



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Validación del método para determinación de detergentes en muestras de agua por espectrofotometría UV-Vis en el laboratorio AqLab de la ciudad del Coca.

Trabajo de titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Ana Belén Aguirre Tubón

Tutor: Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

Ambato – Ecuador

Marzo - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

CERTIFICA:

Que el presenta trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 20 de diciembre de 2021

.....

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

C.I: 1802706596

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Ana Belén Aguirre Tubón, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Ana Belén Aguirre Tubón

C.I. 180541521-1

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....
Presidente del Tribunal

.....
M.Sc. Jeanette Verónica Carrera Cevallos
C.I. 1716192271

.....
Santiago Esmiro Cadena Carrera PhD
C.I. 1715602593

Ambato, 02 de febrero del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Ana Belén Aguirre Tubón

C.I. 1805415211

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la sabiduría necesaria y ser la guía para cumplir con mis anhelos y metas.

A mi familia: Elian y Cristian por ser el motor y motivo de mi vida, por compartir un sin número de alegrías y tristezas, por estar presentes en los momentos de angustia y desesperación, por brindarme su apoyo incondicional y enseñarme que con paciencia y perseverancia se logran muchas cosas. Sin ustedes este logro no sería posible.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato, especialmente a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por abrirme sus puertas y permitir formarme como una profesional llena de valores y conocimientos.

Al personal Administrativo y Técnico del Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental Aqlab de la ciudad del Coca por haber permitido realizar este trabajo dentro de sus instalaciones, brindándome su apoyo, conocimientos, consejos y pautas teóricas que ayudaron a obtener resultados exitosos en este trabajo.

A mi tutor, Químico Lander Pérez por sus consejos y conocimientos impartidos y por solventar cada una de mis inquietudes.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
EL PROBLEMA.....	2
1.1 Tema de Investigación.....	2
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II	5
2 MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes investigativos	5
2.1.1 Selección y verificación de métodos.....	5

2.1.2	Validación de métodos	5
2.2	Criterios de aceptación o rechazo	6
2.2.1	Selectividad	6
2.2.2	Linealidad	6
2.2.3	Sensibilidad analítica	7
2.2.4	Límite de detección (LOD)	7
2.2.5	Límite de cuantificación (LOC)	8
2.2.6	Intervalo de trabajo del método	8
2.2.7	Exactitud	8
2.2.8	Veracidad	9
2.2.9	Precisión	10
2.2.10	Robustez	11
2.2.11	Incertidumbre de medida	11
2.2.12	Fuentes de incertidumbre	11
2.2.13	Componentes de la incertidumbre	12
2.2.14	Incertidumbre típica	12
2.2.15	Incertidumbre típica combinada	12
2.2.16	Incertidumbre Expandida	13
CAPÍTULO III	14
MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1	Selección del método de Referencia	14
3.2	Localización geográfica de la investigación	14
3.3	Condiciones ambientales	15
3.4	Selección de los parámetros de validación	16
3.5	Diseño Experimental	16

3.6	Parte Experimental	17
3.6.1	Materiales.....	17
3.7	Técnicas de recolección de datos	19
3.8	Metodología.....	19
3.8.1	Preparación de las muestras	19
3.8.2	Procedimiento experimental del ensayo.....	20
CAPITULO IV		21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		21
4.1	Detección de la Necesidad Analítica.....	21
4.2	Puesta a punto del equipo.....	21
4.2.1	Absorbancia máxima.....	21
4.2.2	Rango lineal	22
4.3	Curva de calibración.....	22
4.4	Determinación de la linealidad de la función respuesta del método	26
4.5	Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	28
4.5.1	Cálculo de la desviación estándar (S_0).....	28
4.5.2	Cálculo de la desviación estándar corregida S'_0	29
4.5.3	Límite de Detección LOD.....	29
4.5.4	Límite de Cuantificación LOQ	29
4.6	Datos experimentales	30
4.7	Análisis de precisión	31
4.7.1	Análisis de repetibilidad.....	31
4.7.2	Análisis de reproducibilidad	32
4.7.3	Prueba de Fisher.....	32
4.8	Análisis de veracidad.....	34

4.9	Determinación de la incertidumbre de medida.....	35
CAPÍTULO V.....		45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		45
5.1	CONCLUSIONES.....	45
5.2	RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA		47
ANEXOS		50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Objetivos de Validación para Tensoactivos.....	16
Tabla 2. Esquema del Diseño Experimental.....	16
Tabla 3. Curvas de calibración.....	23
Tabla 4. Parámetros estadísticos de la función respuesta.....	26
Tabla 5. Interceptos y pendientes para el control de curvas de calibración.....	27
Tabla 6. Mediciones del blanco.....	28
Tabla 7. Datos experimentales para validación de tensoactivos aniónicos en aguas.....	30
Tabla 8. Repetibilidad para analista 1.....	31
Tabla 9. Repetibilidad para analista 2.....	31
Tabla 10. Análisis estadístico T student para Analista 1 y Analista 2.....	32
Tabla 11. Prueba de Fisher para todas las muestras y estándares analizados.....	33
Tabla 12. Análisis de precisión.....	33
Tabla 13. Determinación del Sesgo (Porcentaje de Recuperación).....	34
Tabla 14. Incertidumbres relativas del material volumétrico utilizado.....	38
Tabla 15. Incertidumbre relativa para cada patrón de calibración.....	39
Tabla 16. Incertidumbre relativa para el volumen de muestra.....	40
Tabla 17. Incertidumbre para dilución.....	40
Tabla 18. Incertidumbre de la concentración por la Función Respuesta.....	41
Tabla 19. Incertidumbres de calibración para cada nivel de concentración.....	42
Tabla 20. Incertidumbre expandida del método para cada nivel.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del Laboratorio AQLAB.	15
Figura 2. Curva de calibración en el primer día.	23
Figura 3. Curva de calibración en el segundo día.	24
Figura 4. Curva de calibración en el tercer día.	24
Figura 5. Curva de calibración en el cuarto día.	25
Figura 6. Curva de calibración en el quinto día.	25
Figura 7. Diagrama de Ishikawa para el método de tensoactivos.	35
Figura 8. Neutralización de la muestra.	58
Figura 9. Extracción de las sustancias activas al azul de metileno.	58
Figura 10. Separación de la fase clorofórmica.	59
Figura 11. Medición en el espectrofotómetro UV-vis.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Manual de procedimiento para la determinación de tensoactivos aniónicos. .50	50
Anexo B. Certificado del estándar de sustancias activas al azul de metileno.....55	55
Anexo C. Barrido espectral.....56	56
Anexo D. Puesta a punto.....57	57
Anexo E. Evidencia fotográfica del ensayo.....58	58
Anexo F. Certificado de calibración matraz aforado 50 ml.60	60
Anexo G. Certificado de calibración matraz aforado 100 ml.61	61
Anexo H. Certificado de calibración matraz aforado 250 ml.62	62
Anexo I. Certificado de calibración matraz aforado 1000 ml.63	63
Anexo J. Certificado de calibración bureta 25 ml.64	64
Anexo K. Certificado de calibración pipeta de pistón 100-1000 uL.65	65
Anexo L. Certificado de calibración de pipeta de pistón 1-10 ml.66	66
Anexo M. Tabla t-student.67	67
Anexo N. Tabla de Fisher.68	68

RESUMEN

La validación del método para determinación de tensoactivos en muestras de agua por espectrofotometría UV-vis se llevó a cabo en el laboratorio de análisis y evaluación ambiental AqLab en la ciudad del Coca. Su validación se realizó tomando en cuenta la necesidad analítica del laboratorio, parámetros de validación de la norma INEN ISO IEC 17025 y normativas del SAE, normativas ambientales descritas en el TULSMA, en su Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua y Ordenanzas municipales del cantón Orellana. Se utilizó el método 5540 C correspondiente a la determinación de tensoactivos aniónicos como MBAS descrito en los Métodos Estándar para las matrices de agua de consumo humano, agua natural y agua residual. Se estableció los objetivos de validación y se planteó el diseño experimental correspondiente en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Se analizó los siguientes parámetros: Función Respuesta, Límite de detección, Límite de cuantificación, Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad), Veracidad, Incertidumbre e Intervalo de trabajo del método. Mediante el análisis estadístico de datos se demostró que el método es adecuado para la aplicación prevista, al cumplir con los objetivos de validación planteados correspondientes a un CV_T y CV_R menor al 30 por ciento para precisión, un porcentaje de recuperación de 80 al 120 por ciento para veracidad, una incertidumbre U menor al 30 por ciento con un intervalo de confianza del 95 por ciento (k es 2) y un intervalo de trabajo del método que comprende los niveles de concentración de 0,1 a 8,85 ppm de MBAS.

Palabras clave: Validación, Tensoactivos, Espectrofotometría Uv-vis, Gestión de calidad, Calidad del agua, Química Analítica.

ABSTRACT

The validation of the method for determination of surfactants in water samples by UV-vis spectrophotometry was carried out in the environmental analysis and evaluation laboratory Aqlab in the city of Coca. Its validation was carried out taking into account the analytical need of the laboratory, validation parameters of the INEN ISO IEC 17025 standard and SAE regulations, environmental regulations described in the TULSMA, in its Environmental Quality and Effluent Discharge Standard: Water Resource and the Municipal Ordinances of the Orellana Canton. The method 5540 C corresponding to the determination of anionic surfactants as MBAS described in the Standard Methods was used for the matrices of water for human consumption, natural water and waste water. The validation objectives were established and the corresponding experimental design was proposed under conditions of repeatability and reproducibility. The following parameters were analyzed: Response Function, Limit of detection, Limit of quantification, Precision (repeatability and reproducibility), Veracity, Uncertainty and Working Interval of the method. Through the statistical analysis of data, it was demonstrated that the method is suitable for the intended application, by meeting the validation objectives set for a CVr and CVR less than 30 percent for accuracy, a recovery percentage of 80 to 120 percent for veracity, an uncertainty U less than 30 percent with a 95 percent confidence interval (k is 2) and a method working range comprising concentration levels 0,10 to 8,85 ppm MBAS.

Keywords: Validation, Surfactants, Uv-vis Spectrophotometry, Quality Management, Water Quality, Analytical Chemistry.

INTRODUCCIÓN

Los recursos hídricos del Ecuador y del mundo se están contaminando por las grandes descargas de efluentes tóxicos provenientes tanto de los diferentes sectores productivos que mueven el desarrollo de un país como del sector urbano. Estos efluentes tóxicos ocasionan una alteración en los sistemas acuáticos causando mortandad de los organismos que en él habitan y perjudicando el medio ambiente que lo rodea.

Dentro de estos contaminantes, encontramos los tensoactivos que se caracterizan por poseer un grupo hidrofóbico y un grupo hidrofílico, razón por la cual son muy utilizados en la elaboración de productos de cuidado personal, farmacéuticos, agrícolas, de limpieza, etc. Al ser estos productos de uso diario su demanda se ve incrementada por la frecuencia de uso y el crecimiento poblacional año tras año, obligando a las grandes industrias al desarrollo de nuevos productos y por ende ocasionando una mayor descarga de aguas residuales que contienen tensoactivos.

La concentración de tensoactivos debe ser reducida antes de ser enviados a un cuerpo de agua receptor para mitigar cualquier problema de contaminación ambiental. Para ello, la legislación ecuatoriana establece normativas ambientales para la descarga de este tipo de sustancias, mismas que deben ser cumplidas por las diferentes empresas que en el interior de sus actividades generen este tipo de residuo.

Los laboratorios de análisis y evaluación ambiental acreditados son los encargados de proporcionar información sobre la presencia de un contaminante en un cuerpo de agua, suelo y aire, a través de análisis químicos, físicos y microbiológicos.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación

VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE DETERGENTES EN MUESTRAS DE AGUA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS EN EL LABORATORIO AQLAB DE LA CIUDAD DEL COCA.

1.2 Justificación

Los laboratorios de análisis y evaluación ambiental deben demostrar que son técnicamente competentes para brindar servicios de alta calidad a sus clientes. La validación de métodos de ensayos es un requerimiento indispensable para adquirir confiabilidad de sus resultados y en base a estos tener la confianza de tomar decisiones en cumplimiento con la normativa ambiental vigente dentro de un país (Eurachem, 2016).

La Norma ISO 17025 define la validación como una verificación de los parámetros establecidos en un determinado método analítico a través de estudios sistemáticos de

laboratorio y evidencias objetivas que demuestren que el método es idóneo y cumple con las especificaciones para un uso específico previsto (ISO/IEC17025, 2017).

En el Ecuador el órgano oficial de acreditación de los procedimientos internos de los laboratorios es el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE). Se encarga de evaluar y acreditar laboratorios para que estos brinden productos y servicios de calidad. En los laboratorios el primer paso es la validación del método analítico a emplearse, mismo que debe cumplir con los requisitos establecidos en la Norma INEN ISO IEC 17025, normativas del SAE y toda la documentación que respalde la confianza y seguridad de los resultados.

Por tanto, el laboratorio de análisis y evaluación ambiental AQLAB requiere ampliar su alcance de acreditación con la validación del método de determinación de tensoactivos en muestras de agua por espectrofotometría UV-VIS, puesto que es un parámetro solicitado por las autoridades ambientales a diferentes empresas para garantizar que se cumplan con los requisitos de descargas de efluentes a cuerpos de agua receptores y para ello se ve en la necesidad de validar la metodología a través de documentos que determinen el grado de confianza de sus resultados. Este proceso de validación con fines de acreditación aumentará la capacidad de servicio del laboratorio y le brindará preferencia en situaciones de competitividad a nivel nacional.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Validar el método para determinación de detergentes en muestras de agua por espectrofotometría UV-VIS en el laboratorio de análisis y evaluación ambiental AQLAB de la ciudad del Coca.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar los límites de detección y cuantificación del método de determinación de detergentes en muestras de agua por espectrofotometría UV-VIS.
- Establecer los criterios de recuperación y control de calidad del método.
- Elaborar un manual de procedimiento para la determinación de detergentes en muestras de agua por espectrofotometría UV-VIS.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

2.1.1 Selección y verificación de métodos

La Norma ISO/IEC:2017 claramente señala en su apartado 7.2 “Verificación y validación de Métodos de Ensayo” que los laboratorios deben usar métodos y procedimientos apropiados para presentar informes altamente confiables de sus resultados. Estos métodos y procedimientos incluyen para la evaluación de la medición de la incertidumbre y todas las técnicas estadísticas utilizadas para el respectivo análisis de datos. Además, el laboratorio tiene la obligación de verificar su metodología antes de ser utilizada para el fin establecido a través de registros de verificación, de tal manera que si el método descrito es modificado por el organismo que lo publicó, el laboratorio estará obligado a repetir y actualizar dicha verificación a su última versión.

