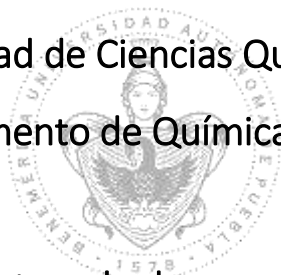


Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica



“Evaluación de los parámetros de desempeño para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando un sensor derivado del cinamaldehído”

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

Ana Karen González Tello

Director de tesis:

Dr. José Luis Gárate Morales

Asesor de tesis:

Dra. Rocío Aguilar Sánchez



PUEBLA, PUE., DICIEMBRE 2018

El trabajo "Evaluación de los parámetros de desempeño para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando un sensor derivado del cinamaldehído" se realizó en el departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se agradece la beca del proyecto VIEP "Sensores óptico-electroquímicos basados en sistemas electrodo/polímero/mediador "con clave BUAP-CA-40.

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

$a$ -	Ordenada en el origen de la recta de regresión
$b$ -	Pendiente de la recta de regresión
$b$ -	Sesgo
CV-	Coefficiente de variación
Ca -	Concentración analítica
$n$ -	Tamaño muestral
$r$ -	Coefficiente de correlación
$r^2$ -	Coefficiente de determinación
%R-	Porcentaje de recobro
$SD$	Desviación estándar de una muestra
$\bar{x}$	Media aritmética de una muestra
$\hat{y}$ -	Valores de $y$ pronosticados por la recta de regresión

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 Bases de Schiff .....	6
1.2 Química de la base de Schiff .....	7
1.3 Cobre .....	8
1.4 Espectroscopía UV-Vis.....	8
1.5 Ley de Lambert-Beer .....	8
1.6 Desviaciones de la ley de Lambert-Beer y fuentes de error .....	9
2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS .....	10
2.1 Características de desempeño de los métodos .....	11
2.1.1 Selectividad .....	11
2.1.2 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LQ) .....	11
2.1.3 Intervalo de trabajo y lineal .....	12
2.1.4 Análisis de regresión .....	12
2.1.5 Determinación del sesgo.....	14
2.1.6 Repetibilidad .....	14
2.1.7 Reproducibilidad .....	15
2.1.8 Robustez.....	15
JUSTIFICACIÓN .....	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTÍCULARES.....	16
INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS .....	16
3. METODOLOGÍA.....	17
3.1 Síntesis química de la imina N-(2-hidroxifenilo)cinamaldeimino [compuesto 1] .....	17
3.2 Preparación del buffer ácido acético-acetato.....	17
3.3 Preparación de la muestra .....	17
3.4 Preparación de la curva para valoración espectrofotométrica.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1 Caracterización del ligante .....	19
4.2 Valoración espectrofotométrica del compuesto 1 con cobre .....	20

4.3 Selectividad .....	21
Parámetro de aceptación para la evaluación del método .....	21
4.4 Intervalo lineal y de trabajo .....	21
4.5 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LQ) .....	24
4.6 Precisión .....	25
4.6.1 Repetibilidad (intradía) .....	25
4.6.2 Repetibilidad (inter-día) .....	26
4.7 Reproducibilidad .....	27
4.8 Pruebas de recuperación .....	30
4.9 Robustez .....	31
CONCLUSIONES .....	34
PROPUESTAS .....	35
MÉTODO ESTABLECIDO .....	36
BIBLIOGRAFÍA .....	38
ANEXOS .....	40

## 1. INTRODUCCIÓN

Recientemente, el diseño y la síntesis de moléculas orgánicas inteligentes ha atraído mucho la atención para ser utilizadas como quimiosensores capaces de detectar metales, con alta selectividad y sensibilidad, explotando sus propiedades colorimétricas o fluorescentes y encontrando aplicaciones en analítica, en medicina o ciencias ambientales.<sup>1</sup> Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la búsqueda de quimiosensores colorimétricos con alta sensibilidad para detectar diferentes metales que representan una problemática actual en cuanto a los procesos de cuantificación. Estudios previos nos han dirigido a la síntesis de bases de Schiff derivadas del cinamaldehído para modular las propiedades químicas de la molécula orgánica e iniciar los estudios correspondientes que comprobarán si es un buen o mal sensor. Ya que las reacciones con metales y bases de Schiff derivadas del cinamaldehído no han sido evaluadas sobre los parámetros de desempeño, nos propusimos evaluar dichos parámetros considerando que está descrito que pueden llegar a formar complejos con níquel, cobalto, zinc o cobre.<sup>2</sup>

El cobre es el tercer metal de transición más abundante en la tierra y es un micronutriente esencial que junto con ciertas proteínas produce enzimas críticas para la vida, interviene en la función inmune y juega un papel importante en la formación de tejido y hueso. Sin embargo, la presencia de cobre en altas concentraciones (como consecuencia de su uso generalizado para fines industriales) puede producir efectos negativos en el organismo como Alzheimer, Parkinson o enfermedad de Wilson.<sup>3,4</sup> La concentración normal de cobre en sangre está limitada a 0.15 mg/L ( $2.36 \times 10^{-5}$  M).<sup>5</sup> Para recursos naturales, como el agua potable, el límite se ha establecido en el rango de  $1 \times 10^{-5}$ -  $3 \times 10^{-5}$  M (1.3 ppm)<sup>6</sup>, en la normativa mexicana el límite se ha establecido en 1 mg/L ( $1.57 \times 10^{-5}$  M).

La técnica por la que se cuantifica la presencia de este metal en agua es absorción atómica, pero este método requiere de un equipo cuyo costo es relativamente alto y por lo tanto no todos los laboratorios cuentan con uno. Gracias a que la base de Schiff sintetizada funciona perfectamente como un quimiosensor para reconocer y cuantificar fácilmente los iones de cobre, se decidió implementar un método que permita cuantificar cobre en agua por espectroscopía UV-Vis. Y motivados porque experimentos cualitativos indican que se puede detectar  $\text{Cu}^{2+}$  en muy bajas concentraciones, se trabajaron los parámetros de desempeño con el objetivo de que en trabajos futuros sea posible establecer un método de validación.

### 1.1 Bases de Schiff

Derivadas de la condensación reversible de aldehídos y aminas y descubiertas por Hugo Schiff en 1864, las bases de Schiff son compuestos caracterizados por poseer un grupo funcional imina  $\text{-C=N}$ , donde el Nitrógeno presenta un par de electrones libres que le permite comportarse como una base de Lewis mientras que el carbono actúa como un electrófilo, además, la presencia de grupos  $\text{-OH}$  produce que estos compuestos aumenten su reactividad. Estas características hacen que sean ligantes versátiles útiles en el campo de la química de coordinación, especialmente en el desarrollo de complejos con iones metálicos que encuentran aplicación en química analítica, biológica e inorgánica.<sup>7</sup>

En los últimos años, en las áreas de farmacia y medicina se han reportado numerosos complejos de bases de Schiff con actividad antimicrobiana, antifúngica, antiproliferativa, antiinflamatoria,

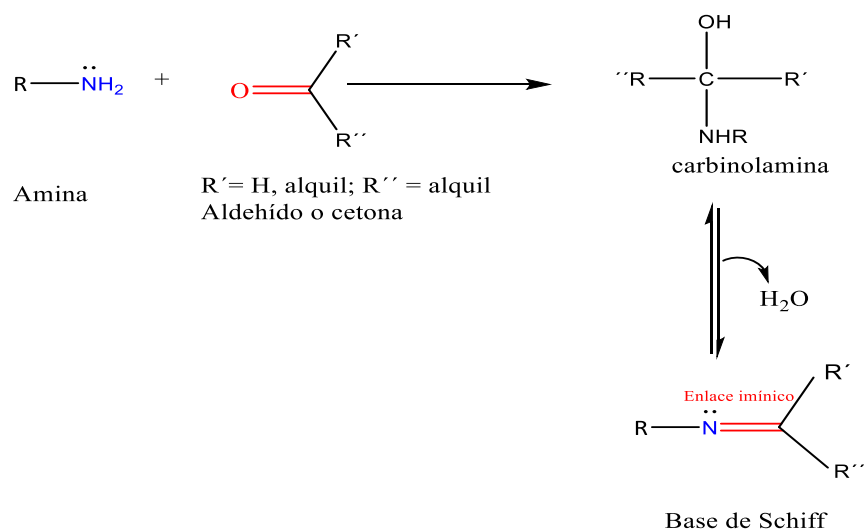
antiviral y antipirética, pero al poseer otras propiedades particulares, también pueden encontrar uso en catálisis y electroanálisis.<sup>8</sup>

Particularmente en el área de química analítica, se sabe que se pueden detectar y cuantificar ciertos iones metálicos específicos como Ag (I), Mg (II), Ni (II), Pb (II), Zn (II), Cu (II), Co (II) porque las bases de Schiff presentan una excelente selectividad y sensibilidad por ellos y su importancia se ve resaltada porque algunos de estos iones son de interés ambiental.<sup>9</sup>

## 1.2 Química de la base de Schiff

Como se menciona en la sección 1.1, las bases de Schiff se forman a partir de aldehídos aromáticos y aminas, puesto que la presencia de al menos un acompañante aromático es necesaria para asegurar la estabilidad de estos compuestos. Generalmente, se preparan por condensación entre un aldehído o una cetona y una amina primaria en presencia de agentes desecantes, ya que la eliminación del agua es necesaria para que la reacción sea completa.

El mecanismo de formación de estos compuestos consiste en que la amina reaccione con el aldehído o la cetona para dar un compuesto de adición inestable llamado carbinolamina. La carbinolamina pierde agua por vías catalizadas por ácidos o bases y al ser un alcohol, sufre deshidratación catalizada por ácido, como se presenta en el Esquema 1, típicamente, la deshidratación de la carbinolamina determina la velocidad de formación de la base de Schiff y es por eso por lo que la reacción es catalizada por ácidos. Sin embargo, la concentración de ácido no puede ser muy elevada ya que las aminas son compuestos básicos. Cuando la nucleofilia de la amina se ve afectada por protonación, el equilibrio se va hacia la izquierda y la formación de carbinolamina no puede ocurrir.<sup>9</sup>



**Esquema 1.** Formación de una base de Schiff por una reacción de condensación.

### 1.3 Cobre

El cobre es el tercer elemento más abundante en la tierra, después del hierro y el zinc. También es un micronutriente esencial que junto con algunas proteínas produce cerca de 20 enzimas críticas para la vida; juega un papel importante en la formación de hueso y tejido, en la respiración celular, en la función inmune y cerebral y en la transcripción de genes. Sin embargo, la presencia de cobre en altas concentraciones (como consecuencia de su uso generalizado para fines industriales) puede producir efectos adversos sobre el organismo debido al estrés oxidativo que genera y por consecuencia el daño a órganos como riñón e hígado. Atas concentraciones de cobre en plasma están asociadas a enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, Menkes o Wilson.<sup>10</sup>

La concentración normal de cobre en plasma está limitada a 0.15 mg/L ( $2.36 \times 10^{-5}$  M).<sup>5</sup> mientras que, en los recursos naturales, como el agua potable, el límite se ha establecido en el rango de  $1 \times 10^{-5}$ - $3 \times 10^{-5}$  M (1.3 ppm)<sup>6</sup>. En la normativa mexicana el límite se ha establecido en 1 mg/L ( $1.57 \times 10^{-5}$  M). Dado que estas concentraciones son muy pequeñas, su cuantificación requiere del uso de técnicas sensibles como voltamperometría de extracción anódica, espectroscopía de absorción atómica, cromatografía o electrodos selectivos de iones. Sin embargo, estos métodos son complicados, requieren de mucho tiempo y utilizan equipos cuyo costo es relativamente alto, por ello, el diseño y la síntesis racional de quimiosensores eficientes para cuantificar fácilmente y mediante técnicas sencillas a los iones de cobre es un tema de especial interés en medicina y ciencias ambientales.<sup>11</sup>

### 1.4 Espectroscopía UV-Vis

Esta técnica es utilizada en casi todos los laboratorios para análisis o investigación de rutina y tiene aplicación tanto en análisis cualitativo como cuantitativo. Se basa en la interacción que existe entre una muestra y luz. La luz es una radiación electromagnética constituida por ondas que tienen diferentes longitudes de onda de fotones que transportan cantidades variables de energía. La radiación está comprendida entre 190 y 800 nm y se divide en dos regiones: la región ultravioleta cuyo rango va de 190 a 400 nm y la región visible que va de 400 a 800 nm.

Las moléculas absorben luz cuando la energía del fotón promueve a sus electrones de valencia a pasar de un estado de menor energía a uno mayor. Esta habilidad de la molécula se presenta en un espectro de absorción UV-Vis que estará en función de la estructura molecular. El espectro puede ser útil en la identificación y determinación de propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, la principal aplicación de esta técnica está relacionada con la cuantificación y está descrita por la ley de Lambert-Beer.<sup>12</sup>

### 1.5 Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer rige estas técnicas y nos dice que la absorción es proporcional a la concentración de moléculas absorbentes y establece que la fracción de radiación absorbida es independiente de la intensidad de la radiación:

$$A = \log_{10} \left\{ \frac{I_0}{I} \right\} = \epsilon c l$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la radiación incidente,  $I$  es la intensidad de la radiación emitida,  $\epsilon$  es el coeficiente de absorptividad molar ( $\text{mol}^{-1}/\text{dc}^{-3}\text{cm}$ ),  $l$  es la longitud de la celda y  $c$  es la concentración de la especie absorbente ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ). El coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) es independiente de la concentración y la longitud de la celda ( $l$ ), mientras que la absorción depende de ambos.<sup>7,15</sup> Esta ley solo es válida cuando la luz es monocromática, esto es, la radiación tiene una

sola longitud de onda.<sup>8</sup> La absorbancia de la molécula depende del solvente (incluida su polaridad), pH, interacciones moleculares y temperatura o la presencia de agentes complejantes. Así pues, la absorbancia medida para un mesurando puede relacionarse linealmente con la concentración a través de esta ley.<sup>12,13</sup>

### **1.6 Desviaciones de la ley de Lambert-Beer y fuentes de error**

La proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración inferida en la ecuación de la sección 1.5, no siempre se observa, debido a desviaciones de la ley de Lambert-Beer que pueden ser de naturaleza química o instrumental.<sup>6</sup> A concentraciones altas del mesurando (generalmente >0.01M) se pueden observar desviaciones de la linealidad puesto que existen cambios en el índice de refracción y porque la proximidad de las moléculas absorbentes afecta su distribución de carga y provoca alteraciones en su capacidad de absorción.

