



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
NICARAGUA (UNAN-LEÓN)**



Facultad de Ciencias y Tecnologia

Departamento de Quimica

***“Calibración de un Espectrofotómetro UV-Visible y
Evaluación de la Incertidumbre”***

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE:
LICENCIADO EN QUIMICA.**

Presentada por:

**Bra. Fanny Sofía Martínez Osorio.
Bra. Irania de los Angeles Pérez Espinoza.**

Tutor: Fabio José Pallavicini Narváez.

León, Nicaragua, Noviembre 2009.



INDICE.

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	3
III. OBJETIVOS.....	5
III.1. Objetivo general.	5
III.2. Objetivos Específicos.	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
IV.1.1. Importancia de la Metrología en el comercio internacional.....	9
IV1.2. Trazabilidad de las mediciones.	9
IV.2 ESPECTROFOTOMETRIA	12
IV.2.1 Generalidades del espectrofotómetro.	12
IV.2.2 Fundamento de la Espectrofotometría.....	12
IV.2.3 Componentes de un espectrofotómetro	14
IV.2.3.1 Fuente de luz.	15
IV.2.3.2 Selectores de longitudes de onda (monocromador).	15
IV.2.3.3 Recipiente de la muestra (cubeta de muestra).....	16
IV.2.3.4 Detectores (foto multiplicador).	16
IV.3 CALIBRACION Y/O VERIFICACION DE LA EFICIENCIA DE UN ESPECTROFOTOMETRO UV/VIS.....	17
IV.3.1 Exactitud de longitud de onda (espectral).	18
IV.3.2 Luz difusa.	20
IV.3.3 Resolución.....	21
IV.3.4 Ruido.	22
IV.3.5 Línea de base Flatnees.....	23
IV.3.6 Estabilidad.....	24
IV.3.7 Exactitud fotométrica	25
IV.3.8 Linealidad.....	26



IV.4 EVALUACION DE LA INCERTIDUMBRE.	27
IV.4.1 Incertidumbre tipo A.	27
IV.4.2 Incertidumbre tipo B.	27
IV.4.3 Procedimiento general para la estimación de la incertidumbre.	27
IV.4.4 Incertidumbre de medición.	29
IV.4.5 Incertidumbre estándar.	29
IV.4.6 Incertidumbre estándar combinada.	29
IV.4.7 Incertidumbre expandida.	29
IV.4.8 Incertidumbre estándar relativa.	30
V. PARTE EXPERIMENTAL.	31
V.1 Reactivos.	31
V.2 EQUIPOS.	31
V.2.1 Espectrofotómetro UV/VIS.	32
V.3 CRISTALERÍA.	32
V.4 PROCEDIMIENTO.	33
V.4.1 Preparación de soluciones.	33
V.4.1.1 Solución de ácido sulfúrico.	33
V.4.1.2 Solución de 50 ppm de Dicromato de potasio.	33
V.4.1.3 Solución de tolueno al 0.02% en Hexano.	33
V.4.2 Calibración de la pipeta de 10 ml.	33
V.4.3 Calibración de 1 matraz volumétrico de 50 ml.	34
V.4.4 Evaluación de la exactitud espectral a partir de una celda de oxido de Holmio.	35
V.4.5 Evaluación de la exactitud fotométrica utilizando un estándar de Dicromato de potasio.	35
V.4.6 Evaluación de la linealidad.	35
V.4.7 Verificación de luz difusa.	36
V.4.8 Ruido.	36
V.4.9 Estabilidad.	36



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	37
VI.1 Evaluación de la exactitud espectral.	37
VI.1.1 Exactitud espectral utilizando una solución de Dicromato de potasio.	37
VI.1.1.1 Exactitud espectral a partir del pico de 350nm.	37
VI.1.1.2 Exactitud espectral a partir del pico de 257nm.	40
VI.1.2 Exactitud espectral utilizando filtro de vidrio de óxido de Holmio.	42
VI.2 Exactitud fotométrica.	44
VI.2.1 Filtro blanco 50%T.	45
VI.2.2 Filtro amarillo al 50%T.	49
VI.2.3 Filtro blanco 10%T.	53
VI.2.4 Filtro amarillo 10%T.	57
VI.3 Estudio de la linealidad del espectrofotómetro UV-Visible.	61
VI.3.1 Evaluación de la linealidad a 257nm.	61
VI.3.2 Evaluación de la linealidad a 350nm.	64
VI.4 Evaluación del ruido.	67
VI.5 Evaluación de la estabilidad.	68
VI.6 Evaluación de la resolución.	70
VI.7 Evaluación de la luz difusa.	71
VI.8 Evaluación de la incertidumbre.	72
VI.8.1 Identificación del modelo matemático y las fuentes de incertidumbre.	72
VI.8.2 Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.	74
VI.8.2.1 Cálculo de la incertidumbre de medición de la absorbancia de la muestra.	74
VI.8.2.2 Cálculo de la incertidumbre de la pipeta de 5ml.	76
VI.8.2.3 Cálculo de la incertidumbre del matraz aforado de 50ml.	77
VI.8.2.4 Incertidumbre debido al intercepto.	78
VI.8.2.5 Incertidumbre debido a la pendiente.	78
VI.8.3 Incertidumbre combinada.	78
VI.8.4 Contribución de cada uno de los componentes.	79
VI. 9 Diagnostico del Espectrofotómetro.	82
VII. CONCLUSIONES.	83
VIII. RECOMENDACIONES.	85
IX. BIBLIOGRAFIA.	86
X. ANEXOS.	88



Dedicatoria

A Dios Padre, Hijo y a su santo Espíritu por darnos la vida hasta ahora y ver unos de nuestros sueños realizados.

A nuestros padres por darnos su apoyo incondicional, por enseñarnos a encarar las adversidades de la vida, por transmitirnos sus valores, sus principios y la perseverancia pero sobre todo su amor sin pedir nada a cambio.

A nuestros hermanos que de alguna otra forma nos dieron una palabra de aliento para concluir la tesis.

A todos ellos,

Gracias de todo corazón.



Agradecimiento

Primero y como mas importante, agradecemos sinceramente a nuestro tutor de tesis Msc. Fabio Pallavicini , su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para nuestra formación.

A nuestros profesores del departamento de Química que de una u otra manera también aportaron para nuestra formación.

De igual manera agradecer a todas aquellas personas que trabajan en la facultad, su trato humano y su visión critica de la vida cotidiana.

Para ellos ,

Gracias por todo.



I. RESUMEN.

En el presente trabajo se realizó las pruebas que se recomienda para la calibración del espectrofotómetro SHIMADZU ubicado en el laboratorio de análisis instrumental y se les realizó las siguientes pruebas al equipo: exactitud y repetibilidad espectral, exactitud y repetibilidad fotométrica, linealidad, luz difusa, ruido, estabilidad, resolución y la evaluación de la incertidumbre.

Para la evaluación de la exactitud espectral se utilizó una solución de Dicromato de potasio y un filtro de vidrio de oxido de Holmio. Para la solución de Dicromato en medio ácido se obtuvo valores de sesgo menores de 1 nm (especificaciones), con valores de repetibilidad bajos se obtuvo muy buena exactitud espectral y repetibilidad, no así cuando se utilizó el filtro de oxido de Holmio en el cual se obtuvo valores de sesgo mayores de 1nm en algunos picos característicos.

En el caso de la exactitud fotométrica se utilizó cuatro diferentes tipos de filtros los cuales fueron: filtro blanco al 50% T, filtro amarillo al 50% T, filtro blanco al 10%T y filtro amarillo al 10%T. una vez realizada las lecturas de los mismos se comparó el valor experimental con sus valores de referencias y se demostró que los valores no presentaron diferencias significativas y en todos los casos el valor del sesgo fue menores de ± 0.005 , que son las especificaciones del instrumento.

En la evaluación de la linealidad se prepararon seis soluciones de Dicromato de potasio en un rango de 20 ppm a 100 ppm, se les realizó la lectura a cada uno de ellos y de los resultados se obtuvo un coeficiente de regresión de 0.999, lo cual nos demuestra la excelente relación entre la absorbancia y la concentración.



Para las pruebas de estabilidad, ruido, ambas nos reportaron valores menores que las especificaciones y en la luz difusa se utilizó dos filtros a 340 y 400 nm y en ambos se reportó valores de absorbancia mayores de dos.

Para verificar la resolución se utilizó una solución de tolueno en hexano, el valor obtenido fue de 1.14 menor que el de las especificaciones del instrumento de 1.5.

Por último se evaluó la incertidumbre de la medición, para ello se utilizó una muestra preparada en el laboratorio que se sabe contenía Dicromato de potasio, este se evaluó de acuerdo al ISO GUM ^[1].



II. INTRODUCCION.

La metrología es el campo del conocimiento relativo a las mediciones, siendo sus principales temas de estudio las unidades de medida y sus patrones, la medición, los instrumentos de medición y aquellas cualidades referidas a la ejecución de las mediciones, de acuerdo con esto se puede decir que la metrología en química es el campo del conocimiento relativo a las mediciones químicas.

En todo laboratorio se realizan diferentes tipos de mediciones, con diferentes instrumentos y diferentes magnitudes, pero todo este tipo de mediciones nos resulta de mucha utilidad para reportar un resultado confiable. Se realizan mediciones a muestra que se desean cuantificar, estándares, patrones de referencia cada uno de ellos con un fin determinado pero que todos nos conllevan asegurar la calidad de los resultados.

Con el fin de reportar un resultados veraz y confiable , se debe tener la certeza de tener un equipo que realice las mediciones correctas y para verificar la buena medición debemos realizar mediciones con patrones internos del laboratorio o patrones de referencias trazables a un organismo que son ampliamente utilizados para las calibraciones de los equipos, la cual su importancia reside en darnos una fotografía instantánea de la situación de nuestro equipo a partir de las cuales podemos efectuar las correcciones necesarias para asegurar su correcto funcionamiento.^[2]

Como consecuencia del proceso de calibración se obtiene una información de la medida actual del equipo, es decir un diagnostico del instrumento, que garantiza la comparación de cuatro parámetros esenciales:

Comparación entre la mediad del equipo y el valor del patrón, incertidumbre, trazabilidad y la evaluación final de los resultados de la calibración.



En la espectrofotometría, la cual es una técnica muy utilizada en química analítica se realiza la medición debido a la interacción de la energía con la materia y lo que se interpreta es la relación de intensidad de energía inicial y la intensidad final una vez que ha interactuado con la misma. Al igual que todos los instrumentos de medición de los laboratorios, el espectrofotómetro necesita la confirmación metrológica del mismo y esto se realiza mediante la comparación de estas características metrológicas con las especificaciones del espectrofotómetro.^[3,4] En la medición por espectrofotometría pueden influir muchos factores en la medición los cuales podrían ser debido al factor: ruido, estabilidad, linealidad, variación de la longitud de onda, repetibilidad fotométrica, luz difusa etc. Para cada uno de ellos se debe tener un material de referencia certificado y así poder compararla con las especificaciones para verificar el buen desempeño del equipo o en todo caso el laboratorio debe contratar un organismo que realice calibraciones a los espectrofotómetros. Sin embargo en Nicaragua no existen laboratorios dedicados a las calibraciones de equipos utilizados en química y de aquí la importancia de poder realizar las calibraciones el mismo laboratorio que realiza los análisis.

Debido a que no se cuenta con laboratorios que presten el servicio de calibración y que las mismas calibraciones son realizadas por el mismo laboratorio con los materiales que se encuentran disponibles, nosotros nos hemos planteado en el siguiente estudio realizar algunas pruebas necesarias para la calibración de un espectrofotómetro verificando todos los posibles factores que podrían afectar la medición de los resultados para ello contamos con filtros de densidad óptica trazables a la NIST y las sustancias disponibles en nuestro laboratorio. Todo esto con el fin de poder identificar estos posibles factores y al mismo tiempo evaluar la incertidumbre de la medición espectrofotométrica.



III. OBJETIVOS.

Objetivo General:

- Realizar algunas pruebas recomendadas para la calibración de un espectrofotómetro utilizando patrones de referencias y evaluar la Incertidumbre.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la exactitud espectral y fotométrica de un espectrofotómetro utilizando materiales de referencia.
- Evaluar la linealidad de la respuesta de un espectrofotómetro.
- Evaluar la eficiencia de un espectrofotómetro a través de : resolución, luz difusa, ruido, estabilidad.
- Evaluar la incertidumbre de la medición en un espectrofotómetro.



IV. MARCO TEÓRICO.

IV.1 Metrología Química.

La Metrología es la ciencia de las medidas. Sus elementos claves son: El establecimiento de estándares de medición que sean internacionalmente aceptados y definidos, el uso de equipo de medición para correlacionar la extensión que los datos del producto y proceso están conforme a especificaciones y la calibración regular de equipos de medición, rastreables a estándares internacionales establecidos.^[5]

En cualquier ámbito que se considere, medir es siempre comparar respecto a patrones o materiales de referencia. Este es el principio fundamental de la metrología, de aplicación en cualquier situación. Se pueden distinguir tres ámbitos claramente diferentes de medidas físicas, químicas y biológicas. En cualquier caso, el objeto de las medidas son las muestras.

La metrología química tiene una relación muy directa con la química analítica porque proporciona las herramientas adecuadas para medir y establecer las formas correctas de aplicarlas para obtener resultados representativos de las muestras.

En la figura N° 1 se recopilan de forma resumida las implicaciones que tiene la metrología en química atendiendo a los fundamentos básicos, las herramientas metrológicas necesarias y las actividades básicas que se precisan. Trazabilidad e incertidumbre son los fundamentos básicos y totalmente generales de la metrología, siempre implícitos en cualquier medida y resultado. El propio analista (entrenado adecuadamente y cualificado) es un primer factor que no se puede ignorar. Los patrones y métodos analíticos constituyen herramientas de trabajo indispensables. La estadística y la Quimiometría representan una ayuda inestimable para el tratamiento de los resultados de las medidas. Finalmente, es necesaria una serie sistemática de actividades para producir el resultado del análisis. Empiezan con la definición correcta de la información que se solicita y su traducción analítica. A continuación, el muestreo, el calibrado de todos los equipos implicados y la validación del proceso en su conjunto preceden el análisis propiamente dicho.^[6]

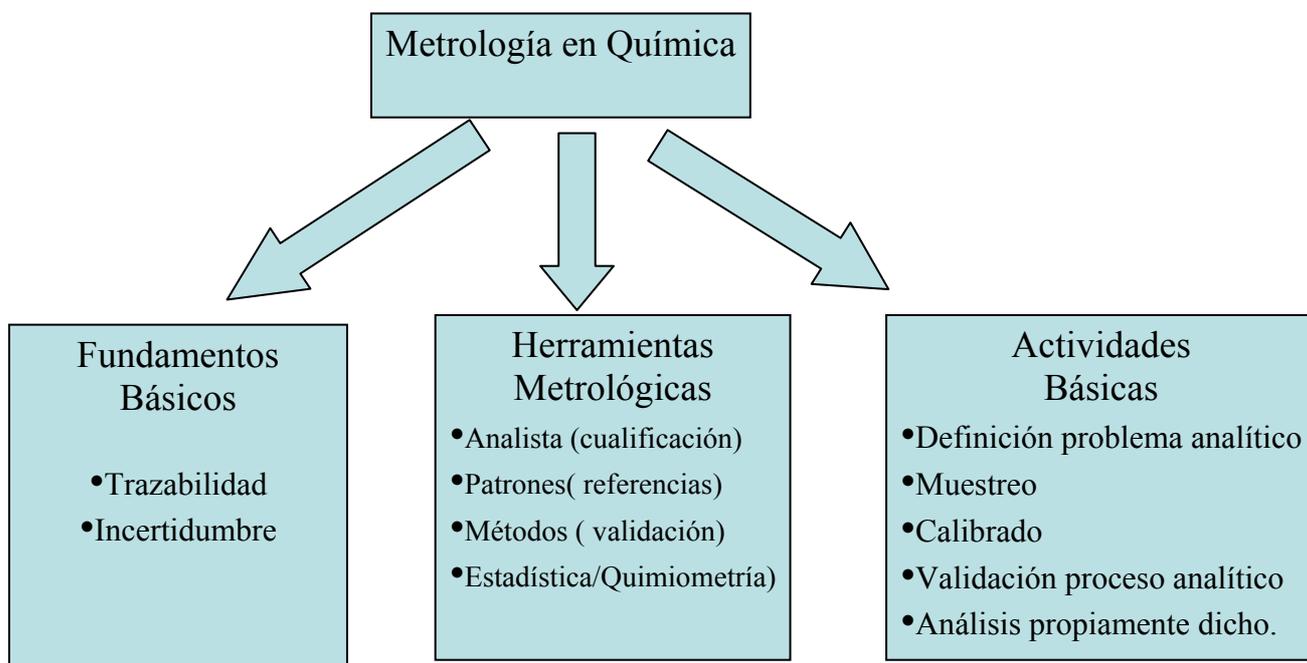


Figura N° 1. Aspectos básicos de la metrología en química.

Estas actividades metrológicas se implementan en el laboratorio a través del denominado proceso analítico, entendido como el conjunto de etapas y sub.-etapas que relacionan un problema con sus resultados correspondientes. Como el objetivo es resolver problemas que plantean el cliente o la sociedad, se empieza con un planteamiento analítico de dicho problema, seguido de la selección (y en su caso optimización) de un método analítico cuyas características permitan llevarlo a cabo y obtener el tipo de información adecuada para su resolución. El objetivo será la identificación o determinación de uno o varios parámetros mediante la implementación de tres grandes etapas: las denominadas operaciones previas, la medición y la transducción de las señales analíticas y la adquisición y tratamientos de datos para generar los resultados. ^[6]



Por otra parte, la Metrología es parte fundamental de lo que en los países industrializados se conoce como "Infraestructura Nacional de la Calidad" compuesta además por las actividades de: normalización, ensayos, certificación y acreditación, que a su vez son dependientes de las actividades metrológicas que aseguran la exactitud de las mediciones que se efectúan en los ensayos, cuyos resultados son la evidencia para las certificaciones. La metrología permite asegurar la comparabilidad internacional de las mediciones y por tanto la intercambiabilidad de los productos a nivel internacional.^[7]

El desarrollo de la metrología proporciona múltiples beneficios al mundo industrial, como veremos a continuación:

- Promueve el desarrollo de un sistema armonizado de medidas, análisis, ensayos exactos, necesarios para que la industria sea competitiva.
- Facilita a la industria las herramientas de medida necesarias para la investigación y desarrollo de campos determinados y para definir y controlar mejor la calidad de los productos.
- Perfecciona los métodos y medios de medición.
- Facilita el intercambio de información científica y técnica.
- Posibilita una mayor normalización internacional de productos en general, maquinaria, equipos y medios de medición.



IV.2 Importancia de la metrología en el comercio internacional.

La metrología es decisiva en el comercio internacional debido a que proporciona los medios técnicos necesarios para asegurar medidas correctas, mediante la implementación de un sistema armonizado de medición compuesto por el Sistema Internacional de Unidades (S.I.U), la exactitud de los instrumentos de medidas cumpliendo con normas internacionales (como las recomendaciones de la OIML) y los métodos y procedimientos validados.^[7]

IV.1.2 Trazabilidad de las mediciones.

El Vocabulario Internacional sobre Metrología, VIM (ISO, 1993) define la trazabilidad como “ la propiedad del resultado de una medida o del valor de un patrón mediante la cual puede relacionarse con referencias establecidas , normalmente patrones nacionales o internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones cada una de las cuales con el valor de su incertidumbre asociada”.^[8]

La trazabilidad de los resultados analíticos, obtenidos mediante la aplicación del proceso analítico en cuestión, se consigue mediante el empleo de patrones adecuados, la calibración de los equipos implicados en dicho proceso y, finalmente, mediante la validación del conjunto del proceso analítico.

El propósito de que los resultados de medición tengan trazabilidad es asegurar que la confiabilidad de los mismos, expresada cuantitativamente por la incertidumbre asociada a ellos, se conozca en términos de confiabilidad que poseen los patrones nacionales o internacionales de medición referidos como el origen de la trazabilidad para tales mediciones.

La ISO 9000:2000 (UNE, 2000a)^[9] y con los principios de garantía de la calidad establecen que los instrumentos de medición deben ser calibrados regularmente con patrones rastreables al método definitivo. Este método tiene que proporcionar resultados caracterizados por su trazabilidad.



El NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) ofrece mas de 1200 SRM (Materiales Estándares de Referencia) diferentes que se certifican por sus propiedades químicas o físicas.