2.1.2 Validación de métodos

La validación de métodos es un parámetro solicitado por los Sistemas de Gestión de Calidad, particularmente en la Norma ISO/IEC 17025 a todos los laboratorios de ensayo y constituye un proceso por el cual se confirma que el método es apto para el propósito descrito, esta requiere de instrumentos calibrados, métodos documentados, patrones de referencia confiables y certificados, analistas calificados y por su puesto la integridad de la muestra. Este proceso consiste específicamente en establecer las características de desempeño, sus limitaciones e identificar las influencias que de alguna manera puede llegar a modificar esas características establecidas. (OSA, 2017).

2.2 Criterios de aceptación o rechazo

2.2.1 Selectividad

La selectividad se define como la capacidad de un método analítico para dar señales reales sin interferencias, es decir, es la capacidad para discriminar entre el analito y los componentes interferentes como impurezas dentro de una determinada muestra bajo condiciones de ensayo establecidas (Zumba & Carvajal, 2018).

La selectividad puede ser considerada como como un término semejante a la especificidad, ya que esta es la capacidad de un método para determinar un analito de interés. Sin embargo, la especificidad se considera como un término absoluto y no calificable, mientras que la selectividad muestra un grado de preferencia y por ende puede ser calificable (Vessman *et al.*, 2001).

2.2.2 Linealidad

La Norma ISO/IEC 17025, 2017 define la linealidad como la relación entre la concentración del analito y la respuesta obtenida por el método. Es decir, es la capacidad para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras dentro de un intervalo determinado. El resultado de una buena correlación de los datos experimentales es una función lineal (SAE, 2018).

Ecuación que relaciona la concentración y respuesta de un analito:

$$y = mx + b \quad (1)$$

Donde:

y: respuesta

x: concentración

m: pendiente de la curva de calibración

b: intercepto con el eje y cuando $x=0$

2.2.3 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica es el factor respuesta obtenido en un proceso de medición para un determinado analito, es decir, es la pendiente de la curva respuesta-concentración. Mientras más alto sea este valor, más sensible será el método (Eurachem, 2016).

2.2.4 Límite de detección (LOD)

Es la concentración más baja de analito detectable en una muestra, no necesariamente cuantificable a un nivel de confianza especificado. Por lo tanto, un valor superior al límite de detección corresponderá al analito mientras que un valor inferior indicará la ausencia del analito en cantidades detectables (González & Herrador, 2007).

Su ecuación está dada por:

$$LOD = \bar{x} + 3 * S'_0 \quad (2)$$

Donde:

\bar{x} : media de las mediciones realizadas

S'_0 : es la desviación estándar corregida

2.2.5 Límite de cuantificación (LOC)

Es la cantidad más baja de analito que puede ser determinado cuantitativamente a un nivel aceptable de precisión y bajo condiciones establecidas de ensayo. Se expresa en unidades de concentración al igual que el LOD (González & Herrador, 2007).

Su ecuación viene dada por:

$$LOC = \bar{x} + 10 * S'_0 \quad (3)$$

Donde:

\bar{x} : media de las mediciones realizadas

S'_0 : desviación estándar corregida

2.2.6 Intervalo de trabajo del método

El intervalo de trabajo del método comprende el límite de cuantificación en su extremo inferior y el valor que incluye la dilución máxima permitida en su extremo superior, es decir es el intervalo en el que el método es capaz de proporcionar resultados con una incertidumbre admisible (IDEAM, 2006).

2.2.7 Exactitud

La exactitud de un método analítico muestra la proximidad que existe entre un valor de referencia y un valor experimental obtenido. Por lo expuesto, el valor verdadero de un analito en una muestra se puede obtener de dos formas, la primera consiste en la comparación con un patrón de referencia correspondiente al valor verdadero de analito o la comparación del resultado obtenido con un método validado del que ya se ha

demostrado su exactitud. Los resultados se pueden expresar en forma de porcentaje de error y porcentaje de recuperación (Socarras & Pretelt, 2020).

La exactitud de medida al no ser una magnitud no se puede calcular ni expresar numéricamente, sin embargo se estudia por veracidad y precisión. Una medida es exacta cuando más pequeño es su error (VIM, 2012).

Porcentaje de error:

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Valor teórico} - \text{valor experimental}}{\text{valor teórico}} * 100 \quad (4)$$

2.2.8 Veracidad

El término veracidad hace referencia al grado de concordancia que existe entre la media aritmética de un número infinito de resultados de ensayo obtenidos de manera repetida y el valor de referencia aceptado. Sin embargo, al no ser posible realizar un número infinito de mediciones, la veracidad no se puede expresar numéricamente pero, se puede realizar una evaluación práctica y expresar en forma de sesgo (NTE INEN-ISO 5725-1, 2015).

El sesgo se define como una valor estimado de un error sistemático, su estudio debe cubrir el alcance del método establecido y puede ser expresado en términos de recuperación relativa de adiciones (Eurachem, 2016).

Porcentaje de recuperación:

$$\%R' = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{adición}}} * 100 \quad (5)$$

Donde:

\bar{x}' : valor medio de adiciones

\bar{x} : valor medio sin adición

$x_{adición}$: concentración añadida

2.2.9 Precisión

Se define como una medida de cercanía entre los resultados independientes obtenidos a través de una serie repetida de mediciones bajo condiciones establecidas de ensayo. Su valor depende de la distribución de los resultados, no está relacionado con el valor verdadero y se expresa en términos de desviación estándar u otra variable de dispersión (Arriola, 2012).

La precisión de los datos se puede medir por:

- a) **Repetibilidad:** se define como una medida de variabilidad de los resultados obtenidos por el dispositivo de medición bajo las mismas condiciones de ensayo, con el mismo analista, mismo equipo y bajo un periodo corto de tiempo (Vilañez Huertas & Malacatus Cobos, 2021).

- b) **Reproducibilidad:** se define como una medida de variabilidad de los resultados obtenidos por el mismo método pero, con diferentes analista, equipos, intervalos de tiempo, etc. Es decir, la reproducibilidad del método permite conocer si un análisis puede repetirse al variar ciertas condiciones, ya sea por la presencia de fallos o cambio de equipos y analistas (Cendejas Bueno, 2018).

2.2.10 Robustez

La robustez muestra la capacidad que tiene el método para no verse afectado por pequeñas variaciones inesperadas, de tal forma que, se convierte en un indicador de su fiabilidad para realizar un ensayo determinado. (Eurachem, 2016).

2.2.11 Incertidumbre de medida

La incertidumbre de medida constituye una duda sobre la validez de un resultado informado pues, toda medida se ve afectada por un error, la incertidumbre de medida nos ayuda a conocer el tamaño del error que podría estar asociado a una medición (Magnusson et al., 2017). Es decir, representa el conocimiento limitado que se tiene sobre un valor en particular, sin embargo, el hecho de conocer la incertidumbre de medida nos brinda una confianza del resultado obtenido en una medición (Eurachem, 2012).

El Vocabulario Internacional de Metrología define la incertidumbre de medida como un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores que se pueden atribuir razonablemente a un mensurando y puede ser expresada en términos de desviación estándar (VIM, 2012).

2.2.12 Fuentes de incertidumbre

En la realización de un ensayo analítico surgen muchas fuentes de incertidumbre, entre ellas se puede citar las fuentes de incertidumbre por muestreo, por efectos de la matriz, por las condiciones ambientales en las que se realiza el ensayo, por las condiciones de medida utilizado, por las incertidumbres de los equipos, por el procedimiento como tal, variaciones aleatorias, etc. (Eurachem, 2012).

2.2.13 Componentes de la incertidumbre

Los componentes de la incertidumbre se clasifican de acuerdo con el método utilizado para estimar dicho valor:

- Evaluación tipo A: cuando una serie de medidas se evalúan por métodos o análisis estadísticos y se expresan en forma de varianzas (s_i^2) o desviaciones típicas (s_i).
- Evaluación tipo B: cuando se realiza la evaluación utilizando medios distintos al análisis estadístico. Se expresan a través de varianzas estimadas (u_j^2) o desviaciones típicas (u_j) (GUM, 2008).

El laboratorio debe realizar las dos evaluaciones tipo A y tipo B de los componentes que intervienen en método de ensayo con la finalidad de incluirlos en la estimación de la incertidumbre global o expandida (Mena, 2018).

2.2.14 Incertidumbre típica

Conocida también como incertidumbre estándar y es la incertidumbre asociada a una medición expresada en forma de desviación típica o estándar (GUM, 2008).

2.2.15 Incertidumbre típica combinada

Aquella incertidumbre típica proveniente de la combinación de valores de varias cantidades relacionadas al resultado de una medición y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos mismos que pueden ser desviaciones típicas, varianzas o covarianzas (Eurolab, 2006).

2.2.16 Incertidumbre Expandida

La incertidumbre expandida proporciona un intervalo de confianza donde se asume que se encuentra el valor verdadero que puede atribuirse al mensurando de acuerdo a una determinada probabilidad y se la obtiene al multiplicar la incertidumbre típica combinada por un factor de cobertura, mismo que depende de la probabilidad o nivel de confianza con el que queremos que se encuentre el valor verdadero dentro del intervalo (Maroto Sánchez, 2002). “Un factor de cobertura k típico toma valores entre 2 y 3” (GUM, 2008, pag. 6).

$$U_{(c)} = k \cdot u_{(c)} \quad (6)$$

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección del método de Referencia

La metodología que usa el laboratorio de análisis y evaluación ambiental AQLAB para sus ensayos está basada en los lineamientos establecidos en la norma internacional actualizada *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition* al ser una fuente válida de metodología precisa y comprobada para el análisis de aguas.

Método 5540 C. Tensoactivos aniónicos como MBAS

Es un método colorimétrico, que se basa en la transferencia del colorante catiónico azul de metileno de una fase acuosa a una fase orgánica por la presencia de sustancias activas al azul de metileno (MBAS). La intensidad del color azul en la fase orgánica es la medida de MBAS determinada por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 652 nm (Baird et al., 2017).

3.2 Localización geográfica de la investigación.

El desarrollo experimental para la validación del método de determinación de tensoactivos en muestras de agua por espectrofotometría UV-VIS se llevará a cabo dentro de las instalaciones del Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental AQLAB, mismo que se encuentra situado en el Puerto Francisco de Orellana también conocida como El Coca,

específicamente en las calles Fray Gregorio de Almunia y Juan Huncite, Barrio Con Hogar, de la Provincia de Orellana.



Figura 1. Mapa de ubicación del Laboratorio AQLAB.

Fuente: Google Maps, (2021).

3.3 Condiciones ambientales

Las condiciones de operación recomendadas dentro del laboratorio son:

- Temperatura $\leq 35^{\circ}\text{C}$
- Humedad Relativa $\leq 85\% \text{ HR}$

3.4 Selección de los parámetros de validación

Tabla 1. *Objetivos de Validación para Tensoactivos.*

Parámetro	Objetivo
Selectividad/Especificidad	Es un método colorimétrico que se basa en la transferencia del colorante catiónico azul de metileno de una fase acuosa a una fase orgánica por la presencia de sustancias activas al azul de metileno (MBAS) (Baird et al., 2017).
Linealidad/Función respuesta	Curva de calibración y regresión lineal con un $R^2 \geq 0.995$
Límite de Detección	$LOD \leq 0,1mg/l$
Límite de Cuantificación	$LOC \leq 0,2 mg/$
Precisión: (repetibilidad y/o reproducibilidad)	<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de variación de repetibilidad $CV_r = \leq 30\%$ • Coeficiente de reproducibilidad $CVR = \leq 30\%$
Veracidad	Porcentaje de recuperación de al menos el 80 al 120 % en todos los niveles.
Incertidumbre	$U \leq 30\%$ del rango más bajo ($K=2$)
Intervalo de trabajo	0,1 a 2 mg/l

3.5 Diseño Experimental

Tabla 2. *Esquema del Diseño Experimental.*

Límite de detección	Se usará 5 blancos en condiciones de repetibilidad.
----------------------------	---

Límite de cuantificación	Se usará 5 blancos en condiciones de repetibilidad.
Linealidad	Al menos 5 curvas de calibración.
Repetibilidad	3 niveles de concentración : <ul style="list-style-type: none"> • Bajo • Medio • Alto Mínimo 5 repeticiones por muestra
Reproducibilidad	3 niveles de concentración : <ul style="list-style-type: none"> • Bajo • Medio • Alto 5 repeticiones por muestra
Veracidad	% de Recuperación de muestras adicionadas (sesgo)
Tratamiento estadístico	<ul style="list-style-type: none"> • FUNCIÓN RESPUESTA • ANOVA • T STUDENT

3.6 Parte Experimental

3.6.1 Materiales

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro UV-vis. EFQ/014 a 652 nm.
- Embudos de separación de 500 ml. MA/035
- Pipeta automática 1ml MV/024

- Probeta 25 ml
- Probeta 50 ml. MV/030
- Probeta 250 ml. MV/033.
- Balón aforado de 50 ml. MV/004
- Balón aforado de 100 ml MV/005
- Balón aforado de 250ml. MV/006
- Balón aforado 1000ml. MV/008
- Bureta 25ml. MV/026
- Balanza analítica. EFQ/006
- Vasos de precipitación.
- Embudos vástago de vidrio
- Papel filtro

Reactivos

- **Estándar madre de MBAS 1000mg/l**
- **Estándar de trabajo MBAS 10 mg/L:** Tomar 1 ml del estándar madre (1000 mg/L) y aforar en un balón de 100 ml.
- **Solución madre de Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 14% v/v:** Colocar aproximadamente 100 ml de agua destilada en un balón aforado de 250 ml y enfriar por 5 minutos aproximadamente en la nevera. Tomar 36,5 ml de H_2SO_4 concentrado al 96% v/v y añadir en el balón de 250 ml con agua previamente enfriada y completar el aforo con agua destilada.
- **Solución de Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 0,7% v/v:** Diluir 50 ml de la solución madre de Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 14% v/v en un balón aforado de 1000 ml.
- **Hidróxido de sodio NaOH 1N:** Pesar 10g de NaOH y aforar en un balón de 250 ml con agua destilada.
- **Reactivo Azul de metileno:** Disolver 0,1 g de azul de metileno en un balón aforado de 100 ml con agua destilada. Transferir 30 ml a un matraz de 1000 ml. Agregar 500 ml de agua destilada, 50 ml de H_2SO_4 al 14% v/v y 50 g de fosfato de

Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado $\text{NH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Agitar hasta que se disuelva por completo y aforar a 1000 ml.

