

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Estudio de Homogeneidad y Estabilidad de una
disolución de Ácido dodecil vengon sulfonato de sodio
como candidato a Material de Referencia.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ELENA STEPHANY CASTAÑEDA SERENO

DIRECTOR DE TESIS:

M. en T. A. Teresita Cardona Juárez

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. Víctor Hugo Becerra López

MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Humberto por ser mi compañero en nuestra formación profesional, mi mejor amigo y un gran padre para mi hijo.

A Hugo y Sayani por ser mi más bella inspiración.

A Teresita por ser un claro ejemplo de nobleza, optimismo y determinación.

A Dolores por sus consejos, amor y dedicación.

A mi hermano Alejandro por ser una gran pilar en mi vida personal y profesional.

A Sara porque su sabiduría continúa conmigo día a día.

A mi esposo Alan por impulsar y apoyar incondicionalmente todos los proyectos de mi vida... gracias mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Control Ambiental del Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CIITEC) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por su voto de confianza al permitirme desarrollar el presente trabajo, brindándome los materiales y medios necesarios para la realización del mismo.

Con mucho respeto y admiración a la M. en C. Teresita Cardona Juárez por ser mi guía principal en el desarrollo de la presente tesis, por compartirme parte de su amplia experiencia en el tema, por facilitarme la información necesaria para el desarrollo de este trabajo, por brindarme su paciencia, dedicación y amistad.

Al Profesor Víctor Hugo por el tiempo y la disposición que me brindo al realizar cada revisión, por todas sus atinadas correcciones y por sus valiosos comentarios que contribuyeron a enriquecer esta tesis.

A Lourdes Montes por su contribución al desarrollo de la parte estadística, por su apoyo en la interpretación de normas, su buena disposición y amistad.

INDICE

I. Introducción.	1
II. Marco teórico.	4
III. Planteamiento del problema.	21
IV. Objetivos.	22
V. Hipótesis.	22
VI. Diseño experimental.	23
VII. Materiales y métodos (metodología).	24
VIII. Diagrama de flujo.	28
IX. Diseño estadístico.	29
X. Resultados.	33
XI. Análisis de resultados.	66
XII. Conclusiones.	70
XIII. Sugerencias.	71
XIV. Glosario de abreviaturas.	72
XV. Anexos.	73
XVI. Lista de referencias consultadas.	86



I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años en México las mediciones que se realizan en el campo de la química han demostrado un rápido crecimiento, principalmente en el área de la química analítica gran parte se atribuye a un creciente compromiso por el mejoramiento en la calidad de los productos.

La realización de un análisis de laboratorio no es un proceso que se efectuó de manera aislada, en la mayoría de los casos se requiere de materiales, reactivos, instrumentos y personal encargado de realizar las pruebas a través de métodos y procedimientos estandarizados. Todos estos elementos son indispensables en el proceso de control de calidad de las mediciones de un laboratorio.

El control de calidad es un sistema implementado para incrementar la probabilidad de que cada resultado emitido por el laboratorio sea válido y pueda ser utilizado con confianza. Los procesos de control de calidad funcionan detectando los errores analíticos, idealmente cualquier error suficientemente grande para invalidar la utilidad de los resultados de laboratorio debe ser detectado. En la práctica, muchos procedimientos de control de calidad operan introduciendo controles (materiales de muestras bien caracterizados por ensayos previos) al proceso de ensayo de laboratorio y comparando los resultados de las pruebas con el rango de valor esperado derivado del ensayo previo.

Otro elemento importante en el control de calidad de las mediciones es la emisión de los resultados, el reconocimiento de la magnitud de los errores experimentales que acompañan al resultado del análisis es crucial para la interpretación adecuada de los mismos, para ello se hace uso de métodos estadísticos comparando el resultado experimental con un valor considerado como verdadero haciendo uso de materiales de referencia.

Un material de referencia (MR) se define como un material o sustancia en el cual uno o más de sus valores propios son suficientemente homogéneos y bien establecidos para ser usados en la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición o para la asignación de los valores a los materiales. (1)

Los materiales de referencia son una herramienta importante en la realización de varios aspectos de la calidad de la medición y se usan para la validación del método, calibración, estimación de incertidumbre de la medición, capacitación, para el control de calidad interno (QC) y para el aseguramiento de la calidad externo (QA) (ensayos de aptitud).



En el sentido más amplio, puede asegurarse la validez de la medición cuando:

- se usan métodos validados y equipos apropiados
- personal calificado y competente para emprender el trabajo
- se aseguran las mediciones realizando pruebas entre diferentes laboratorios (trazabilidad e incertidumbre de la medición)
- se dispone de evidencia independiente del desempeño (ensayos de aptitud)
- se emplean procedimientos para el control de calidad interno y para los ensayos de aptitud, preferentemente involucrando la acreditación de tercera parte. (2)
- se usan materiales de referencia certificados para evaluar patrones de más baja calidad como secundarios o terciarios.