Además, los compuestos que son objeto de estudio no deben participar en reacciones químicas, como reacciones de auto-asociación o degradación que pudieran conducir a cambios en la absorbancia. Las partículas presentes en la muestra también pueden conducir a estos cambios debido a la dispersión de la luz.

Experimentalmente no es posible obtener radiación monocromática. En la práctica la muestra es expuesta a radiación policromática dentro de un cierto rango de longitud de onda ( $\Delta\lambda$ ), cuando más estrecho sea el rango de longitud de onda, mejor, ya que la luz policromática conduce a desviaciones de la ley. Esta desviación es significativa cuando los coeficientes de absorción molar varían mucho. En consecuencia, para el trabajo cuantitativo, se debe seleccionar un rango de longitud de onda relativamente estrecho en el que solo haya un pequeño cambio en la capacidad de absorción; esto normalmente se encuentra en el máximo de absorción.

Las desviaciones también se pueden dar debido a la luz dispersa que ocasiona que llegue luz al detector sin que haya pasado por la muestra debido a la luz de dispersión dentro de la instrumentación o luz que ingresa desde el exterior. Por otra parte, la luz difusa dará como resultado desviaciones negativas, estos errores son predominantes cuando la longitud de onda de la fuente de luz es baja.<sup>13,14</sup>

## 2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

La ISO 9000:2000 define a la validación como la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que un procedimiento analítico es efectivamente, aplicable para el objetivo establecido. El objetivo de cualquier método analítico es proporcionar datos consistentes, confiables y precisos. Por esta razón, los rendimientos y las limitaciones del método, así como las influencias externas que pueden modificar estas características, deben determinarse antes de su uso.

La validación consiste en la determinación de parámetros de calidad bien definidos estadísticamente (selectividad, especificidad, linealidad, exactitud, precisión, recuperación, límite de detección, límite de cuantificación y comparación con otros métodos) así como parámetros operativos/económico (simplicidad, tiempo de análisis, precio por análisis, seguridad del personal del laboratorio e impacto ambiental). Los resultados de la validación del método evidencian la calidad y consistencia de los resultados analíticos obtenidos en determinaciones futuras en muestras reales, mientras que los parámetros operacionales/económicos evalúan si el método puede usarse para análisis de rutina.

Se considera que la validación está muy relacionada con el desarrollo del método. De hecho, a veces es difícil establecer cuándo ha finalizado la optimización del método y comienza la validación. Algunos de los parámetros de validación se evalúan durante el método de validación, con el fin de optimizar las condiciones experimentales.<sup>15</sup>

La mayoría de las veces, un estudio de validación se lleva a cabo cuando:<sup>16</sup>

- Un nuevo método analítico se está desarrollando
- Se están realizando pruebas para la extensión de la aplicabilidad de un método analítico conocido, por ejemplo, determinaciones de un mesurando dado, pero con una matriz diferente.
- El control de calidad del método aplicado muestra variabilidad de sus parámetros a través del tiempo.
- Un método analítico dado tiene que ser usado en otro laboratorio, usando diferentes instrumentos
- Comparación del nuevo método analítico con uno de referencia

El rango de parámetros, cuya determinación debe de ser la base del proceso de validación para un método analítico dado depende de los siguientes factores:

- El carácter de la prueba analítica a realizar, usando un método analítico dado (análisis cualitativo o cuantitativo, análisis de una sola muestra o una investigación analítica de rutina)
- Requisitos de un método analítico dado
- Tiempo y costos que deben gastarse durante el proceso de validación

Los parámetros que se consideran necesarios para la validación de diferentes tipos de procedimientos analíticos se presentan en la Tabla 1. En este trabajo, se evaluarán los parámetros señalados con color gris.

Tabla 1. Parámetros cuya determinación es necesaria para diferentes tipos de procedimientos analíticos. <sup>16</sup>

Parámetro	Análisis cualitativo	Prueba de impurezas límite	Análisis cuantitativo	Prueba de ensayo
Precisión	- <sup>a</sup>	-	+	+
Exactitud	-	- <sup>a</sup>	+	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección	- <sup>a</sup>	+	- <sup>a</sup>	
Límite de cuantificación	- <sup>a</sup>	-	+	-
Linealidad	- <sup>a</sup>	-	+	+
Robustez	+	+	+	+

<sup>a</sup> podría ser determinado

Cuánto más parámetros se incluyan en el proceso de validación, más tiempo se debe gastar en el proceso.

## 2.1 Características de desempeño de los métodos

Los parámetros de validación estadística describen el rendimiento y las limitaciones de los métodos, indicando la calidad de los resultados. Para determinarlos, el analista debe conocer el significado de cada parámetro y el proceso de cálculo apropiado. El método es adecuado para el propósito establecido si los resultados de la validación están dentro de los criterios de aceptación establecidos.

### 2.1.1 Selectividad

Los estudios de selectividad buscan encontrar los efectos de los interferentes más probables, en este trabajo son otros iones metálicos divalentes diferentes al cobre, mediante su adición intencional. Esto para demostrar que los efectos de otros interferentes no son significativos. En otras palabras, para cumplir con este parámetro es necesario que en una mezcla compleja de estos interferentes se asegure que la respuesta obtenida solo se debe al mesurando que está siendo estudiado y no a algo física o químicamente similar, que pudiera causar un sesgo en el resultado de la medición. <sup>17</sup>

### 2.1.2 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LQ)

Mientras que límite de cuantificación es la concentración mínima del mesurando que se puede determinar con precisión y exactitud aceptable, el límite de detección es la concentración mínima del mesurando que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Ambos parámetros definen la sensibilidad del método.

Según la Eurochem, se calculan multiplicando una desviación estándar por un factor adecuado. Es importante que esta desviación estándar sea representativa de la precisión obtenida para muestras de ensayo típicas y que se realicen suficientes réplicas de medición para brindar una estimación confiable. Las muestras usadas deberían ser preferentemente muestras que no tengan cantidades detectables del mesurando o muestras de analito con concentraciones cercanas o por debajo de del LQ esperable. Las muestras blanco funcionan bien en métodos en los cuales se obtienen una señal

medible para un blanco como son la espectrofotometría o absorción atómica. La desviación estándar puede ser calculada con o sin corrección del blanco ( $s'_o$ ), esto depende de qué especifique el procedimiento determinado y finalmente, se utiliza para calcular LOD y LQ.<sup>17</sup>

La fórmula para calcular la desviación estándar a partir de resultados de réplicas de blancos o con muestras de concentración cercana a cero es:

$$s'_o = \frac{s_o}{\sqrt{n}}$$

donde:

$s'_o$  es la desviación estándar usada para calcular LOD y LQ

$s_o$  es la desviación estándar estimada de  $m$  resultados individuales en o cerca de concentración 0

$n$  es el número de réplicas de observación

Típicamente se consideran necesarias de 6-15 réplicas; usualmente se recomiendan 10 réplicas en procedimientos/protocolos de validación.

### 2.1.3 Intervalo de trabajo y lineal

El “intervalo de trabajo” es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación, LQ. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

El intervalo lineal es la capacidad para obtener resultados de un dato variable (ejemplo: absorbancia) que es directamente proporcional a la concentración de la muestra y su evaluación se realiza para cada nivel por triplicado, por lo menos a cinco niveles diferentes de concentración, para finalmente graficar la respuesta.

El intervalo de trabajo y la linealidad se evalúan mediante una inspección visual del gráfico, con el apoyo de estadísticas y un gráfico de residuales de una regresión lineal.<sup>17</sup>

### 2.1.4 Análisis de regresión

En la terminología de la regresión, la variable que se va a predecir se llama variable dependiente. La o las variables que se usan para predecir el valor de la variable dependiente se llaman variables independientes. En general, existen cuatro posibles formas en que las variables pueden relacionarse: relación lineal directa, relación lineal inversa, relación no lineal directa y relación no lineal inversa, cuya estructura formal y funcional permite dilucidar con objetividad las actividades orientadas a decidir qué ecuación debe emplearse, cuál es la ecuación que mejor se ajusta a los datos y cómo debe validarse la significancia de los pronósticos realizados.<sup>18</sup>

Para cada análisis de regresión se obtiene una ecuación, denominada ecuación de la línea recta

$$Y = a + bX$$

Donde  $a$  representa la ordenada Y. Su valor es el punto en el cual la línea de regresión cruza el eje “y”

$b$  es la pendiente de la recta y representa qué tanto cambia la variable dependiente  $Y$  por cada unidad de incremento de la variable independiente  $X$ . También se conoce como razón de cambio:

$$b = \frac{\Delta Y}{\Delta X}$$

En otras palabras, indica cómo varía “ $y$ ” cuando “ $x$ ” se ajusta a los valores elegidos, esto proviene de la consideración de que los errores en la línea recta están sujetos en el eje “ $y$ ”, de tal manera que es razonable minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, debido a los valores de los residuos que pueden ser tanto positivos como negativos. De ahí el término de “método de los mínimos cuadrados” que se busca para este procedimiento. La línea recta buscada debe pasar por el centro de gravedad de los puntos.

$$b = \frac{\sum i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum i (x_i - \bar{x})^2}$$

Tanto  $a$  como  $b$  son constantes numéricas porque para cualquier línea recta dada, sus valores no cambian.<sup>19</sup>

De este mismo análisis se obtiene el coeficiente de correlación que es la relación que existe de los valores entre el eje  $Y$  y el  $X$ .

$$r = \frac{\sum i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\left\{ [\sum i (x_i - \bar{x})^2] [\sum i (y_i - \bar{y})^2] \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

Los valores que puede tomar  $r$  están en el intervalo  $-1 \leq r \leq +1$ , que implica que todos los puntos experimentales están sobre una línea recta “ $x$ ” y “ $y$ ” de pendiente negativa o positiva. Cuando  $r$  toma valor de 0 implica que no existe correlación ente

Por otro lado, el coeficiente de determinación indica qué tanto se ajusta la curva a una línea recta y se calcula elevando al cuadrado el valor obtenido del coeficiente de correlación.

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y ordenada en el origen son importantes, considerándose ahora las ecuaciones utilizadas para calcularlos. Primero, se hace el cálculo de  $S_{y/x}$  que estima los errores aleatorios de la dirección “ $y$ ”<sup>19</sup>

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum i \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Obtenido el valor anterior es posible calcular  $S_b$  y  $S_a$ , las desviaciones de la pendiente y la ordenada al origen, de ser necesario. Estas vienen dadas por:

Desviación estándar de la pendiente

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Desviación estándar de la ordenada al origen <sup>19</sup>

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum i x_i^2}{n \sum i (x_i - \bar{x})^2}}$$

### 2.1.5 Determinación del sesgo

Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados ( $\bar{x}$ ) del método candidato con un valor de referencia adecuado ( $x_{ref}$ ). Existen tres enfoques generales: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y c) comparación con resultados obtenidos mediante otro método. Los estudios de sesgo deben cubrir el alcance del método y, por lo tanto, pueden requerir el análisis de diferentes tipos de muestra y/o diferentes niveles del mesurando. Para lograr esto, se puede requerir una combinación de estos enfoques diferentes. <sup>17</sup>

El sesgo puede expresarse en términos absolutos como:

$$b = \bar{x} - x_{ref}$$

O en términos relativos de porcentaje

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} * 100$$

En algunos sectores de la medición analítica también es posible utilizar la recuperación relativa (recuperación aparente) en porcentaje.

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} * 100$$

En ausencia de materiales de referencia adecuados, se pueden utilizar estudios de recuperación (experimentos con adiciones) para dar una indicación del nivel de sesgo probable.

### 2.1.6 Repetibilidad

Constituye una medida de precisión bajo las mismas condiciones de operación sobre un intervalo de tiempo. Para cubrir este parámetro, se realizan como mínimo diez mediciones a la concentración de interés. De ahí se obtendrá la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. <sup>19</sup>

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\sum i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

Media:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Coeficiente de variación: <sup>17</sup>

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

### **2.1.7 Reproducibilidad**

También llamada precisión intermedia, está definida como la variación dentro del mismo laboratorio, esto incluye la variación intradía, variación del analista y la variación del equipo. En este parámetro se reporta también la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación y para evaluarlo es posible usar ANOVA de un solo factor.

Esta prueba se utiliza para comparar las medias de tres o más grupos con el fin de determinar si difieren entre sí de manera significativa. Otra función importante es la estimación de las diferencias entre grupos específicos. <sup>17</sup>

### **2.1.8 Robustez**

En un laboratorio, los parámetros operativos (factores) rara vez se mantienen exactamente en los valores descritos en el método, y siempre oscilan dentro de un rango realista. Los estudios de robustez tienen como objetivo examinar la influencia de las posibles fuentes de variaciones en las respuestas del método.

La robustez influye en la manera de realizar mediciones usando un método analítico dado. Cuanto mayor sea la influencia de ligeros cambios en los parámetros del proceso de medición sobre la determinación final, mayor será el nivel de atención que se debe prestar al mantenimiento de estos parámetros en un nivel estable. Se trata de un parámetro relativo que refleja cambios en condiciones internas. <sup>12</sup> y que describe la utilidad del método analítico en diferentes condiciones; también puede estimarse en función de la reproducibilidad.

Dentro de estas pruebas se encuentra ANOVA que es un método conocido también como análisis de varianza. Es el método más exacto para calcular la variabilidad de un sistema de medición porque posee la ventaja de cuantificar la variación debida a la interacción entre los operadores y las partes. <sup>19</sup>

## JUSTIFICACIÓN

Existen muchas técnicas para cuantificar  $\text{Cu}^{2+}$ , la normativa actual en México emplea a la espectroscopía de absorción atómica, sin embargo, este método suele ser complicado, requiere de mucho tiempo y de un equipo cuyo costo es relativamente alto. Por ello, el diseño y la síntesis de quimiosensores que permitan reconocer y cuantificar fácilmente a los iones de cobre es un tema importante en Química Analítica, así como la evaluación de sus parámetros de desempeño. En este trabajo se estudia una base de Schiff como un quimiosensor para detectar y cuantificar iones de cobre por espectroscopía Uv-Vis.

## HIPÓTESIS

La evaluación de los parámetros de desempeño para la cuantificación de cobre mediante la técnica de UV-Vis cumple con los criterios de aceptación para cada parámetro.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar los parámetros de desempeño para la determinación de  $\text{Cu}^{+2}$  mediante la formación de un complejo con la imina N-(2-hidroxifenilo)cinamaldeimino por espectroscopía UV-Vis.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Síntesis de la imina N-(2-hidroxifenilo)cinamaldeimino
- Determinar a qué longitud de onda se leerá el experimento mediante una valoración espectrofotométrica entre N-(2-hidroxifenilo)cinamaldeimino y  $\text{Cu}^{2+}$
- Determinar el intervalo lineal y de trabajo del método
- Establecer el límite de detección y cuantificación
- Llevar a cabo estudios de recuperación y sesgo
- Obtener repetibilidad y reproducibilidad
- Hacer estudios de robustez del método
- Implementar un protocolo de trabajo del método desarrollado.

## INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

Para realizar este proyecto, se hizo uso de lo siguiente:

Espectrofotómetro modelo *Cary 50 conc Uv-visible Spectrophotometer* marca *Varian*.

Balanza analítica modelo *EP214DC* marca *OHAUS*.

Espectrofotómetro modelo DR 500 UV-Vis marca HACH

Reactivos

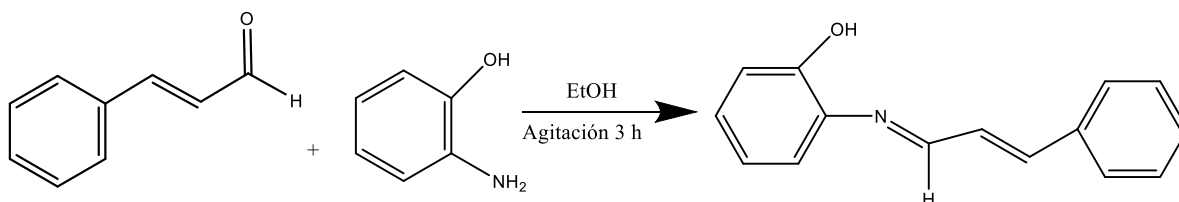
Todos los reactivos y solventes son usados sin ningún tratamiento previo

- Cinamaldehído (3-Phenylprop-2-enal) marca Sigma Aldrich
- 2-aminofenol marca Sigma Aldrich
- Ácido acético glacial marca Golden Bell
- Acetato de sodio
- Acetato de cobre
- Papel filtro marca Whatman

- Material de uso común de laboratorio

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Síntesis química de la imina N-(2-hidroxifenilo)cinamaldeimino [compuesto 1]



Esquema 2. Síntesis del compuesto 1

251  $\mu\text{L}$  de cinamaldehído ( $1\mu\text{M}$ ) disueltos en 5 ml de etanol se añaden gota a gota a 0.107 g de 2-aminofenol ( $1\mu\text{M}$ ) disueltos en 5 ml de etanol. Se mantiene en agitación constante por tres horas a temperatura ambiente y al final de la reacción se observa una solución color naranja-rojizo.

Posteriormente se reduce a la mitad del volumen la solución obtenida mediante secado a presión reducida, el volumen final de la solución se deja en refrigeración por doce horas y una vez transcurrido este tiempo se observa un precipitado. El compuesto 1 es un sólido café-rojizo separado por filtración y secado al vacío; es utilizado sin purificar. Rendimiento 0.316 g, 71.17%.  $\text{PM}=222\text{ g mol}^{-1}$ . **UV-Vis** [ $\lambda(\text{nm})_{\text{etanol}}$ ] 293;354. **IR (KBr)** [ $\nu_{\text{max}}$ ] = 1628(C=N).

#### 3.2 Preparación del buffer ácido acético-acetato

Se preparan 250 ml de una solución 0.1 M de ácido acético glacial, se afora con agua desionizada y posteriormente se añaden 0.205 g de acetato de sodio.

Se verifica el pH de la solución y debe estar en 3.55. Es importante mantener este pH, pues con esta solución se disolverá al cobre y de esta manera se evita que precipite.

#### 3.3 Preparación de la muestra

La siguiente técnica es la que se propone en este trabajo para evaluar el desempeño del método propuesto:

Solución 1: se preparan 25 ml de una solución madre de ligante  $1 \times 10^{-3}\text{M}$  y se afora con etanol. La solución es incolora.

Solución 2: se preparan 50 ml de una solución madre de cobre (0.05 M) (se afora con el buffer ácido acético-acetato). Esta solución presenta color azul.

A un matraz de 100 ml se añaden 3 ml de la solución 1, luego se añade el volumen requerido para alcanzar la concentración de cobre a analizar (que va de los 10 a los 40  $\mu\text{L}$ ) y se afora con etanol. Se deja reaccionar por 15 minutos y comienzan las lecturas.

### 3.4 Preparación de la curva para valoración espectrofotométrica

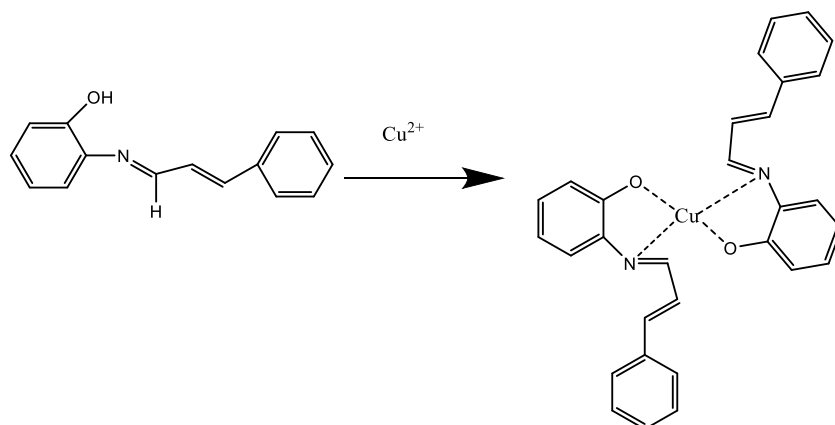
Añadir 3  $\mu\text{L}$  de la solución 1 a cinco matraces de aforación de 10 ml.

Se prepara la solución 2 cinco veces, es decir, se tienen cinco diferentes soluciones de cobre a la misma concentración (0.05 M). De cada solución 2, se añade un volumen diferente (2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{L}$ ) a los matraces previamente adicionados con la solución 1. Cuando se añade este pequeño volumen de solución de cobre al ligante, se observa un cambio inmediato de incoloro a amarillo intenso. Se afora con etanol.

Se deja reaccionar por 15 minutos y comienzan las lecturas.

Adicionar a una celda de cuarzo de 3 ml la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur limpia y hacer un barrido en el equipo de UV-Vis.

Esta metodología se usó únicamente para la valoración espectrofotométrica.

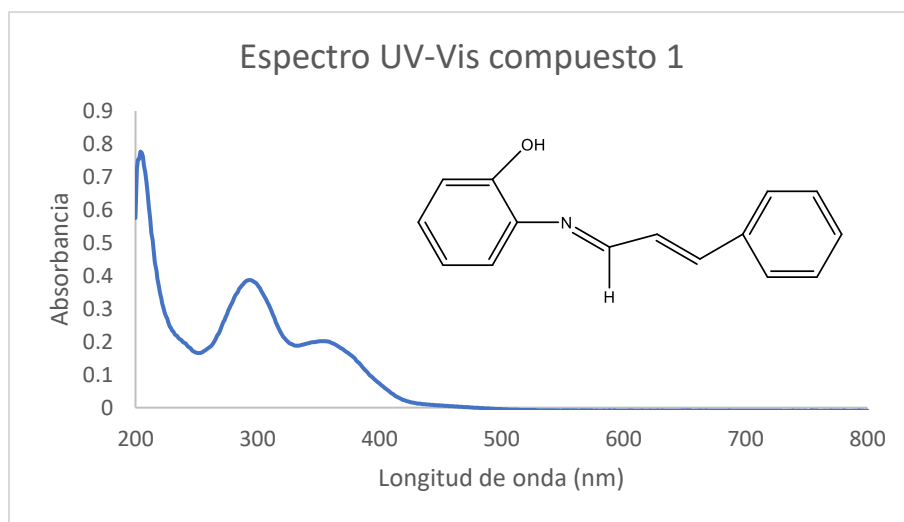


**Esquema 3.** Propuesta de formación del complejo con  $\text{Cu}^{2+}$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización del ligante

La Figura 1 muestra el espectro de UV-Vis del compuesto 1, usando como disolvente etanol. Éste presenta tres bandas: 204 nm, 293 nm y 354 nm. La banda en 293 nm corresponde a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del grupo imino, mientras que la banda en 354 nm se asigna a la transición de  $n \rightarrow \pi^*$  debida al par de electrones libres, por último, la banda en 204 nm se atribuye a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo aromático.<sup>20</sup>



**Figura 1.** Espectro de absorción UV-Vis que muestra el pico principal en 293 nm que corresponde a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  de la imina (C=N)

En la Figura 2 se muestra el espectro de infrarrojo, donde se puede notar una banda intensa en  $1628 \text{ cm}^{-1}$  que se asigna a la vibración C=N, otra en  $1294 \text{ cm}^{-1}$  a la que se le atribuye la vibración del enlace C-O. La banda en  $748 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la deformación C-H “fuera del plano” del anillo fenólico, mientras que la banda en  $3024 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones O-H. Se observa que esta señal es muy débil, muy probablemente debido a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular  $\text{--OH---N}$  (nitrógeno imínico).<sup>21</sup> La banda en  $1265 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración C-O iminofenólico. La banda en  $748 \text{ cm}^{-1}$  se atribuye a deformaciones fuera del plano del anillo fenólico. Finalmente, la banda en  $3345 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de los enlaces O-H de moléculas de agua.

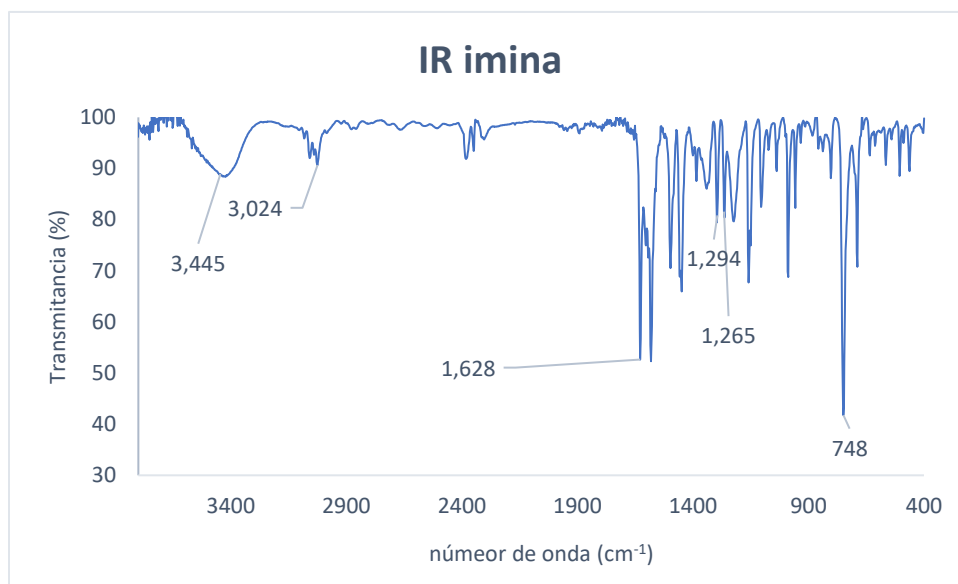


Figura 2. Espectro de IR del compuesto 1.

#### 4.2 Valoración espectrofotométrica del compuesto 1 con cobre

La valoración espectrofotométrica se hizo con el propósito de conocer cómo interacciona el ligante con el metal y percibir si hay desplazamiento de bandas, ausencia o presencia de nuevas. Para esto se siguió el procedimiento de la sección 3.4 de este trabajo y se obtuvo el siguiente espectro:

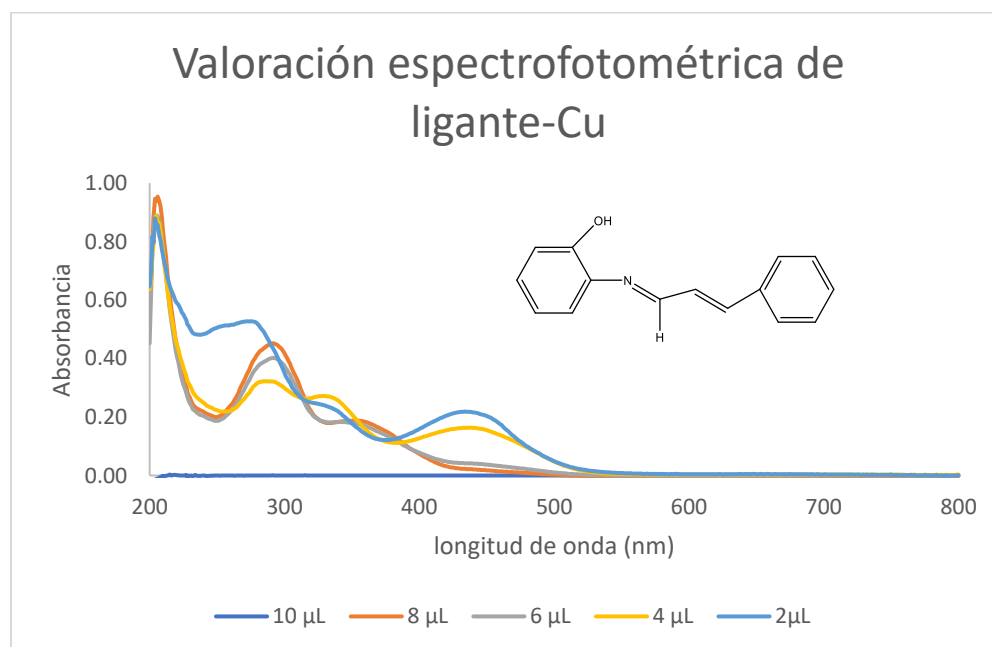


Figura 4. Valoración espectrofotométrica del complejo compuesto 1-Cu<sup>2+</sup>

Como se muestra en la Figura 4, es posible seguir la formación del complejo mediante esta técnica, ya que existe la aparición de una nueva banda en 450 nm.

Con base en el comportamiento observado en la Figura 4, se decidió establecer la longitud de onda del método en 288 nm y corroborar con el desplazamiento de banda aproximadamente a 450 nm.

#### **4.3 Selectividad**

Ya que, de acuerdo a la literatura, las bases de Schiff son selectivas para iones metálicos específicos, se probó con los siguientes:  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $V^{5+}$ ,  $Mg^{2+}$ . Además, estos iones metálicos pueden ser contaminantes de agua al igual que el cobre, es decir, son interferentes potenciales. Para su evaluación, se preparó por separado soluciones de cada uno de estos metales a las mismas cinco concentraciones con que se trabaja cobre. En el espectro, no se observa ningún cambio en las bandas que expresa el ligante.