- **Solución de lavado de fosfato:** Disolver 50 g de $\text{NH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 500ml de agua destilada en un balón aforado de 1000 ml. Anadir 50 ml de H_2SO_4 al 14%, completar el aforo con agua destilada. Ajustar el pH a 1.8 de ser necesario.
- **Indicador de fenolftaleína al 0,05% m/v:** Pesar 0,5 g de fenolftaleína, añadir 50 ml de etanol al 95% v/v y diluir con agua destilada en un balón de 100ml.
- **Cloroformo CHCl_3**
- **Peróxido de Hidrógeno al 30% v/v**
- **Agua destilada tipo I**

3.7 Técnicas de recolección de datos

Análisis de laboratorio.

3.8 Metodología

3.8.1 Preparación de las muestras

Previo al análisis de tensoactivos las muestras deben ser acondicionadas a temperatura ambiente, especialmente si se encuentran en estado de refrigeración.

El espectrofotómetro UV-VIS será operado según el procedimiento ITU-AQLAB-01 y será encendido con media hora de anticipación previo al ensayo.

3.8.2 Procedimiento experimental del ensayo

- Colocar 250 ml de la muestra, estándar y blanco en una probeta limpia de 250 ml.
- Añadir la muestra en el embudo de separación limpio de 500 ml. (Ayudarse de un soporte de apoyo).
- Neutralizar la muestra: Añadir 3 gotas de fenolftaleína y añadir gota a gota la solución de NaOH hasta producir un color rosa. Añadir gota a gota suficiente solución diluida de H_2SO_4 0.7% v/v, para que el color rosa desaparezca.
- Añadir tres gotas de H_2O_2 al 30% v/v, para evitar la decoloración del azul de metileno por sulfuros y agitar suavemente.
- Añadir 25 ml de solución azul de metileno en el embudo y agitar suavemente.
- Añadir 50 ml de solución de lavado de fosfato, tapan el embudo y agitar suavemente por 30 s.
- Añadir 50 ml de cloroformo, tapan el embudo y agitar suavemente durante 30 s, eliminar la presión del embudo abriendo la llave con dirección hacia arriba y dejar reposar por 1 minuto.
- Drenar la fase clorofórmica a través de un embudo vástago de vidrio con papel filtro y recolectar en balones de 50 ml.
- Medir en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 652 nm con el programa previamente establecido y frente a un blanco de cloroformo.
- Los resultados se presentarán en unidades de mg/L de MBAS

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Detección de la Necesidad Analítica

La necesidad analítica para validar un método de ensayo viene dada por la demanda analítica del laboratorio, las normativas nacionales que se deben cumplir y las ordenanzas municipales de cada sector.

Para la validación del método se tomó en cuenta el Anexo I del Libro IV del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, AM 097., donde se establecen los criterios de calidad del agua con relación al parámetro tensoactivo y la Ordenanza de Control de Calidad del Agua de la Municipalidad de Orellana.

4.2 Puesta a punto del equipo

4.2.1 Absorbancia máxima

El libro *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition*, establece una longitud de onda a 652 nm. Para la comprobación de la absorbancia máxima para las sustancias activas al azul de metileno establecida en el método de referencia, se realizó un barrido espectral desde 600 nm hasta 700 nm en un intervalo de 1nm de un estándar de 0,2 mg/L.

La absorbancia máxima obtenida fue a una longitud de onda de 652,3 nm como se observa en el Anexo C, razón por la cual se trabajó con la longitud de onda establecida en el método de referencia.

4.2.2 Rango lineal

Se realizaron curvas de calibración para determinar hasta qué punto el método es lineal con estándares desde 0,1 a 3 mg/L, ver Anexo D. El rango lineal se lo obtuvo a partir de 0,1 mg/L hasta 1 mg/L, valores que fueron utilizados en las curvas de calibración posteriores.

4.3 Curva de calibración

Se realizaron cinco curvas de calibración en 5 días utilizando el material de referencia MBAS de 1000 mg/L. Los patrones seleccionados fueron de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 y 1,0 mg/L. Se llevó a cabo todo el procedimiento respectivo para la extracción de sustancias activas al azul de metileno y se obtuvieron los resultados detallados en la tabla 3 .

El cálculo de cada patrón de calibración se realizó a partir de la siguiente ecuación:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (7)$$

Donde:

C_1 : Concentración del Material de Referencia MBAS (1000 mg/L)

V_1 : Volumen a tomar del Material de Referencia (L).

C₂: Concentración deseada (mg/L)

V₂: volumen de aforo deseado (L).

Tabla 3. Curvas de calibración.

Concentración		Señal (Abs)				
Estándar	mg/l	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Blanco	0,000	0,004	-0,005	0,009	0,001	-0,001
STD 1	0,100	0,158	0,113	0,119	0,139	0,116
STD 2	0,200	0,277	0,222	0,263	0,27	0,257
STD 3	0,300	0,434	0,393	0,373	0,445	0,402
STD 4	0,500	0,734	0,687	0,664	0,689	0,626
STD 5	1,000	1,417	1,286	1,402	1,429	1,307

En las siguientes figuras se muestran las curvas de calibración obtenidas durante 5 días:

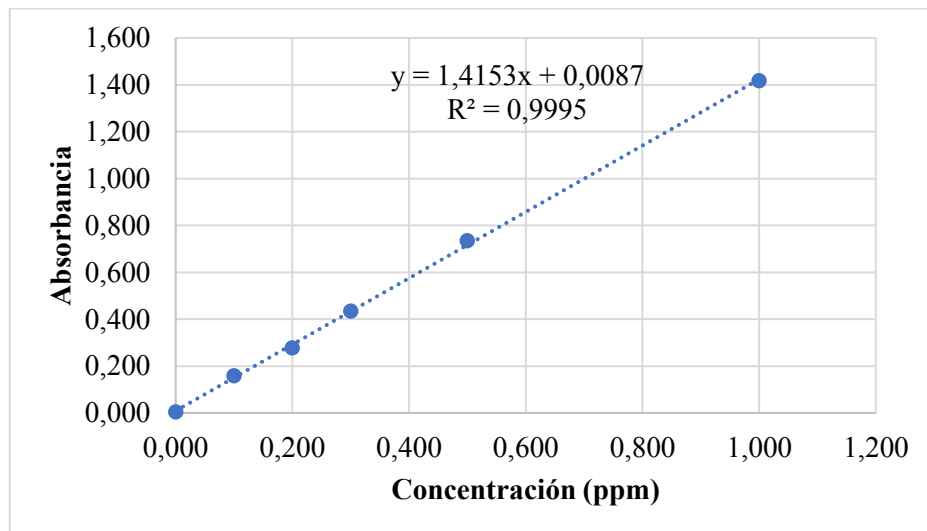


Figura 2. Curva de calibración en el primer día.

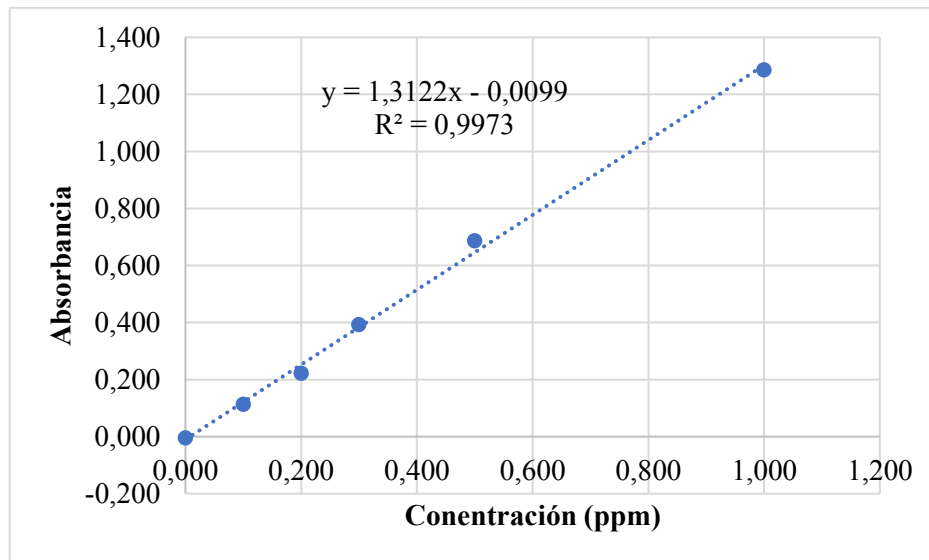


Figura 3. Curva de calibración en el segundo día.

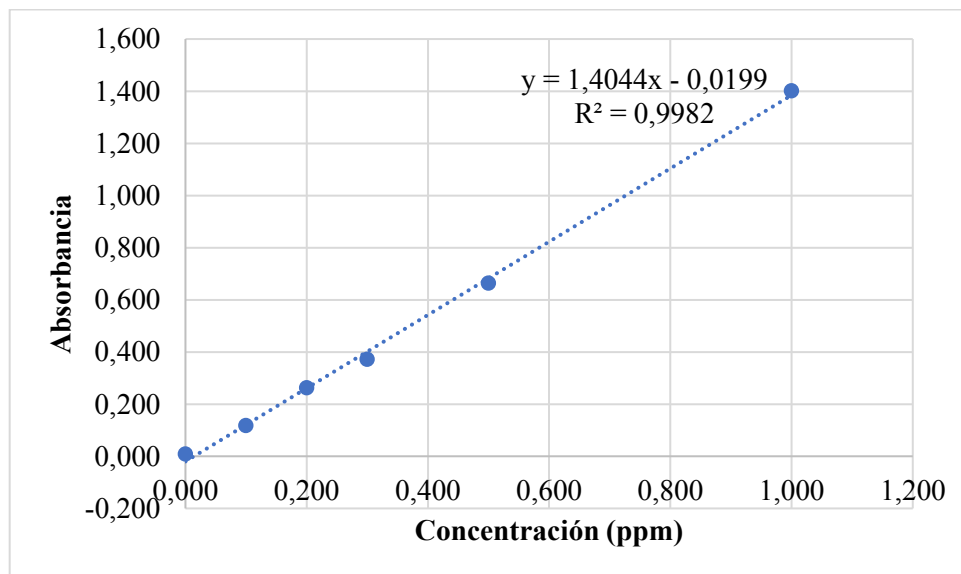


Figura 4. Curva de calibración en el tercer día.

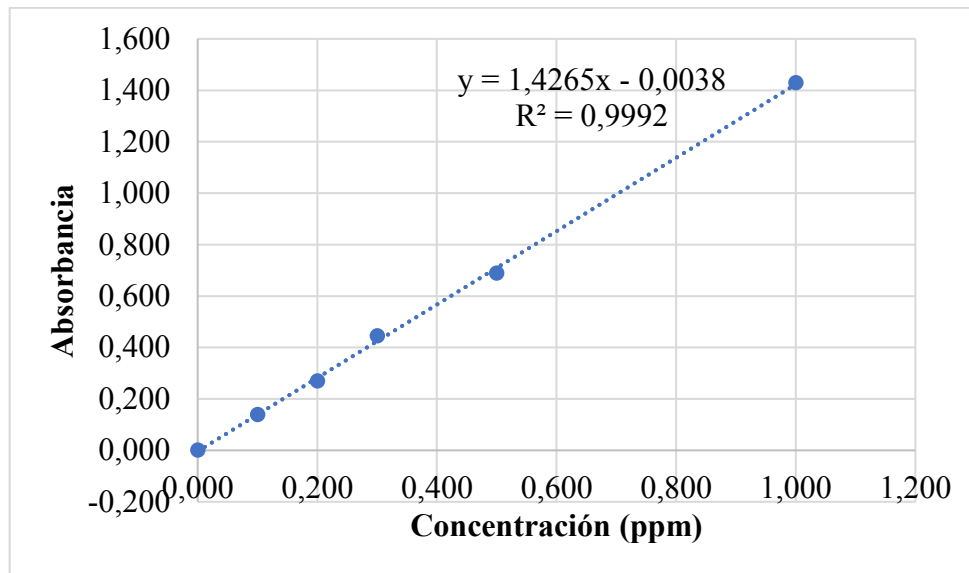


Figura 5. Curva de calibración en el cuarto día.

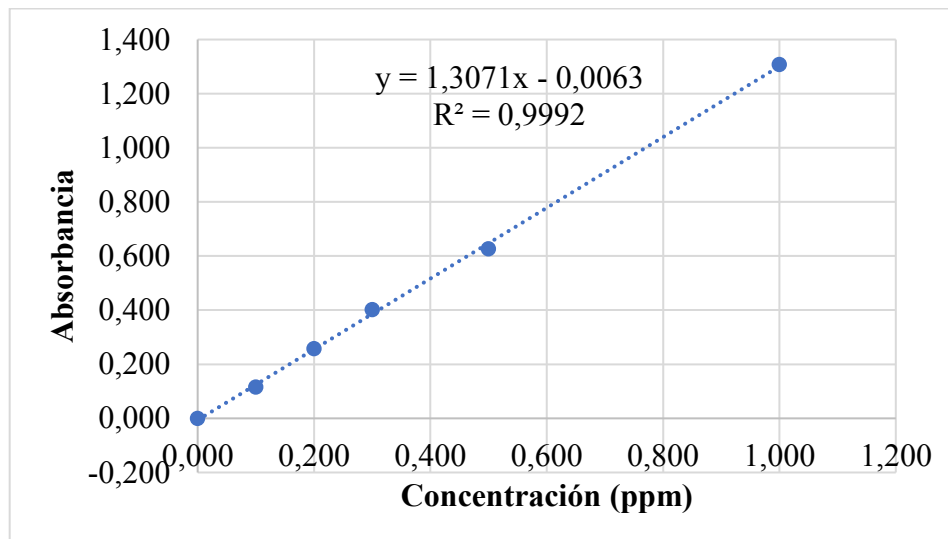


Figura 6. Curva de calibración en el quinto día.

4.4 Determinación de la linealidad de la función respuesta del método

La linealidad del método se determinó aplicando el Método de Mínimos Cuadrados obteniendo los resultados detallados en la tabla 4. La herramienta estadística utilizada fue el programa Excel a través de la función: ESTIMACIÓ.LINEAL.

Tabla 4. *Parámetros estadísticos de la función respuesta.*

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
b(m)	1,415	1,312	1,404	1,426	1,307
a	0,009	-0,010	-0,020	-0,004	-0,006
S_b	0,016	0,034	0,030	0,020	0,018
S_a	0,008	0,016	0,014	0,010	0,009
r²	0,999	0,997	0,998	0,999	0,999
S_{yx}	0,013	0,028	0,024	0,016	0,015
G.L. (n-2)	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
t	2,776	2,776	2,776	2,776	2,776
a_{min.}	-0,013	-0,055	-0,059	-0,030	-0,030
a_{máx.}	0,030	0,036	0,020	0,023	0,018
b_{min.}	1,371	1,218	1,322	1,371	1,257
b_{máx.}	1,459	1,407	1,487	1,482	1,357
r	1,000	0,999	0,999	0,999	1,000

Donde:

b(m): pendiente

a: intercepto

S_b: desviación estándar de la pendiente

S_a: desviación estándar del intercepto

r^2 : coeficiente de determinación

S_{yx} : error tipo de la estimación “y”

G.L.: Grados de libertad

t: valor t con una probabilidad de cometer un error de 0,05, $\alpha= 95\%$ y 4 grados de libertad obtenido de la tabla t student Anexo M (Miller & Miller, 2002).

