrio.
- La pureza de los reactivos utilizados, en particular los ácidos y el agua.
- La manipulación de las muestras, evitando el contacto con superficies metálicas o materiales que pudiesen aportar selenio u otros elementos interferentes.

2.5.3. Control de blancos y pruebas de recuperación.

Parte del control de calidad se planifica desde la preparación de la muestra. Dos herramientas fundamentales son:

- **Blancos de reactivos:** digestiones realizadas sin muestra, utilizando los mismos reactivos y condiciones, para evaluar posibles aportes de selenio o interferencias desde los ácidos, el agua o el material de laboratorio.
- **Pruebas de recuperación:** digestiones de biomasa a la que se le ha añadido una cantidad conocida de selenio (fortificación), con el fin de verificar qué porcentaje de esa cantidad se logra recuperar tras todo el proceso de digestión y análisis.

Estas pruebas, permitirán anticipar cómo se evaluaría, en la práctica, la eficiencia de la preparación de la muestra y qué ajustes serían necesarios para mejorar la exactitud del método.

2.6. Consideraciones de seguridad y manejo en la etapa previa al análisis.

El trabajo con biomasa microbiana y compuestos de selenio requiere medidas de seguridad que protejan tanto a las personas como al entorno de laboratorio. Desde la preparación de los cultivos hasta la digestión oxidante, cada etapa implica riesgos específicos que deben abordarse de forma preventiva.

2.6.1. Seguridad en el manejo de cultivos microbianos.

Aunque los microorganismos empleados suelen pertenecer a grupos de bajo riesgo biológico, se deben respetar normas generales de bioseguridad:

- Uso de elementos de protección personal, como guantes, delantal de laboratorio y, cuando sea necesario, protección ocular.
- Manipulación de cultivos líquidos en cabinas o zonas designadas para reducir el riesgo de salpicaduras y aerosoles.
- Desinfección de superficies con soluciones adecuadas antes y después de trabajar.
- Eliminación de residuos biológicos mediante autoclave u otros métodos establecidos por la normativa institucional.

Estas medidas no solo protegen la salud de las personas, sino que también evitan la contaminación cruzada entre las muestras.

2.6.2. Manejo seguro de compuestos de selenio.

Los compuestos de selenio, especialmente en formas solubles y oxidantes, pueden resultar tóxicos en determinadas concentraciones, debido a esto el manejo de soluciones de selenio en el laboratorio exige:

- Evitar el contacto directo con la piel y mucosas.
- Minimizar la inhalación de vapores o aerosoles, especialmente durante la preparación de soluciones concentradas.
- Mantener recipientes bien rotulados, indicando claramente la naturaleza del contenido y su peligrosidad.

- Almacenar las soluciones de selenio en sitios apropiados, lejos de fuentes de calor y de sustancias incompatibles.

En la etapa de digestión oxidante, el riesgo se incrementa por el uso de ácidos concentrados y agentes fuertemente oxidantes, por lo que las medidas de seguridad deben reforzarse.

2.6.3. Seguridad en el uso de ácidos y digestión oxidante.

Durante la digestión oxidante se emplean típicamente ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, los cuales requieren un manejo cuidadoso como:

- Agregar siempre el ácido al agua (y no al revés) cuando se preparan diluciones.
- Manipular los reactivos bajo campana extractora para evitar la exposición a vapores irritantes.
- Utilizar recipientes resistentes a la presión y a la corrosión cuando se trabajen digestiones asistidas por microondas.
- Dejar enfriar completamente los vasos de digestión antes de abrirlos, para prevenir salpicaduras y liberación brusca de vapores.

El personal que eventualmente ejecute estas tareas debe recibir capacitación específica, conocer las hojas de datos de seguridad de los reactivos y saber cómo actuar en caso de derrames o accidentes.

2.6.4. Gestión de residuos.

Como resultado del proceso de preparación de biomasa y digestión, se generan residuos líquidos y sólidos que pueden contener restos de selenio, ácidos y biomasa microbiana. Su manejo debe seguir las normativas internas y ambientales aplicables, considerando:

- Separar los residuos que contienen selenio de otros residuos químicos.
- Neutralizar ácidos cuando corresponda, bajo condiciones controladas.
- Tratar o disponer adecuadamente de la biomasa residual, evitando su liberación al sistema de alcantarillado sin tratamiento.

Una adecuada gestión de residuos contribuye a la seguridad del entorno y a la sostenibilidad de las prácticas de laboratorio.

Capítulo 3:
Parámetros instrumentales y
estrategias de calibración en
HG-MP-AES.

3.1. Descripción del instrumento MP-AES con generador de hidruros.

La determinación de selenio total en biomasa microbiana mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas acoplada a generación de hidruros (HG-MP-AES) requiere un control riguroso tanto de los parámetros instrumentales como de las estrategias de calibración. La incorporación de un generador de hidruros permite mejorar significativamente la sensibilidad y selectividad del método, ya que el selenio es separado previamente de la matriz y transportado al plasma en forma gaseosa, reduciendo interferencias físicas y químicas propias de matrices biológicas complejas.

3.1.1. Estructura general del MP-AES con generador de hidruros.

El sistema HG-MP-AES combina dos módulos principales: el equipo de MP-AES y un generador de hidruros acoplado externamente. En conjunto, el sistema está constituido por:

- **Sistema de preparación y transporte de reactivos:** este incluye la bomba peristáltica para la muestra digerida, el reactivo reductor y el medio ácido.
- **Generador de hidruros:** es donde el selenio es convertido químicamente en un hidruro volátil.
- **Separador gas-líquido:** este permite aislar el hidruro gaseoso de la fase líquida residual.
- **Sistema de introducción al plasma:** este transporta el hidruro directamente al plasma de microondas.
- **Fuente de plasma de microondas:** es donde ocurre la atomización y excitación del selenio.
- **Sistema óptico y detector:** Son los encargados de seleccionar y medir la emisión característica del selenio.

Esta configuración permite que el analito ingrese al plasma prácticamente libre de la matriz original, mejorando la relación señal/ruido y disminuyendo los efectos de interferencias.

3.1.2. Principio de la generación de hidruros para selenio.

La generación de hidruros se basa en la reacción del selenio presente en la muestra, generalmente en estado de oxidación +4, con un agente reductor fuerte, comúnmente borohidruro de sodio (NaBH_4), en medio ácido. Como resultado de esta reacción se forma hidruro de selenio (H_2Se), un compuesto gaseoso que puede ser separado de la solución líquida.

De forma simplificada, el proceso comprende las siguientes etapas:

1. La muestra digerida, previamente acondicionada químicamente, se mezcla con un ácido fuerte.
2. Se adiciona el reactivo reductor, generándose el hidruro de selenio.
3. El hidruro gaseoso se separa de la fase líquida en un separador gas-líquido.
4. El gas es transportado mediante un flujo portador hacia el plasma de microondas.