Para corroborar lo anterior, se prepara una mezcla de todos estos iones metálicos y se pone en contacto con el ligante y no se observa ningún cambio en el espectro. A la misma mezcla, se le adiciona cobre y se vuelve a leer en el espectro y ahora sí, se observan los desplazamientos descritos en la valoración espectrofotométrica. Por lo tanto, se concluye que el compuesto 1 es altamente selectivo para  $Cu^{2+}$ .

#### **Parámetro de aceptación para la evaluación del método**

En adelante, todos los parámetros de desempeño evaluados corresponden a la respuesta del compuesto 1 con cobre y los valores obtenidos se compararán con la concentración que es posible permitir por normativa, esto es,  $1.57 \times 10^{-5} M$  ( $1 \times 10^{-3} g/L$ .)

#### **4.4 Intervalo lineal y de trabajo**

El intervalo lineal abarcó solamente cinco puntos, los mínimos que la normativa establece para que el procedimiento sea válido, pero que cumple perfectamente con el intervalo en el que se encuentra la máxima concentración que se puede permitir de cobre en agua para consumo humano. Las concentraciones con las que se trabajó fueron  $1 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-5} M$ , mismas que se midieron por triplicado a la longitud de onda establecida y los valores de absorbancia obtenidos fueron promediados.

De los datos de la Tabla 1, se determina que la ecuación ajustada para el modelo lineal que describe la relación entre Y y X es:  $y = 9660x + 0.7103$  y que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) tiene un valor de 0.9992

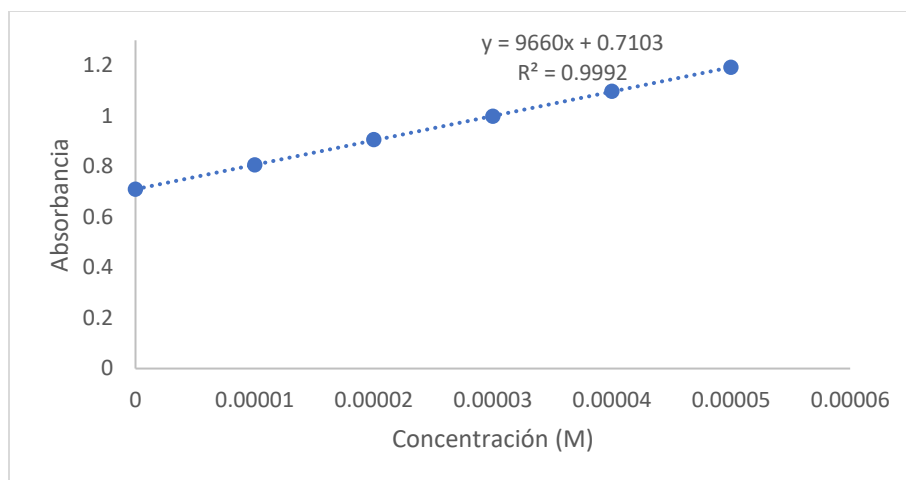
Es necesario graficar los residuales para evaluar si existen valores sospechosos

**Tabla 1. Datos para calcular manualmente el valor de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación.** Los valores en negritas corresponden a los promedios y los que están en gris a la sumatoria de la columna.

x	y	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
0	0.71	-0.000025	6.25E-10	0.24183333	0.05848336	6.04583E-06
1.00E-05	0.806	-1.50E-05	2.25E-10	0.14583333	0.02126736	2.19E-06
2.00E-05	0.906	-5.00E-06	2.5E-11	0.04583333	0.00210069	2.29E-07
3.00E-05	0.999	5.00E-06	2.5E-11	0.04716667	0.00222469	2.36E-07
4.00E-05	1.097	1.50E-05	2.25E-10	0.14516667	0.02107336	2.18E-06
5.00E-05	1.193	2.50E-05	6.25E-10	0.24116667	0.05816136	6.03E-06
<b>0.000025</b>	<b>0.95183333</b>	0	1.75E-09	0	0.16331083	1.69E-05

El coeficiente de correlación indica que el grado de asociación lineal entre estas dos variables aleatorias es alto y que la asociación es positiva, es decir, que cuando los valores de x aumentan los de y también lo hacen. El cuadrado del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) indica una alta precisión en las futuras predicciones.

Por otro lado, el nivel de significancia p ( $P=0.001$ ) indica que la relación entre las variables es estadísticamente significativa ( $p<0.05$ )



**Gráfico 1. Regresión lineal para evaluar intervalo lineal y de trabajo.** Este abarcó cinco puntos que mediante una inspección visual y estadística presenta linealidad y un buen coeficiente de correlación y determinación, esto indica que es posible hacer análisis cuantitativo de una muestra de concentración desconocida de cobre y obtener buenos resultados.

El gráfico de residuales (Gráfico 2) es necesario para observar si existen valores sospechosos, normalmente los residuales deberían estar distribuidos alrededor de cero, en este caso se observa un gráfico satisfactorio, excepto que  $y_3$  podría ser un valor anómalo, para ello se recurre a la prueba de Grubbs:

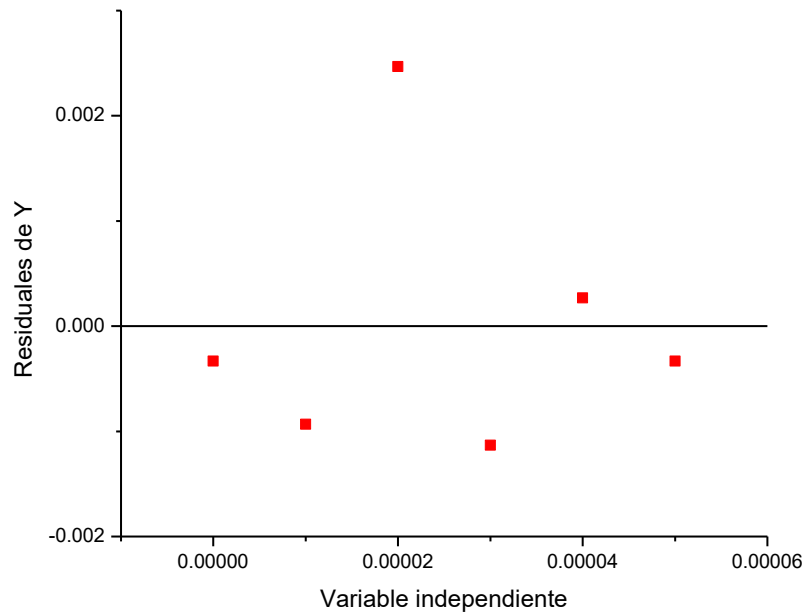
Hipótesis nula                    Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal  
 Hipótesis alterna                El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico  
 Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Prueba de Grubbs

Variable	Concentración (M)	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	P
Absorbancia	0.00000	1	0.71000	*	0.71000	0.71000	*	*
	0.00001	1	0.80600	*	0.80600	0.80600	*	*
	0.00002	1	0.90600	*	0.90600	0.90600	*	*
	0.00003	1	0.99900	*	0.99900	0.99900	*	*
	0.00004	1	1.0970	*	1.0970	1.0970	*	*
	0.00005	1	1.1930	*	1.1930	1.1930	*	*

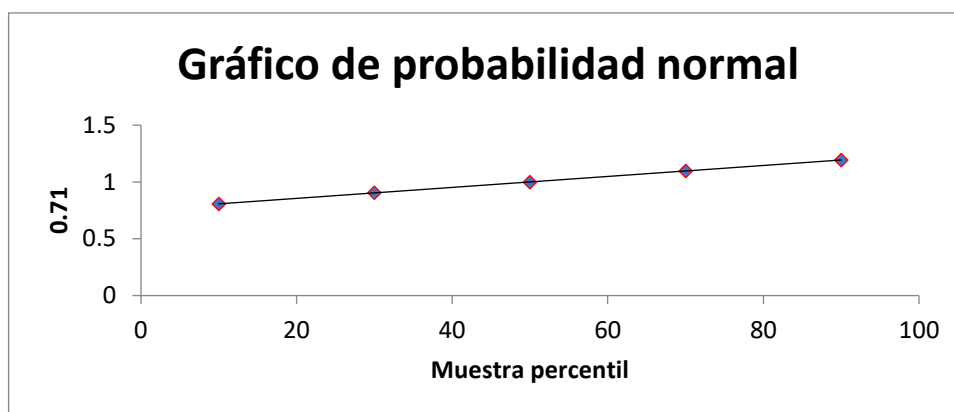
\* NOTA \* No hay valor atípico en el nivel de significancia de 5%

\*El cambio de formato, se debe a que los valores se reportan directamente del programa estadístico Minitab



**Gráfico 2. Gráfico de residuos de intervalo lineal.** Muestra que los puntos  $y_1$ ,  $y_2$ ,  $y_4$ ,  $y_5$  y  $y_6$  están cercanos a cero, por lo que no se sospecha que sean valores atípicos. Es necesario aplicar una prueba al punto  $y_3$  para saber si es atípico y si lo es, eliminarlo estadísticamente

Posterior a esto, se realiza la prueba de Shapiro-Wilk y se corrobora que los datos se comportan de manera normal. De igual forma se realiza un gráfico de probabilidad normal de los residuos (gráfico 3) y ya que se ajustan a una línea recta se comprueba que los residuos están distribuidos normalmente.



**Gráfico 3. Gráfico de probabilidad normal de residuos.** Normalmente debe seguir una línea recta, por lo que se verifica el supuesto de que los residuos están distribuidos normalmente.

#### 4.5 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LQ)

Ya que al realizar las mediciones del blanco diez veces por duplicado y ver que la desviación estándar está muy cercana a cero ( $S = 0.00047$ ) no se hace la determinación por el método del blanco, se recurre al método de la regresión lineal, que como se sabe por la prueba realizada en el parámetro anterior, la respuesta del instrumento está linealmente relacionada con la concentración  $x$  para el intervalo de trabajo seleccionado. El modelo se expresa con la ecuación de la recta  $y = a + bx$ .

De igual forma como se procedió para los parámetros anteriores, se realizan mediciones a los cinco puntos de concentración determinados y se leen por triplicado para la determinación de LOD y LQ:

**Tabla 2.** Valores por triplicado de cada nivel de concentración para determinar LOD y LQ

	Blanco	Concentración				
Réplicas	0	1.00E-05	2.00E-05	3.00E-05	4.00E-05	5.00E-05
1	0.71	0.812	0.901	1.009	1.115	1.205
2	0.70	0.803	0.912	1.008	1.090	1.194
3	0.69	0.815	0.905	0.998	1.092	1.195
promedio	0.70	0.81	0.906	1.005	1.099	1.198

**Tabla 3.** Estadística de regresión lineal y cálculo del valor  $s_{y/x}$

	valor	$S_D$
Intersección	0.70614	0.00332
pendiente	9874.285	109.76
$s_{y/x}$	$6.693 \times 10^{-3}$	

De los datos anteriores se obtiene que la ecuación de la recta es  $y = 0.7097 + 9662.85 x$ . Es posible entonces calcular LOD y LQ y se puede expresar:

$$LOD = y_B + 3s_B$$

$$LOQ = y_B + 10s_B$$

Donde  $y_B$  es la desviación estándar de la intersección y  $s_B$  es el valor de  $s_{y/x}$

Entonces para el experimento:

$$LOD = (0.70614 + (3 * 6.693 \times 10^{-3})) = \mathbf{0.726}$$

$$LOQ = (0.70614 + (10 * 6.693 \times 10^{-3})) = \mathbf{0.773}$$

Haciendo uso de la ecuación de regresión se tiene un límite de detección de  $2.025 \times 10^{-6}M$  y a un límite de cuantificación de  $6.77 \times 10^{-6}M$

#### 4.6 Precisión

##### 4.6.1 Repetibilidad (intradía)

Se trata de una prueba preliminar que evalúa la precisión del método en un periodo de tiempo corto. Esto se consigue haciendo diez mediciones a partir de una sola muestra que es medida diez veces a lo largo del día y es la desviación estándar de los valores obtenidos la que informará acerca de la imprecisión del método. Ya que es poco práctico a la hora de comparar con otros métodos (por las unidades) por conveniencia se calcula el coeficiente de variación en porcentaje.

Esta imprecisión de la que se habla está dada por errores al azar (EA), mismos que deben ser calculados en unidades de concentración y que finalmente, se comparará con el valor que el método puede permitirse.

Medición	absorbancia	concentración
1	0.819	1.12495E-05
2	0.808	1.01108E-05
3	0.814	1.07319E-05
4	0.81	1.03178E-05
5	0.819	1.12495E-05
6	0.814	1.07319E-05
7	0.811	1.04213E-05
8	0.831	1.24917E-05
9	0.812	1.05248E-05
10	0.81	1.03178E-05

**Tabla 4.** Datos de repetibilidad intradía para análisis de cobre y cálculo de coeficiente de variación y error al azar a partir de los mismos.

promedio	1.081E-05
DS	6.658E-07
CV (%)	6.156
EA	1.10E-06
valor permitido	1.57E-05

Al calcular el error al azar a un 95% de confianza se obtiene que es menor que el valor permitido por la normativa, así que pasa la prueba. Entonces es posible decir que la imprecisión o los errores que se tienen en un período corto son tolerables, es decir, que no afecta las mediciones que se van a reportar.

El error al azar se calcula:

$$EA = DS * 1.65$$

#### 4.6.2 Repetibilidad (inter-día)

Esta prueba forma parte de los experimentos finales y se determina el error al azar mediante estudios de replicación, pero esta vez a largo plazo con la finalidad de obtener información acerca de la imprecisión total del método.

Para ello se realizan mediciones por triplicado durante veinte días a la concentración crítica establecida.

**Tabla 5.** Datos de repetibilidad inter-día para análisis de cobre y cálculo de coeficiente de variación y error al azar a partir de los mismos.

Medición	absorbancia	concentración
1	0.815	1.08E-05
2	0.811	1.04E-05
3	0.827	1.21E-05
4	0.821	1.15E-05
5	0.834	1.28E-05
6	0.823	1.17E-05
7	0.835	1.29E-05
8	0.829	1.23E-05
9	0.807	1.00E-05
10	0.898	1.94E-05
11	0.921	2.18E-05
12	0.819	1.13E-05
13	0.874	1.69E-05
14	1.002	3.00E-05
15	0.879	1.74E-05
16	0.993	2.92E-05
17	0.809	1.02E-05
18	0.808	1.01E-05
19	0.809	1.02E-05
20	0.807	1.00E-05

promedio	1.46E-05
DS	5.99408E-06
CV (%)	41.1907647
EA	9.89023E-06
Valor permitido	1.56E-05

Con esta prueba se determina que el método trabajará bien con el tiempo ya que el error al azar (que sería el total para el método) es menor al valor máximo permisible. Se observa que el coeficiente de variación es alto debido a que las concentraciones más altas reportadas en la tabla 5, corresponden a días de trabajo donde la temperatura fue muy alta (30-33°C).