$a_{\text{mín.}}$: intercepto mínimo

$a_{\text{máx.}}$: intercepto máximo

$b_{\text{mín.}}$:pendiente mínima

$b_{\text{máx.}}$: pendiente máxima

r: coeficiente de correlación lineal

Una vez estimados los parámetros estadísticos de la función respuesta, se determinó los interceptos y pendientes máximas y mínimas para el respectivo control de las curvas de calibración durante y después de todo el proceso de validación.

Tabla 5. *Interceptos y pendientes para el control de curvas de calibración.*

Límites	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Para Control
$a_{\text{mín.}}$	-0,0126	-0,0555	-0,0594	-0,0305	-0,0304	-0,0594 $a_{\text{mín.}}$
$a_{\text{máx.}}$	0,0299	0,0356	0,0196	0,0230	0,0178	0,0356 $a_{\text{máx.}}$
$b_{\text{mín.}}$	1,3712	1,2176	1,3223	1,3710	1,2570	1,2176 $b_{\text{mín}}$
$b_{\text{máx.}}$	1,4594	1,4068	1,4865	1,4820	1,3572	1,4865 $b_{\text{máx.}}$

A partir de la figura 2 hasta la figura 6 se puede observar que el método cumple con la linealidad requerida, así lo demuestran sus coeficientes de correlación en la tabla 4, donde

se observan valores de 0,999 y 1,000 indicando una correlación positiva perfecta por lo tanto la concentración del analito puede ser determinada por interpolación.

4.5 Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

Para la determinación del LOD y el LOQ se midieron 10 veces los blancos obteniendo los resultados de la tabla 6.

Tabla 6. Mediciones del blanco.

Repeticiones	Resultado mg/L
1	0,010
2	0,000
3	0,002
4	0,002
5	0,021
6	0,008
7	0,021
8	0,013
9	0,008
10	0,010
Media (\bar{X})	0,009
Desviación estándar (S)	0,008

4.5.1 Cálculo de la desviación estándar (S₀)

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n}} \quad (8)$$

$$S_0 = 0,008 \text{ mg/L}$$

4.5.2 Cálculo de la desviación estándar corregida S'_0

Se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

$$S'_0 = 0,008 \text{ mg/L}$$

4.5.3 Límite de Detección LOD

Se calculó utilizando la ecuación (2):

$$LOD = (0,009 + 3 * 0,008) \text{ mg/L}$$

$$LOD = 0,032 \text{ mg/L}$$

4.5.4 Límite de Cuantificación LOQ

Se calculó utilizando la ecuación (3):

$$LOQ = (0,009 + 10 * 0,008) \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 0,085 \text{ mg/L}$$

4.6 Datos experimentales

Se obtuvieron un total de 80 datos en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad como se muestra en la tabla 7, mismos que fueron utilizados posteriormente en los respectivos cálculos estadísticos de validación. El equipo utilizado fue el Espectrofotómetro UV-visible Ultrospec 3000. El método se evaluó para las siguientes matrices: aguas de consumo humano, aguas naturales y aguas residuales o de descarga.

Tabla 7. Datos experimentales para validación de tensoactivos aniónicos en aguas.

Muestras	STD 0,1	ACH 0,010	ACH + 0,2	STD 0,5	AN 0,130	AN+0, 5	AR 7,303	AR+2, 0
Concentración (mg/L)	0,100	0,010	0,200	0,500	0,130	0,660	7,303	8,853
Analista 1	0,093	0,008	0,215	0,508	0,138	0,624	7,347	9,195
	0,102	0,005	0,212	0,516	0,124	0,659	7,173	9,195
	0,090	0,006	0,203	0,524	0,129	0,639	7,383	9,123
	0,089	0,006	0,204	0,501	0,134	0,669	7,310	8,651
	0,090	0,007	0,198	0,471	0,129	0,682	7,231	8,593
Analista 2	0,090	0,007	0,196	0,489	0,127	0,664	7,310	8,746
	0,097	0,006	0,206	0,501	0,136	0,667	7,499	8,709
	0,087	0,005	0,193	0,509	0,113	0,640	7,195	8,717
	0,110	0,005	0,181	0,498	0,107	0,693	7,267	8,949
	0,112	0,005	0,208	0,480	0,121	0,696	7,310	8,651
Dilución	1	1	1	1	1	1	10	10

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

4.7 Análisis de precisión

4.7.1 Análisis de repetibilidad

Tabla 8. *Repetibilidad para analista 1.*

Muestras	ACH	SDT	AN	ACH	STD	AN	AR	AR
		0,1		+	0,5	+		+
		mg/l		0,2mg/l	mg/l	0,5mg/l		2mg/l
\bar{X}	0,006	0,093	0,131	0,207	0,504	0,655	7,289	8,952
S	0,001	0,005	0,006	0,007	0,021	0,023	0,086	0,303
CV (%)	16,96	5,67	4,32	3,30	4,09	3,56	1,18	3,38

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

Tabla 9. *Repetibilidad para analista 2.*

Muestras	ACH	SDT	AN	ACH	STD	AN	AR	AR
		0,1		+	0,5	+		+
		mg/l		0,2mg/l	mg/l	0,5mg/l		2mg/l
\bar{X}	0,006	0,099	0,121	0,197	0,495	0,672	7,316	8,754
S	0,001	0,011	0,011	0,011	0,011	0,023	0,113	0,114
CV(%)	14,35	11,30	9,32	5,54	2,24	3,46	1,54	1,30

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

El porcentaje del coeficiente de variación del analista 1 y 2 es < 30%, es decir se aceptan los datos de repetibilidad de validación al cumplir con el objetivo planteado como se muestra en las tablas 8 y 9.

4.7.2 Análisis de reproducibilidad

Tabla 10. Análisis estadístico *T student* para Analista 1 y Analista 2.

Muestras	ACH	SDT	AN	ACH	STD	AN	AR	AR
		0,1		+ 0,2	0,5	+ 0,5	+ 2	
		mg/l		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	
\bar{X}_1	0,006	0,093	0,131	0,207	0,504	0,655	8,952	7,289
\bar{X}_2	0,006	0,099	0,121	0,197	0,495	0,672	8,754	7,316
s^2_1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,092	0,007
s^2_2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,013	0,013
$t_{teórico}$	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306
$t_{calculado}$	0,956	1,151	1,749	1,690	0,845	1,163	1,364	0,435
Resultado	PASA	PASA	PASA	PASA	PASA	PASA	PASA	PASA

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

Los datos obtenidos en la tabla 10 son aceptados al cumplir la siguiente condición $t_{calculado} < t_{teórico}$, es decir, no hay diferencia significativa entre los datos tomados por los dos analistas.

4.7.3 Prueba de Fisher

Se analizaron los datos obtenidos de forma experimental mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, donde se planteó como hipótesis nula que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos entre grupos (analistas) y los resultados obtenidos dentro de los grupos, es decir datos obtenidos en condiciones de repetibilidad. Los resultados obtenidos al aplicar la prueba de significación estadística de Fisher se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Prueba de Fisher para todas las muestras y estándares analizados.

Muestras	F calculado	F crítico	Diagnóstico
STD 0,1 mg/l	1,326	5,318	No hay diferencia significativa
ACH	0,914	5,318	No hay diferencia significativa
ACH + 0,2mg/l	2,857	5,318	No hay diferencia significativa
STD 0,5 mg/l	0,714	5,318	No hay diferencia significativa
AN	3,058	5,318	No hay diferencia significativa
AN+ 0,5 mg/l	1,352	5,318	No hay diferencia significativa
AR	0,189	5,318	No hay diferencia significativa
AR+2,00 mg/l	1,860	5,318	No hay diferencia significativa

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

Se acepta la hipótesis nula: $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$; los datos de la validación son aceptados al no existir diferencias significativas entre grupos ni dentro de grupos.

Una vez aceptados los datos para la validación se procedió a calcular la desviación estándar de repetibilidad (S_r), la precisión intermedia (S_L^2) y la desviación estándar de reproducibilidad (S_R), así como también sus coeficientes de variación de repetibilidad (CV_r) y reproducibilidad (CV_R) de cada matriz evaluada como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Análisis de precisión.

Muestras	S_r	S_L^2	S_R	CV_r	CV_R
	mg/L	mg/L	mg/L	%	%
STD 0,1 mg/l	0,0088	0,00000500	0,0090	9,12	9,41
ACH	0,0010	-0,00000002	0,0010	15,85	15,85
ACH+ 0,2mg/l	0,0091	0,00003066	0,0106	4,51	5,28
STD 0,5 mg/l	0,0166	-0,00001568	0,0166	3,31	3,31
AN	0,0089	0,00003270	0,0106	7,09	8,42

AN + 0,5 mg/l	0,0233	0,00003808	0,0241	3,51	3,63
AR	0,1001	-0,00162615	0,1001	1,37	1,37
AR+2,00 mg/l	0,2286	0,00898559	0,2475	2,58	2,80

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

De acuerdo con los resultados de la tabla 12 se aceptan los resultados de validación al ser el $S_r < S_R$ y sus coeficientes de variación de repetibilidad (CV_r) y reproducibilidad (CV_R) menores al 30% como se estableció en los objetivos de validación.

4.8 Análisis de veracidad

Para el análisis de veracidad y determinación del sesgo se evaluó el porcentaje de recuperación de 3 muestras fortificadas que comprenden el intervalo de trabajo con las siguientes matrices: agua de consumo, agua natural y agua residual. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. *Determinación del Sesgo (Porcentaje de Recuperación).*

Matriz	ACH	A.NATURAL	A.RESIDUAL
	+0,2 mg/l	+0,5 mg/l	+ 2mg/l
R(%)	107,48	98,66	96,24
	107,48	108,66	104,94
	102,40	103,59	90,81
	102,77	108,52	70,87
	99,50	112,14	71,96
	98,42	108,95	75,58
	103,85	107,65	64,35
	97,69	106,78	79,93

	91,53	118,67	87,91
	105,30	116,49	70,87
\bar{X} (%)	101,64	109,01	81,35

Nota: ACH=Agua de consumo humano, R(%)=Porcentaje de recuperación, \bar{X} (%)= media.

Se obtuvieron medias de 101,64%, 109,01% y 81,35% correspondientes a las muestras fortificadas de agua de consumo, agua natural y agua residual respectivamente y, de acuerdo con el objetivo planteado para este parámetro el porcentaje de recuperación debe cumplir con al menos una recuperación del 80% al 120% en todos los niveles, condición que cumple.

4.9 Determinación de la incertidumbre de medida

Con la finalidad de simplificar el proceso para establecer todas la contribuciones a la incertidumbre se realizó un diagrama de Ishikawa como se muestra en la figura 7.

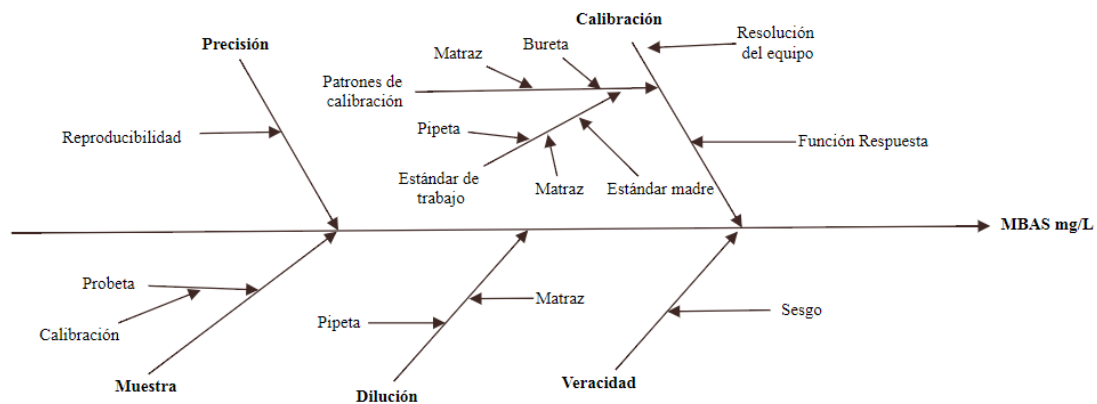


Figura 7. Diagrama de Ishikawa para el método de tensoactivos.

- **Incertidumbre del Material de Referencia Certificado MBAS (1000 mg/L)**

$$u_{MRC} = \frac{U}{K} \quad (10)$$

Donde:

U= Incertidumbre expandida descrita en el certificado, anexo B.

K= Factor de cobertura con un nivel de confianza de 95%.

$$u_{MRC} = \frac{0,024}{2}$$

$$u_{MRC} = 0,012 \text{ mg/L}$$

$$u_{relativa_{MRC}} = \frac{0,012 \text{ mg/L}}{1000 \text{ mg/L}}$$

$$u_{relativa_{MRC}} = 0,000012$$

- **Incertidumbre del material volumétrico**

La incertidumbre del material volumétrico se determinó teniendo en cuenta el coeficiente de expansión térmica del material como se muestra en el siguiente ejemplo de cálculo:

$$u_{vmatriz\ 100ml} = \sqrt{(u_{calibración})^2 + (u_{repetibilidad})^2 + (u_{temperatura})^2} \quad (11)$$

$$u_{cal} = \frac{0,008 \text{ ml}}{2}$$

$$u_{cal} = 0,004 \text{ ml}$$

La incertidumbre de repetibilidad es la desviación estándar obtenida al realizar 10 mediciones de verificación del material volumétrico:

$$u_{repe} = 0,0231 \text{ ml}$$

Incertidumbre debida a la diferencia entre la T de calibración:

$$u_{temp} = \frac{Dif T * Vf * \alpha}{\sqrt{3}}$$

$$u_{temp} = \frac{10 * 100 \text{ ml} * 0,00025}{\sqrt{3}}$$

$$u_{temp} = 0,072 \text{ ml}$$

Incertidumbre combinada para el matraz aforado de 100 ml a través de la ecuación (11):

$$u_{vmatriz 100ml} = \sqrt{(0,004 \text{ ml})^2 + (0,0231 \text{ ml})^2 + (0,072 \text{ ml})^2}$$

$$u_{vmatriz 100ml} = 0,146 \text{ ml}$$

Incertidumbre relativa:

$$u_{relativa} = \frac{u_v}{V}$$

$$u_{relativa} = \frac{0,146 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$$

$$u_{relativa} = 0,001$$

En la tabla 14 se muestra en resumen las incertidumbres del material volumétrico.