La eficiencia de esta etapa es crítica, ya que determina directamente la cantidad de selenio que llega al plasma y, por ende, la sensibilidad del método.

3.1.3. Ventajas del acoplamiento HG-MP-AES.

El uso de generación de hidruros acoplada a MP-AES presenta ventajas relevantes frente a la introducción directa de la muestra, entre las que destacan:

- Incremento significativo de la sensibilidad para selenio.
- Reducción de interferencias de matriz, especialmente de componentes orgánicos y sales.
- Mejora de los límites de detección y cuantificación.
- Mayor robustez del método frente a variaciones en la composición de la muestra.

Estas características hacen que el acoplamiento HG-MP-AES sea especialmente adecuado para el análisis de biomasa microbiana.

3.2. Parámetros instrumentales críticos del MP-AES.

El funcionamiento del MP-AES se apoya en varios parámetros que el analista debe definir antes de realizar una serie de mediciones. Ajustarlos de manera adecuada

representa una mezcla de criterio técnico y sentido práctico. A continuación, se describen los principales.

3.2.1. Potencia de microondas.

La potencia de microondas determina la energía disponible en el plasma y, por lo tanto, la eficiencia de atomización y excitación del selenio. Una potencia insuficiente puede generar señales débiles e inestables, mientras que una potencia excesiva puede aumentar el ruido de fondo o afectar la estabilidad del plasma.

El objetivo es encontrar un punto intermedio donde la señal de selenio sea intensa y estable, sin necesidad de forzar el instrumento a condiciones extremas.

3.2.2. Flujos de gas.

El nitrógeno cumple diferentes roles como:

- Mantener el plasma.
- Arrastrar la muestra nebulizada.
- Proteger componentes ópticos en algunos diseños.

Los flujos de gas se expresan habitualmente en litros por minuto y se configuran desde el software. Flujos inadecuados pueden causar pérdida de estabilidad del plasma, entrada insuficiente de muestra (si el flujo es muy bajo, puede haber poca introducción de aerosol) o enfriamiento del plasma (si el flujo es excesivo), reduciendo la eficiencia de excitación.

Para el método propuesto, se sugiere trabajar inicialmente con flujos recomendados para matrices acuosas y ajustar en etapas posteriores, si se observa que la matriz de la biomasa digerida afecta la estabilidad, los flujos recomendados son para el gas de plasma alrededor de los 15 L/min; el gas de nebulización oscila entre 0,5 y 0,7 L/min y finalmente, el gas protector en un rango de 1 a 1,5 L/min mas o menos.

3.2.3. Selección de la longitud de onda para selenio.

El selenio presenta varias líneas de emisión posibles. La selección de la longitud de onda debe considerar:

- Alta sensibilidad.
- Baja interferencia espectral.
- Fondo espectral estable.

En matrices biológicas, es especialmente importante seleccionar una línea que no se vea afectada por la emisión de elementos mayoritarios como sodio, calcio o magnesio.

3.2.4. Sistema de introducción de muestra.

La bomba peristáltica, el nebulizador y la cámara de nebulización definen cómo llega la muestra al plasma. Algunos puntos clave son:

- **Velocidad de la bomba:** determina el flujo volumétrico de solución hacia el nebulizador. Si es muy alto, puede generarse exceso de aerosol, pérdida de eficiencia y variabilidad, y si es muy bajo, las señales pueden ser débiles.
- **Tipo de nebulizador:** hay diseños más robustos y otros más sensibles a la limpieza y a la presencia de partículas. Para soluciones provenientes de digestiones oxidantes, generalmente claras, suele funcionar bien un nebulizador convencional, siempre que se mantenga limpio.
- **Cámara de nebulización:** elimina gotas grandes y estabiliza el aerosol que va hacia el plasma. Su diseño influye en la estabilidad de la señal y en la velocidad con que responde el sistema a cambios de concentración.

En el contexto de muestras de biomasa microbiana digeridas, es fundamental que las soluciones estén bien filtradas o libres de sólidos para evitar obstrucciones del nebulizador.

3.2.5. Tiempo de lectura, réplicas y modo de medición.

El tiempo durante el cual el detector observa la emisión de una muestra (tiempo de integración o de lectura) afecta directamente el ruido y la precisión:

- **Tiempos de lectura cortos:** permiten analizar más muestras en menos tiempo, pero aumentan el ruido relativo.
- **Tiempos de lectura más largos:** mejoran la relación señal/ruido, pero aumenta en tiempo total de análisis.

Además del tiempo de lectura, el instrumento permite definir el número de réplicas por muestra, es decir, cuántas veces se mide la misma solución y se promedia el resultado. Trabajar con más réplicas reduce la variabilidad, pero incrementa el tiempo ocupado por cada muestra.

Para este método se propone:

- Un tiempo de lectura que ofrezca una señal estable para los estándares intermedios de selenio, el cual sería unos 3 segundos por muestra.
- Un número moderado de réplicas, por ejemplo, tres repeticiones por muestra, para asegurar buena repetibilidad sin saturar la capacidad del instrumento.

3.3. Parámetros críticos del generador de hidruros.

3.3.1. Medio ácido.

La formación eficiente del hidruro de selenio requiere un medio ácido controlado. La concentración del ácido influye en la cinética de la reacción y en la estabilidad del hidruro generado. Un medio excesivamente ácido puede provocar descomposición prematura del hidruro, mientras que una acidez insuficiente reduce la eficiencia de generación.

3.3.2. Reactivo reductor.

El borohidruro de sodio es el reductor más utilizado. Su concentración debe optimizarse para asegurar una generación completa del hidruro sin generar exceso de gas hidrógeno que pueda diluir la señal o afectar la estabilidad del sistema.

3.3.3. Caudales de muestra y reactivos.

Los caudales controlan el tiempo de contacto entre la muestra y el reactivo reductor. Un equilibrio adecuado entre los flujos asegura una reacción eficiente y una señal estable. Variaciones en estos caudales pueden generar dispersión en la respuesta analítica.

3.3.4. Separador gas-líquido.

El diseño y funcionamiento del separador gas-líquido son fundamentales para evitar el arrastre de fase líquida hacia el plasma, lo que podría introducir interferencias o inestabilidad en la señal.

3.4. Preparación de estándares y curva de calibración.

La calibración es el puente entre lo que ve el instrumento (intensidades de luz) y lo que el analista necesita (concentraciones en mg/L o µg/L). Una buena curva de calibración es una relación confiable y estable entre ambas cosas.

3.4.1. Solución madre de selenio.

El punto de partida es disponer de una solución madre de selenio de concentración conocida, trazable y estable. Esta puede ser una solución comercial certificada, con una concentración conocida de selenio en un medio ácido, o bien una solución preparada en el laboratorio a partir de una sal de selenio de alta pureza, disuelta cuidadosamente en un ácido apropiado.