#### 4.7 Reproducibilidad

Esta prueba de tipo final es llevada a cabo por tres analistas en un equipo diferente bajo el mismo procedimiento durante tres días de trabajo consecutivos y cada día se hicieron dos mediciones por triplicado. Ya que se compararán más de dos medias, se utiliza la prueba de ANOVA de un solo factor. En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos.

**Tabla 6.** Concentraciones obtenidas por tres diferentes analistas al mismo tiempo de análisis para el parámetro reproducibilidad

Analista	Concentración (M)	Tiempo (min)	Muestra (M)
1	0.0000099	15	0.00001
1	0.00001	15	0.00001
1	0.0000101	15	0.00001
1	0.0000103	15	0.00001
1	0.0000102	15	0.00001
1	0.0000111	15	0.00001
2	0.0000301	15	0.00001
2	0.0000293	15	0.00001
2	0.0000102	15	0.00001
2	0.0000112	15	0.00001
2	0.0000197	15	0.00001
2	0.0000196	15	0.00001
3	0.0000101	15	0.00001
3	0.0000104	15	0.00001
3	0.0000104	15	0.00001
3	0.0000114	15	0.00001
3	0.0000111	15	0.00001
3	0.0000115	15	0.00001

Se realiza el ANOVA unidireccional de concentración medida (columna dos de la tabla) contra analista y se obtiene lo siguiente:

## ANOVA unidireccional: Concentración (M) vs. Analista

Método

Hipótesis nula                    Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna                Por lo menos una media es diferente  
Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Analista	3	1, 2, 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Analista	2	0.000000	0.000000	7.40	0.006
Error	15	0.000000	0.000000		
Total	17	0.000000			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0000049	49.66%	42.95%	27.51%

Medias

Analista	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	6	0.000010	0.000000	(0.000006, 0.000015)
2	6	0.000020	0.000009	(0.000016, 0.000024)
3	6	0.000011	0.000001	(0.000007, 0.000015)

Desv.Est. agrupada = 4.932275E-06

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

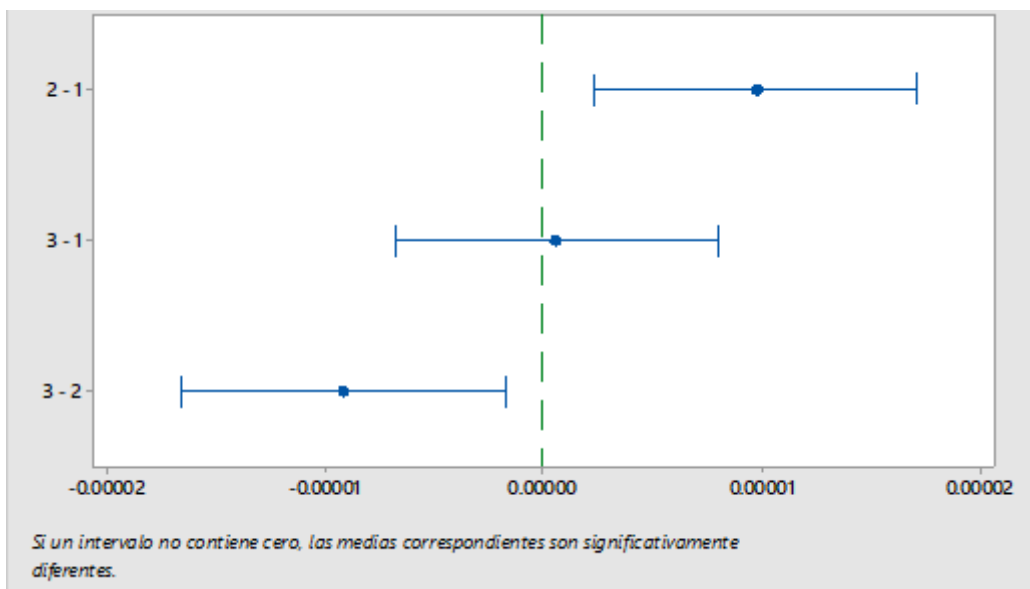
Analista	N	Media	Agrupación
2	6	0.000020	A
3	6	0.000011	B
1	6	0.000010	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

\*el cambio en el formato se debe a que los datos se presentan directamente del programa estadístico Minitab

El valor de p para concentración (M) de la muestra es menor que 0.05. Este resultado indica que las concentraciones medidas difieren significativamente. Entonces se entiende que algunas de las medias del grupo son diferentes.

Para probar de manera formal si existe diferencia estadística significativa entre un par de grupos, se hace uso del método de Tukey mismo que se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado. Es importante considerar la tasa de error por familia cuando se hacen comparaciones múltiples, porque la probabilidad de cometer un error de tipo I para una serie de comparaciones es mayor que la tasa de error para cualquier comparación individual. Para contrarrestar esta tasa de error más elevada, el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que se especifique.



**Gráfico 4. Intervalos de constancia simultáneos de 95% de Tukey.** Existe diferencia en las medias para concentración (M)

\*el cambio en el formato de gráficos se debe a que se ha tomado directamente del programa estadístico Minitab.

La gráfica 4, que incluye los intervalos de confianza simultáneos de Tukey muestra que el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias del analista 2 y 1 se extiende de  $2.36 \times 10^{-6}$  a  $1.71 \times 10^{-5}$  y la diferencia entre el analista 3 y 2 va de  $-1.66 \times 10^{-5}$  a  $-1.81 \times 10^{-5}$ . Este rango no incluye cero, lo que indica que la diferencia entre estas medias es significativa. Ya que el intervalo entre el analista 1 y 3 pasa por cero, la diferencia no es significativa.

El  $R^2$  que se obtiene es demasiado bajo, lo que indica que las predicciones que el modelo genere serán imprecisas para nuevas observaciones. La imprecisión puede venir dada por el grupo que es tan pequeño. Así este modelo no sirve para hacer generalizaciones más allá de los datos obtenidos de las muestras.

#### 4.8 Pruebas de recuperación

Esta prueba, que también corresponde a las preliminares, informa de errores sistemáticos proporcionales.

Para ello se prepara una muestra basal (que no contenga ninguna concentración del mesurando) y diferentes muestras de prueba donde se añaden diferentes concentraciones del metal. La diferencia observada, constituye la cantidad de metal recuperada.

**Tabla 7.** Cálculo del porcentaje de recobro a partir de la diferencia observada en la prueba

Absorbancia	Concentración	Concentración	Recobro (%)
0.711	7.24E-08	0	0
0.809	1.02E-05	1.00E-05	102.17
0.909	2.06E-05	2.00E-05	102.84
1.005	3.03E-05	3.00E-05	101.69
1.103	4.07E-05	4.00E-05	101.63

Ya que se observa que los valores de la columna de recobro no aumentan conforme aumenta la concentración, significa que el método no presenta errores sistemáticos proporcionales. Además, la normativa marca que el rango de aceptación para este parámetro va de 100 a 120%

Gracias a que el método cumple con este parámetro, que corresponde al experimento final de las pruebas preliminares, es posible pasar a los estudios finales.

#### 4.9 Robustez

A lo largo del desarrollo del método se observó que cuando se varía el tiempo y especialmente la temperatura, los resultados obtenidos se alejan del valor esperado por lo que podría tener un efecto significativo en el desempeño del método. Por lo tanto, los resultados que se muestran anteriormente son resultado de un trabajo realmente estricto.

En primer lugar, se evaluó el parámetro tiempo para cada punto de concentración dentro de la metodología, se incluyeron cuatro tiempos diferentes y se repitió la operación seis veces. De igual forma que en el parámetro repetibilidad, los datos se someten a la prueba ANOVA de un solo factor en el programa estadístico Minitab y los resultados se reportan de manera íntegra.

**Tabla 8.** Concentraciones obtenidas bajo diferentes tiempos de análisis para evaluar el parámetro robustez.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Concentración (M)</i>	<i>Analista</i>	<i>Muestra (M)</i>
15	0.0000105	1	0.00001
15	0.00001009	1	0.00001
15	0.00001012	1	0.00001
15	0.00001003	1	0.00001
15	0.00001006	1	0.00001
15	0.00001011	1	0.00001
30	0.00001011	1	0.00001
30	0.00001013	1	0.00001
30	0.0000109	1	0.00001
30	0.00001032	1	0.00001
30	0.00001011	1	0.00001
30	0.00001012	1	0.00001
45	0.00001045	1	0.00001
45	0.00001038	1	0.00001
45	0.00001054	1	0.00001
45	0.00001027	1	0.00001
45	0.00001068	1	0.00001
45	0.00001061	1	0.00001
60	0.00001112	1	0.00001
60	0.00001145	1	0.00001
60	0.00001235	1	0.00001
60	0.00001132	1	0.00001
60	0.00001342	1	0.00001
60	0.00001234	1	0.00001

## ANOVA unidireccional: Concentración (M) vs. Tiempo (min)

Método

Hipótesis nula                    Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna                Por lo menos una media es diferente  
Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tiempo (min)	4	15, 30, 45, 60

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (min)	3	0.000000	0.000000	19.39	0.000
Error	20	0.000000	0.000000		
Total	23	0.000000			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0000005	74.42%	70.58%	63.16%

Medias

Tiempo (min)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
15	6	0.000010	0.000000	(0.000010, 0.000011)
30	6	0.000010	0.000000	(0.000010, 0.000011)
45	6	0.000010	0.000000	(0.000010, 0.000011)
60	6	0.000012	0.000001	(0.000012, 0.000012)

Desv.Est. agrupada = 4.770666E-07

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo (min)	N	Media	Agrupación
60	6	0.000012	A
45	6	0.000010	B
30	6	0.000010	B
15	6	0.000010	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

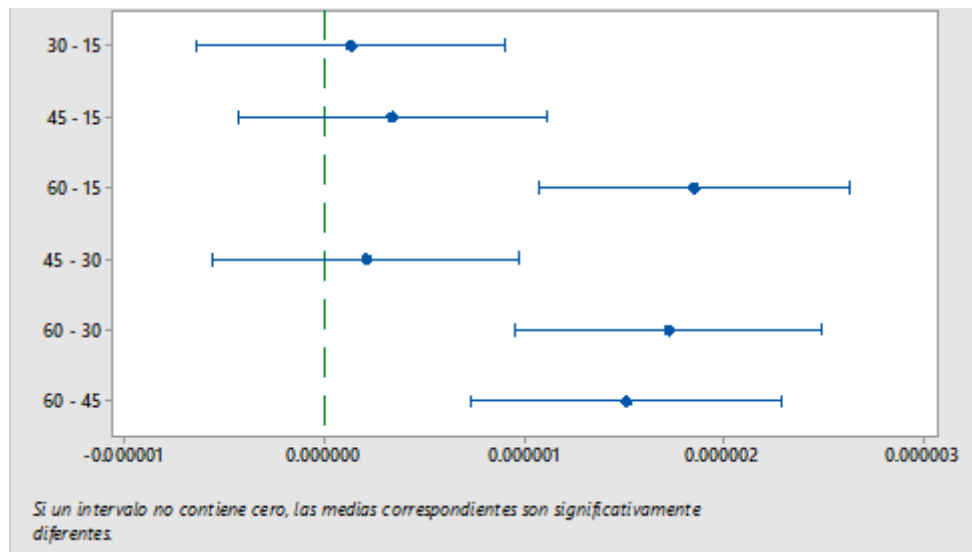
El valor p arrojado es menor que 0.05, esto indica que las concentraciones medidas a diferentes tiempos difieren significativamente. Si se toma en cuenta el gráfico que incluye los intervalos de confianza simultáneos de Tukey, los intervalos de confianza para la diferencia entre los pares de medias entre los tiempos 30-15, 45-15 y 45-30 incluyen cero, lo que indica que las diferencias no son significativas.

También se observa que las diferencias entre todos los pares de medias que incluyen el tiempo 60, presenta diferencias significativas con el resto de los tiempos.

El  $R^2$  obtenido es 74%, si bien no es el más alto o indique que los datos están sumamente relacionados, no se considera un porcentaje bajo ya que podría ser el resultado de la interferencia de los valores del tiempo 60 y pudiera indicar que el modelo podría generar mediciones imprecisas para nuevas observaciones si las muestras se leen luego de la primera hora.

Con esta prueba se reafirma que leer a los 15 minutos es el tiempo óptimo y que si se varía el tiempo la muestra sufre transformaciones que podrían dar falsos resultados, o al menos que se alejan mucho del valor real.

Ya que es difícil establecer diferentes condiciones de temperatura, se infiere que el método no es robusto ante este factor ya que las pruebas de repetibilidad inter-día muestran cambios en las concentraciones medidas cuando varía la temperatura y esto hace que la imprecisión del método sea mayor.



**Gráfico 5. Intervalos de constancia simultáneos de 95% de Tukey.** Existe diferencia en las medias para concentración (M)

\*el cambio en el formato de gráficos se debe a que se ha tomado directamente del programa estadístico Minitab.

## CONCLUSIONES

La evaluación de los parámetros de desempeño para la cuantificación de  $\text{Cu}^{2+}$  mediante la técnica de UV-Vis fue realizada de manera completa tomando como base la guía internacional Eurachem: The Fitness for Purpose of Analytical Methods (2014) y a la norma oficial mexicana: *NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel*. Los parámetros que están dentro de la especificación son linealidad, intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, repetibilidad; el parámetro que no cumple es la robustez; esto se observa en la Tabla 1 de esta sección.

La robustez es el único parámetro que no se cumple, se cree que puede ser por la inestabilidad del ligante en sí, mismo que obliga a utilizar un alcohol como matriz que dependiendo del tiempo o la temperatura cambia sus propiedades (al menos en cuanto a concentración) lo que hace que los resultados obtenidos varíen significativamente de los esperados si la muestra se analiza en un tiempo diferente al establecido. Como se menciona en la discusión de resultados, es complicado variar las condiciones de temperatura para evaluar el método propuesto así que este parámetro fue evaluado con base a los resultados observados en la repetibilidad inter-día, donde se observaron severos cambios de temperatura de hasta  $10^{\circ}\text{C}$  que influyeron en el aumento del error y como se discutió, podría ser un error tolerable.

Finalmente, dadas las condiciones del laboratorio es imposible validar el método porque el equipo e instrumentación no están acreditados.