El procedimiento de preparación, que debe ser estrictamente seguido, se describe en los certificados que acompañan a los SRM. ^[10]

Los SRM se usan para tres propósitos principales:

- Para ayudar a desarrollar métodos de análisis precisos.
- Para calibrar sistemas de mediciones
- para garantizar que los programas de certificación de calidad de las mediciones sean adecuadas.

En ciencia y tecnología la palabra inglesa “Standard” se utiliza con dos significados diferentes; como una norma técnica escrita ampliamente adoptada, especificación, recomendación técnica o documento similar y también como un patrón de medición

Tipos de patrones de medición.

- **Patrón Primario.**

Patrón que es designado o ampliamente reconocido como poseedor de las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor se acepta sin referirse a otros patrones de la misma magnitud.

- **Patrón Secundario.**

Patrón cuyo valor se asigna por la comparación con un patrón primario de la misma magnitud, normalmente los patrones primarios son utilizados para calibrar patrones secundarios.

Los materiales de referencia son definidos por la Guía ISO 30^[11] como “Material en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos,



Para ser utilizadas para la calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.”(ISO 1992).

La Guía ISO 30 define los materiales de referencia certificados (MRC) como “Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o mas valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en la que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.”^[11]

Los requisitos fundamentales de los materiales de referencia ^[11] son:

Homogeneidad:

Debe asegurarse que los valores que se determinan en una muestra de un lote se puedan aplicar a cualquier otra muestra, dentro de los límites de incertidumbre indicados.

Estabilidad:

Debe asegurarse la estabilidad en todo el periodo de validez del MRC. Las condiciones de conservación y de utilización, deben estar bien definidas con el fin de asegurar la estabilidad.

Exactitud y trazabilidad de los valores certificado:

Los materiales de referencia certificado se usan mayoritariamente para validar métodos analíticos, verificar los resultados o calibrar instrumentos. Para estas aplicaciones la exactitud y la trazabilidad de los valores certificados son exigencias básicas.

Incertidumbre de los valores certificados:

Cualquier valor de referencia debe ir acompañado de su nivel de variabilidad. Por tanto, es un requisito básico que en los certificados que acompañan a los MRC aparezcan las incertidumbres correspondientes a cada parámetro.



IV.2 ESPECTROFOTOMETRIA.

IV.2.1 Generalidades del espectrofotómetro.

Los espectrofotómetros UV-VIS son instrumentos de laboratorio utilizados para análisis cualitativos y cuantitativos de compuestos químicos, estas técnicas de análisis tienen gran importancia para los diferentes sectores de la industria, estas industrias son: química, petroquímica, farmacéutica, entre muchas otras. ^[2]

Una de las principales utilidades del espectrofotómetro es que tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática (de una longitud de onda particular) a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Como también la relación de la intensidad del color en una muestra y su relación a la cantidad de soluto dentro de la misma.

IV.2.2 Fundamento de la Espectrofotometría.

La espectrofotometría UV- Visible es una técnica de medición de concentración de masa de elementos y compuestos químicos, como principio es la interacción entre la energía electromagnética con la materia.

La espectrofotometría se fundamenta en medir la radiación monocromática absorbida por un elemento o molécula causante de desplazamientos electrónicos a capa superiores, estas transiciones determinan la región del espectro en la que tiene lugar la absorción.

La ley Fundamental en que se basa los métodos espectrofotométricos es la ley de Lambert – Beer en el cual establece que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración y el camino óptico. La cual se puede expresar en la siguiente formula:



$$A = \epsilon l C \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde

A: absorbancia.

l: camino óptico

ϵ : Coeficiente de absortividad molar.

C: concentración.

Esta ley es de mucha utilidad para la cuantificación de determinado analito en una muestra. En el grafico se puede observar la relación lineal de la absorbancia y de la concentración a un camino óptico constante. [3]

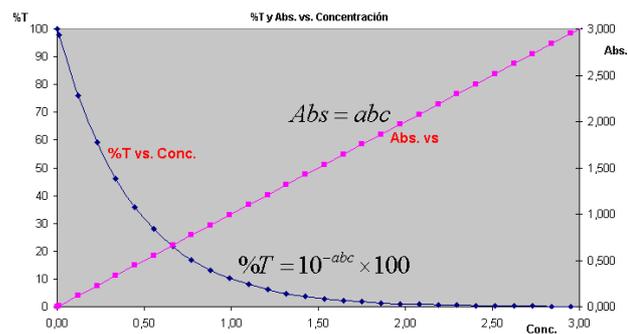


Gráfico N°1. % de Transmitancia y Absorbancia VS. Concentración

Esta ley se ve alterada cuando ocurren algunos errores en el análisis al utilizar esta técnica las cuales se conocen como desviaciones de la ley de Lambert – Beer y estas desviaciones pueden ocurrir debido a:

Limitaciones fundamentales: Es una ley limitante solo para concentraciones bajas de analitos menores de 0.01M. A concentraciones muy altas las especies absorbentes pierden su independencia, esto es al aproximarse demasiado las moléculas interaccionan entre sí provocando que cambien sus propiedades eléctricas.



Interferencias químicas: La cuales se producen como consecuencia de la asociación, disociación o reacción de las especies de interés, estas presentan una dependencia fundamentalmente del pH de la solución, de la cantidad de concentración del complejante y del Buffer, en fin todos los factores que pudieran afectar el equilibrio de la reacción.

Interferencias espectrales: la cual es debido a la radiación no monocromática, es decir no se emite una sola longitud de onda, para que se cumpla debe existir un solo coeficiente de absorptividad en el intervalo de $\lambda \pm \Delta\lambda$.

Interferencias instrumentales: provocado por errores de lectura que siempre se producen pero se hacen mas graves a valores pequeños o muy grandes de absorbancias. También es provocada por la radiación parásita la cual es aquella que llega al detector y no procede de la muestra, esta se agrava más a valores altos de absorbancias y es provocada por polvos, por reflexiones o por defectos del sistema óptico.

La presencia de cualquiera de estas interferencias provocaría automáticamente un error en el análisis que se estuviera realizando, de ahí la importancia de minimizar cualquier tipo de interferencia. ^[3]

IV.2.3 Componentes de un espectrofotómetro. ^[3]

Los componentes principales de un espectrómetro son:

- Fuente de radiación (Fuente de luz)
- Selector de longitud de onda (Monocromador)
- Recipiente de la muestra (Cubeta de muestra)
- Detector (Foto multiplicador)
- Amplificador de la señal
- Dispositivo de lectura (Ordenador)

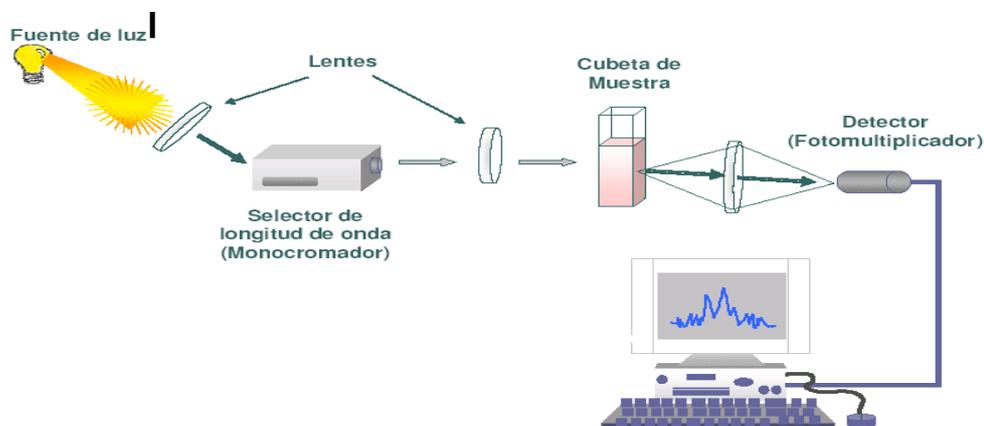


Figura N° 2. Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro UV-VIS.

IV.2.3.1 Fuente de luz.

La fuente de luz ilumina la muestra. Las condiciones necesarias de la fuente son estabilidad, direccionalidad, distribución de energía espectral continua y larga vida. Las fuentes empleadas en los espectrofotómetros son lámparas de tungsteno de bajo voltaje, lámpara tungsteno-halógena o lámpara de pulso/arco de xenón.

Utilidad: Región del visible al infrarrojo. 320 – 2500 nm .

IV.2.3.2 Selectores de longitudes de onda. (Monocromador)

Se necesita una radiación constituida por un grupo limitado, estrecho y continuo de longitudes de onda denominadas bandas.

Una anchura de banda estrecha aumenta la resolución.

Como regla general el ancho de media banda instrumental debe ser como máximo $\frac{1}{10}$ del ancho de media banda espectral de la banda de absorción a medir



IV.2.3.3 Recipiente de la muestra. (Cubeta de muestra)

Es el camino óptico que atraviesa la radiación electromagnética, los recipientes de la muestra tienen medidas de 0.5 a 5 cm., sus formas pueden ser rectangulares y cilíndricas, el material del que están elaborados varían dependiendo de la región del espectro electromagnético en el cual serán utilizadas, así podemos encontrar para la región Ultra violeta: Cuarzo o sílice fundida, para la región Visible: Cuarzo, sílice fundida, plástico y para Infrarrojo: cristales de sal (KCl, KBr).

IV.2.3.4 Detectores (Fotomultiplicador)

Los detectores son transductores que convierten la energía radiante en señal eléctrica. La propiedad general de los detectores es su capacidad de producir una señal eléctrica cuando son bombardeados por fotones.

Características:

Tiempo de respuesta pequeños.

Estabilidad.

Posibilidad de ampliación de la señal.

Elevada Sensibilidad.

Elevada relación Señal / ruido.

Señal proporcional a la concentración



IV.3 Calibración y/o verificación de la eficiencia de un Espectrofotómetro UV/VIS.

El objetivo de la calibración es evaluar la capacidad de medida de los instrumentos como objeto de garantizar la comparabilidad de los resultados con los obtenidos por otros laboratorios.

El vocabulario internacional de términos fundamentales y generales de metrología (Iso, 1993) define así la calibración: “Conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esta magnitud realizados por patrones”

Existen varias pruebas para calibrar un espectrofotómetro ultra violeta visible, estas incluyen la exactitud, reproducibilidad de la longitud de onda, y la exactitud y la reproducibilidad fotométrica. Las pruebas se presentan en la siguiente lista ^[12]:

Tabla N°1 Pruebas de rendimiento del espectrofotómetro UV-VIS.

Pruebas	Estándar utilizado
Exactitud de longitud de onda o exactitud espectral	Lámpara de Deuterio
	Lámpara de vapor de mercurio
	Filtro de óxido de Holmio
	Filtro de Didymio
	Oxido de Holmio en ácido perclórico
Reproducibilidad de la longitud de onda	Solución de dicromato de potasio (350 y 257 nm).
Luz difusa	Solución de cloruro de potasio (200 nm)
	Solución de yoduro de potasio (220 nm)
Resolución	Solución de tolueno en hexano
Exactitud fotométrica	Filtros de vidrio de densidad neutra
	Filtros de metales en cuarzo
	Solución de dicromato de potasio
Reproducibilidad fotométrica	Solución de dicromato de potasio
Ruido	Barrido espectral del aire (500 nm).
Línea de base	Barrido de aire en modo de absorbancia.
Estabilidad	Barrido del aire por 60 min. A 340 nm.
Linealidad	Solución de dicromato de potasio en ácido.



IV.3.1 Exactitud de longitud de onda (espectral).

Es definida como la desviación de la longitud de onda leída a una banda de absorción o emisión de una banda de longitud de onda conocida. Esta desviación puede ser causas de errores significantes en las medidas de los análisis cualitativos y cuantitativos.

La exactitud de longitud de onda es determinada por comparación entre las medidas obtenidas de un material de referencia y el valor estándar establecido en el certificado del material de referencia. Entre los materiales de referencias utilizados tenemos un material óptico neutro el cual tiene poca dependencia de la longitud de onda para las transmitancias o absorbancias es deseable porque este elimina la dependencia del ancho de banda espectral de las mediciones.

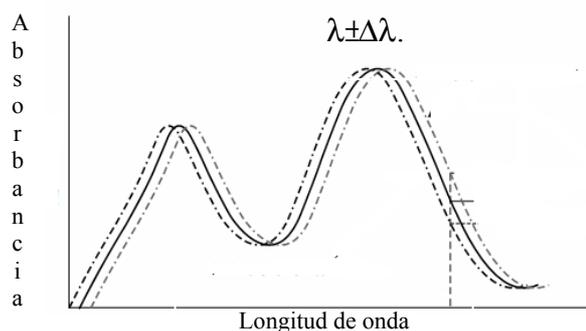


Gráfico N°2. Efecto de la exactitud de longitud de onda en una medición UV-VIS.

Prueba:

La exactitud de la longitud de onda se verifica midiendo un estándar de referencia de longitud de onda conocida, con picos de absorción o emisión bien caracterizado y comparando la longitud de onda del pico registrado contra el valor de longitud de onda declarado en el certificado del estándar de referencia. Hay muchos estándares que son comúnmente usados para verificar la exactitud de un espectrofotómetro dentro de estos tenemos:



Lámpara de Deuterio, Lámpara de vapor de mercurio, filtro de oxido de Holmio y solución de oxido de Holmio (4 % de oxido de Holmio en 10 % de ácido perclórico en una celda de 1 cm).

Criterio de aceptación: ± 1 nm en el rango ultra violeta (200 – 380 nm).

± 3 nm en el rango visible (380 – 800 nm).

Tres lecturas del pico deben estar entre ± 0.5 nm.

Tabla N° 2. Ventajas y desventajas de los estándares de referencia.

Estandar de longitud de onda	Ventajas	Desventajas
Líneas de emisión de Lámpara de Deuterio.	Presentes en la fuente de luz UV.	Limitado para longitud de onda visible (486.0 y 656.1nm).
Líneas de Emisión de Lámpara de Vapor de Mercurio.	Líneas espectrales agudas cubren las regiones uv y vis.	No es comúnmente built en los instrumentos.
Filtros de oxido de holmium De Didymium.	Fácil de usar, disponible como material estándar de referencia de la NIST.	Filtros de vidrios absorben fuertemente debajo de 300 nm . Limitado principalmente a las regiones visibles 280 – 640 nm. Salto de líneas espectrales. Requiere recertificación cada 2 años.
Solución al 4 % de óxido de Holmium en ácido perclorico al 10 %.	Cubre ambos zonas espectrales uv – vis. Requiere recertificación cada ocho años.	Depende de la resolución del instrumento. Solución corrosiva.

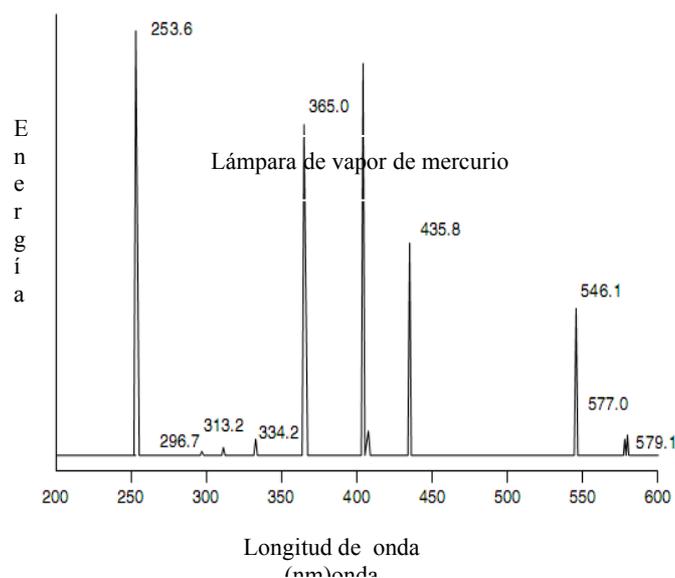
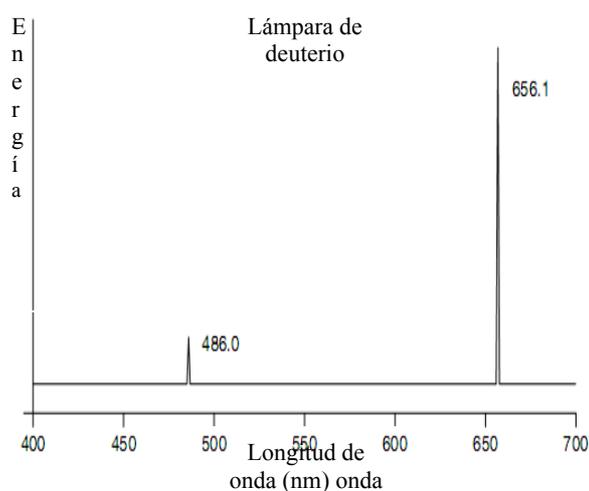




Gráfico N°3. Espectro de emisión de lámpara de deuterio.

Gráfico N° 4. Espectro de emisión de Lámpara de vapor de mercurio.

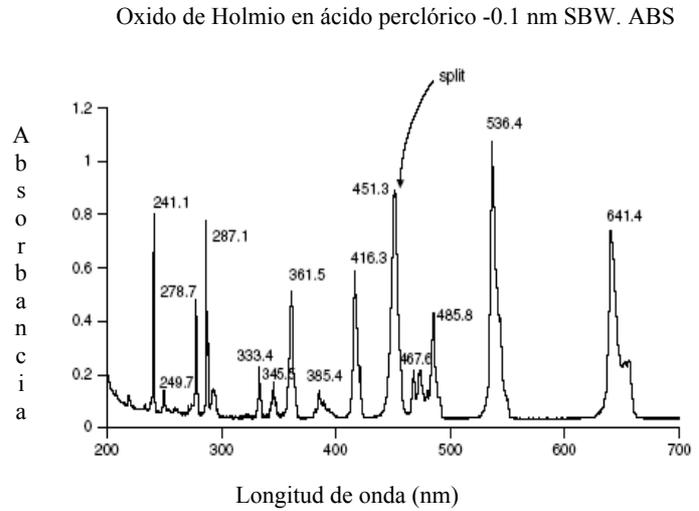
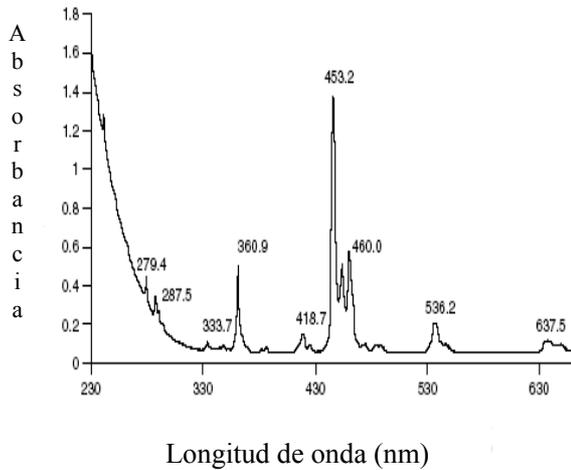


Gráfico N°5. Espectro de absorción del filtro de Oxido de Holmio.

Gráfico N°6. Espectro de absorción de la solución de oxido de Holmio.

IV.3.2 Luz difusa.

La luz difusa puede tener varios orígenes: luz de órdenes superiores de la red de difracción, reflexiones internas en el monocromador, en los montajes de componentes ópticos y en superficies ópticas deterioradas, luz dispersada por partículas de polvo flotando en el camino óptico.

La luz difusa causa una disminución de absorbancia y reduce el rango lineal del instrumento. Las absorbancias altas se ven más afectadas por la luz difusa. Las absorbancias entre 0.3 y 1 son menos susceptibles a la luz difusa y los problemas de ruido.

Prueba:

Se pueden utilizar varios filtros o soluciones. Las soluciones pueden ser KCl, NaI y NaNO₂ medidas a 200, 220 y 340 nm respectivamente. Para el barrido se utiliza como referencia el aire.



Criterio de aceptación:

La transmitancia de la solución en una celda de 1 cm debe ser menor de 0.01, o el valor de absorbancia debe ser mayor de 2.