Sea cual sea el origen, la solución madre deberá:

- Estar correctamente rotulada, indicando concentración, fecha de preparación y responsable.
- Mantenerse en un recipiente adecuado, protegido de la luz y a una temperatura adecuada.
- No utilizarse más allá del tiempo de estabilidad definido, para evitar cambios en la concentración por evaporación o reacciones no deseadas.

3.4.2. Preparación de estándares de trabajo.

A partir de la solución madre se preparan los estándares de trabajo, que son diluciones a concentraciones menores, dentro del rango que se espera encontrar en las muestras.

se deberá preparar estándares de selenio en un rango que cubra desde valores cercanos al límite de cuantificación hasta concentraciones superiores a las esperadas en las muestras, como:

- Estándar 1: concentración baja (cerca del límite de cuantificación).
- Estándar 2: concentración intermedia.
- Estándar 3: concentración media-alta.
- Estándar 4 o 5: concentración alta.

Cada estándar se preparará por dilución volumétrica, utilizando matraces aforados y pipetas adecuadas. Es importante:

- Utilizar el mismo medio de disolución que en las muestras digeridas para que la matriz de los estándares se parezca lo más posible a la de las muestras y así reducir diferencias de comportamiento.
- Mezclar bien cada solución luego de preparar la dilución.
- Registrar exactamente los volúmenes utilizados, para poder recalcular la concentración en caso de duda.

3.4.3. Blanco y verificación del cero.

El blanco es una solución que contiene todos los reactivos excepto el analito. En este caso, puede ser una solución de ácido en la misma concentración que la de las muestras digeridas, pero sin selenio añadido.

El blanco sirve para:

- Medir la señal basal del instrumental y de los reactivos.
- Detectar posibles contaminaciones.
- Ajustar el cero de la curva de calibración.

De acuerdo con la práctica descrita en la literatura y en manuales técnicos, antes de medir los estándares, se suele aspirar el blanco hasta que la señal se estabiliza. Si el blanco muestra una señal significativa para selenio, se debe investigar el origen: puede ser contaminación de reactivos, vasos, pipetas o incluso acumulación previa de selenio en el sistema de introducción de muestra.

3.4.4. Construcción de la curva de calibración.

Basada en lo descrito en la literatura y manuales técnicos, una vez preparados los estándares y el blanco, estos deben ser medidos en el MP-AES, obtenido como resultado la intensidad de emisión para cada concentración conocida de selenio.

A partir de estos datos el software ajustará una recta de calibración, la cual relacionará la intensidad y la concentración. Por lo general, se debe esperar una relación lineal en el rango de trabajo elegido. La recta se expresa en términos de una ecuación del tipo:

- $\text{señal} = \text{pendiente} \times \text{concentración} + \text{intercepto}$

Aunque en este informe no se profundizará en fórmulas, es importante entender que:

- La pendiente refleja la sensibilidad del método: cuanto mayor es, más cambia la señal ante pequeños cambios de concentración.
- El intercepto representa la señal que se obtendría si la concentración fuera cero; idealmente debería ser cercano a cero, pero en la práctica puede existir un pequeño valor debido a fondo instrumental o de reactivos.

Durante una futura etapa de validación se deberá evaluar qué tan bien se ajustan los puntos experimentales a esta recta, mediante parámetros como el coeficiente de correlación. Desde un enfoque teórico y en base a antecedentes reportados en la literatura, se espera que la curva de calibración presente un comportamiento lineal dentro del rango elegido, siempre que las condiciones instrumentales se mantengan estables.

3.4.5. Calibración externa, adiciones estándar y ajuste a matriz.

La forma más habitual de calibrar el MP-AES es la calibración externa, en la que se usan estándares preparados en un medio similar al de las muestras, pero sin biomasa. Sin embargo, cuando la matriz de las muestras es compleja, como ocurre con los digestos de biomasa microbiana, pueden aparecer efectos de matriz que modifiquen la señal.

Como solución a este problema se pueden considerar estrategias complementarias, como:

- Preparar estándares en una matriz que imite la composición de las muestras digeridas.
- Aplicar el método de adiciones estándar, en el que se añaden cantidades conocidas de selenio directamente a la muestra y se observa el aumento de señal.

Esto permite compensar efectos de matriz, aunque aumenta el trabajo de preparación.

Para este proyecto, se propone utilizar calibración externa como estrategia principal y complementarla con pruebas exploratorias de recuperación, además de forma eventual, adicionar estándar en la etapa de validación, para evaluar y corregir los efectos de la matriz.

3.5. Condiciones para asegurar sensibilidad y repetibilidad.

Una vez que el instrumento está ajustado y la curva de calibración construida, el siguiente paso será que el método sea suficientemente sensible para detectar el selenio en las concentraciones de interés y que los resultados sean repetibles, es decir, que se obtengan valores similares cuando se mida la misma muestra varias veces.

3.5.1. Optimización de la señal.

Para mejorar la sensibilidad, según literatura el analista podría:

- Ajustar la longitud de onda para seleccionar la línea más intensa y menos interferida.
- Optimizar la potencia de microondas y el flujo de gas, hasta encontrar un compromiso entre señal alta y ruido controlado.
- Ajustar la velocidad de la bomba de muestra, de modo que el aerosol generado sea eficiente y estable.

En términos prácticos, la sensibilidad se traduce en:

- **Límite de detección (LD):** menor concentración que se puede detectar con confianza, aunque no necesariamente cuantificar con precisión.
- **Límite de cuantificación (LC):** menor concentración que se puede medir con una precisión y exactitud aceptables.

En este trabajo estos valores se definen desde el enfoque teórico, sin validación experimental, pero de igual forma el diseño del método debe apuntar a que el LD y el LC sean inferiores a las concentraciones de selenio esperadas en la biomasa, de forma que el método propuesto sea capaz de detectar y cuantificar niveles bajos del analito.

3.5.2. Repetibilidad y control de la deriva instrumental.

La repetibilidad se refiere a la capacidad de obtener resultados similares cuando se mide la misma muestra en condiciones iguales, en un corto periodo de tiempo y está influida por:

- Estabilidad del plasma.
- Estabilidad del flujo de muestra.
- Limpieza del sistema de introducción.
- Calidad de la curva de calibración.

Para monitorear y mejorar la repetibilidad, se pueden utilizar:

- **Muestras duplicadas:** se mide dos o más veces la misma solución y se calcula la dispersión entre los resultados.
- **Estándares de control intermedio:** un estándar de concentración conocida se mide periódicamente durante la jornada. Si sus resultados se desvían demasiado, puede indicar deriva del instrumento o problemas en algún parámetro.