Tabla 14. Incertidumbres relativas del material volumétrico utilizado.

Material	Volumen(ml)	u (ml)	u relativa
Pipeta automática	1	0,001	0,001
Pipeta automática	10	0,014	0,001
Bureta graduada	25	0,084	0,003
Matraz aforado	100	0,146	0,001
Matraz aforado	250	0,362	0,001
Probeta	250	0,693	0,002

- **Incertidumbre del estándar de trabajo**

$$u_{std} = C_{std} * \sqrt{\left(\frac{u_{std \text{ madre}}}{C_{std \text{ madre}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{v \text{ pipeta}}}{V_{\text{pipeta}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{matraz}}}{V_{\text{matraz}}}\right)^2} \quad (12)$$

$$u_{std} = 10 \text{ mg/L} * \sqrt{\left(\frac{0,012 \text{ mg/L}}{1000 \text{ mg/L}}\right)^2 + \left(\frac{0,001 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0,146 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}\right)^2}$$

$$u_{std} = 0,018 \text{ mg/L}$$

$$u_{relativa\ std} = 0,0018$$

- **Incertidumbre de los patrones de calibración**

$$u_{relativa_{p1}} = \sqrt{(ur_{std\ de\ trabajo})^2 + (ur_{bureta})^2 + (ur_{matraz})^2} \quad (13)$$

Ejemplo de cálculo para el estándar de 0,1 mg/L:

$$u_{relativa_{p1}} = \sqrt{(0,0018)^2 + (0,003)^2 + (0,001)^2}$$

$$u_{relativa_{p1}} = 0,004$$

En la tabla 15 se muestran las incertidumbres relativas para los patrones de calibración.

Tabla 15. Incertidumbre relativa para cada patrón de calibración.

STD	[] mg/L	bureta (ml)	matraz (ml)	ur (Vb)	ur (Vm)	u relativa	u nivel mg/L
1	0,100	2,5	250	0,003	0,001	0,004	0,041
2	0,200	5	250	0,003	0,001	0,004	0,020
3	0,300	7,5	250	0,003	0,001	0,004	0,014
4	0,500	12,5	250	0,003	0,001	0,004	0,008
5	1,000	25	250	0,003	0,001	0,004	0,004

Nota: Vb y Vm = incertidumbre relativa de la bureta y del matraz aforado.

- **Estimación de la incertidumbre relativa para el volumen de muestra tomado**

Tabla 16. *Incertidumbre relativa para el volumen de muestra.*

N°	Volumen (ml)	Probeta (ml)	u relativa (Vp)	u relativa (Vmuestra)
1	250	250	0,002772032	0,002772032

- **Estimación de la incertidumbre relativa para la dilución de la muestra**

Tabla 17. *Incertidumbre para dilución.*

N°	Volumen (ml)	Pipeta (ml)	Matraz (ml)	u(Vp)	u(Vm)	u (dil)
1	25	10	250	0,00142	0,00144	0,00202

- **Incertidumbre de la Función Respuesta**

La incertidumbre de la concentración a partir de la función respuesta se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$u_{x_0} = \frac{S_{yx}}{b} * \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (14)$$

Donde:

u_{x_0} = Incertidumbre de la concentración

S_{yx} = Error tipo de la estimación y.

b= pendiente

p= número de mediciones para determinar C_0 .

n= número de mediciones para la calibración.

C_0 = concentración determinada de tensoactivos aniónicos.

\bar{C} = valor medio de los diferentes patrones de calibración (n número de mediciones).

S_{xx} = Suma de residuales

Los valores calculados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Incertidumbre de la concentración por la Función Respuesta.

Muestras	Nivel mg/L	u_{x0} / C_0 (uFR)
STD 0,1	0,096	0,066
ACH	0,006	0,067
ACH+0,2	0,202	0,065
STD 0,5	0,500	0,065
AN	0,126	0,066
AN+ 0,5	0,663	0,066
AR	7,303	0,069
AR + 2,00	8,853	0,069

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

- **Incertidumbre de resolución del equipo**

$$u_{res} = \frac{Res}{\sqrt{12}} \quad (15)$$

$$u_{res} = 0,0003$$

- **Incertidumbre de calibración**

$$u_{cal} = \sqrt{u_{res}^2 + u_{FR}^2 + u_p^2} \quad (16)$$

Ejemplo de cálculo para el estándar de 0,1 mg/L:

$$u_{cal} = \sqrt{0,0003^2 + 0,0661^2 + 0,0041^2}$$

$$u_{cal} = 0,0662$$

Tabla 19. Incertidumbres de calibración para cada nivel de concentración.

Parámetro	ACH	STD 0,1 mg/l	AN	ACH+0,2 mg/l	STD 0,5 mg/l	AN+ 0,5 mg/l	AR	AR + 2 mg/l
[] mg/L	0,01	0,10	0,13	0,20	0,50	0,66	7,30	8,85
u _{cal}	0,0669	0,0662	0,0660	0,0656	0,0651	0,0656	0,0689	0,0689

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

- **Incertidumbre relativa de veracidad**

$$u_{sesgo} = \sqrt{u_{Rec}^2 + u_{MRC}^2} \quad (17)$$

Ejemplo de cálculo para la muestra fortificada de agua residual:

$$u_{sesgo} = \sqrt{0,0005^2 + 0,000012^2}$$
$$u_{sesgo} = 0,0005$$

- **Incertidumbre combinada del método**

$$u_{método} = C * \sqrt{u_{cal}^2 + u_{precisión}^2 + u_{veracidad}^2 + u_{muestra}^2 + u_{dilución}^2} \quad (18)$$

Ejemplo de cálculo para la muestra fortificada de agua residual:

$$u_{método} = 8,85 \text{ mg/L} * \sqrt{0,0689^2 + 0,0279^2 + 0,0005^2 + 0,0028^2 + 0,0020^2}$$

$$u_{método} = 0,659 \text{ mg/L}$$

- **Incertidumbre expandida**

$$U = u_{combinada} * k \quad (19)$$

$$U = 0,659 * 2$$

$$U = 1,32 \text{ mg/L}$$

$$\%U = \frac{1,32 \text{ mg/L}}{8,85 \text{ mg/L}} * 100$$

$$\%U = 15$$

Tabla 20. Incertidumbre expandida del método para cada nivel.

Parámetro	ACH	SDT 0,1 mg/l	AN	ACH+0,2 mg/l	STD 0,5 mg/l	AN+ 0,5 mg/l	AR	AR+ 2 mg/l
□ mg/L	0,01	0,1	0,13	0,200	0,500	0,660	7,303	8,853
u	0,001	0,011	0,014	0,017	0,037	0,050	0,513	0,659
combinada								
u*k	0,002	0,022	0,027	0,034	0,073	0,099	1,027	1,317
u	23	22	21	17	15	15	14	15
expandida%								

Nota: STD= estándar; ACH=Agua de Consumo Humano; AN=Agua Natural; AR=Agua Residual.

Para la declaración de la Incertidumbre se toma el valor más alto dentro del rango de trabajo, en este caso el método tiene una incertidumbre del 22%, valor aceptado por el objetivo de validación propuesto con una incertidumbre $\leq 30\%$.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se validó el método de ensayo para determinación de detergentes en muestras de agua por espectrofotometría UV-Vis en el laboratorio AqLab de la ciudad del Coca, mismo que fue aprobado por la Dirección Técnica al cumplir con los objetivos de validación e ingresados al Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio.
- Se determinó los límites de detección y cuantificación del método con valores de 0,032 mg/l y 0,08 mg/l respectivamente.
- Se estableció los criterios de control de calidad del método donde el criterio de aceptación y rechazo del estándar de control de 0,5 mg/l es de $\pm 0,05$ mg/l, para duplicados el 15%, mientras que la recuperación en todo el rango es de 81% a 109%.
- Los criterios de aceptación y rechazo de las curvas de calibración fueron: Intercepto máx.: 0,0356 y mín.: -0,0594. Pendiente máx.: 1,4865 y mín.: 1,2176.
- Se elaboró un manual de procedimiento para la determinación de detergentes en muestras de agua por espectrofotometría UV-VIS, mismo que contiene los materiales y reactivos necesarios y la descripción del procedimiento de ensayo a seguir, así como también los criterios de aceptación y rechazo del método.
- Las características de desempeño para el método de determinación de tensoactivos en muestras de agua se fijaron de acuerdo con la norma NTE INEN-ISO 17025:2017 y la Guía Eurachem donde se señalan las características de desempeño mínimas que se debe tomar en cuenta a la hora de realizar una validación.

5.2 RECOMENDACIONES

- Mantener en refrigeración las muestras a una temperatura adecuada para evitar la degradación del tensoactivo por acción microbiana y analizar lo antes posible, se recomienda como máximo una conservación no más allá de las 48 horas.
- Usar el equipo de protección adecuado ya que se trabaja con reactivos peligrosos para la salud como el cloroformo, además, es importante el uso de la sorbona para evitar posibles inhalaciones durante el ensayo.
- Usar material volumétrico de alta calidad, especialmente al momento de preparar los patrones de calibración o patrones de control de calidad para el método en mención con la finalidad de garantizar la fiabilidad de los resultados.
- Se recomienda al Laboratorio Aqlab dar mantenimiento preventivo a los equipos, ya que de estos dependen los resultados obtenidos.
- Lavar el material volumétrico con un detergente no aniónico ya que podrían quedar residuos que posteriormente interferirán con los resultados reales del ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arriola, L. (2012). *Validación de Métodos Analíticos, Físicoquímicos y Microbiológicos*.
https://medicamentos.mspas.gob.gt/Archivos/Descargas/Curso_Validación_de_Métodos_Analíticos_con_formulas.pdf
- Baird, R. B., Eaton, A. D., & Rice, E. W. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
<http://dspace.uniten.edu.my/jspui/handle/123456789/14241>
- Cendejas Bueno, E. (2018). *Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antifúngicos triazólicos en muestras preclínicas y clínicas* [UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID].
<https://eprints.ucm.es/id/eprint/46126/1/T38025.pdf>
- Eurachem. (2012). Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas. *Eurachem/Citac, 3rd Editio*, 133. https://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf
- Eurachem. (2016). La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. In *Eurachem. org. Retrieved*.
- Eurolab. (2006). Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results. *Measurement, 1*, 1–50.
- González, G., & Herrador, Á. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 26*(3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>
- GUM. (2008). *Evaluación de datos de medición. Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida*. 79(1), 20–50.
<https://www.cem.es/sites/default/files/gum20digital1202010.pdf>

- IDEAM. (2006). *Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales*.
http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analiticos.pdf
- ISO/IEC17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>
- Magnusson et al. (2017). Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. *Turkish Journal of Biochemistry*.
<https://doi.org/10.5505/tjb.2014.04127>
- Maroto Sánchez, A. (2002). *Incertidumbre En Métodos Analíticos De Rutina* [Universitat Rovira I Virgili].
https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8987/tesis_Alicia_Maroto.PDF?sequence=1&isAllowed=y
- Mena, B. E. (2018). *Validación de los métodos de ensayo para la determinación de sulfatos, sulfuros y fenoles en el Laboratorio Ambiental Environovalab* [Universiada Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15792/1/T-UCE-0008-CQU-017.pdf>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (Cuarta). PEARSON EDUCACIÓN. S.A.
- NTE INEN-ISO 5725-1. (2015). *Exactitud (Veracidad y Precisión) de Resultados y sus Métodos de Medición - Parte 1: Principios Generales y Definiciones (ISO 5725-1:1994, IDT)*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-iso-5725-1.pdf>
- OSA. (2017). *Organismo Salvadoreño de Acreditación*. <http://www.osa.gob.sv/wp-content/uploads/2015/09/GUIA-VALIDACIONFQ-OSA-V2-vigencia-09-10-18-1.pdf>
- SAE. (2018). *Validacion de metodos de ensayo en laboratorios clinicos*.
www.acreditacion.gob.ec

- Socarras, J., & Pretelt, M. (2020). *Validación del Método Analítico para la Determinación de Nitritos en Agua Natural y Potable, por Espectrofotometría Visible en El Laboratorio de Investigación y Calidad Ambiental del Centro de Comercio, Industria y Turismo del Sena, Regional* [Universidad de Córdoba]. [https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3041/Pretelt y Socarras..pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3041/Pretelt_y_Socarras..pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vessman, J., Raluca, S., Jacobus, S., Klaus, D., Wolfgang, L., Duncan, B., Ales, F., & Helmut, M. (2001). International Union Of Pure And Applied Chemistry Analytical Chemistry Division Commission On General Aspects Of Analytical Chemistry* Selectivity In Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl. Chem*, 73(8), 1998–1999.
- Vilañez Huertas, J. C., & Malacatus Cobos, P. N. (2021). *Validación de métodos de ensayo para determinar pH, conductividad, tensoactivos, dureza total, cálcica, calcio, magnesio, litio en agua y suelo*. [Quito: UCE]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/23232>
- VIM. (2012). Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. *International Organization for Standardization Geneva ISBN, 3ª Edición(Vim)*, 104. <http://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>
- Zumba, J., & Carvajal, G. (2018). *Validación de métodos de ensayo para DQO, tensoactivos; y aceites y grasas en aguas, en el Laboratorio Ambiental y Consultoría Environovalab Cía. Ltda.* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/16224>

ANEXOS

Anexo A. Manual de procedimiento para la determinación de tensoactivos aniónicos.



**DETERMINACIÓN DE
TENSOACTIVOS ANIÓNICOS**

ITE-AQLAB-18

Hoja 3 de 7

1. OBJETO

Este instructivo describe el procedimiento para la determinación de Detergentes o Tensoactivos aniónicos (Methylene Blue Active Substance MBAS) en muestras acuosas, mediante una reacción colorimétrica y medición en el Espectrofotómetro UV-VIS.

2. ALCANCE

Este método es aplicable para la determinación de tensoactivos aniónicos (SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO MBAS) en muestras de aguas naturales de consumo, y descargas. El intervalo de trabajo comprende los niveles de concentración de 0,10 a 8,85 mg/L de SAAM.