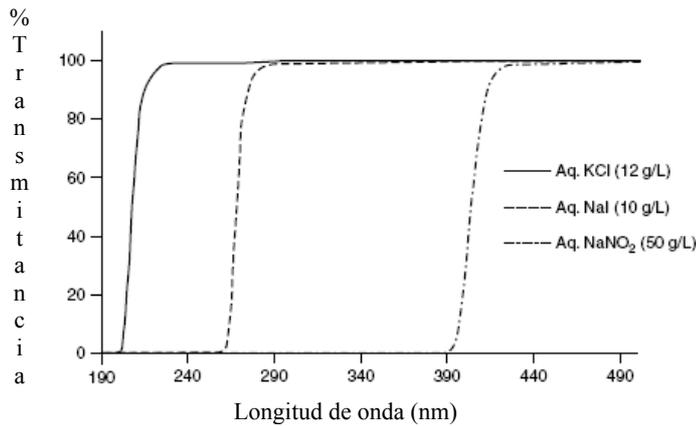


Gráfico N° 7. Efecto de la luz difusa en las mediciones de absorbancia

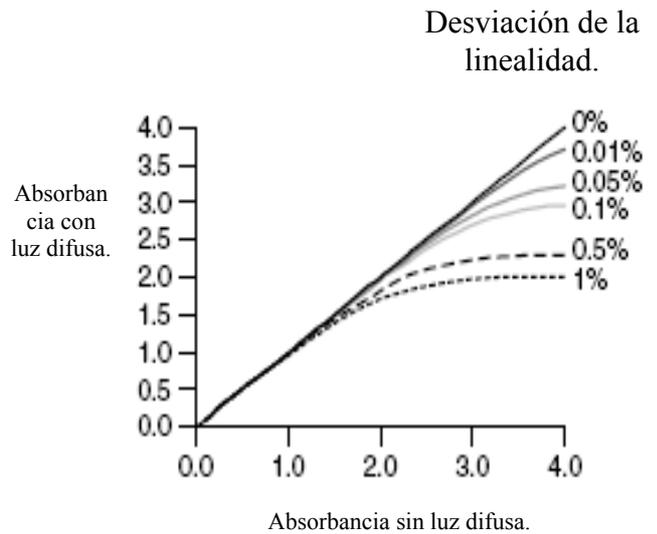


Gráfico N° 8. Mediciones de luz difusa

IV.3.3 Resolución.

La resolución de un espectrofotómetro UV- VIS está relacionada con el ancho de banda espectral, un pico fino proporciona una buena resolución. El ancho de banda espectral depende del ancho de ranura y del poder dispersivo del monocromador. Únicamente los espectrofotómetros diseñados para una resolución de trabajo tienen un ancho de ranura variable. Los espectrofotómetros para análisis de rutina usualmente tienen un ancho de ranura fijo. Para instrumentos con arreglo de diodo la resolución también depende del número de diodo en el arreglo.

Prueba:



Una mezcla de Tolueno al 0.02 % (v/v) en hexano es usado para probar el poder de resolución del espectrofotómetro. El espectro es corrido y se registran los valores a longitudes de ondas máximas y mínimas (269 nm y 266 nm)

Criterio de aceptación: La relación de la Absorbancia máxima a la longitud de onda máxima (269nm) y la absorbancia a la longitud de onda mínima (266 nm) debe ser mayor de 1.5.

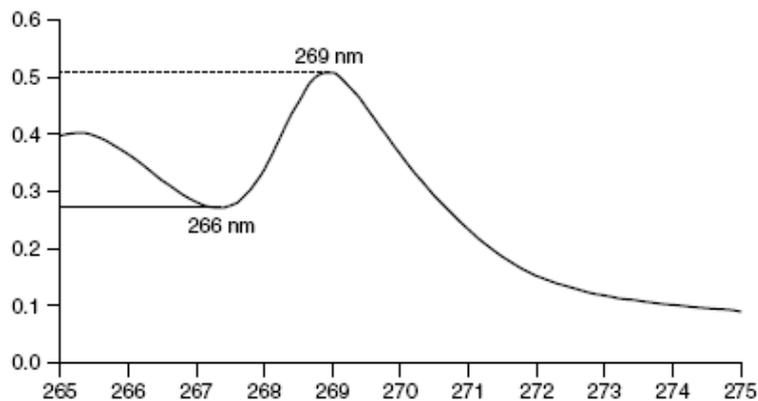


Gráfico N°9. Verificación de la resolución: Espectro de una solución de tolueno al 0.02%(v/v).

IV.3.4 Ruido

Son originados principalmente de las fuentes de luz y los componentes electrónicos.

El ruido debido al fotón de la fuente de luz afecta la exactitud de las mediciones.

Los ruidos electrónicos provenientes de los componentes eléctricos afectan la exactitud de las mediciones de las absorbancias grandes.

Un alto nivel de ruido afecta la precisión de las mediciones y reduce el límite de detección provocando una menor sensibilidad del instrumento.

Prueba:



El aire es barrido en el modo de absorbancia por 10 minutos, el ruido de pico a pico es registrado a 500 nm. Se calcula la raíz cuadrada del promedio del ruido la cual es una medida de la desviación estándar de la señal de ruido de fondo. Los equipos modernos están usualmente equipados con una función que estima el ruido.

Para los espectrofotómetros viejos la raíz cuadrada del promedio puede ser estimada multiplicando el ruido más alto por un factor de 0.7.

Criterio de aceptación: La raíz cuadrada del promedio debe ser típicamente menor que 0.001 UA

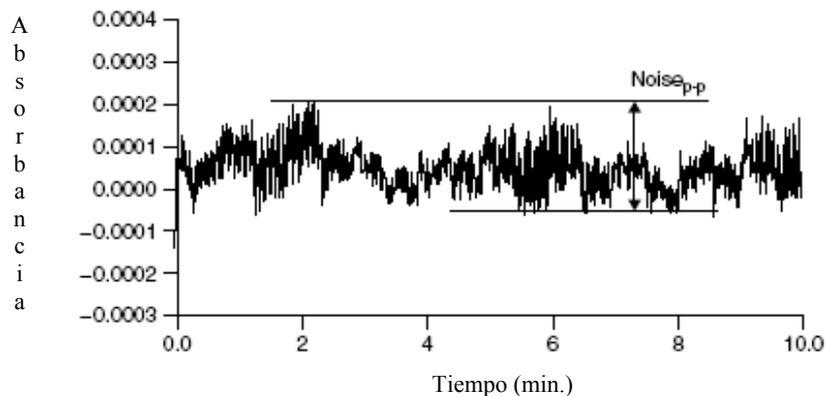


Gráfico N°10. Medida del ruido.

IV.3.5 Línea de base Flatness.

La intensidad de la radiación de la fuente de luz varía según la zona del espectro UV-VIS esto es debido a la presencia del cambio de fuente de energía ya sea de la lámpara de Deuterio a lámpara de Tungsteno.

La prueba de la línea de base Flatness demuestra la capacidad del instrumento de normalizar la medida de la intensidad de la luz y la salida espectral a diferentes longitudes de ondas a través de un rango espectral.

Prueba:



El aire es barrido en el modo de absorbancia, se registra la deflección más alta y más baja en unidades de absorbancia

Criterio de aceptación: La deflexión es típicamente menor de 0.01 UA.

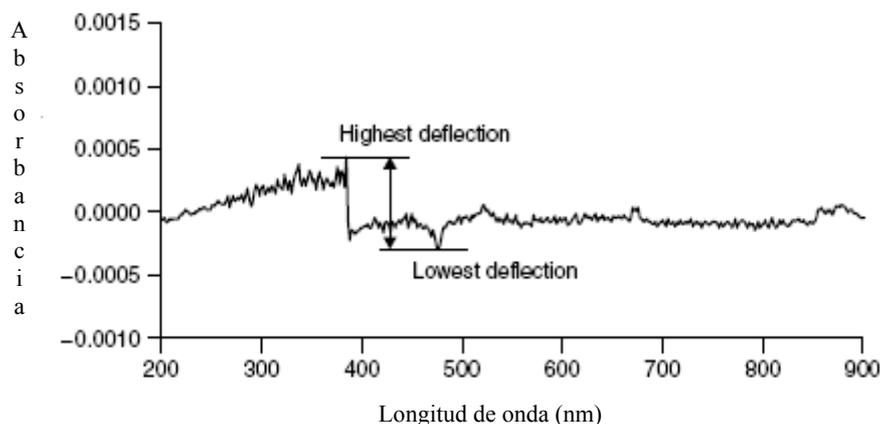


Gráfico N° 11. Línea de base.

IV.3.6 Estabilidad

Las variaciones en la intensidad de la lámpara y las salidas electrónicas entre las mediciones de las referencias y las muestras dan como resultado un instrumento fluctuante.

La intensidad de la lámpara es una función del tiempo de uso de la lámpara, fluctuaciones de la temperatura y la longitud de onda de la medición.

Prueba:

El chequeo se realiza realizando un barrido con aire en modo de absorbancia por un período de 60 minutos a una longitud de onda específica. (Típicamente a 340 nm).

Las deflecciones se registran más altas y más bajas en unidades de absorbancia.

Criterio de aceptación: La deflexión es típicamente menor de 0.02 UA/h.

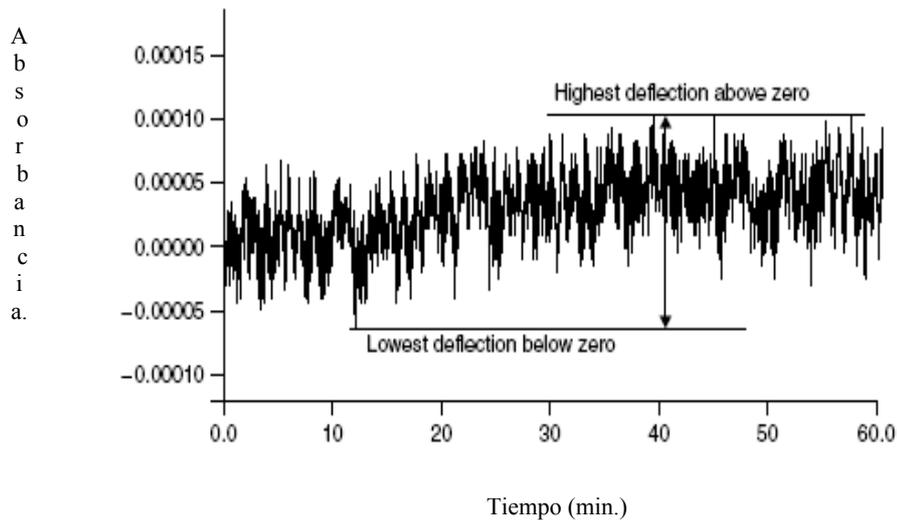


Gráfico N°12. Estabilidad del sistema.

IV.3.7 Exactitud fotométrica.

La exactitud fotométrica es determinada comparando la diferencia entre la absorbancia medida del material estándar de referencia y el valor estándar establecido.

Entre los materiales de referencia utilizados tenemos un material óptico neutro el cual tiene poca tendencia de la longitud de onda para la transmitancia o absorbancias es deseable porque este elimina la dependencia del ancho de banda espectral de las mediciones.

Prueba:

Cualquier filtro de densidad óptica neutra o una solución de Dicromato de potasio pueden ser usados.

Filtro de densidad neutral: Filtro de referencia al vacío y donde los filtros a varios valores de transmitancia a 440, 465, 546.1, 590 y 635nm son leídos. Se compara estos resultados con los valores certificados.



Solución de Dicromato de potasio: 0.06 g de Dicromato por Kg. de solvente es preparado en ácido perclórico 0.01N. Se realizan las lecturas para la solución de Dicromato de potasio a 235, 257, 313 y 350 nm.

Criterio de aceptación: Exactitud típica de ± 0.01 o rango de valores de absorbancia específicas.

IV.3.8 Linealidad.

El rango dinámico lineal de las mediciones está limitado por la luz difusa a grandes valores de absorbancia y por el ruido a bajos valores de absorbancia.

Prueba:

Una serie de soluciones de Dicromato de potasio a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg / L en ácido sulfúrico 0.005 M son utilizadas para realizar la prueba de la linealidad. Los valores de absorbancia y las concentraciones son barridas o leídas a las longitudes de onda de 235, 257, 313 y 350 nm.

Se grafican las absorbancias a las diferentes longitudes de onda contra las concentraciones de las soluciones y se calcula el coeficiente de correlación.

Criterio de aceptación: Coeficiente de correlación mayor o igual a 0.999.



IV.4 Evaluación de la Incertidumbre.

La ISO, en colaboración con otros organismos (BIPM... etc.) ^[13] define la incertidumbre como el intervalo dentro del cual se espera encontrar el valor real de aquello que se mide.

La incertidumbre se expresa como un intervalo y engloba tanto errores aleatorios como sistemáticos.

Independientemente de las fuentes de las incertidumbres, hay dos aproximaciones para estimarlas; Incertidumbre del tipo A y del tipo B.

IV.4.1 Incertidumbre tipo A:

Método de evaluación de la incertidumbre mediante análisis estadístico de observaciones (generalmente utilizando la desviación estándar) obtenida en el curso de la medición.

IV.4.2 Incertidumbre tipo B:

Método de evaluación de la incertidumbre por medios distintos al análisis estadístico de observaciones u obtenidas a partir de valores “históricos”o proporcionados por el fabricante.

IV.4.3 Procedimiento general para la estimación de la Incertidumbre.

El procedimiento general para estimar la incertidumbre se presenta en la siguiente figura de acuerdo a las directrices existentes para la estimación de la incertidumbre ^[13-15]

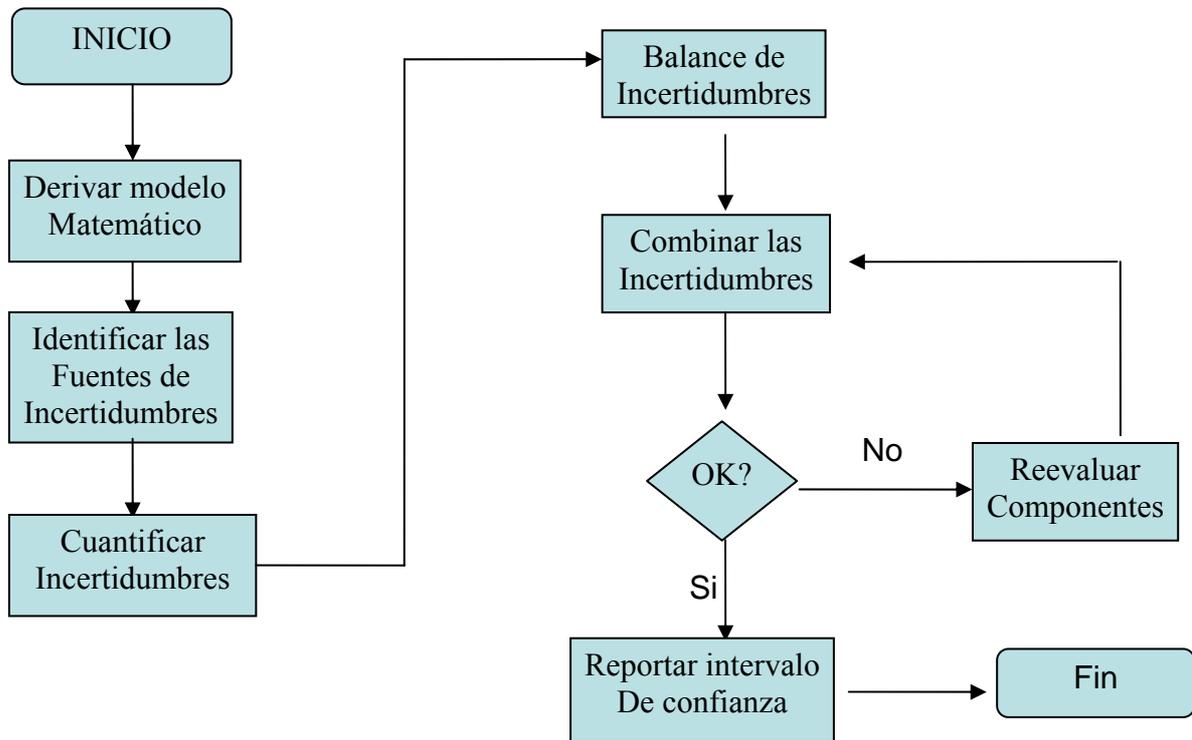


Figura3. Diagrama de flujo representando el procedimiento para la estimación de la incertidumbre.

En primer lugar se deriva el modelo matemático, se identifican las fuentes de incertidumbres (las de tipo A o las de tipo B), se cuantifican las incertidumbres, se hace un balance de las incertidumbres. Se combinan las incertidumbres a través de la ley de la propagación de la incertidumbre, se revisa si no hay incongruencia para reevaluar los componentes de la incertidumbre, se calcula el intervalo de confianza especificando el factor de cobertura y finalmente se reportan los resultados con el número de cifras significativas correcto.



IV.4.4 Incertidumbre de medición:

Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando.

La idea básica en la interpretación de la incertidumbre de una medida, es que el valor obtenido en una medición es una aproximación al valor verdadero. Es decir que todo resultado genera una duda acerca de cuán cerca está el valor hallado del verdadero, se puede pensar en una serie de valores que en conjunto representa un rango que incluye el valor verdadero de la magnitud que se está midiendo. A menor rango, mayor certeza y viceversa.

IV.4.5 Incertidumbre Estándar:

Cuando la incertidumbre se expresa como desviación estándar.

IV.4.6 Incertidumbre Estándar Combinada:

Cuando los resultados son obtenidos por combinaciones de incertidumbres estándares de otras variables, a través de la propagación de la incertidumbre.

IV.4.7 Incertidumbre Expandida:

Cantidad que define un intervalo alrededor de una medición dentro del cual puede esperarse que se encuentre una fracción grande de la distribución de valores que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando.

$$U = k \cdot u_c \quad \text{Ec. (2)}$$

Factor de cobertura.



Factor numérico usado como multiplicador de la incertidumbre normal combinada con el propósito de obtener una incertidumbre expandida. Si la función de densidad es simétrica centrada se puede estimar como:

$$k = t(\%, n) \quad \text{Ec. (3)}$$

IV.4.8 Incertidumbre estándar relativa.

Se denota por IER y se obtiene dividiendo la media de la incertidumbre combinada con respecto a la media poblacional de los factores multiplicada por 100.

$$\%IER = \bar{U} / \bar{X} * 100 \quad \text{Ec. (4)}$$



V. PARTE EXPERIMENTAL.

V.1 Reactivos

Tabla N°3. Reactivos utilizados.

Nombre.	Formula General.	Peso Molecular.	Pureza.	Casa Comercial.
n-Hexano.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	86.17 g/mol	98%	MERCK
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	98.0g/mol	95-99.9%	MERCK
Dicromato de Potasio.	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	294.18 g/mol	99.5%	MERCK
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	92.1 g/mol	99.9%	MERCK

V.2 Equipos.

Tabla N°4. Descripción de balanza analítica.

Marca	Carga Máxima.	Incertidumbre del Fabricante.	Resolución.
Sartorius (Balanza Analítica) Ac 210.	210	+/- 0.1 mg	0.5 mg
Marca	Modelo	Serie	
Shimadzu (Espectrofotómetro)	1200	530109	



V.2.1 Espectrofotómetro UV/VIS

Tabla N°5. Especificaciones del espectrofotómetro Shimadzu 1200 ^[4]

parámetros	especificaciones
Longitud de onda	200-1100 nm
Ancho de banda espectral	5 ± 0.5 nm
Escala	0.1 nm incrementos
Exactitud espectral	± 1.0 nm
Repetibilidad de la longitud de onda	± 0.3 nm (para cortas y largas longitudes de onda)
Velocidad de barrido	6000 nm/min.
Luz difusa	< 0.05%T filtro de 340 nm < 0.05%T filtro de 220 nm
Rango fotométrico	A -0.3 / 2 %T 0 /200 %
Exactitud fotométrica	± 0.005 A (a escala 1 A)
Repetibilidad fotométrica	± 0.002 A (a escala 1 A)
Deriva	Menor de ± 0.001 abs/h

V.3 Cristalería.

Tabla N°6. Descripción de cristalería.

Descripción	Marca	Clase	Tolerancia
Pipeta de 10ml	Pyrex	Clase A	+/- 0.03
Pipeta de 5ml	Pyrex	Clase A	+/- 0.02
Beaker de 50ml	Pyrex	Clase A	+/- 5%
Matraces de 100 ml	Pyrex	Clase A	+/- 0.5
Matraces de 50 ml	Pyrex	Clase A	+/- 0.5



V.4 PROCEDIMIENTO.

V.4.1 *Preparación de soluciones.*

V.4.1.1 Solución de ácido sulfúrico 0.005M.

Se midió exactamente 0.28ml de ácido sulfúrico concentrado transferirlos a un matraz volumétrico de 1L de capacidad conteniendo agua destilada.

V.4.1.2 Solución de 500ppm de dicromato de potasio.