La deriva instrumental es el cambio gradual de la respuesta del equipo a lo largo del tiempo, esto puede deberse a variaciones de temperatura, acumulación de sales en el nebulizador, pequeños cambios en la potencia de microondas, etc. Para gestionarla, se recomienda:

- Dejar que el equipo se estabilice antes de comenzar la serie de análisis.
- Intercalar estándares de control cada cierto número de muestras.
- Programar limpiezas preventivas del sistema de introducción de muestra.

3.5.3. Mantenimiento preventivo y cuidado del sistema de introducción de muestra.

La sensibilidad y la repetibilidad no dependen sólo de ajustes “digitales” en el software, sino también del cuidado físico del equipo, ya que en el día a día, la acumulación de residuos de sales o partículas en el nebulizador y la cámara de nebulización puede generar:

- Señales menos estables.

- Mayor ruido.
- Obstrucciones que afectan el flujo de muestra.

Por eso, en el diseño teórico del método se considera necesario contemplar prácticas de mantenimiento y control del sistema de introducción de la muestra, tales como:

- Enjuagar el sistema con agua ultrapura después de medir soluciones concentradas o muestras complejas.
- Realizar limpiezas periódicas del nebulizador y la cámara con soluciones ácidas suaves si es necesario.
- Verificar visualmente la antorcha y componentes expuestos, para detectar depósitos o daños.

Un equipo bien mantenido no sólo mejora el desempeño analítico, sino que también tiene una vida útil más larga.

3.6. Manejo de interferencias y ajuste del método a matrices orgánicas.

Las muestras reales rara vez son “limpias”. En el caso de la biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio, incluso después de la digestión oxidante, la solución resultante sigue siendo una mezcla compleja de elementos y restos de matriz mineralizada y esa complejidad puede generar interferencias, las cuales afectan la señal de selenio y, si no se controlan, pueden distorsionar los resultados.

3.6.1. Interferencias espectrales.

Las interferencias espectrales ocurren cuando la emisión de otros elementos o la señal basal del espectro se superponen parcial o totalmente con la línea de selenio elegida. Esto puede producir:

- Sobreestimación de la concentración de selenio, si la señal de otro elemento aporta intensidad en la misma región espectral.
- Aumento del ruido, si el fondo es muy variable.

Para minimizar este tipo de interferencias, en el marco de la presente propuesta metodológica teórica, se plantea la implementación de criterios de selección y corrección espectral ampliamente descritos en la literatura y en manuales técnicos de la técnica MP-AES. En particular, se propone:

- Elegir una longitud de onda de selenio con menor riesgo de solapamiento.
- Usar las capacidades de corrección de fondo que ofrece el software del MP-AES, restando la señal de regiones cercanas a la línea analítica, donde se supone que no hay contribución de selenio, pero sí de interferencias.

Como consejo para la futura etapa experimental, se podrían realizar estudios con soluciones multielementales para identificar interferencias específicas y, si es necesario, evitar ciertas líneas de selenio problemáticas.

3.6.2. Interferencias de matriz: efectos físicos y químicos.

Además de las interferencias espectrales, las matrices orgánicas digeridas pueden generar:

- **Efectos físicos:** cambios en las propiedades del líquido como la viscosidad, la tensión superficial, entre otras, lo cual afectan la formación del aerosol y la eficiencia de nebulización.
- **Efectos químicos:** presencia de especies que influyen la volatilidad o estado químico del selenio en el plasma, modificando la intensidad de la señal.

Para enfrentar estos efectos, se contemplan varias estrategias:

- **Dilución de las muestras:** reducir la concentración global de matriz, manteniendo el selenio por encima del límite de cuantificación. Si bien se pierde algo de sensibilidad, se gana estabilidad y así se reduce la probabilidad de interferencias de matriz.
- **Ajustar el medio de calibración:** preparar los estándares en una matriz que se parezca lo más posible a la de las muestras digeridas como, por ejemplo, en el mismo tipo de ácido y concentración, y, si es viable, con niveles similares de otros elementos principales.
- **Verificar la linealidad en presencia de matriz:** comparar la curva de calibración preparada en medio simple con la obtenida mediante adiciones estándar a la muestra, para evaluar si la matriz altera la pendiente o el intercepto.

Estas acciones permitirán que el método no sólo funcione bien con estándares “limpios”, sino que también responda de manera confiable cuando se enfrenta a muestras reales de biomasa.

3.6.3. Pruebas de recuperación y robustez del método.

Para evaluar en qué medida las interferencias y la matriz afectan el método, es útil recurrir a:

- **Pruebas de recuperación:** se añade una cantidad conocida de selenio a una muestra de biomasa digerida y se procesa de nuevo. Si la recuperación de ese selenio añadido es cercana al 100 %, se concluye que el método compensa adecuadamente los efectos de matriz en ese nivel de concentración.
- **Estudios de robustez:** se varían ligeramente algunos parámetros, por ejemplo, el volumen de ácido, la temperatura de digestión o la velocidad de la bomba, y se observa si los resultados cambian de manera significativa. Un método robusto no debería verse afectado por pequeños cambios en las condiciones operativas.

En este proyecto, estos estudios se proponen de forma conceptual, por ende, se deberá evaluar cómo se comporta la metodología ante las variaciones naturales del trabajo de laboratorio.

3.6.4. Ajuste final del método a la biomasa microbiana.

Se debe adaptar las condiciones del MP-AES y las estrategias de calibración para que el sistema responda de manera fiel a las características particulares de la biomasa microbiana digerida.

Para ello se debe:

- Elegir la longitud de onda adecuada para selenio.
- Definir los parámetros instrumentales en rangos que brinden estabilidad.
- Diseñar la curva de calibración y, si es necesario, complementarla con adiciones estándar.
- Incorporar controles de calidad y pruebas de recuperación.
- Establecer procedimientos de limpieza y mantenimiento que tengan en cuenta el tipo de muestras analizadas.

Capítulo 4:
Plan de validación del método según
ISO/IEC 17025.

4.1. Conceptos clave de la validación de métodos en ISO/IEC 17025.

La validación de un método analítico es, en palabras sencillas, demostrar con datos que ese método sirve en las condiciones reales en las que se va a usar. No se trata sólo de que el método funcione una vez, sino de que lo haga de manera confiable, trazable y repetible en el tiempo.