Interferencias

El método presenta interferencias positivas y negativas. Las interferencias positivas provienen de todas las sustancias activas al azul de metileno presentes en la muestra capaces de transferir el colorante catiónico a la fase clorofórmica. Estas pueden ser sulfonatos orgánicos, sulfatos, carboxilatos, fenoles, los tiocianatos inorgánicos, cianatos, nitratos y cloruros. Por otro lado, las interferencias negativas se derivan de la presencia de tensoactivos catiónicos y cationes como las aminas, mismos que compiten con el azul de metileno para la formación de pares iónicos. El material particulado presente en una muestra también puede provocar la absorción de las sustancias activas al azul de metileno y producir una interferencia negativa. Finalmente, los sulfuros presentes en las aguas residuales crudas o tratadas pueden provocar la decoloración del azul de metileno.

3. REFERENCIAS

- ITE-AQLAB-35. Instructivo Técnico de Ensayo para la Determinación de la Biodegradabilidad del Tensoactivo como MBAS.
- PG-AQLAB-01. Procedimiento para la Elaboración de Documentos.
- ASTM D26667. Standard Test Method for Biodegradability of Alkylbenzene Sulfonates
- Standard Methods for the Examination of water and Wastewater APHA 23th. Edition. 2017. SM5540C, Surfactantes Aniónicos como SAAM.

4. GENERAL

4.1 Definiciones

4.1.1 Sustancias Activas para el Azul de Metileno (SAAM)

Son sustancias que llevan a cabo la transferencia del azul de metileno, un tinte catiónico, de una solución acuosa a un líquido orgánico inmiscible hasta el equilibrio.

4.1.2 Método SAAM en español o MBAS en inglés.

El Método SAAM es útil para valorar el contenido de tensoactivo aniónico de las aguas limpias y residuales. Este método es relativamente simple y preciso.

4.1.3 Sulfonatos de Alquilbenceno Lineales(LAS).

La mayoría de los detergentes son compuestos de sodio del sulfonato de benceno sustituido, denominados Sulfonatos de Alquilbenceno Lineales (LAS). Otros son compuestos de Alquilbencen Sulfatos de cadena ramificada (ABS), que se degradan más lentamente que los LAS.

4.2 Toma de muestra, Preservación, Manejo y Almacenamiento

La identificación, transporte manipulación y almacenamiento de las muestras se lo realizará conforme a lo establecido en MC-AQLAB-04 y MC-AQLAB-21.

Recolectar las muestras en botellas de plástico o vidrio limpias. Analizar las muestras lo antes posible para evitar la degradación de tensoactivos. La muestra puede ser preservada por un periodo de 48 horas como máximo enfriándolas a $\leq 6^{\circ}$ C. Antes de realizar la extracción, acondicionar las muestras a temperatura ambiente.

5. DESCRIPCIÓN

5.1 Equipos, Materiales y Reactivos

5.1.1 Equipos y Materiales

Espectrofotómetro UV-vis. EFQ/014 a 652 nm.
Embudos de separación de 500 ml. MA/035
Pipeta automática 1ml MV/024
Probeta 25 ml. MV/041
Probeta 50 ml. MV/030
Probeta 250 ml. MV/033.
Balón aforado de 50 ml.
Balón aforado de 100 ml MV/005
Balón aforado de 250ml MV/006
Balón aforado 1000ml. MV/008
Bureta 25ml. MV/026
Balanza analítica. EFQ/006
Vasos de precipitación.
Embudos vástago de vidrio
Papel filtro

5.1.2 Reactivos

- **Estándar madre de MBAS 1000mg/l**
- **Estándar de trabajo LAS 10 mg/L:** Tomar 1 ml del estándar madre (1000 mg/L) y aforar en un balón de 100 ml.
- **Solución madre de Ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 14%:** Colocar aproximadamente 100 ml de agua destilada en un balón aforado de 250 ml y enfriar por 5 minutos aproximadamente en la nevera. Tomar 36,5 ml de H₂SO₄ concentrado al 96% y añadir en el balón de 250 ml con agua previamente enfriada y completar el aforo con agua destilada.
- **Solución de Ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 0,7%:** Diluir 50 ml de la solución madre de Ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 14% en un balón aforado de 1000 ml.
- **Hidróxido de sodio NaOH 1N:** Pesar 10g de NaOH y aforar en un balón de 250 ml con agua destilada.
- **Reactivo Azul de metileno: Disolver 0,1 g** de azul de metileno en un balón aforado de 100 ml con agua destilada. Transferir 30 ml a un matraz de 1000 ml. Agregar 500 ml de agua destilada, 50 ml de H₂SO₄ al 14% y 50 g de Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado NaH₂PO₄.H₂O. Agitar hasta que se disuelva por completo y aforar a 1000 ml.
- **Solución de lavado de fosfato:** Disolver 50 g de NaH₂PO₄.H₂O en 500ml de agua destilada en un balón aforado de 1000 ml. Anadir 50 ml de H₂SO₄ al 14%, completar el aforo con agua destilada. Ajustar el pH a 1.8 de ser necesario.
- **Indicador de fenolftaleína al 0,05%:** Pesar 0,5 g de fenolftaleína, añadir 50 ml de etanol al 95% y diluir con agua destilada en un balón de 100 ml.
- **Cloroformo CHCl₃**
- **Peróxido de Hidrógeno al 30%**

5.2 Preparación

Previo al análisis las muestras deben ser acondicionadas, especialmente si se encuentran en estado de refrigeración.

El espectrofotómetro UV-VIS será operado según el procedimiento ITU-AQLAB-01. Encender el equipo 30 min antes del ensayo.

5.2.1 Condiciones Ambientales

Las condiciones óptimas de operación recomendadas son:

- Temperatura ≤ 35°C
- Humedad Relativa ≤ 85% HR

5.3 Realización

Preparación de la curva de calibración correspondiente:

Estándar madre MBAS: 1000mg/l

Estándar de trabajo MBAS (10 mg/l): tomar 1 ml del estándar madre de 1000 mg/l y colocar en un balón de 100 ml, aforar con agua destilada.

Realizar la curva de calibración con los siguientes estándares: blanco, 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 mg/l a partir de un estándar de trabajo de 10 mg/l.

CONCENTRACIÓN FINAL	ml de Solución de 10 mg/l y aforar a 250 ml con agua destilada
0,1 mg/l	2,5 ml
0,2 mg/l	5,0 ml
0,3 mg/l	7,5 ml
0,5 mg/l	12,5 ml
1,0 mg/l	25,0 ml

Una vez ajustado el equipo UV-VIS, se elabora la curva de calibración; empezar por el blanco y trabajar hacia delante, hasta el estándar de mayor concentración.

Extracción del Sulfonato de alquilbenceno lineal

- Colocar 250 ml de la muestra, estándar y blanco en una probeta limpia de 250 ml.
- Añadir la muestra en el embudo de separación limpio de 500 ml. (Ayudarse de un soporte de apoyo).
- Neutralizar la muestra: Añadir 3 gotas de fenolftaleína y añadir gota a gota la solución de NaOH hasta producir un color rosa. Añadir gota a gota suficiente solución diluida de H₂SO₄ 0.7% v/v, para que el color rosa desaparezca.
- Añadir tres gotas de H₂O₂ al 30%, para evitar la decoloración del azul de metileno por sulfuros y agitar suavemente.
- Añadir 25 ml de solución azul de metileno en el embudo y agitar suavemente.
- Añadir 50 ml de solución de lavado de fosfato, tapar el embudo y agitar suavemente por 30 s.
- Añadir 50 ml de cloroformo, tapar el embudo y agitar suavemente durante 30 s, eliminar la presión del embudo abriendo la llave con dirección hacia arriba y dejar reposar por 1 minuto.
- Drenar la fase clorofórmica a través de un embudo vástago de vidrio con papel filtro y recolectar en balones de 50 ml.

- Medir en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 652 nm con el programa previamente establecido.
- Los resultados se presentarán en unidades de mg/L de MBAS

5.4 Tratamiento de Resultados

El espectrofotómetro UV-vis presenta los resultados directamente en mg/L de MBAS a través del cálculo siguiente:

$$MBAS \frac{mg}{L} = conc * F * \frac{Vol_{vial}}{Vol_{muestra}} * fd$$

- F es el factor igual a 5 (250/50) volumen de muestra vs volumen Cloroformo
- fd factor de dilución

5.5 Cálculo de incertidumbre

La asignación y expresión de incertidumbres se realiza siguiendo los criterios establecidos en PG-AQLAB-06.

5.6 Medidas de Seguridad

Se recomienda realizar los ensayos con el uso adecuado de equipos de protección personal, para evitar salpicaduras e inhalación de cloroformo u otro reactivo químico como el H₂SO₄. Usar la Sorbona durante la extracción con cloroformo para evitar inhalaciones.

5.6 Control de Calidad

Se efectuará actividades de Control de Calidad según lo establecido en el Plan de Aseguramiento de la Calidad formato MC2201.

5.8 Criterios de aceptación rechazo

El criterio de aceptación y rechazo del estándar de 0,50 mg/L es de ± 0,05 mg/L, para duplicados el 15%, mientras que para recuperación para todo el rango es de 81-109%.






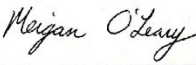
Los criterios de aceptación y rechazo de curvas de calibración son:

Intercepto máx.: 0,0356 y mín.: -0,0594. Pendiente máx.: 1,4865 y mín.: 1,2176

6. ANEXOS

ITE1801 Formato para la Determinación de Detergentes en Aguas.

Anexo B. Certificado del estándar de sustancias activas al azul de metileno.

125 Market Street New Haven, CT 06513 USA				Tel (203)786-5290 Fax (203)786-5287 www.AccuStandard.com	
CERTIFICATE OF ANALYSIS					
Wet Chemistry Reference Standard					
Catalog No: WC-MBAS-R1-10X-1 Description: Methylene Blue Activated Substance Standard Element: Methylene Blue Active Substance (MBAS) SRM: Ind. Std. Lot: 221035198 Matrix: Water Hazards: Refer to SDS for complete safety information			Date Certified: Apr 6, 2021 Expiration: May 6, 2023 Sample Size: 100 mL Components: 1 Storage Condition: Ambient (>5 °C)		
 Signal Word: Warning			Certified Reference Material   		
Component		SRM #		Certified Concentration (µg/mL)	
MBAS Methylene Blue Active Substance		Ind. Std.		1000	
<p>The gravimetric uncertainty for this product is ±0.24%. The CRM uncertainty is ±2.4%. The final solution was checked against an independent standard to verify its concentration. MBAS/mL (calculated as LAS, molecular weight 288.38) All glassware used in preparation is Class A. All weights are traceable through NIST, Test No. 684/289871-17 Shake bottle prior to use and do not pipette directly out of the bottle. Use only cleaned Class A volumetric glassware. Keep bottle tightly capped.</p>					
				Certified By:  Meigan O'Leary, Inorganic QC Manager	
Page 1 of 1				For use in routine laboratory analysis.	
AccuStandard is accredited to ISO 17034, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001:2015					
QR-ORG/INO-001 Rev. 7/20					

S-2
 Hqs: 10-08-2021

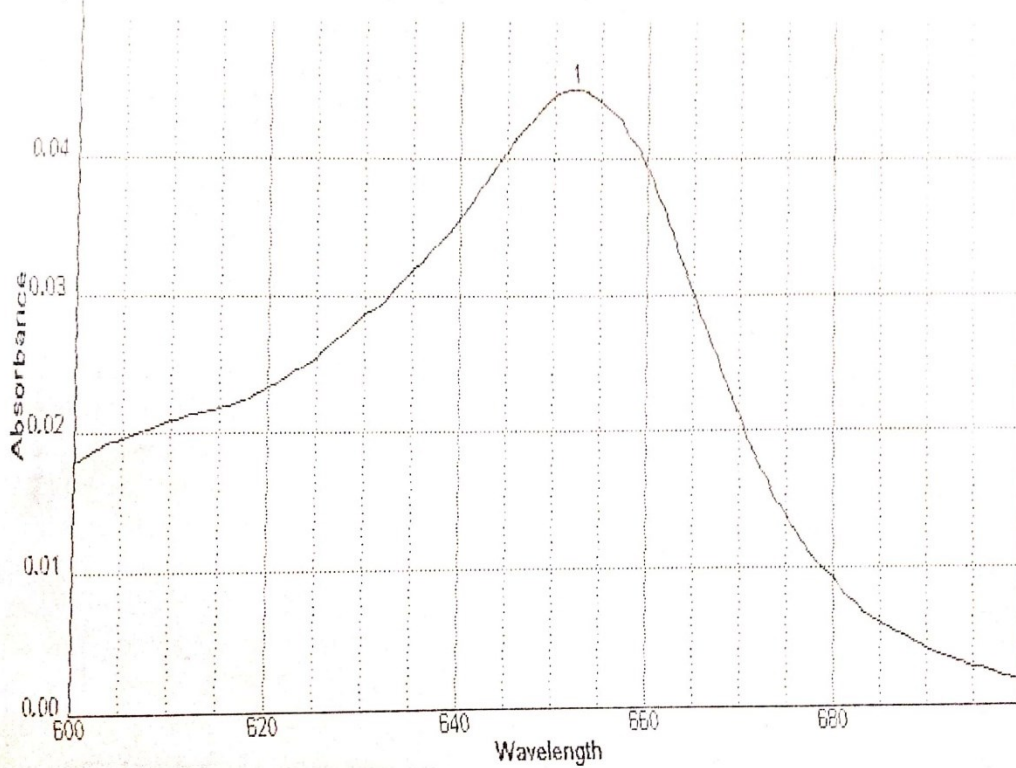
AccuStandard

Anexo C. Barrido espectral.