Se pesó 0.05 g de dicromato de potasio y colocarlos en un matraz volumétrico de 100 ml de capacidad y diluir con ácido sulfúrico de 0.05 M.

V.4.1.3 Solución de Tolueno al 0.02% en Hexano.

Se midió 0.01 ml de Tolueno transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml de capacidad y diluir con hexano hasta la línea de aforo.

V.4.2 Calibración de la pipeta de 10 ml.

1. Se llenó la pipeta de 10 mL con agua destilada a temperatura ambiente, aspirando el agua (con la pro pipeta o pera de succión) hasta que el menisco se encuentre por encima de la marca de calibrado de fábrica.
2. Se Colocó el dedo índice sobre el extremo superior de la pipeta para mantener el agua en su lugar; eliminar cuidadosamente las gotas de agua que estén adheridas al exterior de la pipeta secándolas con un papel suave.
3. Se sostiene verticalmente la pipeta sobre un recipiente y se enrasó el nivel del menisco moviendo el dedo índice hasta que coincida con la marca de calibrado.



4. Se transfirió el agua a un matraz aforado de 125mL, limpio y previamente pesado, procurando que la punta de la pipeta esté dentro del matraz para evitar pérdidas por Salpicaduras; para ello aflojar el dedo índice y dejar que el agua de la pipeta escurra libremente por 20 segundos. No debe soplar para que salga la pequeña porción de agua que queda en la punta de la pipeta ya que ésta ha sido tomada en cuenta en el calibrado original de la misma.
5. Se tapó el matraz rápidamente para evitar pérdidas por evaporación y pesar su contenido.
6. Se calculó la masa de agua transferida mediante la diferencia entre este valor y el del matraz vacío.
7. Se calculó el valor del verdadero volumen transferido.
8. Luego se repitió este procedimiento 10 veces.
9. Posteriormente se calculó la diferencia entre el volumen medido y el corregido y la desviación estándar de los valores obtenidos en la repeticiones efectuadas.

V.4.3 Calibración del Matraz volumétrico de 50 ml.

1. Se Pesó un matraz aforado de 50 ml vacío, debe estar perfectamente limpio y seco.
2. Se llenó hasta la marca con agua destilada, no debe haber gotas de agua en el cuello y luego se midió la temperatura del agua con un termómetro digital.
3. Se colocó el balón lleno con agua y se obtiene su masa.
4. Después de obtener la primera medida de la masa del balón con el agua, se procede a extraer una pequeña porción del agua que esta contenida en el mismo, para lo cual se puede hacer uso de un gotero, luego esta masa se repone hasta llegar de nuevo a la marca de aforo, se coloca el balón lleno con agua en la balanza y se obtiene su masa. Toda esta operación debe repetirse por lo menos 10 veces.
5. Una vez calculados los volúmenes contenidos, se determina el valor promedio y el desvío estándar del grupo.



V.4.4 Evaluación de la exactitud espectral a partir de una celda de oxido de Holmio.

1. Se corrigió la línea de base, realizando un barrido espectral de 200-800 nm utilizando el aire como blanco.
2. Se colocó el filtro de Holmio en el camino correcto del paso óptico.
3. Se realizó el barrido espectral de 200-800 nm.
4. Se realizó el barrido espectral 10 veces.
5. Se realizó este procedimiento durante 5 días consecutivos.

V.4.5 Evaluación de la exactitud fotométrica utilizando un estándar de dicromato de potasio.

1. Se preparó 100 ml de una solución de dicromato de potasio de 500 ppm en ácido sulfúrico 0.005 M, de acuerdo a los procedimientos V.4.1.1 y V.4.1.2.
2. Se preparó una solución de 60 ppm de dicromato de potasio en ácido sulfúrico 0.005 M a partir de la solución anterior.
3. Se realizó un barrido espectral de 200-450 nm de la solución de ácido sulfúrico 0.005 M a modo de corrección de la línea base.
4. Se realizó este procedimiento durante cinco días consecutivos.

V.4.6 Evaluación de la linealidad.

1. Se seleccionó una longitud de onda nominal para el valor mayor de absorbancia (λ máx.)
2. Se preparó una serie de estándares de dicromato de potasio de: 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.
3. Se realizó las lecturas de absorbancia para cada solución.



V.4.7 Verificación de luz difusa.

1. Se seleccionó la longitud de onda de 220 nm.
2. Se seleccionó el máximo valor de %T de 100 % y el mínimo a 0%.
3. Se ajustó el cero frente al filtro de 0%.
4. Se Realizó la lectura de filtro SER-220nm.
5. Se realizó los pasos 2, 3 y 4 cinco veces.
6. Se realizó los mismo pasos anteriores pero ahora con los filtros de SER- 340 nm y el de SER-400 nm.

V.4.8 Ruido.

1. Se realizó un barrido en modo de absorbancia utilizando el aire como blanco por 10 minutos.
2. Se registró el ruido cada 10 segundos a 500 nm.

V.4.9 Estabilidad.

1. Se realizó un barrido en modo de absorbancia utilizando el aire como blanco por un periodo de 60 minutos a una longitud de onda de 340nm.
2. Se registró los valores de absorbancia cada 30 segundos.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VI.1 Evaluación de la exactitud Espectral.

Para evaluar la exactitud espectral del espectrofotómetro SHIMADZU 1200, ^[16,17] se utilizaron dos diferentes materiales de referencia: una solución de Dicromato de potasio en medio ácido preparado en el laboratorio y un filtro de vidrio de oxido de Holmio.

VI.1.1 Exactitud espectral utilizando una solución de dicromato de potasio.

Para evaluar la reproducibilidad del espectrofotómetro marca Shimadzu 1200, se utilizó una solución de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ (60ppm) ^[16,17] en medio ácido 0.005M. (H_2SO_4) Se realizó el barrido espectral y se obtuvieron dos picos máximos los cuales presentaron longitudes de onda de 350 y 257 nm .A estas longitudes de onda se les realizaron lecturas por cinco días consecutivos, por cada día se realizaron cinco replicas como se indica en el procedimiento. Esto se realizó con el fin de verificar la exactitud espectral del instrumento y comparar los valores obtenidos experimentalmente con los valores de referencia del mismo.

VI.1.1.1 Exactitud espectral a partir del pico de 350nm.

Los resultados obtenidos para la longitud de onda de máxima absorbancia a 350nm se presentan en la siguiente tabla:



Tabla No7. Resultados de la longitud de onda a 350 nm para la exactitud espectral durante cinco días consecutivos.

Réplicas	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3	DÍA 4	DÍA 5
1	351.5	349	348.5	349	351
2	350	350.5	349	351	350.5
3	350	349.5	350	350	350
4	350	350.5	350	349	350.5
5	350.5	349.5	350	349	350
Prom.	350.4	349.8	349.5	349.6	350.4
desviación	0.65	0.67	0.71	0.89	0.42

A los resultados que se muestran en la tabla N°7 se les realizó el test de Bartlett con el objetivo de evaluar la homocedasticidad de las varianzas, obteniéndose un valor del parámetro de Bartlett menor que el valor tabulado de Chi cuadrado (χ^2) ($M = 1.89 < \chi^2_{0.05} = 9.49$), por lo que se puede afirmar con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas durante los cinco días.

Con el propósito de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los promedios de los cinco días se realizó ANOVA de un factor. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla:

Tabla N° 8. Resultado de ANOVA para los promedios de los cinco días consecutivos.

Origen	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Varianza.	Razón.
Entre días	3.76	4	0.94	$F_c = 2$
Dentro de los días	9.4	20	0.47	$F(0.95) = 2.866$
total	13.16	24		



Como se puede observar en la tabla N° 8, el valor de “F” calculado fue de 2, y el valor tabulado de $F_{0,05}$ es de 2.866, entonces se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los promedios de los cinco días.

También se evaluó el sesgo espectral a esta longitud de onda para ello se utilizaron los promedios de las lecturas de longitud de onda a 350 nm durante cinco días consecutivos, los cuales se muestran en la tabla N° 7.

El sesgo espectral se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Sesgo = (\bar{X} - \mu) \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde:

μ = Es el valor de referencia reportado por la NIST el cual es de 350 nm.

X_i = Es el promedio de longitud de onda para cada día.

Para cada promedio de cada día se evaluó el sesgo y luego se graficaron, el sesgo se presenta en el siguiente gráfico:

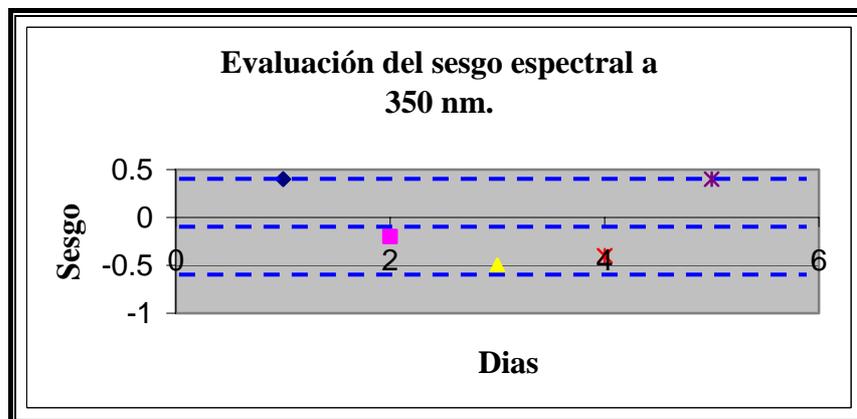


Gráfico N° 13. Evaluación del sesgo espectral a 350 nm.



Se observa que los valores obtenidos en el gráfico anterior ninguno de éstos son superiores a 1nm (especificaciones del espectrofotómetro SHIMADZU 1200). Por tanto el sesgo fotométrico a 350 nm es inferior a uno lo cual nos confirma que nuestros valores de exactitud espectral se encuentran por debajo del valor máximo permitido que es: +/- 1.0nm.

VI.1.1.2 Exactitud espectral a partir del pico de 257nm.

De igual manera se realiza el análisis para la longitud de onda a 257nm. Los resultados obtenidos para esta longitud se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 9. Resultados de la longitud de onda a 257 nm para la exactitud espectral durante cinco días consecutivos.

Réplicas	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3	DÍA 4	DÍA 5
1	257.5	258	258	257	258
2	257.5	257	258	258.5	259
3	258.5	258.5	258	257.5	258.5
4	258	258.5	258	258	259
5	258	259	258.5	258	258
Prom.	257.9	258.2	258.1	257.8	258.5
desviación	0.42	0.76	0.22	0.57	0.50

A los resultados que se muestran en la tabla N° 9, se les realizó también el test de Bartlett con el objetivo de evaluar la homocedasticidad de las varianzas, obteniéndose un valor del parámetro de Bartlett menor que el valor tabulado de Chi cuadrado (x^2) ($M = 4.74 < x^2_{0.05} = 9.49$), por lo que se puede afirmar con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas durante los cinco días.

Con el propósito de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los promedios de los cinco días se realizó ANOVA de un factor. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla:



Los resultados para estas pruebas estadísticas son:

Tabla N° 10. Resultados de ANOVA para las replicas de las longitudes de onda.

Origen	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Varianza.	Razón.
Entre días	1.5	4	0.375	Fc. = 1.363
Dentro de los días	5.5	20	0.275	F(0.95)=2.86
total	7	24		

Como se puede observar en la tabla N° 10 el valor de “F” calculado fue de 1.36, y el valor tabulado de $F_{0,05}$ es de 2.866, entonces se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los promedios de los cinco días.

También se evaluó el sesgo espectral a esta longitud de onda para ello se utilizaron los promedios de las lecturas de longitud de onda a 257 nm durante cinco días consecutivos, los cuales se muestran en la tabla N° 9.

El valor del sesgo espectral es calculado a partir de la ecuación (1).

Para cada promedio de cada día se evaluó el sesgo y luego se graficaron, el sesgo se presenta en el siguiente gráfico:

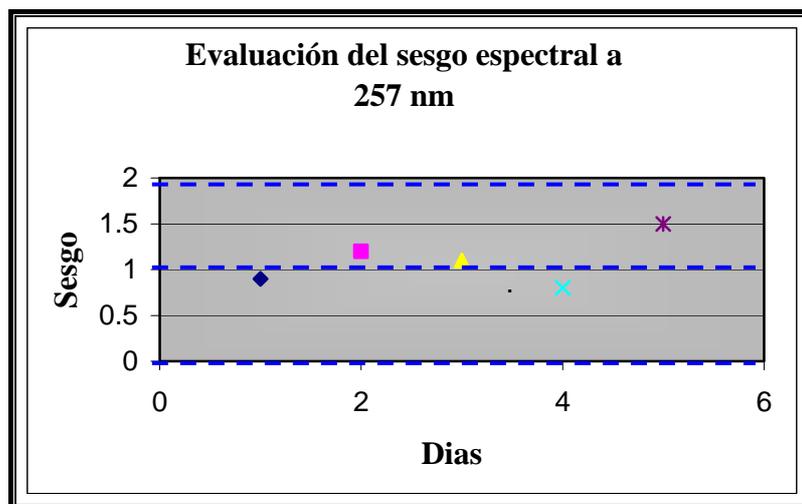


Gráfico N°14. Evaluación del sesgo espectral a 257nm.



Se observa que los valores obtenidos en el gráfico anterior ninguno de éstos son superiores a 1nm (especificaciones del espectrofotómetro SHIMADZU 1200). Por tanto el sesgo fotométrico a 257 nm es inferior a uno lo cual nos confirma que nuestros valores de exactitud espectral se encuentran por debajo del valor máximo permitido que es: +/- 1.0nm.

VI.1.2 Exactitud espectral utilizando filtro de vidrio de oxido de Holmio.

Par este barrido espectral se le realizaron 10 replicas de un filtro de vidrio de oxido de Holmio ^[18] en el espectrofotómetro SHIMADZU 1200 el barrido espectral se realizó en un rango de 200 a 800 nm para seleccionar los picos característicos que presenta dicho filtro, luego estos resultados fueron comparados con los valores de referencias reportados en la literatura para un filtro de vidrio de oxido de Holmio. Los valores experimentales y los valores de referencia con el sesgo se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 11. Valores experimentales y valores de referencia para el filtro de vidrio de oxido de Holmio.

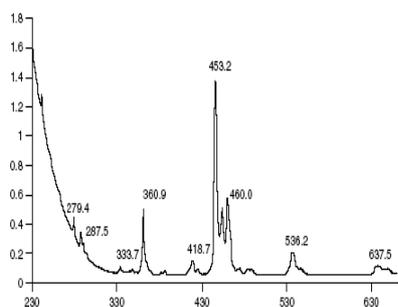
Valores de referencia	Valores experimentales	sesgo
641,5	637,43	4,07
537,72	537,1	0,62
451,23	447	4,23
417,04	418,98	-1,94
360,66	361,24	-0,58
333,54	334	-0,46

Como se puede observar al analizar el sesgo de los datos experimentales con los valores de referencia en todos los casos el sesgo nos reportó valores menores de cinco nanómetro, lo cual es aceptable debido a que las especificaciones del SHIMADZU nos dice que este presenta un ancho de banda espectral de 5 nm, además hay que considerar que el filtro que se utiliza no presentaba un certificado de los valores de sus longitudes de onda, sino que utilizamos los de la literatura, también habría que considerar el tiempo del filtro, ya que este filtro presenta aproximadamente seis años de haberse adquirido.



En las graficas 14 y 15 se puede observar el espectro teórico (de referencias de la NIST) y experimentalmente en el espectrofotómetro SHIMADZU, donde se pueden observar en los siguientes gráficos.

A
b
s
o
r
b
a
n
c
i
a



Longitud de onda (nm)

Gráficos N° 15 y 16. Espectros del filtro de vidrio de oxido de Holmio.

Para comprobar si el tiempo del filtro ha modificado los picos característicos, se realizó un estudio de comparación realizando las lecturas del filtro de oxido de Holmio con otro espectrofotómetro LAMBDA 15 utilizado como referencia y se comparan los valores con los experimentales obtenidos por el SHIMADZU. Los resultados de los dos espectrofotómetros y el sesgo se presentan en la siguiente tabla:



Tabla N° 12. Resultados del Espectrofotómetro Shimadzu 1200 y Lambda 15.

Valores de Referencia (LAMBDA 15)	Valores Experimentales (SHIMADZU 1200)	sesgo
637,43	637,225	-0.175
537,1	535,21	-1,89
447	445,54	-1,46
418,98	418,225	-0,755
361,24	360,575	-0,665
334	333,825	-0,175

De los resultados anteriores se puede demostrar que el valor de los sesgos para cada pico son más pequeños, valores menores de dos nanómetros, si tomamos como referencia los valores del LAMBDA 15 podemos afirmar que no existen diferencias significativas entre los resultados de los dos espectrofotómetros, esto es las longitudes de onda de los picos del filtro de vidrio de oxido de Holmio son los mismos en ambos equipos.

Para las pruebas realizadas en la evaluación de la exactitud espectral podemos afirmar que de los resultados obtenidos experimentalmente para la solución de Dicromato, estos presentaron unos valores del sesgo menores que los máximos (± 1 nm) permitidos por lo cual se considera una exactitud espectral aprobada para ambos picos. Por otra parte para los resultados cuando se utilizó el filtro de oxido de Holmio algunos picos característicos presentaron un sesgo mayor de 1 nm ya sea cuando se utilizó los valores de referencias de la literatura o cuando se tomó como referencia los valores en otro equipo, sin embargo habría que considerar otros aspectos como el ancho de banda espectral del SHIMADZU el cual es de 5nm, el tiempo del filtro y que no se cuenta con los valores verdaderos de los picos de este filtro.



VI.2 Exactitud fotométrica.

Para evaluar la exactitud fotométrica del espectrofotómetro SHIMADZU 1200 se utilizaron cuatro diferentes estándar fotométricos conocidos como filtros de densidad óptica neutra ^[19], los cuales son materiales de referencia trazables a la NIST, estos filtros utilizados fueron los siguientes:

Filtro Blanco al 50 % de Transmitancia. (FB50%).

Filtro Amarillo al 50 % de Transmitancia. (FA50%).

Filtro Blanco al 10 % de Transmitancia. (FB10%).

Filtro Amarillo al 10 % de Transmitancia. (FA10%).

A estos filtros se les realizó la lectura durante 5 días consecutivos con diez replicas como se indica en el procedimiento. Con el fin de verificar la exactitud y repetibilidad fotométrica que presentaba el instrumento y compararla con las especificaciones del instrumento.

VI 2.1 Filtro Blanco 50% T.

Los resultados obtenidos para el primer filtro (FB50%) se presentan en la siguiente tabla:

Tabla No13. Resultados de absorbancias durante cinco días del Filtro Blanco 50% T.

replicas / días	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3	DÍA 4	DÍA 5
1	0,312	0,312	0,311	0.311	0.311
2	0,312	0,312	0,311	0.311	0.312
3	0,311	0,312	0,311	0.312	0.311
4	0,311	0,312	0,311	0.311	0.313
5	0,312	0,313	0,312	0.312	0.311
6	0,311	0,312	0,312	0.311	0.312
7	0,313	0,313	0,311	0.312	0.313
8	0,311	0,311	0,311	0.312	0.312
9	0,31	0,31	0,312	0.311	0.311
10	0,311	0,313	0,311	0.313	0.311
Prom.	0,3114	0,3120	0,3113	0.3116	0.3117
desviación	0,0008	0,0009	0,0004	0.0007	0.0008



A los resultados que se muestran en la tabla N°13 se les realizó el test de Bartlett con el objetivo de evaluar la homocedasticidad de las varianzas, obteniéndose un valor del parámetro de Bartlett menor que el valor tabulado de Chi cuadrado (χ^2) ($M = 2.379 < \chi^2_{0.05} = 9.49$), por lo que se puede afirmar con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas durante los cinco días.

Con el propósito de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los promedios de los cinco días se realizó ANOVA de un factor. ^[20,21] Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla:

Los resultados para estas pruebas estadísticas son:

Tabla N°14. Resultados de ANOVA. .

Origen	Suma De cuadrados.	Grados de libertad.	Varianza.	Razón.
Entre días	0.00002232	4	5.58E-06	Fc= 1.25
Dentro de los días	3.05E-05	45	6.77778E-07	F(0.95)= 2.58
total	5.282E-05	49		

Como se puede observar en la tabla N° 14 el valor de “F” calculado fue de 1.25, y el valor tabulado de $F_{0.05}$ es de 2.58, entonces se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los promedios de los cinco días.