La norma ISO/IEC 17025 exige que los laboratorios que realizan ensayos y calibraciones logren información verificable de que sus métodos son adecuados para el uso previsto. Para métodos cuantitativos como este, centrados en la cuantificación de selenio total, los parámetros de desempeño que suelen considerarse son:

- **Selectividad o especificidad:** capacidad del método para medir selenio sin verse confundido por otros componentes de la muestra.
- **Linealidad:** qué tan bien la señal responde de forma proporcional a la concentración en un rango definido.
- **Rango de trabajo:** intervalo de concentraciones en el que el método mantiene un comportamiento aceptable.
- **Precisión:** qué tan cerca están entre sí los resultados de mediciones repetidas.
Incluye:
 - ✓ Repetibilidad (misma persona, mismo equipo, corto tiempo).
 - ✓ Precisión intermedia (días distintos, analistas distintos, pequeña variación de condiciones).
- **Veracidad y sesgo:** cercanía entre el valor medido y el valor “verdadero” o aceptado como tal.
- **Exactitud:** combinación de veracidad y precisión.
- **Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC):** concentraciones más bajas que el método puede detectar o cuantificar con fiabilidad.
- **Robustez:** estabilidad del método frente a pequeñas variaciones en condiciones de trabajo.
- **Incertidumbre de medida:** estimación cuantitativa de qué tan confiable es el resultado final.

4.2. Plan de validación para el método HG-MP-AES de selenio total.

El plan de validación describe, en orden lógico, qué se va a evaluar, cómo se va a evaluar y con qué criterios se decidirá si el método es apto o no para su propósito.

El plan para el método de selenio total en biomasa microbiana incluye:

1. Definir el alcance del método:

- Matriz: biomasa microbiana seca productora de nanopartículas de selenio (y matrices similares).
- Rango de concentración esperado: por ejemplo, desde unos pocos mg/kg hasta algunos cientos de mg/kg en base seca (definido a partir de antecedentes bibliográficos y estudios preliminares).
- Técnica: MP-AES con digestión oxidante previa.

2. Establecer los parámetros de desempeño a estudiar:

- Selectividad.
- Linealidad y rango.
- LD y LC.
- Precisión (repetibilidad y precisión intermedia).
- Veracidad y recuperación.
- Robustez.
- Estimación de incertidumbre de medida.

3. Diseñar ensayos específicos para cada parámetro, usando:

- Blancos de método.
- Material de referencia (si existe alguno razonablemente similar).
- Muestras reales de biomasa microbiana.
- Muestras fortificadas (spikeadas) con selenio.

4. Definir criterios de aceptación:

- Coeficiente de correlación lineal mínimo.
- Rangos de recuperación aceptables (por ejemplo, 80–120 %, según el nivel).
- Desviación estándar relativa (RSD) máxima permitida para la precisión.
- Límites de detección y cuantificación acordes a los objetivos.

5. Documentar todo el proceso de forma que cualquier analista del laboratorio pueda seguirlo, repetirlo y revisar los resultados.

4.3. Ensayos necesarios y su ejecución.

4.3.1. Selectividad y blancos de método.

Objetivo: demostrar que el método responde específicamente al selenio en la matriz de interés, sin señal significativa proveniente de otros componentes.

Como realizar el ensayo:

- Preparar y medir:
 - Blanco de reactivos (ácidos, agua, recipientes, sin biomasa ni selenio).
 - Blanco de método (biomasa “en blanco” de un lote sin adición de selenio o con nivel muy bajo conocido, si se dispone de ella).
 - Estándares de selenio en el medio de digestión.
- Verificar que la señal en la longitud de onda seleccionada para selenio sea despreciable en los blancos, en comparación con el nivel mínimo de interés.
- Si existen sospechas de interferencias espectrales, realizar mediciones con soluciones que contengan otros elementos presentes en la biomasa (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K) para verificar que no generen señales significativas en la línea de selenio.

Resultado esperado:

- Señal del blanco cercana al cero de la curva de calibración.
- Ausencia de picos adicionales o deformaciones en el espectro que puedan confundirse con selenio.

4.3.2. Linealidad y rango.

Objetivo: comprobar que la respuesta del instrumento (intensidad de emisión) es proporcional a la concentración de selenio en un intervalo definido.

Como realizar el ensayo:

1. Preparar al menos 5 niveles de estándares de selenio dentro del rango de trabajo previsto, por ejemplo:
 - 0,05 mg/L
 - 0,10 mg/L
 - 0,25 mg/L

→ 0,50 mg/L

→ 1,00 mg/L

2. Medir cada estándar con el MP-AES, en condiciones ya optimizadas, en al menos dos repeticiones por nivel.
3. Ajustar una recta de calibración y calcular:
 - Pendiente y ordenada al origen.
 - Coeficiente de correlación lineal (R).
 - Inspeccionar gráficamente la distribución de puntos.
4. Montar, si se desea, pruebas estadísticas simples para evaluar si las desviaciones de la recta son aleatorias o indican curvatura.

Criterios teóricos de aceptación:

- Coeficiente de correlación $\geq 0,995$.
- Residuos (diferencias entre valores observados y esperados por la recta) distribuidos de forma aleatoria y sin tendencia.
- La recta debe pasar razonablemente cerca del origen, o bien se justifica el uso de un intercepto distinto de cero.

El rango se define como el intervalo de concentraciones en el que se cumple esa linealidad y se verifican requisitos de precisión y recuperación aceptables.

4.3.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Objetivo: estimar las concentraciones más bajas que el método puede detectar (LD) y cuantificar (LC) con un nivel de confianza razonable.

Como realizar el ensayo:

1. Medir el blanco (medio ácido sin selenio) varias veces, por ejemplo, 10 mediciones.
2. Calcular la desviación estándar de la señal del blanco.
3. Estimar:
 - $LD \approx 3$ veces la desviación estándar del blanco, convertida a concentración usando la pendiente de la curva.

- $LC \approx 10$ veces la desviación estándar del blanco, convertida a concentración.

Otra opción más orientada a la práctica consiste en preparar un estándar de baja concentración y medirlo varias veces para ver a qué nivel de selenio se obtiene una repetibilidad aceptable.

En cualquier caso, los valores de LD y LC deben ser más bajos que las concentraciones mínimas que se esperan encontrar en las muestras de biomasa. Si no lo son, habría que optimizar nuevamente la etapa instrumental o la estrategia de digestión, o bien considerar concentrar las muestras.

4.3.4. Precisión: repetibilidad y precisión intermedia.

Objetivo: evaluar qué tan consistentes son los resultados cuando se repite el análisis en condiciones similares y cuando se introducen pequeñas variaciones (día, analista, etc.).

a) Repetibilidad (intra-día)

- Seleccionar al menos dos niveles de concentración representativos del rango (por ejemplo, uno bajo y uno medio).
- Tomar una porción homogénea de biomasa y digerirla en, por ejemplo, 6 réplicas independientes para cada nivel.
- Medir las soluciones digeridas en una misma sesión, con el mismo analista y equipo.
- Calcular el valor medio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (RSD).

b) Precisión intermedia (inter-día o inter-analista)

- Repetir el experimento anterior en días distintos, o con analistas distintos, o en diferentes turnos.
- Comparar los resultados usando ANOVA simple o, al menos, evaluando si las medias de los distintos días/analistas son comparables y si las RSD se mantienen dentro de un rango aceptable.