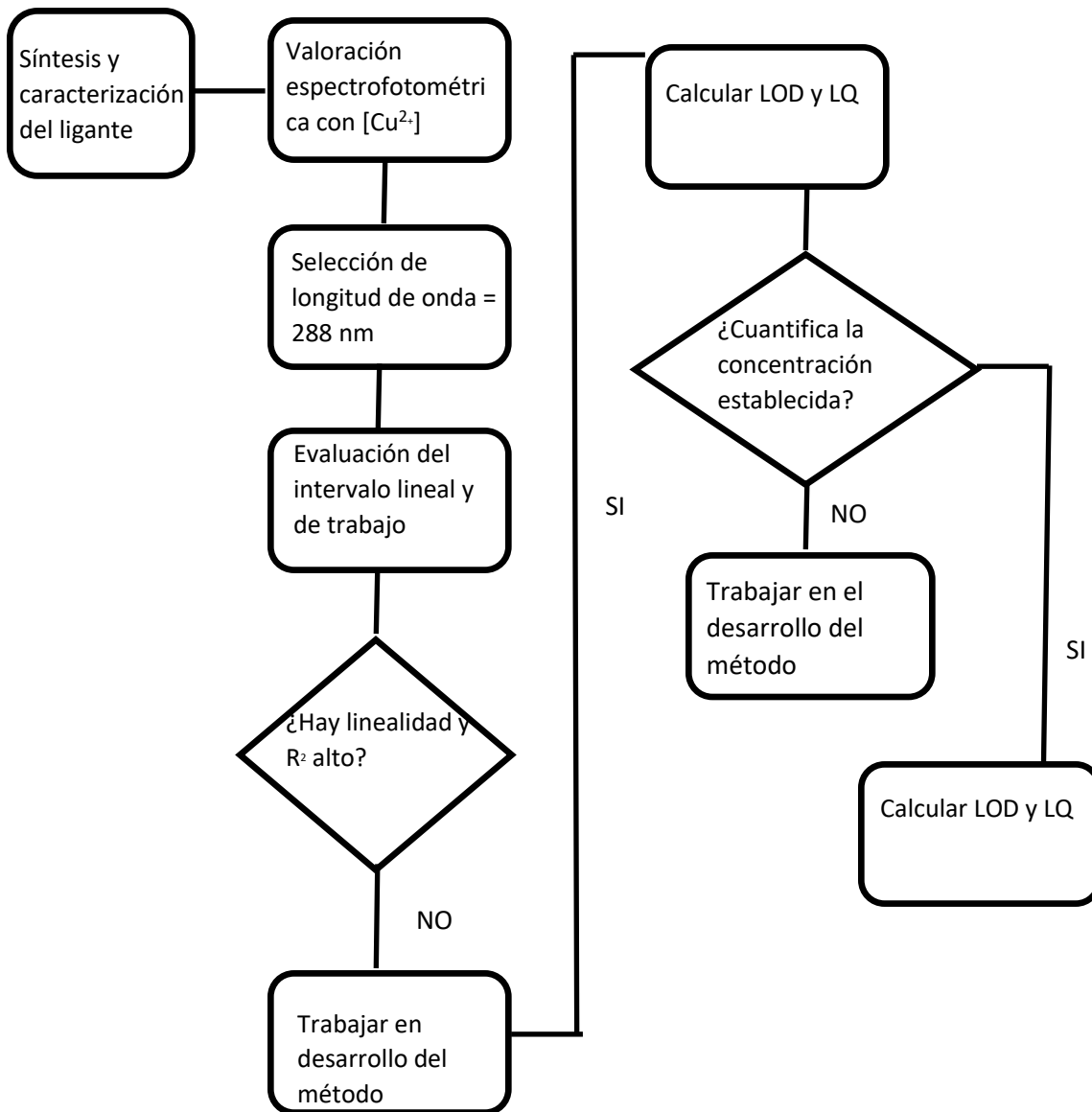
**Tabla 1.** Parámetros de desempeño que cumple/no cumple el método analítico desarrollado.

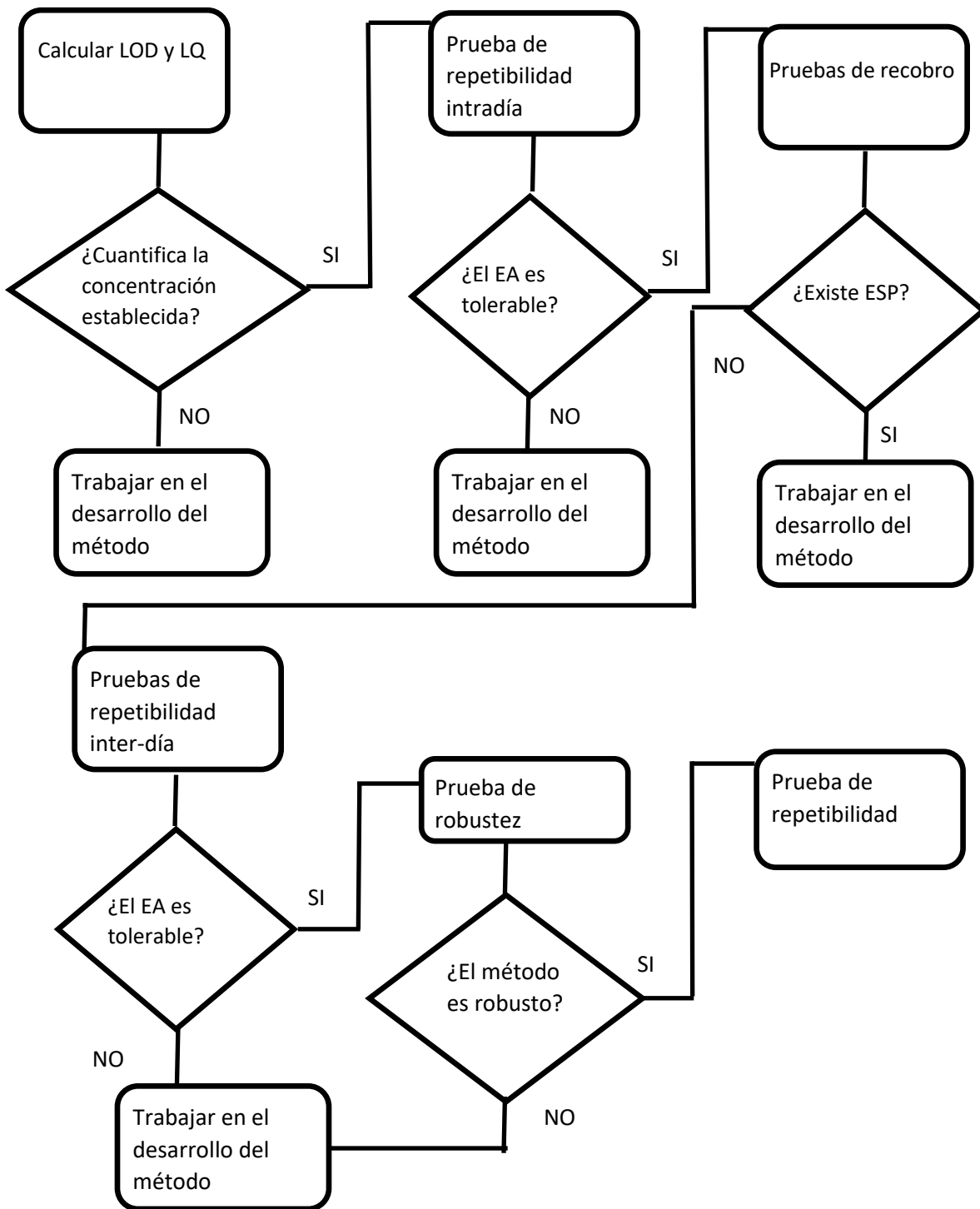
Parámetro	Criterio de aceptación	Resultados experimentales	Cumple/no cumple
Intervalo lineal y de trabajo	$R^2 \geq 0.98$	$R^2=0.9992$	Cumple
Recuperación	90-108%	1.00E-05=102.17% 2.00E-05=102.84% 3.00E-05=101.69% 4.00E-05=101.63%	Cumple
Límite de detección	$<1.56\text{E-}05 \text{ M}$	$2.025 \times 10^{-6} \text{ M}$	Cumple
Límite de cuantificación	$\leq 1.56\text{E-}05 \text{ M}$	$6.77 \times 10^{-6} \text{ M}$	Cumple
Repetibilidad	$\leq 1.56\text{E-}05$	Interdía= $9.89\text{E-}06$ Intradía= $1.10\text{E-}06$	Cumple
Reproducibilidad	$\leq 6.00\text{E-}06$	$4.93\text{E-}06$	Cumple
Robustez	-	-	No cumple

## PROPUESTAS

- Dentro del método desarrollado existen problemas que pueden ser controlables pero que son tediosos como lo es la estabilidad del ligante N-(2-hidroxifenilo)cinamaldeimino, por lo que se propone realizar la síntesis añadiendo algún otro grupo que haga que no sea sensible a la humedad o al menos que lo haga soluble en agua, ya que de esta manera la matriz sería ideal y de menor costo que la usada en esta metodología.
- Desarrollar un sistema de gestión de calidad en el laboratorio con la finalidad de minimizar al máximo los errores tanto instrumentales como humanos. Esto es, tener todos los aparatos y material de vidrio calibrados y acreditados con la finalidad de asegurar que los resultados obtenidos sean confiables. El correcto uso de los instrumentos de medición, así como la constante capacitación de los usuarios y el manejo claro de las buenas prácticas de laboratorio enriquece, da fortaleza y confianza al alcance de cada método que se evalué en el laboratorio.
- Propiciar las condiciones necesarias en el laboratorio de docencia para la mejora continua, así como propiciar hacer mediciones con base a normativas específicas.