También se realizó una comparación de los resultados de los promedios de absorbancia de cada día con respecto a los valores de referencia reportados con el certificado de la NIST. Estos valores de referencia se les encontraron su límite superior e inferior. El valor de referencia con su incertidumbre para el filtro blanco al 50% T es:

$$FB \text{ al } 50\%T = \mu \pm 2c = 0.315 \pm 0.005$$

Con un límite superior de 0.32 y un límite inferior de 0.31.

Se graficaron estos límites de referencia y el promedio de cada día como se muestran en el gráfico N° 17.

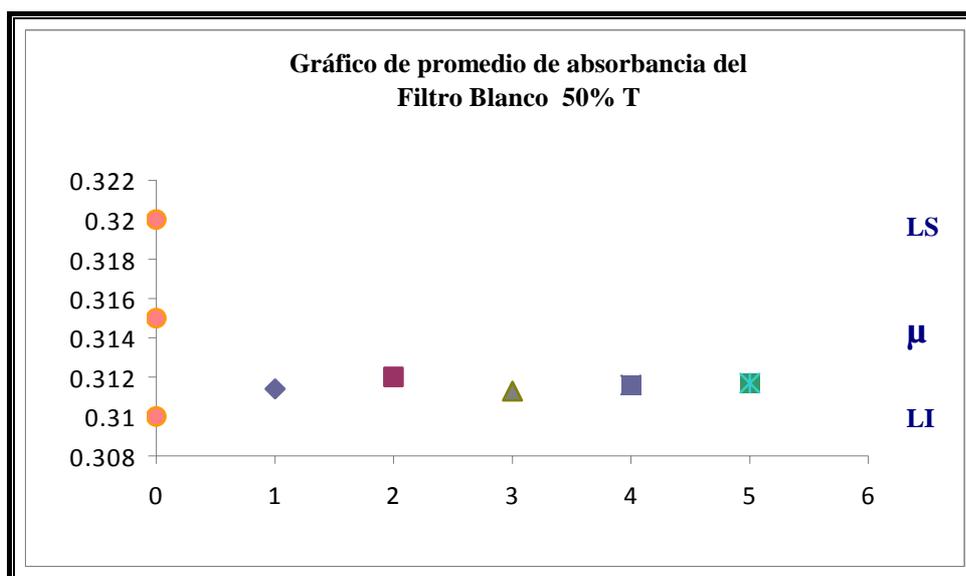


Gráfico N° 17. Promedio de absorbancia del Filtro Blanco 50% T.

Al graficar cada promedio de cada día mediante puntos se puede observar que todos están dentro del rango de valores permitidos. Por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores experimentales y de referencia.

Para evaluar el sesgo que presenta cada señal de cada día se realizó la diferencia entre el valor experimental de cada día y el valor de referencia del filtro ($A_{exp} - \mu_{ref}$)

Tabla N° 15. Resultados de los promedios del valor experimental con el valor de referencia.

Promedio/Día.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
valor experimental	0,3114	0,3120	0,3113	0,3116	0,3117
Valor de referencia	0.315	0.315	0.315	0.315	0.315
Sesgo	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003



Una de las especificaciones del instrumento utilizado ^[4] es que al evaluar la exactitud fotométrica no debe tener un sesgo mayor de 0.005 nm ya sea positivo o negativo, es por esto que en el siguiente grafico se toma como referencia estos rangos y se calcula el sesgo para cada día, lo cual al graficarlo en forma de puntos se observa que todos los valores están dentro de ese rango permitido.

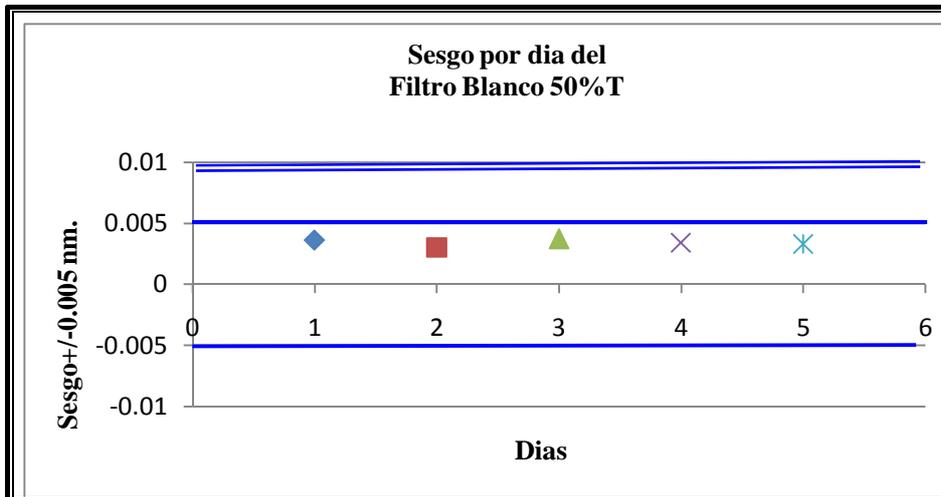


Grafico N°18. Sesgo del Filtro Blanco 50% T.



VI. 2.2 Filtro Amarillo al 50% T.

Los resultados obtenidos para el segundo filtro (FA50%) se presentan en la siguiente tabla:

Tabla No16. Resultados de absorbancias durante 5 días del filtro amarillo de 50%T.

replicas / días	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3	DÍA 4	DÍA 5
1	0.302	0.302	0.303	0.302	0.303
2	0.303	0.304	0.303	0.304	0.303
3	0.302	0.303	0.303	0.303	0.302
4	0.303	0.304	0.302	0.304	0.302
5	0.303	0.302	0.302	0.302	0.302
6	0.302	0.302	0.303	0.302	0.302
7	0.303	0.303	0.302	0.303	0.302
8	0.302	0.303	0.302	0.303	0.303
9	0.302	0.304	0.302	0.304	0.303
10	0.302	0.302	0.302	0.302	0.302
Prom.	0.3024	0.3029	0.3024	0.3029	0.3024
desviación	0.001	0.001	0.0005	0.001	0.0005

A los resultados que se muestran en la tabla N°16 se les realizó el test de Bartlett con el objetivo de evaluar la homocedasticidad de las varianzas, obteniéndose un valor del parámetro de Bartlett menor que el valor tabulado de Chi cuadrado (χ^2) ($M=5.878 < \chi^2_{0.05} = 9.49$), por lo que se puede afirmar con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas durante los cinco días.

Primeramente a estos resultados se les realizó una comparación de las varianzas Obtenidas durante los cinco días diferentes por medio del test de Bartleth y luego se compararon los promedios de los mismos utilizando como prueba estadística el ANOVA de un Factor.

Con el propósito de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los promedios de los cinco días se realizó ANOVA de un factor.^[20,21] Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla:



Los resultados para estas pruebas estadísticas son:

Tabla N°17. Resultado de ANOVA de un factor.

Origen	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Varianza.	Razón.
Entre días	3 E-06	4	7.5E-07	Fc. 1.607143
Dentro de los días	2.1 E-5	45	4.66667E-7	F(0.95)= 2.525
total	2.4 E-5	49		

Como se puede observar en la tabla N° 17 el valor de “F” calculado fue de 1.6071, y el valor tabulado de $F_{0.05}$ es de 2.525, entonces se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los promedios de los cinco días.

También se realizó una comparación de los resultados de los promedios de absorbancia de cada día con respecto a los valores de referencia reportados con el certificado de la NIST. Estos valores de referencia se les encontró su límite superior e inferior. El valor de referencia para el filtro amarillo 50% T es:

$$FA \text{ al } 50\%T = \mu \pm 2c = 0.302 \pm 0.005$$

Con un límite superior de 0.307 y un límite inferior de 0.297.

Se graficaron estos límites de referencia y el promedio de cada día como se muestra en el gráfico N° 19.

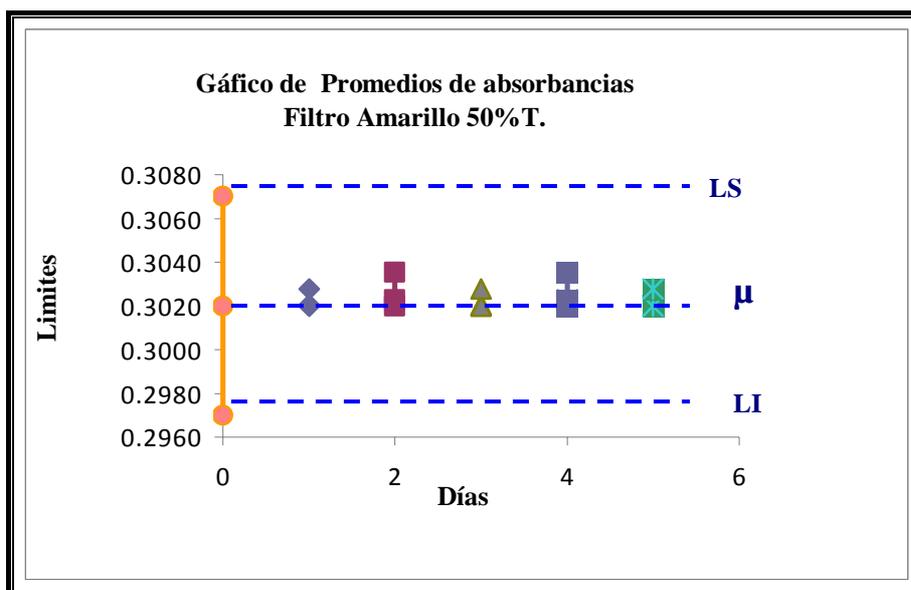


Grafico N°19. Promedio de absorbancia del Filtro Amarillo 50% T.

Al graficar cada promedio de cada día mediante puntos se puede observar que todos están dentro del rango de valores permitidos. Por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores experimentales y el de referencia. Al graficar cada promedio de cada día mediante puntos se puede observar que todos están dentro del rango de valores permitidos.

Para evaluar el sesgo que presenta cada señal de cada día se realizó la diferencia entre el valor experimental de cada día y el valor de referencia del filtro ($A_{exp} - \mu_{ref}$)

Tabla N° 18. Resultados de los promedios de cada día del valor experimental con el valor de referencia para calcular el sesgo.

Promedio/Día.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
valor experimental	0.3024	0.3029	0.3024	0.3029	0.3024
Valor de referencia	0.302	0.302	0.302	0.302	0.302
Sesgo.	-0.0004	-0.0009	-0.0004	-0.0009	-0.0009



Una de las especificaciones del instrumento utilizado ^[4] es que al evaluar la exactitud fotométrica no debe tener un sesgo mayor de 0.005 nm ya sea positivo o negativo, es por esto que en el siguiente grafico se toma como referencia estos rangos y se calcula el sesgo para cada día, lo cual al graficarlo en forma de puntos se observa que todos los valores están dentro de ese rango permitido.

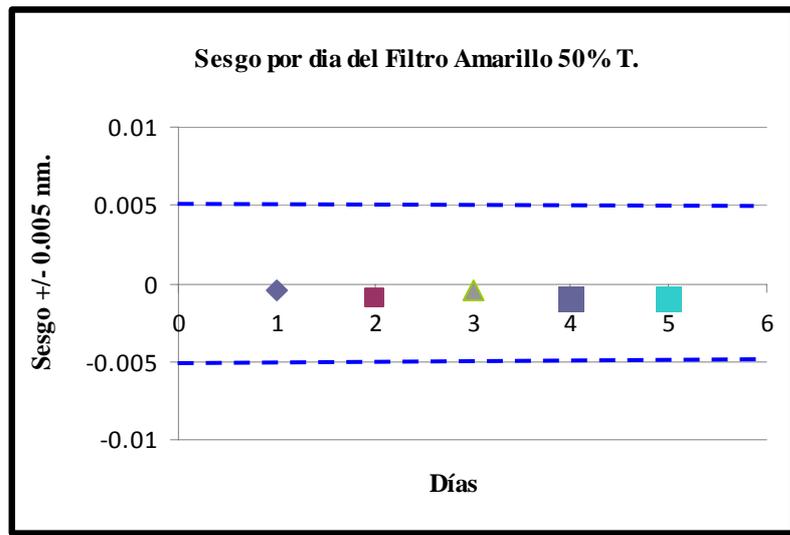


Grafico N°20. Sesgo del Filtro Amarillo 50% T.



VI. 2.3 Filtro Blanco 10% T.

Los resultados obtenidos para el tercer filtro (FB10%) se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 19. Resultados de absorbancia durante 5 días del filtro blanco de 10%T.

replicas / días	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3	DÍA 4	DÍA 5
1	1.068	1.067	1.065	1.065	1.065
2	1.067	1.067	1.062	1.068	1.067
3	1.068	1.067	1.068	1.065	1.069
4	1.067	1.068	1.066	1.067	1.067
5	1.067	1.066	1.068	1.063	1.065
6	1.067	1.065	1.068	1.068	1.067
7	1.07	1.069	1.068	1.072	1.065
8	1.068	1.067	1.07	1.07	1.07
9	1.065	1.067	1.067	1.07	1.067
10	1.062	1.068	1.069	1.067	1.068
Prom.	1.0669	1.0671	1.0671	1.0675	1.067
desviación	0.0021	0.0011	0.0023	0.0027	0.0017

A los resultados que se muestran en la tabla N°19 se les realizó el test de Bartlett con el objetivo de evaluar la misma homocedasticidad de las varianzas, obteniéndose un valor del parámetro de Bartlett menor que el valor tabulado de Chi cuadrado (x^2) ($M = 6.994 < x^2_{0.05} = 9.49$), por lo que se puede afirmar con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas durante los cinco días.

Primeramente a estos resultados se les realizó una comparación de las varianzas obtenidas durante los cinco días diferentes por medio del test de Bartleth y luego se compararon los promedios de los mismos utilizando como prueba estadística el ANOVA de un Factor.

Con el propósito de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los promedios de los cinco días se realizó ANOVA de un factor. ^[20,21] Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla:



Los resultados para estas pruebas estadísticas son:

Tabla N °20. Resultado de ANOVA de un factor.

Origen	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Varianza.	Razón.
Entre días	2.08E-06	4	5.2E-07	Fc.=0.122384
Dentro de los días	0.0001912	45	4.2489E-06	F(0.95)= 2.525
total	0.00019328	49		

Como se puede observar en la tabla N° 20 el valor de “F” calculado fue de 0.1223, y el valor tabulado de $F_{0.05}$ es de 2.525, entonces se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los promedios de los cinco días.

También se realizó una comparación de los resultados de los promedios de absorbancia de cada día con respecto a los valores de referencia reportados con el certificado de la NIST. Estos valores de referencia se les encontró su límite superior e inferior. El valor de referencia con su incertidumbre para el filtro blanco 10% T es:

$$FB \text{ al } 10\%T = \mu \pm 2c = 1.069 \pm 0.013$$

Con un límite superior de 1.082 y un límite inferior de 1.056.



Se graficaron estos límites de referencia y el promedio de cada día como se muestra en el gráfico N° 21.

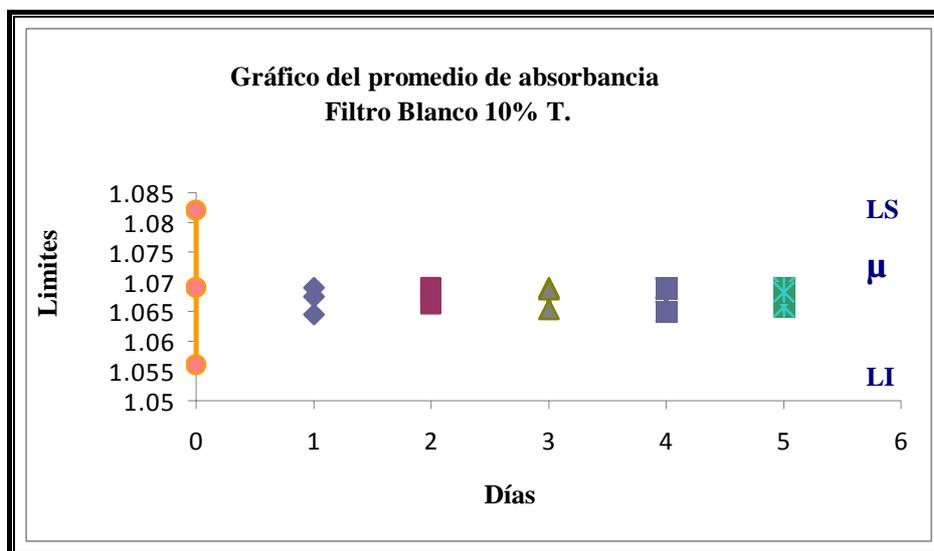


Gráfico N°21. Promedio de absorbancia del Filtro Blanco 10% T.

Al graficar cada promedio de cada día mediante puntos se puede observar que todos están dentro del rango de valores permitidos. Por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores experimentales y del de referencia.

Para evaluar el sesgo que presenta cada señal de cada día se realizó la diferencia entre el valor experimental de cada día y el valor de referencia del filtro ($A_{exp} - \mu_{ref}$)

Tabla N° 21. Resultados de los promedios de cada día del valor experimental con el valor de referencia para calcular el sesgo.

Promedio/Día.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
valor experimental	1.0669	1.0671	1.0671	1.0675	1.067
Valor de referencia	1.069	1.069	1.069	1.069	1.069
Sesgo.	0.0021	0.0019	0.0019	0.0015	0.002



Una de las especificaciones del instrumento utilizado ^[4] es que al evaluar la exactitud fotométrica no debe tener un sesgo mayor de 0.005 nm ya sea positivo o negativo, es por esto que en el siguiente grafico se toma como referencia estos rangos y se calcula el sesgo para cada día, lo cual al graficarlo en forma de puntos se observa que todos los valores están dentro de ese rango permitido.

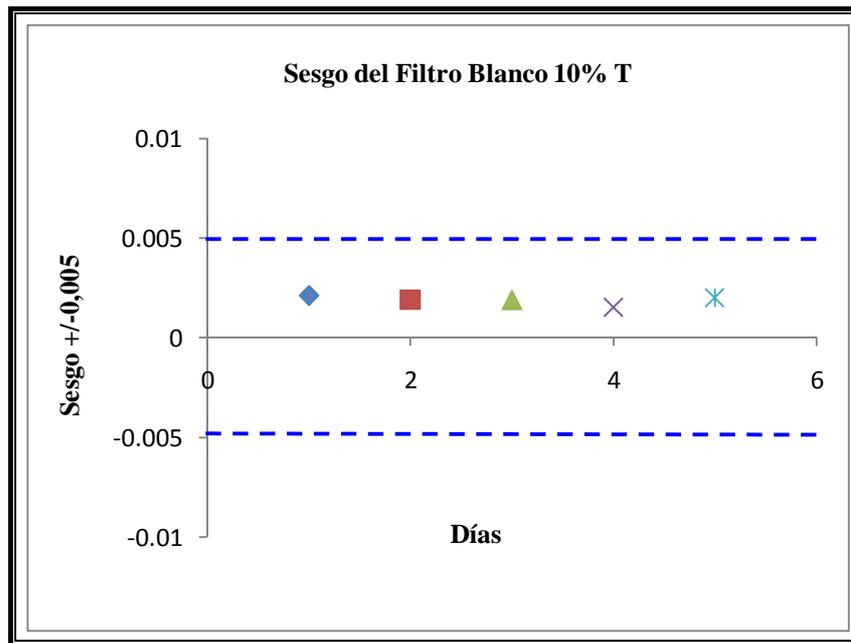


Grafico N°22 .Sesgo del Filtro Blanco 10% T.



VI. 2.4 Filtro Amarillo 10% T.

Los resultados obtenidos para el cuarto (FA10%) se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 22. Resultados de absorbancia durante 5 días del filtro amarillo de 10%T.

replicas / días	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3	DÍA 4	DÍA 5
1	1.022	1.023	1.023	1.022	1.021
2	1.023	1.022	1.022	1.021	1.023
3	1.021	1.022	1.021	1.022	1.025
4	1.021	1.022	1.021	1.022	1.022
5	1.024	1.023	1.023	1.023	1.021
6	1.022	1.023	1.022	1.025	1.023
7	1.021	1.021	1.022	1.022	1.024
8	1.023	1.023	1.021	1.023	1.024
9	1.024	1.022	1.022	1.022	1.022
10	1.021	1.022	1.022	1.022	1.022
Prom.	1.0222	1.0223	1.0219	1.0224	1.0227
desviación	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

A los resultados que se muestran en la tabla N°22 se les realizó el test de Bartlett con el objetivo de evaluar la misma homocedasticidad de las varianzas, obteniéndose un valor del parámetro de Bartlett menor que el valor tabulado de Chi cuadrado (χ^2) ($M=5.923 < \chi^2_{0.05} = 9.49$), por lo que se puede afirmar con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas durante los cinco días.