En un contexto teórico, se podría considerar un criterio de aceptación, por ejemplo: $RSD \leq 5-10\%$ para niveles de concentración medios y altos, y tal vez un poco mayor para niveles cercanos al límite de cuantificación (siempre que se justifique).

4.3.5. Veracidad y recuperación.

Objetivo: determinar qué tan cerca están los resultados del valor verdadero o aceptado.

Como en la matriz específica (biomasa microbiana con nanopartículas) puede no existir un material de referencia certificado con valor de selenio total, la estrategia más razonable es trabajar con recuperación mediante fortificación:

- Tomar una muestra de biomasa con un contenido basal de selenio.
- Dividirla en varias porciones:
 - Una porción sin fortificar (para determinar el nivel basal).
 - Una o más porciones a las que se añaden cantidades conocidas de selenio (por ejemplo, adiciones bajas, medias y altas).
- Procesar todas las porciones por completo (digestión, dilución, análisis por MP-AES).
- Calcular la recuperación como:

Recuperación (%) = [(concentración medida en la porción fortificada – concentración basal) / concentración añadida] × 100

Criterios generales:

- Recuperaciones entre 80 % y 120 % suelen considerarse aceptables, dependiendo de la concentración y del propósito del método.
- En niveles más bajos, se puede tolerar una variabilidad algo mayor, siempre que se justifique.

4.3.6. Robustez.

Objetivo: comprobar cómo se comporta el método si se producen pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo que podrían ocurrir en la vida real del laboratorio.

Como realizar el ensayo:

- Seleccionar una o dos muestras de biomasa representativas.
- Procesarlas bajo condiciones “nominales” y bajo condiciones ligeramente modificadas, por ejemplo:
 - Temperatura de digestión ± 5 °C.

- Tiempo de digestión $\pm 10 \%$.
- Pequeñas variaciones en el volumen final de dilución (dentro de tolerancias razonables).
- Ligero cambio en el flujo de gas del MP-AES dentro de los márgenes permitidos por el fabricante.
- Comparar las concentraciones determinadas de selenio entre las condiciones nominales y las modificadas.

Si las diferencias se mantienen dentro de un margen estrecho, por ejemplo, $\pm 5 \%$, se considera que el método es robusto frente a esas variaciones.

4.4. Evaluación integrada de los parámetros de desempeño.

Una vez realizados los ensayos de validación, es importante no ver cada parámetro como algo aislado, sino integrarlos en una visión global de la capacidad del método.

En la lógica de ISO/IEC 17025, el laboratorio debe poder demostrar que, considerando todos estos aspectos, el método es apto para el uso previsto.

En el caso concreto de este proyecto:

- Si se espera usar el método para controlar biomasa microbiana enriquecida con selenio en un rango relativamente alto, la exigencia sobre LD y LC puede ser más relajada, pero habrá que ser exigente con la precisión y la recuperación.
- Si, por el contrario, se quisiera aplicar el método para detectar niveles cercanos al mínimo nutricional o ambiental, habría que optimizar al máximo sensibilidad y LD/LC.

4.5. Procedimiento para estimar la incertidumbre de medida.

La incertidumbre de medida es un concepto central en ISO/IEC 17025. No se trata de decir “el resultado es $X \text{ mg/kg}$ ”, sino “el resultado es $X \text{ mg/kg} \pm U$ ”, donde U resume el conjunto de fuentes de variación que afectan al valor final.

Acompañar ese valor con una estimación de la incertidumbre expandida es imprescindible, es decir, debe reflejar el rango de valores donde presumiblemente se halle el valor real, considerando un nivel de confianza definido.

4.5.1. Identificación de las fuentes de incertidumbre.

El primer paso es identificar y organizar las fuentes de incertidumbre relevantes del proceso, para este método, entre las principales se consideran:

- Preparación de estándares de calibración: errores en el pesaje, en la preparación de soluciones madre y en las diluciones.
- Curva de calibración: incertidumbre asociada a la regresión (pendiente e intercepto).
- Repetibilidad: variación entre mediciones repetidas de la misma muestra.
- Volúmenes y masas en la preparación de la muestra: errores de pipetas, matraces y balanzas durante la digestión.
- Efectos de matriz residuales: que puedan causar pequeñas desviaciones no totalmente corregidas.

No es necesario incorporar absolutamente todo, pero sí las contribuciones más importantes en el contexto del método.

4.5.2. Cuantificar componentes de incertidumbre.

Para cada fuente relevante, se estima un componente de incertidumbre estándar. Por ejemplo:

- Para la preparación de estándares, se puede estimar la incertidumbre a partir de la tolerancia de la balanza y de los volumétricos utilizados.
- Para la curva de calibración, se utilizan los parámetros estadísticos de la regresión.
- Para la repetibilidad, se utiliza la desviación estándar de las mediciones repetidas.

Cada componente se expresa como una desviación estándar (o equivalente) en las mismas unidades que la magnitud de interés (por ejemplo, mg/L o mg/kg).

4.5.3. Combinar las contribuciones.

Se pueden convertir todas las componentes a unidades de concentración (por ejemplo, mg/kg) y luego combinarlas mediante suma cuadrática (raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de cada componente).

En términos conceptuales:

1. Se elevan al cuadrado los componentes de incertidumbre estándar.
2. Se suman los cuadrados de las contribuciones relevantes.
3. Se extrae la raíz cuadrada de la suma, obteniendo la incertidumbre estándar combinada.

Esta incertidumbre se refiere, normalmente, a una única medición o a una condición específica.

4.5.4. Obtener la incertidumbre expandida.

Multiplicando la incertidumbre estándar combinada por un factor de cobertura (k), habitualmente $k = 2$, que equivale aproximadamente a un nivel de confianza del 95 %.

El resultado final se expresaría, por ejemplo, como:

Selenio total = 25,0 mg/kg $\pm$ 3,0 mg/kg ($k = 2$)

En este proyecto, la estimación se describe conceptualmente, pero en una implementación real el laboratorio debería documentar con detalle el modelo de incertidumbre, las fuentes consideradas, los cálculos y cualquier supuesto adoptado.

4.6. Alcances y limitaciones del método propuesto.

Aunque el método esté bien diseñado y validado, siempre tiene ámbitos en los cuales funciona bien y otros donde sus resultados pueden ser menos confiables.

4.6.1. Alcances.

- **Matriz objetivo:** biomasa microbiana seca productora de nanopartículas de selenio, y matrices biológicas similares (por ejemplo, biomasa de otros microorganismos cultivados en condiciones comparables).