### MÉTODO ESTABLECIDO





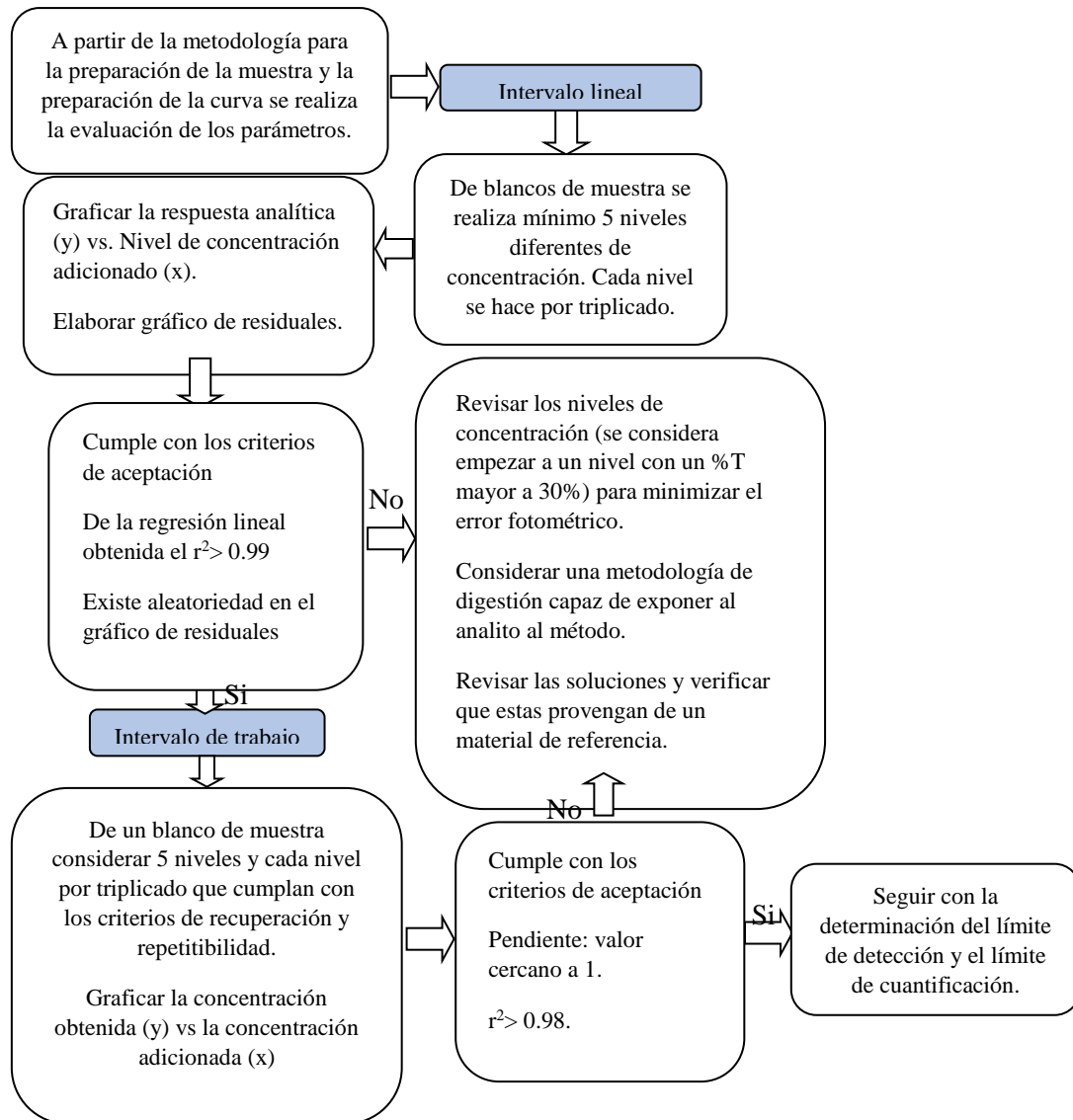
## BIBLIOGRAFÍA

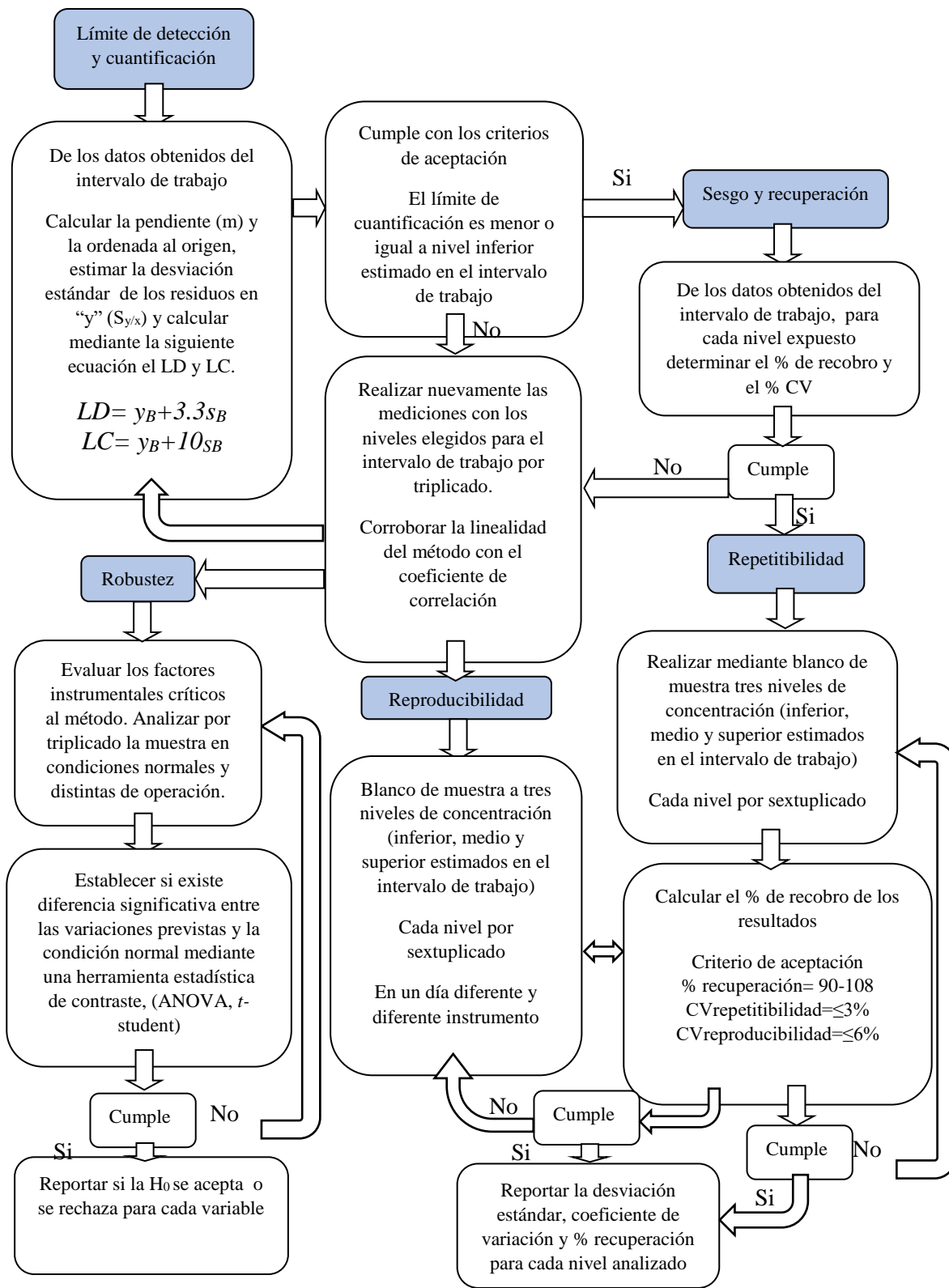
- [1] H. N. Kim, W. X. Ren, J. S. Kim, J. Y. Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium and mercury ions, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 3210– 3244.
- [2] D. Peralta-Domínguez, M. Rodríguez, G. Ramos-Ortíz, J.L. Maldonado, M.A.Meneses-Nava, O. Barbosa-García, R. Santillan, N. Farfán, A Schiff basederivative from cinnamaldehyde for colorimetric detection of Ni<sup>2+</sup>in water,*Sens. Actuators B* 207 (2015) 511–517.
- [3] Y. Jeong, J. Yoonet., Recent progress on fluorescent chemosensors for metal ions, *Inorg. Chimica Acta* 381 (2012) 2–14.
- [4] P. Kaur, D. Sareen, and K. Singh, Selective colorimetric sensing of Cu<sup>2+</sup> using triazolyl monoazo derivative, *Talanta* 83 (2011) 1695–1700.
- [5] W. L. Chang, P. Y. Yang, A color-switching colorimetric sensor towards Cu<sup>2+</sup> ion: sensing behavior and logic operation, *J. of Luminescence* 141 (2013) 38–43.
- [6] Q. Lin, P. Chen, J. Liu, Y. P. Fu, Y. M. Zhang, T. B. Wei, Colorimetric chemosensor and test kit for detection copper(II) cations in aqueous solution with specific selectivity and high sensitivity, *Dyes Pigments* 98 (2013) 100–105.
- [7] A. Singh, S. Malik, A. S. Mirza, Schiff base metal complexes of bioinorganic and medicinal relevance: a review, *Int J Chem Pharma Anal* 2348-0726 (2017) 7.
- [8] A. Hameed, M. al-Rashida, M. Uroos, S.A. Ali, M. Khan, Schiff bases in medicinal chemistry: a patent review (2010-2015), *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (2017) 63-79.
- [9] A. Rauf, A. Shah, K.S. Munawar, A.A. Khan, R. Abbasi, M.A. Yameen, A.M. Khan, A.R. Khan, I.Z. Qureshi, H.-B. Kraatz, Zia-ur-Rehman, Synthesis, spectroscopic characterization, DFT optimization and biological activities of Schiff bases and their metal (II) complexes, *Journal of Molecular Structure* (2017) 132-140.
- [10] S. Li, H. Shang, F. Liu, A. Zhang, Toxic effects of copper (II) ions on bovine hemoglobin, *Spectroscopy Letters* (2018) 67-73.
- [11] S. Mustafa, M. AlSharif, Copper (Cu) an Essential Redox-Active Transition Metal in Living System—A Review Article, *American Journal of Analytical Chemistry* (2018) 15.
- [12] G. George, R. Wilson, J.Joy, Ultraviolet Spectroscopy: A Facile Approach for the Characterization of Nanomaterials, *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* (2017) 52-72.
- [13] J. Østergaard, UV/Vis Spectrophotometry and UV Imaging. In *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. Springer: New York, 2016; pp 3-27.
- [14] F. Fifield, D. Kealey, *Analytical Chemistry: principles and practice*, Blackwell Science: Oxford, 2000; pp 40-45.

- [15] L. Huber, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, CRC Press. USA: New York, 2007; pp 43-50.
- [16] B. Allison, S. Clark, *Validation of analytical test methods*, Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Separation Science and Technology Series (2011) 300-355.
- [17] Magnusson, B. and Örnemark, U. (eds.) *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, (2nd edn 2014, 1st ed. issued in 1998.) Available at: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf)
- [18] S. Chatterjee, A. Hadi, *Regression analysis by example*, John Wiley & Sons: Egypt, 2015; pp 26-34.
- [19] J. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. UK: Pearson Education, 2018; pp 30-140.
- [20] J. Đorović, Z. Marković, Z. Petrović, D. Simijonović, V. Petrović, *Theoretical analysis of the experimental UV-Vis absorption spectra of some phenolic Schiff bases*, *Molecular Physics* (2017) 2460-2468
- [21] R. Lal, M. Mandal, L. Roy, J. Mukherjee, R. Bhawal, K. Maiti, *Synthesis, spectroscopic and structural studies on N-(2-hydroxyphenyl)cinnamaldimine and some bivalent metal complexes*, *Indian Journal of Chemistry* (2008) 1480-1485

## ANEXOS

### Protocolo de trabajo para la evaluación de los parámetros en la determinación de hierro mediante la técnica de UV-Vis





# Informe de calibración del espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 marca Varian®

© 2016 Agilent Technologies



Servicios de cualificación Agilent CrossLab



## Informe de cualificación del equipo

### Cualificación Agilent CrossLab

Tipo de cualificación:	UVVIS-OQ
ID del sistema:	UV-Vis
Nombre del EQP:	AgilentRecommended
Información del EQP:	Agilent Technologies Sistema
Versión del EQP:	UVVIS.01.08
Fecha publicación EQP:	Septiembre de 2016
Fecha:	09 August 2017 13:18:50
Tipo de informe:	Informe con certificado para los
Ubicación de la org.:	Av. 14 Sur esq. Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla, CP 72540, México

From Insight to Outcome

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

## Resumen de la prueba

### Finalidad

Esta sección incluye un estado para cada una de las pruebas programadas y la cualificación global. Para cada prueba realizada, (1) el estado se determina automáticamente según los límites predefinidos y (2) se muestra el número total de veces que ha realizado la prueba.

Si desea información detallada sobre los resultados y especificaciones de alguna prueba, consulte los resultados de las pruebas en este EQR.

[Información](#)

Prueba	Estado	Análisis
Exactitud de la longitud de onda: línea de la fuente : Cary 50	Pasa	1
Exactitud de la longitud de onda: óxido de holmio en ácido perclórico : Cary 50	Pasa	1
Reproducibilidad de la longitud de onda : Cary 50	Pasa	1
Resolución tolueno/hexano : Cary 50	Pasa	1
Luz difusa: cloruro potásico : Cary 50	Pasa	1
Exactitud fotométrica: dicromato potásico : Cary 50	Pasa	1
Reproducibilidad fotométrica: dicromato potásico : Cary 50	Pasa	1

### Estado de cualificación global

Pasa

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

## Información del servicio

### Finalidad

Esta sección incluye la información del contacto local para la prestación de este servicio.

### Información general

N.º de pedido/solicitud de servicio: 6001654921  
Nombre del EQP: AgilentRecommended  
Versión del EQP: UVVIS.01.08  
Tipo de informe: Informe con certificado para los resultados del CDS adjuntos

### Información de la organización

Nombre: BUAP – Facultad de Ciencias Químicas – FCQ9  
Ubicación: Av. 14 Sur esq. Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla, CP 72540, México

### Información del contacto local:

Nombre: Dr. José Luis Gárate  
Cargo: Coordinador Química Analítica  
Ubicación de la cualificación: Lab. Química Analítica

### Información del operador

Nombre: Cosme Rosales  
Cargo: Ingeniero de Servicio

### Información de la adquisición de datos

Estación de datos del cliente (CDS): Cary WinUV  
Nombre del software de adquisición: Cary WinUV  
Versión del software de adquisición: 3.00 [182]

---

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

## Información del instrumento

### Finalidad

Esta sección describe la configuración del sistema encontrada.

### Información

#### Espectrofotómetro UV-Vis 1

Fabricante	Agilent Technologies
Nombre	Cary 50
Número de modelo	Cary 50
Defina el método de entrada de datos	Adjuntar el informe de la prueba del CDS del instrumento
Número de serie	EL02116378

---

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

## Información del protocolo

Esta sección presenta las versiones de todas las unidades de pruebas de este informe. Si desea consultar la información completa y detallada de los cambios de cada prueba, consulte el historial de las actualizaciones.

Versión de la prueba	Prueba
UVVIS.01.07	Exactitud de la longitud de onda: línea de la fuente
UVVIS.01.08	Exactitud de la longitud de onda: óxido de holmio en ácido perclórico
UVVIS.01.08	Exactitud fotométrica: dicromato potásico
UVVIS.01.07	Luz difusa: cloruro potásico
UVVIS.01.07	Reproducibilidad de la longitud de onda
UVVIS.01.08	Reproducibilidad fotométrica: dicromato potásico
UVVIS.01.07	Resolución tolueno/hexano

---

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

## Materiales

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de óxido de holmio al 4% en ácido perclórico al 10%

LABORATORIO  
METROLOGÍA  
ACREDITACIÓN CP-03

## INFORME DE MEDICIÓN

Página 1/2

Informe No.: CMIO-16/0063  
 Nombre del Cliente: Agilent Technologies México, S. de R.L. de C.V.  
 Dirección: Av. Insurgentes Sur No. 1602, Oficina 801, Col. Crédito Constructor,  
 Delegación Benito Juárez, México, Distrito Federal, C.P. 03940.  
 Fecha de emisión: 2016-04-14

## DATOS DEL MATERIAL DE REFERENCIA

Instrumento:	Celda de Vidrio con Solución de Óxido de Holmio
Marca:	Starna
Modelo:	RM-0660HLKCSITX
No. Serie:	19259
Clave de Identificación:	RM-0660HLKCSITX
Requisitos Especificados por el Cliente:	Indicar Próxima Medición

## DATOS DEL PATRÓN

Patrón:	Espectrofotómetro	Intervalo de Med.:	190 nm a 900 nm
Marca:	Vánan	Incertidumbre:	$\pm 0.25$ nm a $\pm 0.20$ nm
Modelo:	Cary 100	Parámetros Espectrales Asignados a la Medición	
No. de Serie:	EL02066025		
Clave:	CMPC-001	Vel. Barrido:	90,000 nm/min
Trazabilidad:	hacia patrones nacionales mantenidos por CENAM	Intervalo de Dato:	5,05 nm
Informe:	CMIO-16/0196	Tiempo Prom. Señal:	5,033 s
Calibrado:	2016-06-20	ARE:	2 nm

## DATOS DE LA MEDICIÓN

Fecha de recepción:	2016-04-04
Fecha de medición:	2016-04-06
Próxima medición:	2018-04
Instructivo de medición:	GT-3504-22 "Medición de Materiales de Referencia del Área de Óptica"
Condiciones Ambientales de Medición	
Temperatura:	23,0 °C
Humedad Relativa:	47,0 % H.R.

CALIBRACIONES PROFESIONALES E INGENIERIA S.A. DE C.V.  
 CAMINO REAL DE CALACCAVA 65 CD. LOPEZ MATEOS C.P. 52990 ATIZAPAN  
 EDO. DE MEX. COMPUTADOR, TEL/FAX: + 52(55)5369-74 31 Y. + 52(55)5369-74 39  
 E.MAIL: info@calpro.com.mx SITIO: www.calpro.com.mx

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
 ID del sistema: UV-Vis

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de óxido de holmio al 4% en ácido perclórico al 10%

Informe No.: CMC-160083

### INFORME DE MEDICIÓN

Página 22

#### RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DEL MATERIAL DE REFERENCIA

LONGITUD DE ONDA (nm)	
ABE = 2 nm	U
261.14	0,10
290.08	0,15
276.12	0,21
287.57	0,11
333.06	0,17
345.37	0,16
361.14	0,14
385.82	0,13
416.67	0,12
451.26	0,12
467.89	0,13
473.52	0,15
485.28	0,11
506.95	0,12
640.76	0,12

El cálculo de incertidumbres está basado en la norma NMX-CH-140-IMNC-2002 IMNC Guía para la Expresión de Incertidumbre en Mediciones y se expresa con un factor de cobertura de  $k=2,15$  con un nivel de confianza de aproximadamente al 95,45 %.

**PROCEDIMIENTO RESUMIDO**

Se dejó estabilizar el equipo y el material de referencia a las condiciones ambientales, posteriormente se realizó la medición de la escala de longitud de onda a un ancho de banda de 2 nm por el método de Medición Directa con un espectrofotómetro patrón realizando en el material mediciones independientes que se efectuaron con una geometría de haz incidente normal a la superficie del filtro, usando como referencia el aire como se describe en el instructivo correspondiente.

La medición se realizó en las instalaciones de Calibraciones Profesionales e Ingeniería, S.A. de C.V.