Primeramente a estos resultados se les realizó una comparación de las varianzas obtenidas durante los cinco días diferentes por medio del test de Bartlett y luego se compararon los promedios de los mismos utilizando como prueba estadística el ANOVA de un Factor.

Con el propósito de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los promedios de los cinco días se realizó ANOVA de un factor.^[20,21] Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla:



Los resultados para estas pruebas estadísticas son:

Tabla N °23. Resultado de ANOVA

Origen	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Varianza.	Razón.
Entre días	3.4E-06	4	8.5E-07	Fc. = 0.7790224
Dentro de los días	4.91E-05	45	1.09111E-06	F(0.95)= 2.525
total	5.25E-05	49		

Como se puede observar en la tabla N° 23 el valor de “F” calculado fue de 0.7790 y el valor tabulado de $F_{0.05}$ es de 2.525, entonces se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los promedios de los cinco días.

También se realizó una comparación de los resultados de los promedios de absorbancia de cada día con respecto a los valores de referencia reportados con el certificado de la NIST. Estos valores de referencia se les encontró su límite superior e inferior. El valor de referencia con su incertidumbre para el filtro amarillo 10% T es:

$$FA \text{ al } 10\%T = \mu \pm 2c = 1.025 \pm 0.013$$

Con un límite superior de 1.038 y un límite inferior de 1.012.



Se graficaron estos límites de referencia y el promedio de cada día como se muestra en el gráfico N° 23.

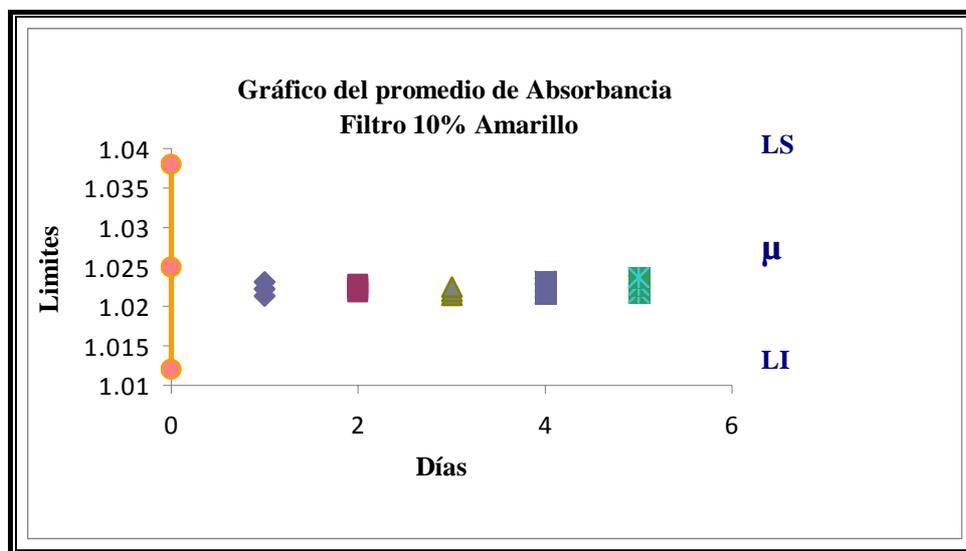


Gráfico N° 23. Promedio de absorbancia del Filtro Amarillo 10% T

Al graficar cada promedio de cada día mediante puntos se puede observar que todos están dentro del rango de valores permitidos. Por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores experimentales y el de referencia.

Para evaluar el sesgo que presenta cada señal de cada día se realizó la diferencia entre el valor experimental de cada día y el valor de referencia del filtro ($A_{exp} - V_{ref}$)

Tabla N° 24. Resultados de los promedios del valor experimental con el valor de referencia.

Promedio/Día.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
valor experimental	1.0222	1.0223	1.0219	1.0224	1.0227
Valor de referencia	1.025	1.025	1.025	1.025	1.025
Sesgo.	0.003	0.0027	0.0031	0.0026	0.0023



Una de las especificaciones del instrumento utilizado ^[4] es que al evaluar la exactitud fotométrica no debe tener un sesgo mayor de 0.005 nm ya sea positivo o negativo, es por esto que en el siguiente grafico se toma como referencia estos rangos y se calcula el sesgo para cada día, lo cual al graficarlo en forma de puntos se observa que todos los valores están dentro de ese rango permitido.

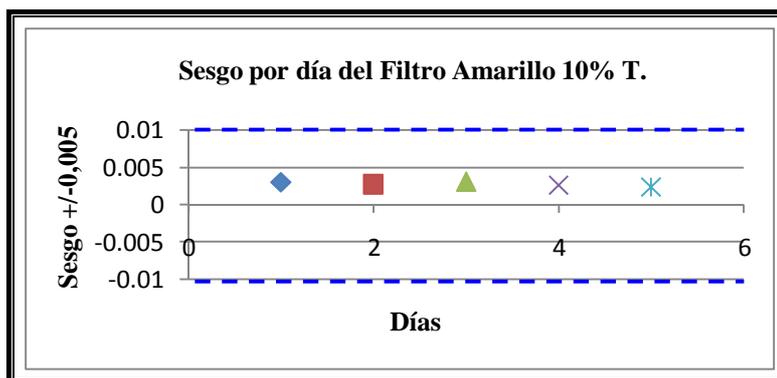


Gráfico N° 24. Sesgo del Filtro Amarillo 10% T.

Como se puede observar en el gráfico los puntos representan la diferencia entre el valor de referencia de absorbancia y el valor de los promedios de cada día dando como resultado que ningún dato es superior a 0.005.

Para las pruebas realizadas en la evaluación de la exactitud fotométrica podemos afirmar que de los resultados obtenidos experimentalmente para los cuatro filtros de referencias en todos los casos se presentó un sesgo menor de 0.005 (± 1 nm) permitidos por lo cual se considera una exactitud fotométrica, también se observó que todos los valores experimentales están entre los límites reportados por el certificado de los filtros, lo cual nos demuestra que no existen diferencias significativas entre los valores experimentales y el valor de referencia. Por lo que se considera que cumple con la exactitud fotométrica y repetibilidad fotométrica ya que como se puede observar en los resultados de ANOVA, estas presentaron una repetibilidad pequeña.



VI.3 Estudio de la linealidad del Espectrofotómetro UV-Visible.

Para evaluar la linealidad de la lectura del espectrofotómetro Shimadzu 1200, se realizó una curva de calibración normal durante cinco días consecutivos, para ello se utilizó una serie de soluciones estándares de dicromato de potasio en un intervalo de concentraciones de 20 – 100 ppm, a cada uno de los estándares se les realizó la lectura espectrofotométrica por triplicado a una longitud de onda de 257nm y 350 nm. Se seleccionaron estas longitudes de onda por que una solución de dicromato de potasio de 60 ppm presentó estos picos máximos de absorción a esas longitudes de onda, se evaluaron la linealidad en estas dos longitudes de ondas seleccionadas.

VI.3.1 Evaluación de la linealidad a 257 nm.

A cinco soluciones conteniendo estándar de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) de concentraciones 20, 40, 60, 80, y 100 ppm se les realizó la lectura de absorbancia a la longitud de onda de 257nm y los resultados de las mismas se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N°25. Datos del promedio de las curvas de calibración normal durante cinco días consecutivos a 257 NM.

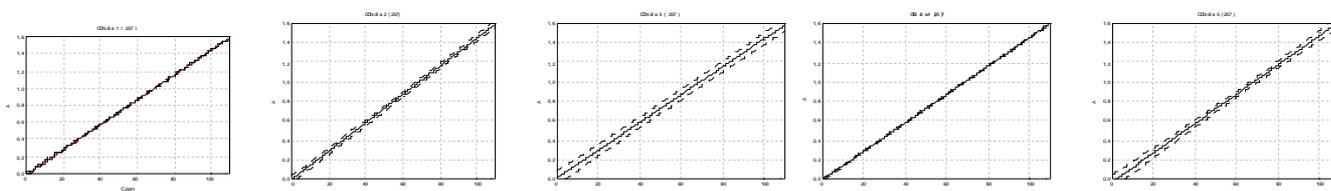
$K_2Cr_2O_7$ (ppm)	Abs. Ref	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	promedio
20	0.281	0.281	0.289	0.291	0.281	0.281	0.2846
40	0.572	0.57	0.574	0.577	0.577	0.575	0.5746
60	0.862	0.857	0.854	0.874	0.874	0.846	0.861
80	1.159	1.159	1.16	1.175	1.16	1.162	1.1632
100	1.448	1.439	1.453	1.426	1.458	1.439	1.443

De estos resultados se graficó cada curva de calibración normal (Gráfico 24) y se les calculó los parámetros de regresión los cuales se presentan en la siguiente tabla:



Tabla N°26. Parámetros de regresión durante cinco días consecutivos.

Parámetros / días	1	2	3	4	5
b0	-0.0103	-0.0082	0.0082	-0.0111	-0.0103
b1	0.01453	0.01457	0.01434	0.01468	0.01452
r ²	0.9999	0.9997	0.9991	0.9999	0.9995

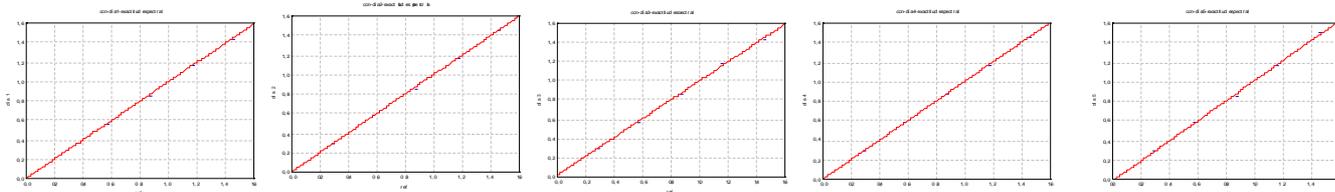


a) ccn día 1. b) ccn día 2 c) ccn día 3 d) ccn día 4 e) ccn día 5

Gráfico N° 25. Resultados de análisis de regresión durante cinco días consecutivos.

Como se puede observar el comportamiento de la respuesta de absorbancias en función de las concentraciones de los estándares es que existe una relación lineal, eso lo podemos observar en las graficas de cada día y además vemos que el coeficiente de regresión para cada curva es próximo a la unidad lo cual nos refleja una excelente linealidad entre la concentración y la respuesta del instrumento. El valor recomendado por la NIST es que debe estar entre 0.998 y 1, por lo cual podemos afirmar que el espectrofotómetro cumple con el parámetro de la linealidad esto es una relación lineal entre absorbancia y concentración de los estándares.

También se evaluó la exactitud a partir de los datos obtenidos en la C.C.N. de 257 nm para cada día ya que para cada estándar preparado se tenían los valores de referencia de la literatura (Tabla N°25), se prepararon nuevas curvas de calibración donde en el eje “ X “ se representan los valores de referencia y en el eje “ Y “ los valores experimentales de absorbancia de cada estándar para cada día. Se realizaron los gráficos de cada día y se evaluaron los parámetros de regresión (ver gráfico N° 26 y Tabla N° 27).



a) ccn día 1 b) ccn día 2 c) ccn día 3 d) ccn día 4 e) ccn día

Grafico N° 26. Curva de calibración normal durante cinco días consecutivos par evaluar la exactitud.

Tabla N°27. Resultados del análisis de regresión a 257 nm durante cinco días consecutivos para evaluar la exactitud.

Parámetros/ días.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
b_0	0.00151651	0.00364663	0.01985254	0.0008995	0.00147553
b_1	0.9945436	0.99763231	0.98189202	1.00543788	0.99389689
S_a	0.00346052	0.00709572	0.01516087	0.00561633	0.00948724
S_b	0.0036121	0.00740652	0.01582493	0.00586233	0.00990279

Se puede observar a partir de los gráficos que existe una relación lineal entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores de referencia, además en la tabla N° 27 se observó que los valores del intercepto y la pendiente son próximos a cero y a uno respectivamente, lo que significa que no existen errores sistemáticos. En el grafico número 27 y 28 se observa claramente que el intercepto pasa por el cero y la pendiente por el uno.

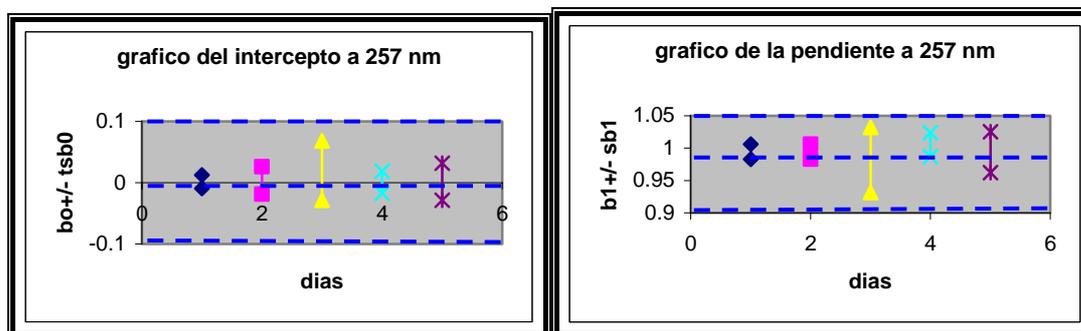


Gráfico N°27 y 28. Intercepto y pendiente a 257 nm.

Para confirmar la existencia o no de errores sistemáticos se realizó el cálculo de la prueba de t student tanto para el intercepto como para la pendiente y se comparan con el valor de tabla, los valores del t calculado se presentan a continuación:



Tabla N°28. Valores del t calculado para la pendiente y el intercepto a 257 nm.

tc b1	1.51	0.31	1.14	0.92	0.61
tc bo	0.44	0.51	1.3	0.16	0.16

Al compararlo con el valor de t a un nivel de confianza el cual es de 2.57, se puede observar que en todos los casos el valor de tc es menor que el tabla por lo cual se confirma que el intercepto es cero y la pendiente es uno, esto es no existen errores sistemáticos.

VI.3.2 Evaluación de la linealidad a 350 nm.

A las mismas cinco soluciones conteniendo estándar de $K_2Cr_2O_7$ se les realizó la lectura de absorbancia a la longitud de onda de 350 nm y los resultados de las mismas se presentan en la siguiente tabla:

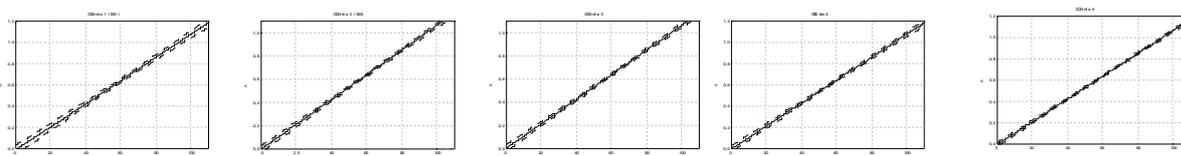
Tabla 29. Datos del promedio de las curvas de calibración normal durante cinco días consecutivos a 350 nm.

$K_2Cr_2O_7$ (ppm)	ABS,REF	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Promedio
20	0.209	0.202	0.216	0.218	0.205	0.208	0.2098
40	0.426	0.428	0.427	0.424	0.439	0.431	0.4298
60	0.634	0.628	0.627	0.631	0.645	0.631	0.6324
80	0.853	0.876	0.8603	0.862	0.868	0.854	0.86406
100	1.069	1.068	1.064	1.06	1.07	1.067	1.0658

Los parámetros de Regresión de las curvas de calibración normal para los cinco días consecutivos se representan en la siguiente tabla:

Tabla N°30. Resultados de análisis de regresión durante cinco días consecutivos.

Parámetros / días	1	2	3	4	5
b0	0.0109	0.0106	0.0106	0.0108	0.0107
b1	-0.0136	7E-05	0.0024	-0.0023	-0.0041
r^2	0.9987	0.9995	0.9995	0.9994	0.9997





a) ccn día 1. b) ccn día 2 c) ccn día 3 d) ccn día 4 e) ccn día 5

Gráfico N°29. Curva de calibración normal durante cinco días consecutivos.

Como se puede observar existe una relación lineal de las respuestas en función de la concentración, el coeficiente de determinación se aproxima a la unidad por lo que podemos decir que existe una buena linealidad entre la concentración y la respuesta del instrumento. . El valor recomendado por la NIST es que debe estar entre 0.998 y 1, por lo cual podemos afirmar que el espectrofotómetro cumple con el parámetro de la linealidad esto es una relación lineal entre absorbancia y concentración.

También se evaluó la exactitud a partir de los datos obtenidos en la C.C.N. de 350 nm para cada día ya que para cada estándar preparado se tenían los valores de referencia de la literatura (Tabla N° 28), se prepararon nuevas curvas de calibración donde en el eje “x” se representan los valores de referencia y en el eje “y” los valores experimentales de absorbancia de cada estándar para cada día. Se realizaron los gráficos de cada día y se evaluaron los parámetros de regresión (ver gráfico N° 30 y Tabla N° 31).

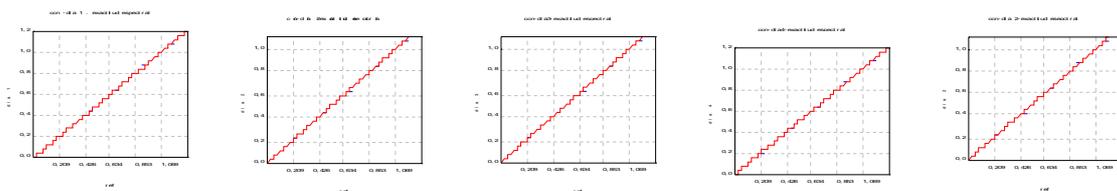


Gráfico N°30. Curva de calibración normal durante cinco días consecutivos para evaluar la exactitud.

Tabla N°31. Resultados de análisis de regresión a 350 nm durante cinco días consecutivos.

Parámetros/ días	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
---------------------	-------	-------	-------	-------	-------



b_0	-0.007649	0.00588364	0.00823407	0.00364924	0.00175268
b_1	1.01543	0.91181504	0.98835151	1.00556372	0.99725372
Sa	0.01323	0.00721751	0.00828941	0.00966311	0.003632
Sb	0.01872	0.01021224	0.0117289	0.1367259	0.00513901

Se puede observar a partir de los gráficos que existe una relación lineal entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores de referencia, además en la tabla N° 31 y 32 se observó que los valores del intercepto y la pendiente son próximos a cero y a uno respectivamente, lo que significa que no existen errores sistemáticos. Los gráficos del Intercepto y la Pendiente con sus intervalos de confianza se presentan a continuación:

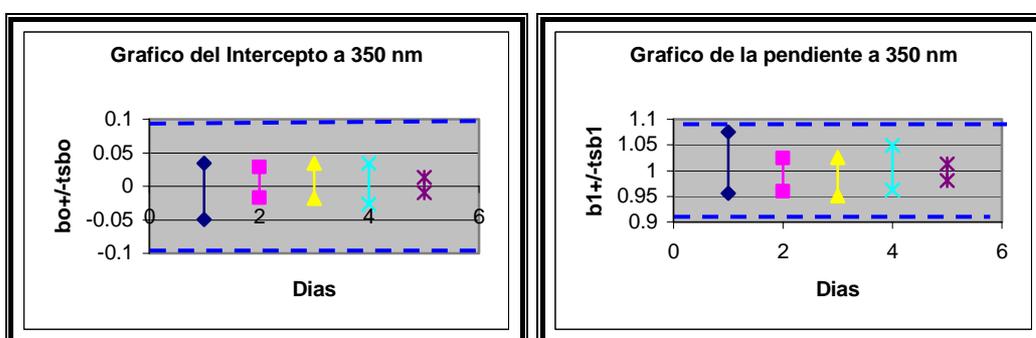


Gráfico N° 31 y 32. Intercepto y pendiente a 350 nm.

Para confirmar la existencia o no de errores sistemáticos se realizó el cálculo de la prueba de t student tanto para el intercepto como para la pendiente, los valores de la t calculada se presentan a continuación:

Tabla N°32. Valores del t calculado para la pendiente y el intercepto a 350 nm.

tc b1	0.57	0.81	0.99	0.37	0.48
tc bo	0.82	0.80	0.99	0.40	0.53

Al compararlo con el valor de t a un nivel de confianza el cual es de 2.57, se puede observar que en todos los casos el valor de tc es menor que el tabla por lo cual se confirma que el



intercepto es cero y la pendiente es uno, esto es no existen errores sistemáticos cuando se realizan las lecturas de la curva de calibración a una longitud de onda de 350 nm.