- **Tipo de analito:** selenio total, sin diferenciar entre especies químicas (selenio elemental, selenitos, selenatos, selenoaminoácidos, etc.).
- **Rango de concentración:** se pretende que cubra el rango usual de concentraciones alcanzadas en bioprocesos de enriquecimiento en selenio, en el orden de mg/kg a cientos de mg/kg, en base seca.
- **Técnica instrumental:** MP-AES con plasma de microondas, que corre en aire o nitrógeno y ofrece límites de detección en rango de $\mu\text{g/L}$ en solución, equivalentes a niveles traza en muchas matrices.

Este alcance lo hace especialmente interesante para:

- Estudios académicos sobre biotransformación de selenio.
- Desarrollo de bioprocesos para producir ingredientes funcionales o suplementos.
- Evaluación preliminar de biomasa microbiana con potencial de uso en alimentos o nutraceuticos.

4.6.2. Limitaciones.

- **No determina especiación:** el método da un valor global de selenio total. Si se requiere conocer qué fracción está como Se^0 , selenito, selenato u otras formas orgánicas, este método no es suficiente; se necesitarían técnicas específicas de especiación (por ejemplo, acopladas a cromatografía).
- **Limitación de matriz:** la validación se plantea para biomasa microbiana. Aplicarlo a otras matrices (alimentos, suelos, aguas, tejidos animales) necesitaría un nuevo estudio de validación o, al menos, verificación.
- **Dependencia de la digestión:** la exactitud del método depende fuertemente de la completitud de la digestión oxidante. Si la matriz no se descompone suficientemente, el selenio podría no liberarse por completo.
- **Infraestructura requerida:** se necesita acceso a un MP-AES, sistema de generación de gas (aire o nitrógeno) y equipamiento de digestión (idealmente microondas), lo que puede no estar disponible en todos los laboratorios.
- **Costos de implementación:** aunque el MP-AES tiene costos operacionales más bajos que otras técnicas, la inversión inicial en el instrumento y en la infraestructura sigue siendo significativa.

4.7. Estimación de costos asociados al método.

A continuación, se entrega una estimación de costos en 2025 asumiendo que:

- El laboratorio ya cuenta con un MP-AES operativo, por lo que no se incluyen costos de compra del equipo (pero sí de uso, mantenimiento y consumibles asociados).
- Los valores son aproximados, basados en precios de mercado chileno para 2024-2025 (reactivos, servicios, materiales y operatividad).
- Se considera el análisis de 200 muestras anual.

La estimación detallada incluye reactivos, material fungible, infraestructura, operación, energía, depreciación y gestión de residuos.

4.7.1. Equipamiento adicional.

El principal requerimiento instrumental corresponde al generador de hidruros, el cual se acopla al sistema MP-AES existente y permite la conversión del selenio a su forma volátil, mejorando la sensibilidad y reduciendo interferencias de matriz.

Ítem	Descripción	Costo estimado (CLP)
Generador de hidruros	Módulo compatible con MP-AES, incluye separador gas-líquido y accesorios básicos	\$4.000.000
Accesorios de acoplamiento	Mangueras, conectores, adaptadores	\$550.00

Tabla 4-1. “Costos de equipamiento adicional”.

4.7.2. Costos de reactivos por muestra.

Reactivo	Uso	Costo anual estimado (CLP)	Costo aproximado por muestra (CLP)
Solución patrón de selenio	Curvas y verificación (prorrateado)	\$180.000	\$900
Borohidruro de sodio (NaBH ₄)	Generación de hidruros	\$150.000	\$750
Ácido clorhídrico (HCl)	Medio ácido HG	\$60.000	\$300
Ácido nítrico (HNO ₃)	Digestión de muestra	\$180.000	\$900
Agua ultrapura	Preparación de soluciones	\$80.000	\$400
Reactivos de limpieza	Mantenimiento analítica	\$60.000	\$300
Subtotal reactivos por muestra			\$3.550

Tabla 4-2. “Costos de reactivos por muestra”.

4.7.3. Costo de materiales y consumibles por muestra.

Material	Uso por muestra	Costo anual estimado (CLP)	Costo por muestra (CLP)
Viales, tubos y frascos	Preparación y almacenamiento	\$80.000	\$400
Mangueras peristálticas	Prorratio por desgaste	\$80.000	\$400
Jeringas, filtros y material auxiliar	Uso rutinario	\$60.000	\$300
Subtotal materiales por muestra			\$1.100

Tabla 4-3. “Costos de materiales y consumibles por muestra”.

4.7.4. Costo de mantención de equipos por muestra.

Equipo	Costo anual (CLP)	Costo por muestra (CLP)
Mantención MP-AES	\$2.500.000	\$12.500
Mantención generador de hidruros	1.200.000	\$6.000
Subtotal mantención por muestra		\$18.500

Tabla 4-4. “Costos de mantenimiento de equipos por muestra”.

4.8. KPI financiero del método analítico.

- KPI de costo total por muestra analizada nos permitirá mostrar si el método es económicamente sostenible, optimizable o competitivo frente a otras técnicas.

Formula

KPI Costo por Muestra:

Costos reactivos + costos materiales + costos mantención + (Costo GH/Vida útil)

Nº de Muestras Analizadas

Donde:

- $C_{\text{reactivos}}$: costo anual de reactivos
- $C_{\text{materiales}}$: costo anual de materiales y consumibles
- $C_{\text{mantención}}$: costo anual de mantención (MP-AES + generador de hidruros)
- C_{HG} : costo de adquisición del generador de hidruros
- $V_{\text{útil}}$: vida útil del generador de hidruros (años)
- N : número de muestras analizadas por año

$$\text{KPI Costo por Muestra} = \frac{\$710.000 + \$220.000 + \$3.700.000 + (\$4.550.000/5)}{200}$$

$$\text{KPI Costo por Muestra} = \$27.700$$

En función de los resultados obtenidos, el KPI de costo total por muestra analizada evidencia que el método propuesto presenta un desempeño económico adecuado, considerando un volumen anual de 200 muestras y la totalidad de los costos asociados a su ejecución. El valor calculado respalda la factibilidad económica para una futura implementación del método en un laboratorio analítico, y constituye una herramienta objetiva para evaluar su sostenibilidad y compararlo con otras técnicas disponibles.

Conclusión

En el presente proyecto se desarrolló una propuesta metodológica de carácter teórico para la determinación de selenio total en biomasa microbiana productora de nanopartículas de selenio mediante generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (HG-MP-AES). A partir de la integración de fundamentos biológicos, analíticos y normativos, se dio cumplimiento al objetivo general del estudio, entregando un diseño metodológico estructurado que puede servir como base para una futura implementación y validación experimental del método bajo la norma ISO/IEC 17025.

En relación con el primer objetivo específico, orientado a describir el proceso de preparación y tratamiento de la biomasa microbiana, el análisis teórico permitió comprender la complejidad de esta matriz y la influencia de cada etapa previa al análisis instrumental. La revisión del cultivo, recolección, lavado, secado y digestión oxidante evidenció que el control riguroso de estos procedimientos es determinante para asegurar la correcta liberación del selenio total y, en consecuencia, la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante generación de hidruros.