**TRAZABILIDAD**


Las mediciones de los patrones y equipos de CalPro son trazables hacia patrones nacionales mantenidos por el Centro Nacional de Metrología.

**ACREDITACION**

Laboratorio acreditado por ama para las mediciones indicadas en el escrito con número de acreditación No. OP-03, Vigencia de acreditación a partir de 2012-04-19.

Este resultado de medición, se puede ser reproducido en forma parcial sin la acreditación por escrito de CALPRO. Los resultados son válidos para el personal que está bajo las condiciones de los calidad certificados.

MIDIÓ:   
Francisco J. Santacruz Velada  
Metrólogo

APROBÓ:   
Juaquín Salazar Escobedo  
Solicitante Autorizado

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de tolueno en hexano al 0.02%

LABORATORIO  
METROLOGÍA  
ACREDITACIÓN 09-82**INFORME DE MEDICIÓN**

Página 13

Informe No.: CMIO- 16/0068  
 Nombre del Cliente: Agilent Technologies México, S. de R.L. de C.V.  
 Dirección: Av. Insurgentes Sur No. 1602, Oficina 801, Col. Crédito Constructor,  
 Delegación Benito Juárez, México, Distrito Federal, C.P. 03940.  
 Fecha de emisión: 2016-04-14

**DATOS DEL MATERIAL DE REFERENCIA**

Instrumento:	Celda de Vidrio con Solución de Tolueno en Hexano
Marca:	Siema
Modelo:	RM-0660HLKCSITX
No. Serie:	19259
Clave de identificación:	RM-0660HLKCSITX
Registros Especificados por el Cliente:	Indicar Próxima Medición

**DATOS DEL PATRÓN**

Patrón:	Espectrofotómetro	Intervalo de Med.:	190 nm a 900 nm
Marca:	Varian	Incertidumbre:	± 0,05 nm a ± 0,20 nm
Modelo:	Cary 130	Parámetros Espectrales Asignados a la Medición	
No. de Serie:	EL03065623		
Clave:	CMFO-001	Vel. Barido:	90,909 nm/min
Trazabilidad:	Hecho patrones nacionales mantenidos por CEMAM	Intensidad de Datos:	0,05 nm
Informe:	CMIO-16/0106	Tiempo Prom. Señal:	0,033 s
Calibrado:	2015-08-20	ABE:	2 nm

**DATOS DE LA MEDICIÓN**

Fecha de recepción:	2016-04-04
Fecha de medición:	2016-04-05
Próxima medición:	2018-04
Instructivo de medición:	GT-3004-22 "Medición de Materiales de Referencia del Área de Óptica"
Condiciones Ambientales de Medición	
Temperatura:	23,0 °C
Humedad Relativa:	47,0 % H.R.

**CALIBRACIONES PROFESIONALES E INGENIERIA S.A. DE C.V.**  
 CAMINO REAL DE CALACAYÁ 65 CD. LOPEZ MATEOS C.P. 50990 ATIZAPÁN  
 EDO. DE MÉX. CONMUTADOR: TEL/FAX: ++52(55)5369-74 31 Y ++52(55)5369-74 39  
 E-MAIL: info@calpro.com.mx SITIO: www.calpro.com.mx

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
 ID del sistema: UV-Vis

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de tolueno en hexano al 0.02%

Informe No.: CMIO-160068

## INFORME DE MEDICIÓN

Página 02

**RESULTADOS DE LA MEDICIÓN  
DEL MATERIAL DE REFERENCIA**

LONGITUD DE ONDA (nm)	
ABE = 2 nm	U
255.28	0,20
261.63	0,20
268.78	0,19

El cálculo de incertidumbre está basado en la norma NMX-CH-140-IMNC-2002 IMNC Guía para la Expresión de Incertidumbre en las Mediciones y se expresa con un factor de cobertura de k= 2,00 con un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45 %.

**PROCEDIMIENTO RESUMIDO**  
Se dejó estabilizar el equipo y el material de referencia a las condiciones ambientales, posteriormente se realizó la medición de la escala de longitud de onda a un ancho de banda de 2 nm por el método de Medición Directa con un espectrofotómetro patrón realizando en el material mediciones independientes que se efectuaron con una geometría de haz incidente normal a la superficie del filtro, usando como referencia la celda identificada como "Hexane Blank" tal como se describe en el instructivo correspondiente.

La medición se realizó en las instalaciones de Calibraciones Profesionales e Ingeniería, S.A. de C.V.

**TRAZABILIDAD**  
Las mediciones de los patrones y equipos de CalPro son trazables hacia patrones nacionales mantenidos por el Centro Nacional de Metrología.

**ACREDITACIÓN**  
Laboratorio acreditado por ema para las mediciones indicadas en el escrito con número de acreditación No. DP-03, Vigencia de acreditación a partir de 2012-04-18.

Este informe de medición no puede ser reproducido en forma parcial en la acreditación por parte de CALPRO. Los resultados son válidos para el intervalo de validez bajo las condiciones y los que se especifican.

  
 MEDIO  
 Francisco J. Salazar Villada  
 Metrologista

  
 APROBÓ:  
 Joaquín Salazar Estrella  
 Signatario Autorizado

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de cloruro potásico al 1.2%

LABORATORIO  
METROLOGÍA  
ACREDITACIÓN D-01

## INFORME DE MEDICIÓN

Página 1/2

Informe No.: **CMIO- 16/0065**  
 Nombre del Cliente: **Agilent Technologies México, S. de R.L. de C.V.**  
 Dirección: **Av. Insurgentes Sur No. 1602, Oficina 801, Col. Crédito Constructor,  
 Delegación Benito Juárez, México, Distrito Federal, C.P. 03940.**  
 Fecha de emisión: **2016-04-14**

### DATOS DEL MATERIAL DE REFERENCIA

Instrumento:	Celda de Vidrio con Solución de Cloruro de Potasio
Marca:	Siema
Modelo:	RM-0650HLKCSITX
No. Serie:	19229
Clave de Identificación:	RM-0650HLKCSITX
Requisitos Especificados por el Cliente:	Indicar Próxima Medición

### DATOS DEL PATRÓN

Patrón:	Espectrofotómetro	Alcance en Escala Fotométrica:	0: 3.5
Marca:	Varian	Incertidumbre:	$\pm 0.0022 \pm 0.0057$
Modelo:	Cary 100	Parámetros Espectrales Asignados a la Medición:	
No. de Serie:	EL02060629	Alcance en Escala de l:	190 nm a 900 nm
Clave:	CMPO-001	Vel. Barrido:	90.000 nm/min
Trazabilidad:	None previous certificate number per CEVAV	Intervalo de Datos:	0.25 nm
Informe:	CMIO-150188	Tiempo Prom. Señal:	0.033 s
Calibrado:	2015-08-20	ABC:	2 nm

### DATOS DE LA MEDICIÓN

Fecha de recepción:	2016-04-04
Fecha de medición:	2016-04-06
Próxima medición:	2016-04
Instructivo de medición:	QT-3004-22 "Medición de Materiales de Referencia del Área de Óptica"
Condiciones Ambientales de Medición	
Temperatura:	23.0 °C
Humedad Relativa:	47.0 % H.R.

CALIBRACIONES PROFESIONALES E INGENIERIA S.A. DE C.V.  
 CAMINO REAL DE CALACIANA 65 CD. LOPEZ MATEOS C.R. 59990 ATIZAPAH  
 EDO. DE MEX. CONMUTADOR: TEL/FAX: ++52/55/5362-74 31 Y ++52/55/5368-74 39  
 E-MAIL: info@calpro.com.mx SITIO: www.calpro.com.mx

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
 ID del sistema: UV-Vis

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de cloruro potásico al 1.2%

Informe No.: CMO-16/0065

### INFORME DE MEDICIÓN

Página 03

#### RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DEL MATERIAL DE REFERENCIA

Escala Fotométrica (α)			Escala Fotométrica (W)		
Longitud de Onda (nm)	Medida	U	Longitud de Onda (nm)	Medida	U
186,0	1,967 7	0,004 6	199,0	1,078 2	0,014 5
186,1	1,968 4	0,004 2	199,1	1,075 5	0,014 2
186,2	1,973 5	0,005 4	199,2	1,064 0	0,010 2
186,3	1,975 5	0,004 6	199,3	1,059 0	0,014 8
186,4	1,975 4	0,005 1	199,4	1,061 5	0,015 7
186,5	1,976 6	0,004 6	199,5	1,054 8	0,014 8
186,6	1,975 6	0,004 6	199,6	1,056 6	0,014 7
186,7	1,975 5	0,003 0	199,7	1,047 1	0,016 6
186,8	1,973 2	0,003 1	199,8	1,049 8	0,016 9
186,9	1,972 9	0,002 2	199,9	1,050 5	0,017 0
189,0	1,971 6	0,003 6	199,0	1,053 8	0,017 4
199,1	1,969 6	0,003 4	199,1	1,056 7	0,017 2
199,2	1,969 6	0,003 6	199,2	1,058 7	0,017 4
199,3	1,965 4	0,004 0	199,3	1,069 2	0,018 0
199,4	1,961 9	0,003 9	199,4	1,078 0	0,017 8
199,5	1,957 2	0,003 9	199,5	1,090 0	0,017 8
199,6	1,949 9	0,004 1	199,6	1,108 8	0,018 3
199,7	1,940 9	0,005 9	199,7	1,147 1	0,017 7
199,8	1,932 8	0,005 9	199,8	1,167 7	0,019 2
199,9	1,924 7	0,005 4	199,9	1,192 1	0,017 4
200,0	1,912 3	0,006 0	200,0	1,227 1	0,019 1
k =	2,10		k =	2,06	

El cálculo de incertidumbres está basado en la norma NMX-CI-IMNC-140-2002 IMNC Guía para la Expresión de Incertidumbre en las Mediciones y se expresa con un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45 %.

**PROCEDIMIENTO RESUMIDO**

Se dejó estabilizar el equipo y el material de referencia a las condiciones ambientales, posteriormente se realizó la medición de la escala fotométrica a un ancho de banda de 2 nm por el método de Medición Directa con un espectrofotómetro patrón realizando en el material mediciones independientes que se efectuaron con una geometría de haz incidente normal a la superficie del lítero, usando como referencia la celda identificada como "Stray Light Blank" tal como se describe en el instructivo correspondiente.

La medición se realizó en las instalaciones de Calibraciones Profesionales e Ingeniería, S.A. de C.V.

**TRAZABILIDAD**

Las mediciones de los patrones y equipos de CalPro son trazables hacia patrones nacionales mantenidos por el Centro Nacional de Metrología.

**ACREDITACIÓN**

Laboratorio acreditado por ema para las mediciones indicadas en el escrito con número de acreditación No: QP-03, Vigencia de acreditación a partir de 2012-04-18.


Este informe de medición no puede ser reproducido en forma parcial ni la totalidad por escrito de CALPRO. Las instalaciones están sujetas a inspecciones periódicas por las autoridades en sus áreas correspondientes.

MIDIO  
Francisco J. Barrios Villeda  
Mudrógo

APROBO  
Joelma Salazar Escobar  
Suplente Autorizado

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

Nombre del documento: Certificado de análisis Solución patrón de dicromato potásico

 Agilent Technologies

---

## Certificate of Analysis

### OQ/PV Standards Kit-1 for UV/Vis


Agilent Part Number: 5063-6503 Sample Lot Number: N082105

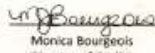
This analytical reference material was manufactured and verified in accordance with an ISO 9001 registered quality system, and the analyte concentrations were verified by an ISO 17025 accredited laboratory. The standards were qualified photometrically using a Cary 4000 spectrophotometer calibrated using the Deuterium Emission and Double Aperture methods for wavelength and absorbance respectively.

Standard	Purpose	Part No.	Lot No.	Value
600.6 mg/L potassium dichromate in 0.01N sulfuric acid	Photometric accuracy test	5063-6503-1	CP-4973	When measured with a path length of 1 cm at 20.0°C (±0.1°C) this solution should have the following absorbance values: Wavelength (nm) 430 Absorbance (A) 0.955 The standard values are certified to be within ± 0.007 A of the above. Absorbance values are temperature sensitive.
60.06 mg/L potassium dichromate in 0.01N sulfuric acid	Photometric accuracy test	5063-6503-2	CP-4974	When measured with a path length of 1 cm at 20.0°C (±0.1°C) this solution should have the following absorbance values: Wavelength (nm) 235 257 313 350 Absorbance (A) 0.748 0.868 0.292 0.644 The standard values are certified to be within ± 0.005 A of the above. Absorbance values are temperature sensitive.
sulfuric acid solution	Photometric accuracy test blank	5063-6503-3	CP-4975	0.01N sulfuric acid aqueous solution
50 g/L sodium nitrite in water	Stray light test	5063-6503-8	CP-4954	The standard is certified to have a transmittance of <0.001% at 340 nm.
10 g/L sodium iodide in water	Stray light test	5063-6503-7	CP-4960	The standard is certified to have a transmittance of <0.001% at 220 nm.
12 g/L potassium chloride in water	Stray light test	5063-6503-6	CP-4955	The standard is certified to have a transmittance of <0.25% at 198 nm.
0.02 % v/v toluene in n-hexane	Resolution test	5063-6503-5	CP-5007	The ratio of the maximum at 269 nm to the absorbance minimum at 266 nm is related to the slit width as follows: Resolution (nm) 1.0 2.0 Ratio(269/266) 2.0 1.4
n-hexane solvent	Resolution test blank	5063-6503-4	CP-5006	n-Hexane, 99.9%

Calibrated Class A glassware and clean bottles were used in the manufacture of this standard. Balances used in the manufacture of this standard are calibrated with weights traceable to NIST in compliance with ANSI/NCSL Z-540-1 and ISO 9001.

Date of release: 07 October 2016  
Date of expiration: 31 October 2018

 John Russo  
President

 Monica Bourgeois  
Director of QA/RA

Fecha: 09 August 2017 13:18:50  
ID del sistema: UV-Vis

## Certificado de cualificación del sistema

UVVIS-OQ

---

ID del sistema:	UV-Vis
Nombre de la organización:	BUAP – Facultad de Ciencias Químicas – FCQ9
Ubicación de la organización:	Av. 14 Sur esq. Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla, CP 72540, México
Fecha:	09 August 2017 13:18:50
Nombre del EQP:	AgilentRecommended
Versión del EQP:	UVVIS.01.08
Estado de cualificación global:	Pasa

---

Exactitud de la longitud de onda: línea de la fuente

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

Exactitud de la longitud de onda: solución de óxido de holmio en ácido perclórico

Pasa

---

Fecha:	09 August 2017 13:18:50
ID del sistema:	UV-Vis