VI.4 Evaluación del ruido.

Para la evaluación del ruido se realizó un barrido a modo de absorbancia durante 10 minutos tomando como muestra el aire y se registro el valor de absorbancia cada treinta segundos esto fue a el ruido de pico a pico una longitud de onda de 500 nm. Los resultados de las absorbancia en función del tiempo se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 33. Valores de absorbancia en función del tiempo.

Tiempo (minutos)	A	Tiempo (minutos)	A
0,5	0,001	5,5	0,002
1	0	6	0,002
1,5	0,002	6,5	0,002
2	-0,001	7	0,003
2,5	0,001	7,5	0
3	0	8	-0,001
3,5	0,001	8,5	0,001
4	0	9	0
4,5	0,001	9,5	-0,001
5	0,002	10	0,001

El valor recomendado por la NIST es de que el valor promedio debe ser típicamente menor que 0.001 al igual que las especificaciones del equipo, y el promedio de resultados experimentales fue de 0.0008 UA (Unidades de Absorbancia) el cual nos refleja un valor menor por lo que podemos afirmar que los niveles de ruido se encuentran dentro de los valores de aceptación.

Se pueden observar el comportamiento de estos valores en la siguiente gráfica:

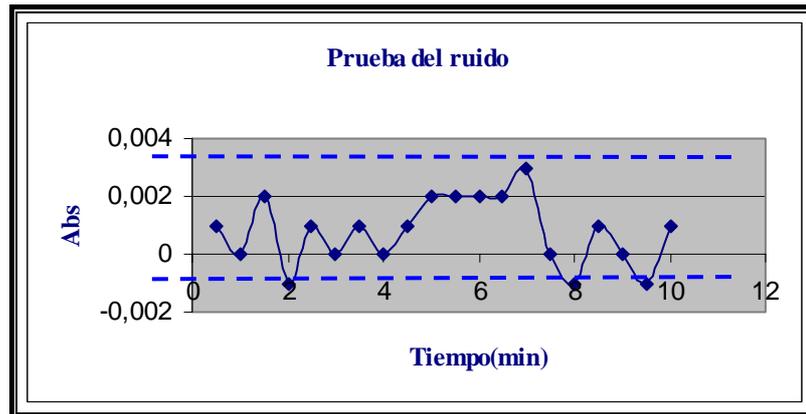


Gráfico N°33. Evaluación del ruido.

De la grafica podemos afirmar que se ve poca variabilidad de la respuesta en función del tiempo lo cual lo confirmamos con el valor del promedio discutido anteriormente.

VI.5 Evaluación de la estabilidad.

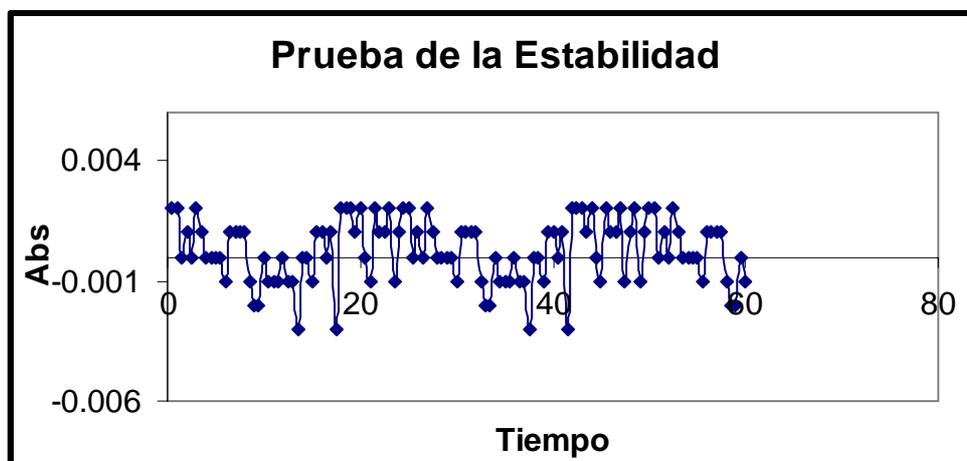
Para evaluar la prueba de la estabilidad se realizó un barrido con aire a modo de absorbancia por un periodo de 60 minutos a una longitud de onda de 340 nm. Los valores de absorbancia fueron leídos cada diez segundos como se muestran en la siguiente tabla:



Tabla N° 34. Lectura de absorbancias en función del tiempo.

t(min)	A												
0,5	0,002	10,5	- 0,001	20,5	0	30,5	0,001	30,5	0,001	40,5	0	50,5	0,002
1	0,002	11	- 0,001	21	- 0,001	31	0,001	31	0,001	41	0,001	51	0
1,5	0	11,5	- 0,001	21,5	0,002	31,5	0,001	31,5	0,001	41,5	- 0,003	51,5	0,001
2	0,001	12	0	22	0,001	32	0,001	32	0,001	42	0,002	52	0
2,5	0	12,5	- 0,001	22,5	0,001	32,5	- 0,001	32,5	- 0,001	42,5	0,002	52,5	0,002
3	0,002	13	- 0,001	23	0,002	33	- 0,002	33	- 0,002	43	0,002	53	0,001
3,5	0,001	13,5	- 0,003	23,5	- 0,001	33,5	- 0,002	33,5	- 0,002	43,5	0,001	53,5	0
4	0	14	0	24	0,001	34	0	34	0	44	0,002	54	0
4,5	0	14,5	0	24,5	0,002	34,5	- 0,001	34,5	- 0,001	44,5	0	54,5	0
5	0	15	- 0,001	25	0,002	35	- 0,001	35	- 0,001	45	- 0,001	55	0
5,5	0	15,5	0,001	25,5	0	35,5	- 0,001	35,5	- 0,001	45,5	0,002	55,5	- 0,001
6	- 0,001	16	0,001	26	0,001	36	0	36	0	46	0,001	56	0,001
6,5	0,001	16,5	0	26,5	0	36,5	- 0,001	36,5	- 0,001	46,5	0,001	56,5	0,001
7	0,001	17	0,001	27	0,002	37	- 0,001	37	- 0,001	47	0,002	57	0,001
7,5	0,001	17,5	- 0,003	27,5	0,001	37,5	- 0,003	37,5	- 0,003	47,5	- 0,001	57,5	0,001
8	0,001	18	0,002	28	0	38	0	38	0	48	0,001	58	- 0,001
8,5	- 0,001	18,5	0,002	28,5	0	38,5	0	38,5	0	48,5	0,002	58,5	- 0,002
9	- 0,002	19	0,002	29	0	39	- 0,001	39	- 0,001	49	- 0,001	59	- 0,002
9,5	- 0,002	19,5	0,001	29,5	0	39,5	0,001	39,5	0,001	49,5	0,001	59,5	0
10	0	20	0,002	30	- 0,001	40	0,001	40	0,001	50	0,002	60	- 0,001

En la grafica se puede ver el comportamiento de la respuesta s de absorbancia en función del tiempo:



Como se puede observar en los valores y las graficas los valores máximos y mínimos son: 0.002 y -0.003 respectivamente y esos valores se encuentran por debajo del valor recomendado por la literatura el cual es de 0.02 UA / h, por lo cual podemos afirmar que las desviaciones de los valores de absorbancia en función del tiempo se encuentra dentro de los valores permisibles que deben de ser menores de 0.02 UA / h.

VI.6 Evaluación de la resolución.

Para evaluar la resolución del pico se realizó un barrido espectral con una mezcla de tolueno en hexano al 0.02 % en un rango espectral de 200 a 300nm.

El espectro de la solución de tolueno se presenta a continuación.



Grafico N°35. Espectro de la solución de tolueno 0.02 %



La longitud de onda máxima tiene un valor de 262.0nm con absorbancia de 0.392 y la mínima de 255.0nm con un valor de absorbancia de 0.345. La resolución se obtiene al dividir la absorbancia máxima entre la absorbancia mínima lo cual nos da un resultado de = 1.14 como se puede observar el valor de la resolución es inferior a 1.5 que es el valor recomendado. Aunque este valor no cumple con las especificaciones, hay que considerar que los reactivos utilizados son los que se encontraban disponibles en bodega y no reflejaban el grado de pureza de los mismos ni el grado requerido para hacer esta prueba, lo cual podría haber afectado los valores de absorbancias. Al mismo tiempo la selección del pico máximo depende de la naturaleza del solvente y en este caso el hexano podría haber afectado el corrimiento del pico máximo de absorción (Teóricamente es 296 para el máximo y 266 para el mínimo). Para realizar esta prueba de la resolución lo ideal sería contar con una solución de tolueno certificada o contar los reactivos adecuados para preparar la solución en el laboratorio.

VI.7 Evaluación de la luz difusa.

Para evaluar la luz difusa se utilizaron dos filtros a dos diferentes longitudes de onda las cuales fueron a 220, y 400 nm.

Las medidas de la transmitancia a la longitud de onda específica y los promedios que se obtuvieron experimentalmente se muestran en la siguiente tabla:

Tabla N° 35. Medidas de transmitancia y promedios experimentales.

parámetros	Filtro de 200 nm	Filtro de 400 nm
Especificaciones	< 0.05T	< 0.05T
Datos obtenidos experimentalmente	0.09 %T	0.12%T
Absorbancias	3.04	2.92



Como se puede observar los valores de en los dos filtros son valores menores que las especificaciones por lo cual podemos afirmar que la luz difusa cumple con las especificaciones, además se puede observar que los valores de absorbancias de estos valores son mayores de 2, lo cual nos confirma que la luz difusa afecta a valores grandes de absorbancias.

VI.8 Evaluación de la incertidumbre:

Para evaluar la incertidumbre de una medición espectrofotométrica se utilizó a manera de aplicación una muestra de agua que contenía una solución de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ y se calculó su concentración a partir de los parámetros de la curva de calibración normal.

VI.8.1 Identificación del modelo matemático y las fuentes de incertidumbre.

Primeramente se encontró el modelo matemático que se utiliza para calcular la concentración. El modelo matemático es el siguiente:

$$C_{K_2Cr_2O_7} = \left(\frac{A_m - b_0}{b_1} \right) * \left(\frac{V_2}{V_1} \right) \text{ Ec. (5)}$$

Donde:

A_m : Absorbancia de la muestra.

b_0 : Intercepto

b_1 : Pendiente

V_1 : volumen de alícuota de 5 ml.

V_2 : volumen de la alícuota de 50 ml.

A partir del modelo matemático se identificaron las fuentes de incertidumbre para cada componente a través del diagrama causa/ efecto. Cada uno de estos componentes principales tiene otras fuentes de incertidumbre los cuales se detallan en el diagrama que se presenta en la figura 3.

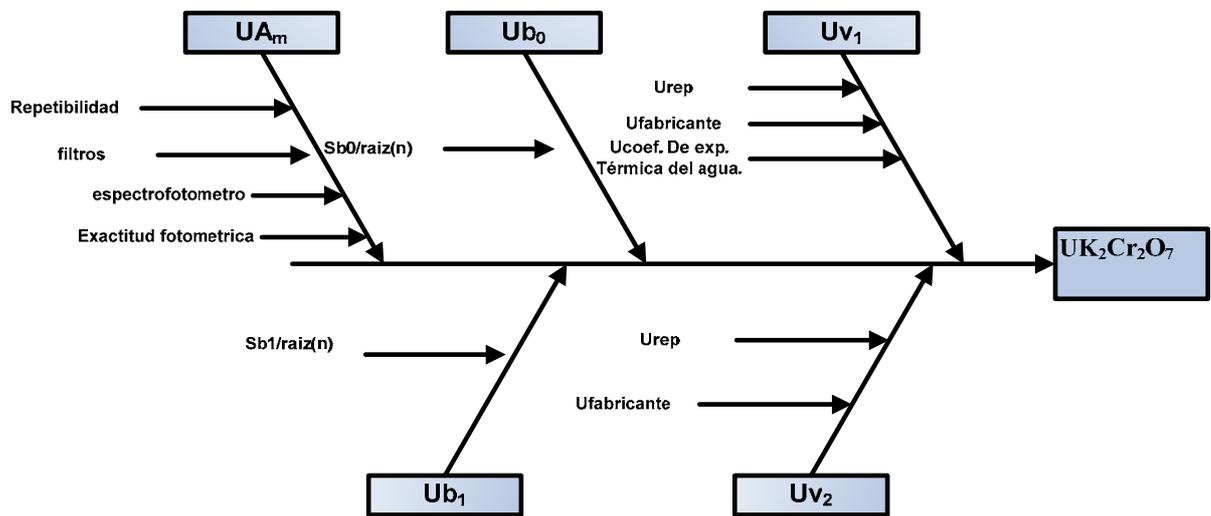


Figura 4. Diagrama de causa-efecto para los componentes de la incertidumbre.

Existen cinco componentes principales que influyen en la incertidumbre en $K_2Cr_2O_7$.

μ_{Am} = Incertidumbre de la absorbancia de la muestra.

μ_{b0} = Incertidumbre del intercepto.

μ_{b1} = Incertidumbre de la pendiente.

μ_{v1} = Incertidumbre de la pipeta volumétrica de 5 ml.

μ_{v2} = Incertidumbre del matraz de 50 ml.

A partir de los principales componentes de las fuentes de la incertidumbre obtenidos del modelo matemático y representado en el diagrama de causa y efecto, se evalúan cada uno de ellos.



VI.8.2 Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.

VI.8.2.1 Cálculo de la incertidumbre de medición de la absorbancia de la muestra.

Sobre la incertidumbre de la medida de la absorbancia de una muestra (U_{Am}) en un espectrofotómetro contribuyen tres componentes:

- Las características del espectrofotómetro. (U_{spec})
- Las características de los filtros. (U_{filtro})
- La precisión de las medidas. (U_{prec})

La expresión de estas contribuciones se resume en la siguiente ecuación:

$$U_{Am} = \sqrt{U_{spec}^2 + U_{filtro}^2 + U_{prec}^2} \quad \text{Ec. (6)}$$

Incertidumbre asociada al espectrofotómetro:

Es la suma de las contribuciones debidas a la resolución del equipo, a la luz deriva y a la deriva de la línea de base.

- **Incertidumbre debido a la resolución:**

Indica el máximo error que se puede cometer en la lectura de la escala del equipo y se calcula:

$$U_{res} = \frac{res}{(2 * \sqrt{3})} = \frac{0.001}{(2 * \sqrt{3})} = 0.0029 \quad \text{Ec. (7)}$$

- **Incertidumbre debido a la luz difusa:**

La contribución de la luz difusa se calcula a partir de los filtros de 220 y 400 nm, a la absorbancia de la muestra se calcula la absorbancia real tomando en consideración la luz difusa y luego se evaluó el sesgo (Absorbancia experimental de la muestra menos la absorbancia real) a cada longitud de onda y se calcula la incertidumbre con la siguiente ecuación:

$$ULD = \sqrt{U_{220}^2 + U_{400}^2} = \sqrt{(0.00138463)^2 + (0.00138463)^2} = 0.0023069 = 0.0023 \quad \text{Ec (8)}$$



• **Incertidumbre debido a la deriva de la línea de base:**

La ecuación de la incertidumbre debido a la deriva es la siguiente:

$$UDER = \frac{DER}{\sqrt{3}} = \frac{0.0008}{\sqrt{3}} = 0.00046 \quad \text{Ec. (9)}$$

Sumando la contribución de las tres incertidumbres obtenemos:

$$U_{esp} = \sqrt{U_{res}^2 + U_{LD}^2 + U_{DER}^2} = \sqrt{0.0029^2 + 0.0023^2 + 0.0052^2} = 0.00238 = 0.0024 \quad \text{Ec. (10)}$$

Incertidumbre asociada al filtro:

Es debida a la propia incertidumbre del valor de referencia para cada uno de los cuatro filtros. Las incertidumbres para cada filtro se muestran en la siguiente tabla:

Tabla N° 36. Incertidumbre asociada a cada filtro utilizado.

filtros	A	U (K=2)	U
50% blanco	0,315	0,005	0,0025
50% amarillo	0,302	0,005	0,0025
10% blanco	1,069	0,013	0,0065
10% amarillo	1,025	0,013	0,0065
U			0,009849

Donde la incertidumbre de los filtros es:

$$U_{filtros} = \sqrt{\sum U_{cada\ filtro}^2} = \sqrt{0.0025^2 + 0.0025^2 + 0.0025^2 + 0.0025^2} = 0.00985 \quad \text{Ec. (11)}$$

Incertidumbre debido a la precisión en las medidas de las muestras:

Es debido a la repetibilidad de las lecturas de la muestra, la ecuación para el cálculo es la siguiente:

$$U_{prec} = S/\sqrt{n} = \frac{0.011}{10} = 0.003478 = 0.0035 \quad \text{Ec. (12)}$$



Las incertidumbres debido a la lectura de la Absorbancia de la muestra tomando en consideración las contribuciones calculadas sería la siguiente:

$$U_{Am} = \sqrt{U_{espec}^2 + U_{filtró}^2 + U_{prec}^2} = \sqrt{(0.0024)^2 + (0.00985)^2 + (0.0035)^2} = 0.0107 \text{ Ec. (13)}$$

VI.8.2.2 Cálculo de la incertidumbre de la pipeta de 5 ml.

La pipeta contiene tres posibles fuentes de incertidumbres: La incertidumbre del fabricante, la incertidumbre debido a la repetibilidad y la incertidumbre debido a la expansión térmica del solvente. La incertidumbre de la pipeta la podemos calcular con la siguiente ecuación:

$$\mu_{pipeta} = \sqrt{\mu_{rep}^2 + \mu_{fab}^2 + \mu_{exp}^2} \quad \text{Ec. (14)}$$

μ_{rep} : Es la desviación obtenida en la calibración de la pipeta con el volumen vertido (ver anexo tabla N°3.)

μ_{fab} : Es la incertidumbre que se enmarca dentro de los límites de su distribución triangular.

μ_{exp} : Esta incertidumbre es debida al volumen, variación de temperatura y el factor del coeficiente de expansión térmica del agua.

donde:

$$\mu_{rep} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0.03904088}{\sqrt{10}} = 0.01234581 \quad \text{Ec. (15)}$$

$$\mu_{fab} = \frac{a}{\sqrt{6}} = \frac{0.020}{\sqrt{6}} = 0.00816 \quad \text{Ec. (16)}$$

$$\mu_{exp} = \frac{v \cdot \partial T \cdot \alpha}{2 \cdot \sqrt{3}} = \frac{10 \cdot 28 \cdot 2.07 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot \sqrt{3}} = 0.016731 \quad \text{Ec. (17)}$$

Sumando la contribución de las tres fuentes de incertidumbre tenemos:

$$\mu_{pipeta} = \sqrt{(0.012345)^2 + (0.00816)^2 + (0.01673)^2}$$

$$\mu_{pipeta} = 0.0220$$



VI.8.2.3 Cálculo de la incertidumbre del matraz aforado de 50 ml.

Al igual que la pipeta el matraz volumétrico de cincuenta mililitros contiene tres posibles fuentes de Incertidumbres: La incertidumbre del fabricante, la incertidumbre debido a la repetibilidad y la incertidumbre debido a la expansión térmica del solvente.

La incertidumbre del matraz la podemos calcular con la siguiente ecuación:

$$U_{\text{balón}} = \sqrt{\mu_{\text{rep}}^2 + \mu_{\text{fab}}^2 + \mu_{\text{exp}}^2} \quad \text{Ec. (18)}$$

μ_{rep} : Es la desviación obtenida en la calibración del balón con el volumen vertido (ver anexo tabla N°4.)

μ_{fab} : Es la incertidumbre que se enmarca dentro de los límites de su distribución triangular.

μ_{exp} : Esta incertidumbre es debida al volumen, variación de temperatura y el factor del coeficiente de expansión térmica del agua.

$$\mu_{\text{rep}} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0.031216}{\sqrt{10}} = 0.0098713 \quad \text{Ec. (19)}$$

$$\mu_{\text{fab}} = \frac{a}{\sqrt{6}} = \frac{0.05}{\sqrt{6}} = 0.02041 \quad \text{Ec. (20)}$$

$$\mu_{\text{exp}} = \frac{v \cdot \partial T \cdot \alpha}{2\sqrt{3}} = \frac{50 \cdot 28 \cdot 2.07 \cdot 10^{-4}}{2\sqrt{3}} = 0.08366 \quad \text{Ec. (21)}$$

Sumando la contribución de las tres fuentes de incertidumbre tenemos:

$$U_{\text{balón}} = \sqrt{(0.0098713)^2 + (0.02041)^2 + (0.08366)^2}$$

$$U_{\text{balón}} = 0.08667$$



VI.8.2.4 Incertidumbre debido al intercepto:

$$b_0 = \frac{S_{b_0}}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (22)}$$

$$U_{b_0} = \frac{0.0062548}{\sqrt{5}} = 0.002797$$

VI.8.2.5 Incertidumbre debido a la pendiente:

$$U_{b_1} = \frac{S_{b_1}}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (23)}$$

$$U_{b_1} = \frac{9.43 \times 10^{-5}}{\sqrt{5}} = 4.22 \times 10^{-5}$$

Encontrado el modelo matemático se aplicó la ley de propagación de la incertidumbre, obteniéndose la siguiente ecuación para calcular la incertidumbre combinada.