Start wavelength 600nm
End wavelength 700nm
Speed Slow
Interval 1nm

MBAS

Sample 10



Peak Centre Height
1 (652.3) 0.045A

Barrido Espectral para
Verificar la ABS Maxima

$$\lambda = 652,3$$

Metodo: 652

[Signature]

07/08/2021

Nivel Medido 0,20 mg/L

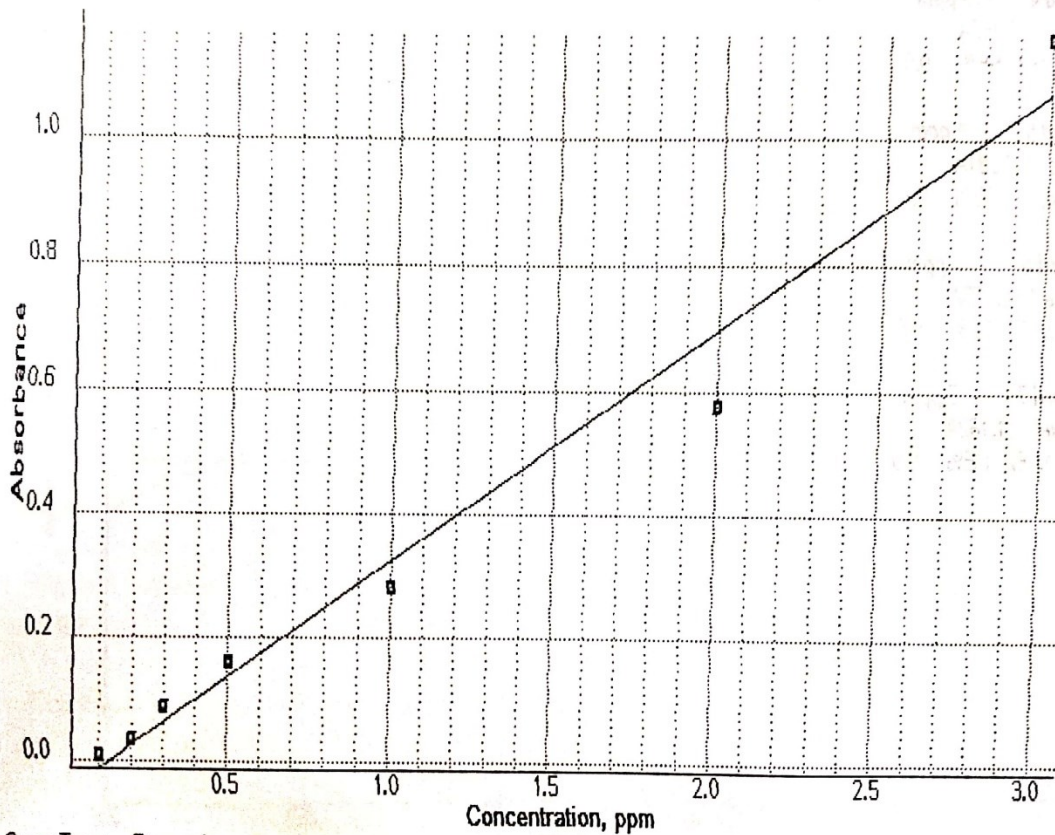
Anexo D. Puesta a punto.

Standard PNHX
Title: TSA

Puesta Punto.
09/08/2021

1

Wavelength: 652nm
No of Standards: 7
No of Std Replicates: 1
Integration Time: Default 0.1s
No of Sample Replicates: 1
Units: ppm



Curve Type: Regression
Slope 0.3738 Intercept -0.049 Linearity 98.7%

Standards collected on 9.08.21 12,29,30

Standard 1 0.1 ppm
Replicate 1 0.009A
Mean 0.009 SE% 0.0

Anexo E. Evidencia fotográfica del ensayo.



Figura 8. Neutralización de la muestra.

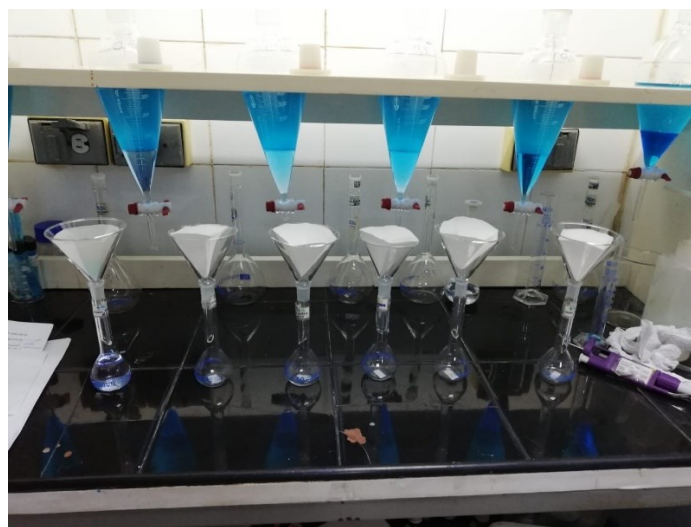


Figura 9. Extracción de las sustancias activas al azul de metileno.



Figura 10. Separación de la fase clorofórmica.







Figura 11. Medición en el espectrofotómetro UV-vis.

Anexo F. Certificado de calibración matraz aforado 50 ml.

2021

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-1352-029-21

		 <p>Acreditación N° SAE LC 10-009 LABORATORIO DE CALIBRACIÓN</p>				 <p>ACCREDITED Calibration Laboratory Cert No 4296 01</p>	
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE							
NOMBRE:	AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑÍA						
DIRECCIÓN:	FRANCISCO DE ORELLANA, CALLE JUAN HUNCITE SIN Y FRAY GREGORIO DE ALUMINIA						
TELÉFONO:	62881715						
PERSONA(S) DE CONTACTO:	ING. ARMANDO MELÉNDEZ LARA						
IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN							
ÍTEM:	MATRAZ AFORADO	CLASE:	A				
MARCA:	GLASSCO	UNIDAD DE MEDIDA:	ml				
MODELO:	NO ESPECIFICA	RESOLUCIÓN:	NO APLICA				
SERIE:	NO ESPECIFICA	INTERVALO DE MEDIDA:	50 ml				
CÓDIGO ASIGNADO:	E-19863	UBICACIÓN:	NO ESPECIFICA				
EQUIPAMIENTO UTILIZADO							
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO	
EL_ET.121	BALANZA ANALITICA	SARTORIUS	SECURA 225D-1S	34004249	2022-02-24	CC-0602-021-21	
EL_PT.035	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST9215	NO ESPECIFICA	2021-07-06	CC-1935-001-20	
EL_PT.466	BAROMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322677	2021-09-04	CC-2945-018-20	
EL_PT.771	TERMOHIGROMETRO	JUMO	LOGOSCREEN 600	4776450	2021-07-03	CC-1935-001-20	
DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA							
Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a los Institutos Nacionales de Metrología (INMs) (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).							
CALIBRACIÓN							
MÉTODO:	GRAVIMÉTRICO						
DOCUMENTO DE REFERENCIA:	ISO 4787:2010						
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.25						
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	LABORATORIO DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)						
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA:	20,9 °C	±0,1 °C					
HUMEDAD RELATIVA MEDIA:	48,1 %HR	±1,1 %HR					
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA:	1010 hPa	±0 hPa					
DENSIDAD MEDIA DEL AIRE:	1,197 kg/m³	±0,002 kg/m³					
RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN							
Nominal	Resultado	Error de Medición	Incertidumbre (U)	Factor de Cobertura (k)	Temperatura ⁽¹⁾	emp	
ml	ml	ml	ml		°C	ml	
50	50,0032	0,0032	0,0056	2,00	20,5	0,06	Cumple
Nota: Se ha realizado 10 mediciones por cada punto de calibración.							
OBSERVACIONES							
La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición U (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom-Calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada (20°C).							
NOTA: El error de indicación se muestra con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).							
⁽¹⁾ Temperatura Media del Agua (Líquido de Referencia) durante la calibración.							
⁽²⁾ Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.							
INFORMACIÓN SOBRE DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD							
Regla de Decisión (Aceptación Simple): El ítem de calibración se acepta como conforme con el requisito especificado de emp (error máximo permitido) si la suma del valor absoluto del error de medición con la incertidumbre expandida de medición es menor o igual al error máximo permitido (emp).							
Nota: El error máximo permitido (emp) está dado en el Apartado 7 (Tabla 1) de la ISO 1042:1998 y se muestra en la tabla de resultados.							
DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: De acuerdo a los resultados reportados en este certificado, el ítem de calibración CUMPLE con el requisito especificado de error máximo permitido (emp).							
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:	Nicolas Arellano						
FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM:	2021-03-31	FECHA DE EMISIÓN:	2021-04-06				
FECHA DE CALIBRACIÓN:	2021-04-05	FECHA PRÓXIMA DE CALIBRACIÓN:	2022-04				



Autenticación de certificado

Autorizado y firmado electrónicamente por:

Gerente técnico - Autorización EC220319SP







Susento legal de firma electrónica

Anexo G. Certificado de calibración matraz aforado 100 ml.

2021

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE

NOMBRE: AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑÍA
 DIRECCIÓN: FRANCISCO DE ORELLANA, CALLE JUAN HUNGITE SIN V...
 TELÉFONO: 62881715
 PERSONA(S) DE CONTACTO: ING. ARMANDO MELÉNDRIZ LARA

IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN

ÍTEM: MATRAZ AFORADO CLASE: A
 MARCA: GLASSCO UNIDAD DE MEDIDA: ml
 MODELO: NO ESPECÍFICA RESOLUCIÓN: NO APLICA
 SERIE: NO ESPECÍFICA INTERVALO DE MEDIDA: 100 ml
 CÓDIGO ASIGNADO: E-18864 UBICACIÓN: NO ESPECÍFICA

EQUIPAMIENTO UTILIZADO

CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO
EL.ET.121	BALANZA ANALÍTICA	SARTORIUS	SECURA 225D-1S	34004249	2022-02-24	CC-0602-021-21
EL.PT.035	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST9215	NO ESPECÍFICA	2021-07-06	CC-1935-001-20
EL.PT.466	BAROMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322677	2021-09-04	CC-2945-019-20
EL.PT.771	TERMOHIGROMETRO	JUMO	LOGOSCREEN 600	4776450	2021-07-03	CC-1935-002-20

DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA

Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros institutos Nacionales de Metrología (INMs).

CALIBRACIÓN

MÉTODO: GRAVIMÉTRICO
 DOCUMENTO DE REFERENCIA: ISO 4787:2010
 PROCEDIMIENTO: PEC.EL.25
 LUGAR DE CALIBRACIÓN: LABORATORIO DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)
 TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA: 20,9 °C ±0,1 °C
 HUMEDAD RELATIVA MEDIA: 47,9 %HR ±1,2 %HR
 PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA: 1010 hPa ±0 hPa
 DENSIDAD MEDIA DEL AIRE: 1,197 kg/m³ ±0,002 kg/m³

RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN

Nominal	Resultado	Error de Medición	Incertidumbre (U)	Factor de Cobertura (k)	Temperatura ⁽¹⁾	emp	Cumplimiento
ml	ml	ml	ml		°C	ml	
100	99,9210	-0,0790	0,0080	2,00	20,5	0,1	Cumple

Temperatura de Referencia: 20 °C Nota: Se ha realizado 10 mediciones por cada punto de calibración.


OBSERVACIONES

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición U (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom-Calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada (20°C).
 NOTA: El error de indicación se muestra con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).
⁽¹⁾ Temperatura Media del Agua (Líquido de Referencia) durante la calibración.
⁽²⁾ Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.

INFORMACIÓN SOBRE DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD

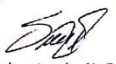
Regla de Decisión (Aceptación Simple): El ítem de calibración se acepta como conforme con el requisito especificado de emp (error máximo permitido) si la suma del valor absoluto del error de medición con la incertidumbre expandida de medición es menor o igual al error máximo permitido (emp).
 Nota: El error máximo permitido (emp) está dado en el Apartado 7 (Tabla 1) de la ISO 1042:1998 y se muestra en la tabla de resultados.
 DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: De acuerdo a los resultados reportados en este certificado, el ítem de calibración CUMPLE con el requisito especificado de error máximo permitido (emp).

CALIBRACIÓN REALIZADA POR:	Nicolas Arellano	FECHA DE EMISIÓN:	2021-04-06
FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM:	2021-03-31	FECHA PRÓXIMA DE CALIBRACIÓN:	2022-04
FECHA DE CALIBRACIÓN:	2021-04-05		




Autenticación de certificado


Autorizado y firmado electrónicamente por:



Gerente técnico - Autorización EC220319SP







Sustento legal de firma electrónica



Anexo H. Certificado de calibración matraz aforado 250 ml.

2021

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-1352-033-21

							
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE							
NOMBRE:		AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑIA					
DIRECCIÓN:		FRANCISCO DE ORELLANA, CALLE JUAN HUNGITE S/N Y FRAY GREGORIO DE ALUMINIA					
TELÉFONO:		62881715					
PERSONA(S) DE CONTACTO:		ING. ARMANDO MELÉNDRIZ LARA					
IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN							
ITEM:	MATRAZ AFORADO	CLASE:	A				
MARCA:	GLASSCO	UNIDAD DE MEDIDA:	ml				
MODELO:	NO ESPECIFICA	RESOLUCIÓN:	NO APLICA				
SERIE:	NO ESPECIFICA	INTERVALO DE MEDIDA:	250 ml				
CÓDIGO ASIGNADO:	E-18865	UBICACIÓN:	NO ESPECIFICA				
EQUIPAMIENTO UTILIZADO							
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO	
EL.ET.044	BALANZA DE PRECISIÓN	KERN	PLS 1200-3A	WI 1000514	2022-01-22	CC-0007-077-21	
EL.PT.035	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST9215	NO ESPECIFICA	2021-07-06	CC-1935-001-20	
EL.PT.466	BAROMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322677	2021-09-04	CC-2945-019-20	
EL.PT.771	TERMOHIGROMETRO	JUMO	LOGOSCREEN 600	4776450	2021-07-03	CC-1935-002-20	
DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA							
Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).							
CALIBRACIÓN							
MÉTODO:	GRAVIMÉTRICO						
DOCUMENTO DE REFERENCIA:	ISO 4787:2010						
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.25						
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	LABORATORIO DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)						
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA:	21,0 °C	±0,2 °C					
HUMEDAD RELATIVA MEDIA:	47,5 %HR	±0,7 %HR					
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA:	1010 hPa	±0 hPa					
DENSIDAD MEDIA DEL AIRE:	1,197 kg/m³	±0,002 kg/m³					
RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN							
Nominal	Resultado	Error de Medición	Incertidumbre (U)	Factor de Cobertura (k)	Temperatura ⁽¹⁾	emp	Cumplimiento
ml	ml	ml	ml		°C	ml	Cumple
250	249.967	-0.033	0.013	2.00	21.0	0.15	
Temperatura de Referencia: 20 °C					Nota: Se ha realizado 10 mediciones por cada punto de calibración.		
OBSERVACIONES							
La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición U (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom-Calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada (20°C).							
NOTA: El error de indicación se muestra con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).							
⁽¹⁾ Temperatura Media del Agua (Líquido de Referencia) durante la calibración.							
⁽²⁾ Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.							
INFORMACIÓN SOBRE DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD							
Regla de Declaración (Aceptación Simple): El ítem de calibración se acepta como conforme con el requisito especificado de emp (error máximo permitido) si la suma del valor absoluto del error de medición con la incertidumbre expandida de medición es menor o igual al error máximo permitido (emp).							
Nota: El error máximo permitido (emp) está dado en el Apartado 7 (Tabla 1) de la ISO 1042:1998 y se muestra en la tabla de resultados.							
DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: De acuerdo a los resultados reportados en este certificado, el ítem de calibración CUMPLE con el requisito especificado de error máximo permitido (emp).							
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:	Nicolas Arellano			FECHA DE EMISIÓN:	2021-04-06		
FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM:	2021-03-31			FECHA PRÓXIMA DE CALIBRACIÓN:	2022-04		
FECHA DE CALIBRACIÓN:	2021-04-05						



Autenticación de certificado

Autorizado y firmado electrónicamente por:

[Signature]

Gerente técnico - Autorización EC220319SP







Sustento legal de firma electrónica

[Signature]

Anexo I. Certificado de calibración matraz aforado 1000 ml.