Respecto del segundo objetivo específico, referido a la definición de los parámetros instrumentales y las estrategias de calibración, se concluye que la incorporación de la generación de hidruros constituye un elemento clave del método propuesto. Esta etapa permite mejorar la sensibilidad y selectividad de la determinación, al separar el analito de la matriz biológica y reducir interferencias, siempre que se aseguren condiciones estables de operación, una pre-reducción adecuada del selenio y una calibración correctamente diseñada, dando así cumplimiento a este objetivo.

Finalmente, el análisis de costos y la evaluación mediante indicadores financieros permitieron concluir que el método propuesto resulta económicamente más eficiente cuando el análisis se realiza en modalidad de lote, considerando tanto el uso del sistema HG-MP-AES como el consumo de reactivos asociados. En conjunto, el cumplimiento de los objetivos específicos permitió consolidar una propuesta metodológica teórica coherente y técnicamente fundamentada, que sienta las bases para futuras aplicaciones experimentales dentro de un marco de calidad analítica y confiabilidad.

Bibliografía.

- [1].Agilent Technologies. (2013). *Agilent 4100 MP-AES: Microwave plasma atomic emission spectrometer*. Agilent Technologies.
- [2].Agilent Technologies. (2013). *Essential spectroscopy and chromatography catalog*. Agilent Technologies.
- [3].Agilent Technologies. (2016). *Microwave plasma atomic emission spectrometers: Site preparation guide (Models 4100, 4200, 4210)* (3rd ed.). Agilent Technologies.
- [4].Agilent Technologies. (s. f.). *Nuevo plasma de emisión por microondas MP-AES 4100: Ventajas de la técnica y ejemplos de aplicaciones*. Agilent Technologies.
- [5].Barrientos, E. Y., Wrobel, K., Guzman, J. C. T., Escobosa, A. R. C., & Wrobel, K. (2016). Determination of SeMet and Se (IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC-HG-MP-AES). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(1), 203-211.
- [6].Constantinescu-Aruxandei, D., Frîncu, R. M., Capră, L., & Oancea, F. (2018). Selenium analysis and speciation in dietary supplements based on next-generation selenium ingredients. *Nutrients*, 10(10), 1466. <https://doi.org/10.3390/nu10101466>
- [7].Eurachem. (2014). *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics* (2nd ed.). Eurachem.
- [8].Gad, S., & Pham, T. (2014). Selenium. In *Encyclopedia of toxicology* (pp. 232–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00926-x>
- [9].Gallarta González, F., Sanz Asensio, J., y Galbán Bernal, J. (1992). Generación de hidruros - espectrometría de absorción molecular UV-VIS en fase gas. Determinación de arsénico, antimonio y selenio. *Zubía*, (10), 53-85.
- [10]. Hidronor Chile S.A. (2023). *Gestión integral de residuos peligrosos en Chile*. <https://www.hidronor.cl>
- [11]. International Organization for Standardization. (2017). *ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. ISO.
- [12]. Lafuente, C., Calpe, J., Musto, L., Nazareth, T. M., Dopazo, V., Meca, G., & Luz, C. (2023). Preparation of sourdoughs fermented with isolated lactic acid

- bacteria and characterization of their antifungal properties. *Foods*, 12(4), 686.
<https://doi.org/10.3390/foods12040686>
- [13]. López-Gutiérrez, M. de L., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortíz, H., Valdez-Aguilar, L. A., Cabrera-De la Fuente, M., & Sandoval-Rangel, A. (2015). Selenio y su efecto en el estado antioxidante y la composición mineral de la lechuga. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(12), 2257–2262.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015001002257
- [14]. Merck KGaA. (s. f.). *Productos químicos y reactivos para laboratorio*.
<https://www.merckgroup.com>
- [15]. Mikhailova, E. O. (2023). Selenium nanoparticles: Green synthesis and biomedical application. *Molecules*, 28(24), 8125.
<https://doi.org/10.3390/molecules28248125>
- [16]. Ministerio del Medio Ambiente. (2020). *Guía para la gestión de residuos peligrosos en laboratorios*. Gobierno de Chile.
- [17]. Ministerio de Salud de Chile. (2003). *Decreto Supremo N°148: Reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos*. <https://www.bcn.cl/leychile>
- [18]. Paydary, P., Schellenger, A. E. P., Teli, M., Jaisi, D. P., Onnis-Hayden, A., & Larese-Casanova, P. (2021). Chemical oxidation of selenite to selenate: Evaluation of reactive oxygen species and O transfer pathways. *Chemical Geology*, 575, 120229. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2021.120229>
- [19]. Pizzorno, P., Falchi, L., Mañay, N., Pistón, M., & Bühl, V. (2024). Determination of toxicological relevant arsenic species in urine by hydride generation microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *MethodsX*, 13, 102893. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102893>
- [20]. Pouri, S., Motamedi, H., Honary, S., & Kazeminezhad, I. (2017). Biological synthesis of selenium nanoparticles and evaluation of their bioavailability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60, e170452.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017170452>
- [21]. Ravi, R. K., Neeraj, A., & Yadav, R. H. (2021). Assessment of microbial biomass for production of ecofriendly single-cell protein, bioenergy, and other useful products. In *Microbial biomass and bioproducts* (pp. 267–284). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824448-7.00015-2>
- [22]. Sagitha, S. R., Aravindan, V., Rani, J. S., & Mahendran, M. (2025). Green synthesis and characterization of nano selenium using the extract of *Phyllanthus emblica*. *Measurement: Energy*, 6, 100051.
<https://doi.org/10.1016/j.meane.2025.100051>

- [23]. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. (2014). *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Cengage Learning.
- [24]. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Comisión de Elementos Traza. (2002). *Metodología recomendada para la medición del contenido de selenio en especímenes biológicos*. *Química Clínica*, 21(2), 67–73.
- [25]. Tarco Cando, Paola Abigail. (2020). Validación del método generador de hidruros por espectrometría de absorción atómica para la determinación de arsénico en aguas naturales, de consumo y residuales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- [26]. Vasanthakumar, S., Manikandan, M., & Arumugam, M. (2024). Green synthesis, characterization and functional validation of bio-transformed selenium nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 39, 101760. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101760>
- [27]. Werkneh, A. A., Gebretsadik, G. G., & Gebru, S. B. (2023). Review on environmental selenium: Occurrence, public health implications and biological treatment strategies. *Environmental Challenges*, 11, 100698. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100698>
- [28]. Zurita-Mápula, J. A., & Bernal-Chávez, S. A. (2024). Estrategias de síntesis verde para obtener nanopartículas inorgánicas de utilidad biomédica. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 27. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2024.669>