VI.8.3 Incertidumbre combinada.

Encontrado el modelo matemático se aplicó la ley de propagación de la incertidumbre, obteniéndose la siguiente ecuación para calcular la incertidumbre combinada.

$$U_{Cm} = \sqrt{(U_{Am}^2 * C_{Am}^2) + (U_{b_0}^2 * C_{b_0}^2) + (U_{V1}^2 * C_{V1}^2) + (U_{b_1}^2 * C_{b_1}^2) + (U_{V2}^2 * C_{V2}^2) + (2 * C_{b_0} * C_{b_1} * U_{b_0} * U_{b_1} * R)} \quad \text{Ec. (24)}$$

Donde:

U_c : Es la incertidumbre combinada.

U_{Am} : Es la incertidumbre de absorbancia medida de la muestra.

C_{Am} : Coeficiente de sensibilidad de absorbancia medida.

U_{b_0} : Es la incertidumbre del intercepto.

C_{b_0} : Coeficiente de sensibilidad del intercepto.

U_{V1} : Incertidumbre del volumen del matríz de 50 ml.

C_{V1} : Coeficiente de sensibilidad del volumen del balón.

U_{b_1} : Es la incertidumbre de la pendiente.

C_{b_1} : Coeficiente de sensibilidad de la pendiente.

U_{V2} : Es la incertidumbre del volumen de la pipeta.



A continuación se muestran los cálculos de los coeficientes de sensibilidad para cada uno de los componentes de la incertidumbre, los cuales se obtienen por la derivada parcial del modelo matemático:

$$C_{A_m} = \left(\frac{\partial C_m}{\partial A_m} \right) = \frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{50 \text{ ml}}{0.010705 * 5 \text{ ml}} = 934.1429 \quad \text{Ec.(25)}$$

$$C_{b_0} : \left(\frac{\partial C_m}{\partial b_0} \right) = - \frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{50 \text{ ml}}{0.010705 * 5 \text{ ml}} = - 934.1429 \quad \text{Ec.(26)}$$

$$C_{V_1} : \left(\frac{\partial C_m}{\partial V_1} \right) = \frac{A_m - b_0}{b_1 * V_2} = \frac{0.5504 - (-0.0041)}{0.010705 * 5 \text{ ml}} = 10.359645 \quad \text{Ec.(27)}$$

$$C_{b_1} = \left(\frac{\partial C_m}{\partial b_1} \right) = - \frac{(A_m - b_0) * V_1}{b_1^2 * V_2} = \frac{(0.5504 - (-0.0041)) * 50 \text{ ml}}{0.010705^2 * 5 \text{ ml}} = - 48386.9455 \quad \text{Ec.(28)}$$

$$C_{V_2} = \left(\frac{\partial C_m}{\partial V_2} \right) = - \frac{(A_m - b_0) * V_1}{b_1 * V_2^2} = \frac{0.5504 - (-0.0041) * 50 \text{ ml}}{0.010705 * 5 \text{ ml}^2} = - 103.59645 \quad \text{Ec. (29)}$$

Si sustituimos todos los valores obtenemos lo siguiente:

$$U_{C_m} = \sqrt{\left((0.0330)^2 * 934.14^2 \right) + \left((0.00279)^2 * (-934.1429)^2 \right) + \left((0.0866)^2 * 10.3596^2 \right) + \left((4.22 \times 10^{-5})^2 * (-48386.9455)^2 \right) + \left((0.022)^2 * (-103.5964)^2 \right) + \left(2 * (-934.14) * 48386.9455 * 0.00279 * 4.22 \times 10^{-5} * (-0.180906) \right)}$$

$$U_{C_m} = 3.108 * 10^{+1}$$

La concentración de $K_2Cr_2O_7$ en la muestra con su incertidumbre es:

$$C_m \pm \mu C_m = 517.98 \pm 31.09$$

VI.8.4. Contribución de cada uno de los componentes.

En la tabla N° 37 se resumen todos los parámetros que intervienen en la evaluación de la Incertidumbre de Dicromato de potasio en esta tabla se muestran las variables xi del modelo matemático de la ecuación (5), el valor correspondiente de las incertidumbres (μ), los coeficientes de sensibilidad de cada variable (C_o), el producto de μ y C_o , y el índice de contribución (% Ind.) calculado a partir de la ecuación (30)



$$\text{Ind}\% = \frac{(\mu C_O)^2}{\Sigma(\mu C_O)^2} (100) \quad \text{Ec.}(30)$$

Tabla N° 37. Balance de la Incertidumbre en la medición.

parámetro	x_i	μ	C_o	$\mu * C_o$	$(\mu * C_o)^2$	% Ind.
b_0	-0.0041	0.00279726	-934.1429	-2.6130391	6.8279737	5.83
b_1	0.010705	4.22E-05	-48386.94	-2.0404994	4.16363788	3.55
V_1	50	0.08667	10.359645	0.89787043	0.80617132	0.69
V_2	5	0.022	-103.5964	-2.2791219	5.19439666	4.43
a_m	0.5504	0.01071332	934.142924	10.0077721	100.155502	85.50
				suma	117.147681	100

Luego cada contribución de cada componente se grafica en el diagrama de Pareto donde se observa que la mayor contribución es la proporcionada por la medición de la absorbancia de la muestra (89.43%), los componentes debido a la incertidumbre del intercepto, volumen del matraz y la pendiente presentan parecida contribución, (5.83, 4.43 y 3.55 respectivamente) y la de menor contribución es la de la pipeta de 5 ml con menos del 1%.

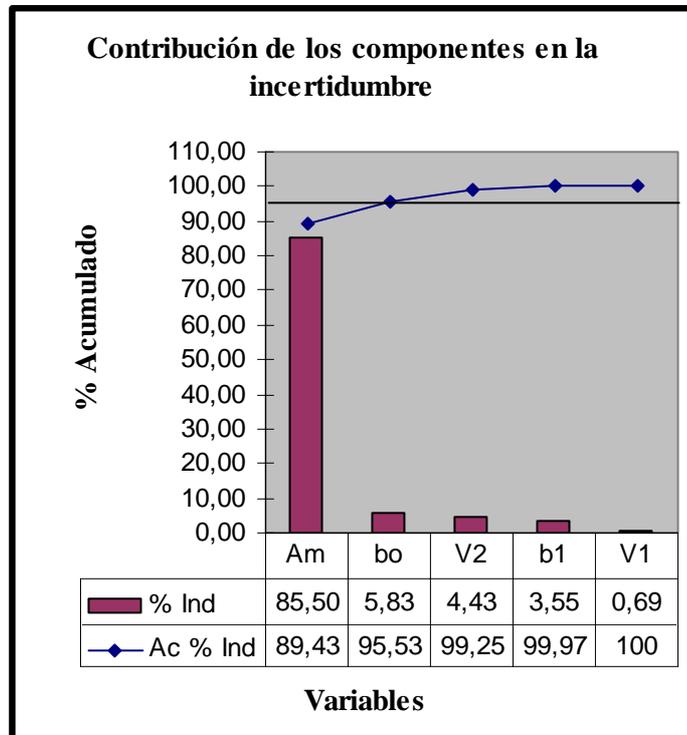


Figura N° 5. Diagrama de pareto para las contribuciones de las incertidumbres en la concentración de $K_2Cr_2O_7$.

También en el mismo gráfico se observa que los dos primeros parámetros (Am y bo). Contribuyen con un 95.53% del total en la evaluación de la incertidumbre.



VI.9 DIAGNOSTICO DEL ESPECTROTOMETRO

MARCA: SHIMADZU.MODELO: 1200.Nº de serie : 55019.

UBICACIÓN: Laboratorio Análisis Instrumental. Departamento de Química.

Resultados de pruebas de calibración de un espectrofotómetro Shimadzu 1200.

EXACTITUD FOTOMETRICA				
MATERIAL UTILIZADO	OBSERVACIONES	VALORES OBTENIDOS	ESPECIFICACIONES	CONCLUSIONES
Filtro Blanco 50 % T	Materiales de referencia con certificado trazable a la NIST	Exactitud: Sesgo < 0.005 Repetibilidad: 6.8e-7	Exactitud: ± 0.005	El equipo presentó buena exactitud y repetibilidad fotométrica.
Filtro amarillo 50 % T		Exactitud: Sesgo < 0.005 Repetibilidad: 4.7e-7		
Filtro Blanco 10 % T		Exactitud: Sesgo < 0.005 Repetibilidad: 4.2e-7	Repetibilidad: ± 0.002	
Filtro amarillo 10 % T		Exactitud: Sesgo < 0.005 Repetibilidad: 1.1e-6		
EXACTITUD ESPECTRAL				
MATERIAL UTILIZADO	OBSERVACIONES	VALORES OBTENIDOS	ESPECIFICACIONES	CONCLUSIONES
Dicromato (350 nm)	Preparado en el laboratorio.	Exactitud: Sesgo < 0.05 nm Repetibilidad: 0.47 nm	± 1.0 nm	Presentó buena exactitud y repetibilidad espectral.
Dicromato (350 nm)	Preparado en el laboratorio.	Exactitud: Todos < 0.05 nm Repetibilidad: 0.275 nm	± 1.0 nm	Presentó buena exactitud y repetibilidad espectral.
Filtro de Oxido de Holmio	Filtro sin certificado de los picos característicos.	Sesgo con respecto a valores de referencia: 4.07, 0.62, 4.23, 1.94, 0.58, 0.46. Sesgo con respecto a equipo de referencia: 0.21, 1.89, 1.46, 0.76, 0.67, 0.18.	± 1.0 nm	Para la exactitud espectral presentó valores del sesgo por encima de lo recomendado en ambos.
LINEALIDAD				
MATERIAL UTILIZADO	OBSERVACIONES	VALORES OBTENIDOS	ESPECIFICACIONES	CONCLUSIONES
Dicromato (350 nm)	Preparado en el laboratorio.	R ² 0.99996	0.998 ≤ R ² ≤ 1	Presentó muy buena linealidad..
Dicromato (350 nm)	Preparado en el laboratorio.	R ² 0.99996	0.998 ≤ R ² ≤ 1	Presentó muy buena linealidad..
RUIDO				
aire	Aire	0.0008 UA	< 0.001	Niveles de ruido menores
ESTABILIDAD				
aire	Aire	< 0.003 A / hora	< 0.02 A / hora (farmacopea)	Niveles menores que las especificaciones
LUZ DIFUSA				
Filtros de 220 nm y 400 nm	Filtros sin certificados.	Filtro de 220 nm : 0.0009 T Filtro de 400 nm: 0.0012T	< 0.05 T	En ambos casos presento luz difusa a valores de absorbancias mayores de 2. Aceptable.
RESOLUCIÓN				
Tolueno en al 0.02 % en Hexano	Preparado en el laboratorio	1.14	1.5	no presentó buena resolución.



VII. CONCLUSIONES.

En el estudio realizado para la calibración y/o verificación SHIMADZU del desempeño de la respuesta del espectrofotómetro, se le realizaron varias pruebas cada una de ellas con objetivos definidos.

En la evaluación de la exactitud espectral, se puede observar, según los resultados que cuando se utilizó la solución de Dicromato de potasio para ambas longitudes de onda evaluadas (350 y 257 nm) se tuvo una exactitud espectral con sesgo menores de 0.1 nm y repetibilidades menores de 0.3 nm los cuales estos valores son menores que los reportados en las especificaciones del instrumento. Con el filtro de holmio para esta misma prueba se obtuvo un sesgo mayor que las especificaciones pero siempre dentro del intervalo del ancho de banda. Sin embargo no se obtuvo buena exactitud por lo que para esta prueba resultó más confiable la solución de Dicromato de potasio en el filtro.

En la evaluación de la exactitud fotométrica, en el cual se utilizaron cuatro filtros certificados, en estos se observó que en los cuatro se obtuvo un sesgo menor que 0.005 UA (Unidades de absorbancia) y una repetibilidad menor de 0.002 UA por lo cual se puede asegurar que el equipo presento muy buena exactitud fotométrica y repetibilidad fotométrica.

Para la evaluación de la linealidad se observó una excelente relación lineal entre la absorbancia y la concentración en un rango de 20 a 100 ppm de los estándares de Dicromato de potasio, esto se puede comprobar por medio del grafico y además por que el coeficiente de regresión a las dos longitudes de onda se encontró entre 0.999 y 1 nm cumpliendo con las especificaciones del fabricante ($0.998 \leq r^2 \leq 1$) por lo cual se afirma que el equipo presenta una excelente relación lineal de los parámetros mencionados.



En el análisis del ruido se observó un valor de “0.008 UA” el cual es menor que el de las especificaciones “ 0.001 UA” por lo cual verificamos que esta prueba cumple con lo recomendado, de igual manera cuando se evaluó estabilidad también se observó valores menores de las especificaciones, también se realizó la prueba de la luz difusa y en ambos filtros utilizados se observó que presentaron valores de absorbancia mayores de 2, por lo cual se confirma que la luz difusa solo afecta a valores grandes de absorbancia.

Por último se evaluó la resolución con la solución de tolueno en hexano y este presentó un valor menor que el de las especificaciones (1.5) por lo cual podríamos afirmar que el equipo no presenta muy buena resolución. Sin embargo habría que considerar que esta solución preparada en laboratorio no presentaba las condiciones adecuadas.

Si tomamos en consideración todas las pruebas realizadas podemos concluir que el equipo presentó muy buena exactitud espectral (solución. de Dicromato de potasio), muy buena exactitud fotométrica, cumplió con los niveles de ruido, estabilidad, luz difusa y que no presentó muy buena resolución.

Además de los estudios antes mencionados se evaluó la Incertidumbre de la medición aplicada a una muestra que contenía Dicromato de potasio, el resultado de la concentración de la muestra con su Incertidumbre fue de: 517.98 ± 31.09 .



VIII. RECOMENDACIONES.

- Evaluar la exactitud espectral utilizando un filtro de Holmio certificado.
- Realizar una prueba para verificar la resolución de los picos utilizando una solución de tolueno en hexano certificado.
- Aunque se obtuvo buena linealidad sería bueno contar con los filtros certificados de Dicromato de potasio para evaluar la linealidad.
- Realizar pruebas de calibraciones a otros espectrofotómetros existentes en los laboratorios de la UNAN – LEÓN con material certificado.



IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1) ISO/IEC Guide 98:1995- Guide to the expression of uncertainty.
- 2) González, R (2004) Curso: Calibración de Espectrofotómetros Ultravioleta-Visible.CASMET. Querétaro, Qro.México.
- 3) Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo Tercera edición
- 4) Manual de instrucciones del instrumento Shimadzu 1200.
- 5) Ramón Compañó Beltrán, Ángel Ríos Castro. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos.
- 6) Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L.M. C.; De Jong, S.; P.J. y Smeyers-Verveke.J (1997): Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Elsevier, Amsterdam.
- 7) www.monografias.com/.../Metrologia.../metrologia-y-calidad.shtml.
- 8) Vocabulario Internacional sobre Metrología.VIM
- 9) Guía ISO 34 (2000) “Requisitos de competencia para los productores de materiales de referencia”
- 10) www.ts.nist.gov/ts/hifdocs/230/232/232.htm
- 11) Guía ISO 30 (1992) “Términos y definiciones relacionadas con los materiales de referencia”
- 12) Chung Chow Chan Y.C. Lee Herman Lam Xue-Ming Zhang. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification.
- 13) BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC. Guide for to the expression of uncertainty (GUM)
- 14) Eurachem/Citac GUIDE, (2000), Quantifying Uncertainty in Analytical Chemistry, 2da edition, UK.
- 15) Phillips S.D., Eberthardt KR, y Parry B, (1993) “ Guidelines for expressing the uncertainty of measurement results containing uncorrected bias” Journal of Research of National Institute of Standards and Technology.
- 16) F. PALLAVICINI (“Métodos espectroscópicos”, Maestría en Química aplicada al Análisis y Gestión de la Calidad. UNAN –LEÓN (Febrero del 2008)



- 17) G. Delgado. Curso Validación de Métodos Analíticos. Maestría en Química Aplicada al Análisis y Gestión de la Calidad. UNAN-LEÓN (Febrero del 2008).

- 18) Weidner, V. R. Mavrodineanu, R. Mielenz, K. D. Velapoldi, R.A. Eck-erle, KL. & Adams, B. (1986). Standard Reference Materials: Holmium Oxide Solution-Wavelength Standard from 240 to 650 nm SRM 2034. NBS Special Publication July 1986. Washington, D.C.

- 19) Mavrodineanu, R. Burke, R. W. Baldwin, J.R. et al. (1994). Standard Reference Materials : Glass Filter as a standard reference material for spectrophotometry selection, preparation, certification and use of SRM 930 and 1930 NIST Special Publication March 1994. Washington D.C.

- 20) Miller N. James, Miller C. Jane. Estadística y Quimiometría para Química Analítica 4ta edición 2002.

- 21) Skoog A., Holler F.J. y Nieman, T, Análisis Instrumental, Quinta edición, editorial Graw Hill, España año 2001.



X. ANEXOS

Calibración de pipeta y Balón

Tabla N°1. Densidad del aire en g/cm³, en función de la presión barométrica.

Densidad del aire a 28°C	1.0048
Densidad de las pesas	8.0
P. Barometrica	760
T. del agua	28°C

Tabla N°2. Densidad absoluta del agua a varias temperaturas.

Temperatura °C	Densidad del agua
20	0.998203
21	0.997992
22	0.997770
28	0.996232
29	0.995944
30	0.995670
31	0.995360
32	0.995050
33	0.4730

Tabla N° 3. Datos obtenidos en la calibración de una Pipeta de 10 ml.

Temperatura °C	Masa Inicial	Masa Final	Masa vertida(aparente)	Masa vertida(al vacío)	Volumen vertido
28	102.5926	112.4609	9.8683	8.6822	9.9156
28	112.46	122.21	9.7491	8.5773	9.7958
28	122.21	132.04	9.8301	8.6486	9.8773
28	132.04	141.8115	9.7714	9.5969	9.8183
28	141.8115	151.624	9.8129	8.6335	9.8600
28	151.624	161.4136	9.7892	8.6126	9.8362
28	161.4136	171.2015	9.7879	8.6114	9.8348
28	171.2015	180.9814	9.779	8.6044	9.8268
28	180.9814	190.7148	9.7334	8.5635	9.7801
28	190.7148	200.5030	9.7882	8.6117	9.8352
				Media	9.8380
				Desvest	0.03904



Tabla N° 4. Datos obtenidos en la calibración de un balón aforado de 50ml.

Temperatura °C	Masa Inicial	Masa Final	Masa vertida(aparente)	Masa vertida (al vació)	Volumen vertido
28	38.9769	88.7075	49.7315	43.7542	49.97
28	38.9769	88.6290	49.6521	43.6844	49.89
28	38.9769	88.6265	49.6496	43.6822	49.88
28	38.9769	88.6219	49.645	43.67	49.88
28	38.9769	88.6161	49.6392	43.6731	49.775
28	38.9769	88.6122	49.6353	43.6696	49.87
28	38.9769	88.6104	49.6335	43.6680	49.87
28	38.9769	88.6096	49.6327	43.6673	49.87
28	38.9769	88.6051	49.6282	43.6634	49.8664
28	38.9769	88.6000	49.6231	43.682	49.8613
				Media	49.8853
				Desvest	0.3122

Tabla N° 5. Resultados de calibración de pipeta y balón.

Volumen Pipeta.	10 ml
U. Fabricante	0.02
Media	9.838
Desviación Estándar	0.03904
Incertidumbre combinada	0.02202
Volumen Balón	50 ml
U. Fabricante	0.05
Media	49.88
Desviación Estándar	0.03121
Incertidumbre combinada	0.08667

La pipeta volumétrica al igual que el balón de aforo utilizado fueron calibrados a una temperatura de 28°C calculando luego la incertidumbre combinada de cada uno de ellos.