2021

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-1352-031-21

							
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE							
NOMBRE:	AOLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑIA						
DIRECCIÓN:	FRANCISCO DE ORELLANA, CALLE JUAN HUNCITE S/N Y FRAY GREGORIO DE ALUMINIA						
TELÉFONO:	62881715						
PERSONA(S) DE CONTACTO:	ING. ARMANDO MELÉNDEZ LARA						
IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN							
ÍTEM:	MATRAZ AFORADO	CLASE:	A				
MARCA:	GLASSCO	UNIDAD DE MEDIDA:	ml				
MODELO:	NO ESPECIFICA	RESOLUCIÓN:	NO APLICA				
SERIE:	NO ESPECIFICA	INTERVALO DE MEDIDA:	1000 ml				
CÓDIGO ASIGNADO:	E-18887	UBICACIÓN:	NO ESPECIFICA				
EQUIPAMIENTO UTILIZADO							
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE GAL.	N° CERTIFICADO	
EL.ET.070	BALANZA DE PRECISION	KERN	EW 6200 - 2NM	121203061	2021-06-05	CC-1491-025-20	
EL.PT.035	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST9215	NO ESPECIFICA	2021-07-06	CC-1935-001-20	
EL.PT.466	BAROMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322677	2021-09-04	CC-2945-019-20	
EL.PT.771	TERMOHIGROMETRO	JUMO	LOGOSCREEN 600	4776450	2021-07-03	CC-1935-002-20	
DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA							
Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).							
CALIBRACIÓN							
METODO:	GRAVIMÉTRICO						
DOCUMENTO DE REFERENCIA:	ISO 4787:2010						
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.25						
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	LABORATORIO DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)						
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA:	21,1 °C ±0,0 °C						
HUMEDAD RELATIVA MEDIA:	47,9 %HR ±0,8 %HR						
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA:	1010 hPa ±0 hPa						
DENSIDAD MEDIA DEL AIRE:	1,196 kg/m³ ±0,002 kg/m³						
RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN							
Nominal	Resultado	Error de Medición	Incertidumbre (U)	Factor de Cobertura (k)	Temperatura ⁽¹⁾	emp	Cumplimiento
ml	ml	ml	ml		°C	ml	
1000	1000,056	0,056	0,098	2,01	20,7	0,4	Cumple
Temperatura de Referencia: 20 °C				Nota: Se ha realizado 10 mediciones por cada punto de calibración.			
OBSERVACIONES							
La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición U (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom-Calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada (20°C). NOTA: El error de indicación se muestra con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM). ⁽¹⁾ Temperatura Media del Agua (Líquido de Referencia) durante la calibración. ⁽²⁾ Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.							
INFORMACIÓN SOBRE DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD							
Regla de Decisión (Aceptación Simple): El ítem de calibración se acepta como conforme con el requisito especificado de emp (error máximo permitido) si la suma del valor absoluto del error de medición con la incertidumbre expandida de medición es menor o igual al error máximo permitido (emp). Nota: El error máximo permitido (emp) está dado en el Apartado 7 (Tabla 1) de la ISO 1042:1998 y se muestra en la tabla de resultados. DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: De acuerdo a los resultados reportados en este certificado, el ítem de calibración CUMPLE con el requisito especificado de error máximo permitido (emp).							
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:		Nicolas Arellano		FECHA DE EMISIÓN:		2021-04-06	
FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM:		2021-03-31		FECHA PRÓXIMA DE CALIBRACIÓN:		2022-04	
FECHA DE CALIBRACIÓN:		2021-04-05					



Autenticación de certificado

Autorizado y firmado electronicamente por:

Gerente técnico - Autorización EC220319SP



Sustento legal de firma electrónica

Anexo J. Certificado de calibración bureta 25 ml.

www.glasscolabs.com

GRADUATED PIPETTE CLASS AS



nv/042



QR 17/01 ISSUE 01 REV 2 DT 02 FEB 2011

Glassco Laboratory Equipments Pvt. Ltd.



C
N
T
E
N
S
T
E

CALIBRATION CERTIFICATE

(Glassco Calibration Laboratory)

(ISO 17025:2005 Certified laboratory)

ny/026-01

CERTIFICATE NO.: GLASSCO/16/10-111/270

CRF. DATE: 10/10/2016

CUSTOMER: GLE-STOCK

CAL. REPORT NO.: 16/10-111

TEST METHOD: GRAVIMETRIC METHOD

ITEM CALIBRATED: BURETTE WITH PTFE STOPCOCK : 25 ml

CATALOGUE NO: 115.451.02

BATCH NO. & SERIAL NO. OF BURETTE : 09.16/270

ITEM CALIBRATED ON: 18/10/2016

CALIBRATION RESULT:

The product was found to deliver the following volume at 20 °C

VOLUME DELIVERED	:	24.998 ml
TOLERANCE	:	± 0.030 ml
CORRECTION	:	0.002 ml
STANDARD DEVIATION	:	0.001 ml
DELIVERY TIME	:	74 Sec

Expanded uncertainty (at 95% C.L. k=2) is ± 0.003 ml

The product has been calibrated with the following devices:

Standard weights: 25 g

Using Balance Number: ABAL-10, 420g/0.001 g (SARTORIUS)

Thermometer NO: DM-08: -50°C to 300°C

All the above devices have valid calibrations traceable to NPL India; traceable to international standards.

The above product has been examined for compliance to ASTM E-287 Class-A. It has been found to satisfy the specified requirements. The above item has been calibrated at 24°C at RH 44%.

The above calibration result is valid at the time of calibration under lab conditions. This report shall not be reproduced, except in full, unless with written permission from Glassco Laboratory Equipments.

CALIBRATED BY:
Mr. YOGENDRA PANWAR

DATE OF ISSUE 19/10/2016

This is an electronically generated certificate.

Page 1 of 1

CALIBRATION CERTIFICATE





www.glasscolabs.com

Anexo K. Certificado de calibración pipeta de pistón 100-1000 uL.



2021

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-1352-013-21





SERVICIO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO
Acreditación N° SAE LC 10-009
LABORATORIO DE CALIBRACIÓN

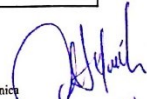
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE							
NOMBRE:	AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑIA						
DIRECCIÓN:	FRANCISCO DE ORELLANA, CALLE JUAN HUNGITE S/N Y FRAY GREGORIO DE ALUMINIA						
TELÉFONO:	62881715						
PERSONA(S) DE CONTACTO:	ING. ARMANDO MELÉNDEZ LARA						
IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN							
ÍTEM:	PIPETA DE PISTÓN	TIPO:	A				
MARCA:	LABNET	UNIDAD DE MEDIDA:	µl				
MODELO:	BP1000	RESOLUCIÓN:	2				
SERIE:	244060809	INTERVALO DE MEDIDA:	(100 a 1000) µl				
CÓDIGO ¹⁾ :	MV/024-02	UBICACIÓN:	NO ESPECIFICA				
EQUIPAMIENTO UTILIZADO							
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO	
EL.ET.121	BALANZA ANALITICA	SARTORIUS	SECURA 22SD-1S	34004249	2022-02-24	CC-0602-021-21	
EL.PT.035	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST9215	NO ESPECIFICA	2021-07-08	CC-1935-001-20	
EL.PT.466	BAROMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322677	2021-09-04	CC-2945-019-20	
EL.PT.771	TERMOHIGROMETRO	JUMO	LOGOSCREEN 600	4776450	2021-07-03	CC-1935-002-20	
DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA							
Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).							
CALIBRACIÓN							
MÉTODO:	GRAVIMÉTRICO						
DOCUMENTO DE REFERENCIA:	ISO 8655-6:2002						
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.25	¿SE REALIZA AJUSTE? SÍ					
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	LABORATORIO DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)				UNIDAD DE MEDIDA:	µl	
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA:	21,1 °C	±0,0 °C	PUNTO DE AJUSTE:		1000		
HUMEDAD RELATIVA MEDIA:	48,1 %HR	±0,9 %HR	LECTURA ANTES:		1027,543		
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA:	1009 hPa	±0 hPa	LECTURA DESPUÉS:		1001,962		
DENSIDAD MEDIA DEL AIRE:	1,195 kg/m ³	±0,002 kg/m ³					
RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN							
Nominal	Resultado	Error de Medición	Incertidumbre (U)	Factor de Cobertura (k)	Temperatura ¹⁾	emp	Cumplimiento
µl	µl	µl	µl		°C	µl	
1000	1001,55	1,55	0,79	2,28	19,7	8	Cumple
500	501,37	1,37	0,61	2,28	19,7	8	Cumple
100	100,73	0,73	0,28	2,17	19,7	8	Cumple
OBSERVACIONES							
La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición U (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom-Calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada (20°C).							
NOTA: El error de indicación se muestra con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).							
¹⁾ Temperatura Media del Agua (Líquido de Referencia) durante la calibración.							
²⁾ Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.							
INFORMACIÓN SOBRE DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD							
Regla de Decisión (Aceptación Simple): El ítem de calibración se acepta como conforme con el requisito especificado de emp (error máximo permitido) si la suma del valor absoluto del error de medición con la incertidumbre expandida de medición es menor o igual al error máximo permitido (emp).							
Nota: El error máximo permitido (emp) está dado en el Apartado 7 (Tabla 1) de la ISO 8655-2:2002 y se muestra en la tabla de resultados.							
DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: De acuerdo a los resultados reportados en este certificado, el ítem de calibración CUMPLE con el requisito especificado de error máximo permitido (emp).							
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:		Nicolas Arellano					
FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM:		2021-03-22		FECHA DE EMISIÓN:		2021-03-24	
FECHA DE CALIBRACIÓN:		2021-03-24					



Autorizado y firmado electrónicamente por:



 Gerente técnico - Autorización EC220319SE





 30-03-2021



Anexo L. Certificado de calibración de pipeta de pistón 1-10 ml.

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-1352-011-21





SERVICIO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO
Acreditación N° BAE LC 10-009
LABORATORIO DE CALIBRACIÓN

ACCREDITED
Calibration Laboratory
Cert. No. 4286-01

IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE

NOMBRE: AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑIA
DIRECCIÓN: FRANCISCO DE ORELLANA, CALLE JUAN HUNCIITE S/N Y FRAY GREGORIO DE ALUMINIA
TELÉFONO: 62881715
PERSONA(S) DE CONTACTO: ING. ARMANDO MELÉNDRIZ LARA

IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN

ITEM: PIPETA DE PISTÓN TIPO: A
MARCA: LABNET UNIDAD DE MEDIDA: ml
MODELO: NO ESPECIFICA RESOLUCIÓN: 0,1
SERIE: 344092033 INTERVALO DE MEDIDA: (1 a 10) ml
CÓDIGO¹: MV-039-01 UBICACIÓN: NO ESPECIFICA

EQUIPAMIENTO UTILIZADO

CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO
ELET.121	BALANZA ANALITICA	SARTORIUS	SECURA Z25D-1S	34004249	2022-02-24	CC-0602-021-21
EL.PT.035	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST9215	NO ESPECIFICA	2021-07-06	CC-1935-001-20
EL.PT.466	BAROMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322877	2021-09-04	CC-2945-019-20
EL.PT.771	TERMOHIGROMETRO	JUMO	LOGOSCREEN 600	4776450	2021-07-03	CC-1935-002-20

DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA

Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).

CALIBRACIÓN

MÉTODO: GRAVIMÉTRICO
DOCUMENTO DE REFERENCIA: ISO 8655-6:2002
PROCEDIMIENTO: PEC.EL.25
LUGAR DE CALIBRACIÓN: LABORATORIO DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA: 21,3 °C ±0,1 °C
HUMEDAD RELATIVA MEDIA: 48,0 %HR ±0,7 %HR
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA: 1011 hPa ±0 hPa
DENSIDAD MEDIA DEL AIRE: 1,196 kg/m³ ±0,002 kg/m³

RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN

Nominal	Resultado	Error de Medición	Incertidumbre (U)	Factor de Cobertura (k)	Temperatura ⁽¹⁾	emp	Cumplimiento
ml	ml	ml	ml		°C	ml	
10	10,0173	0,0173	0,0012	2,01	19,7	0,06	Cumple
5	4,95342	-0,04658	0,00071	2,04	19,7	0,06	Cumple
1	0,99791	-0,00209	0,00029	2,11	19,7	0,06	Cumple

Temperatura de Referencia: 20 °C

Nota: Se ha realizado 10 mediciones por cada punto de calibración.

OBSERVACIONES

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición U (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada (20°C).
 NOTA: El error de indicación se muestra con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).
⁽¹⁾ Temperatura Media del Agua (Líquido de Referencia) durante la calibración.
⁽²⁾ Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.

INFORMACIÓN SOBRE DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD

Regla de Decisión (Aceptación Simple): El ítem de calibración se acepta como conforme con el requisito especificado de emp (error máximo permitido) si la suma del valor absoluto del error de medición con la incertidumbre expandida de medición es menor o igual al error máximo permitido (emp).
 Nota: El error máximo permitido (emp) está dado en el Apartado 7 (Tabla 1) de la ISO 8655-2:2002 y se muestra en la tabla de resultados.
 DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: De acuerdo a los resultados reportados en este certificado, el ítem de calibración CUMPLE con el requisito especificado de error máximo permitido (emp).

CALIBRACIÓN REALIZADA POR: Nicolas Arellano
 FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM: 2021-03-22
 FECHA DE CALIBRACIÓN: 2021-03-24
 FECHA DE EMISIÓN: 2021-03-24



Autenticación de certificado

Autorizado y firmado electronicamente por:

Gerente técnico - Autorización E@220319SP



Sustento legal de firma electrónica

Official
20-3-2021

Anexo M. Tabla t-student.

Tabla A.2. La distribución t .

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Los valores críticos de $|t|$ son adecuados para un contraste de *dos* colas. Para un contraste de *una* cola el valor se toma de la columna para *dos veces* el valor de P deseado, es decir, para un contraste de una cola, $P = 0.05$, 5 grados de libertad, el valor crítico se lee de la columna $P = 0.10$ y es igual a 2.02.

Fuente: (Miller & Miller, 2002).

Anexo N. Tabla de Fisher.

264 **Tabla A.3.** Valores críticos de F para un contraste de una cola ($P = 0.05$).

Apéndice 2

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.

Fuente: (Miller & Miller, 2002)