Para que un material sea considerado como un MR deben cumplir ciertas características de importancia, dentro de las cuales se encuentra la homogeneidad que es la variación que puede presentarse de botella a botella de una o más de sus propiedades y la estabilidad que puede ser alterada por diversos factores como temperatura, luz, humedad, oxígeno y actividad microbiológicas, por mencionar algunas.

La homogeneidad es requisito para todos los MR, de ahí que uno de los pasos a complementar en la evaluación de cada candidato a MR sea la demostración de este. El envasado en su forma final, tiene un grado de heterogeneidad no detectable, o que al menos no interfiere en el uso previsto.

Para asegurar mayor efectividad en el estudio, las determinaciones se realizan preferiblemente en condiciones de repetitividad, utilizando métodos de ensayo suficientemente precisos. La precisión requerida para el estudio de homogeneidad puede definirse de acuerdo al uso previsto para el material, expresándola en función de la desviación estándar. El presente trabajo evaluó la homogeneidad de un candidato a MR por un método de ensayo químico. Esto hace que una de las variantes a considerar en la metodología sea el empleo del mismo método de ensayo, con el cual, se evaluó simultáneamente la estabilidad.

Existen varias instancias a nivel nacional e internacional que se encargan de proveer a los distintos laboratorios de MR y material de referencia certificado (MRC), en nuestro país el Centro Nacional de Metrología (CENAM) es el laboratorio nacional de referencia en materia de mediciones. El CENAM está dedicado a establecer las unidades de medición con las más altas cualidades y calidades metrológicas posibles de acuerdo a sus capacidades científicas y técnicas.

En la actualidad, el CENAM no cuenta con un MRC para la cuantificación de agentes surfactantes en aguas, razón por la cual se encuentra en el desarrollo del mismo.

Los agentes surfactantes son uno de los principales contaminantes en los sistemas acuosos utilizados por el hombre tales como ríos, plantas de tratamiento, ríos de aguas negras, etc., mismos que son monitoreados para su análisis, por los laboratorios dedicados a el control ambiental. Estos laboratorios



demandan la necesidad de contar con un MRC que les permita emitir resultados con un nivel aceptable de calidad, para cumplir con los requerimientos establecidos por la normatividad nacional vigente.

La metodología que utilizan los laboratorios de control ambiental interesados en la cuantificación de agentes surfactantes en agua, se basa en la extracción líquido-líquido a pH ácido en presencia de un indicador, los agentes surfactantes o tensoactivos pueden unirse químicamente al azul de metileno y ser cuantificados mediante una técnica espectrofotométrica. El principio de este método se basa en la formación de un par iónico extractable en cloroformo de color azul por la reacción del azul de metileno catiónico y un tensoactivo aniónico. Dicho método es descrito en la norma NMX-AA-039-SCFI-2001, “Análisis de Agua – Determinación de Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM) en Aguas Naturales, Potables, Residuales y Residuales tratadas”. (3)

Debido a la importancia que tienen los MR como control de calidad para los laboratorios analíticos-ambientales y la creciente necesidad de cumplir con los requerimientos establecidos por las entidades de acreditación. En el presente trabajo nos dimos a la tarea de colaborar en la evaluación de un candidato a MR que se pretende utilizar en la realización de ensayos para la determinación de Sustancias Activas al Azul de Metileno en aguas, que realizan los laboratorios acreditados a nivel internacional. (4)

El candidato a MR fue preparado por el CENAM, identificado con el lote DES-70, embotellado en envases de plástico ámbar y distribuido para realizarle diferentes pruebas como lo establece la normatividad.

El Laboratorio de Control Ambiental del Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CIITEC) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), recibió dicho candidato a MR para contribuir a la evolución del mismo realizando los Estudio de Homogeneidad y Estabilidad que se redactan puntualmente en los siguientes capítulos de esta tesis.



II. MARCO TEÓRICO

1.- Validación de métodos.

De acuerdo a las Buenas Prácticas tanto de fabricación como de laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos que se emplean estén validados. La validación es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. (4)

Por lo tanto la validación es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La validación le proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos, además de que también impacta en aquellas aéreas relacionadas a la calidad de un producto como son la estabilidad, la limpieza de equipos, el uso de reactivos, etc. (5)

2.- Agentes surfactantes

Los surfactantes son compuestos utilizados principalmente por la industria en la fabricación de jabones, se disuelven en las aguas limpias y residuales principalmente por descarga de residuos acuosos provenientes del lavado doméstico e industrial de ropa y otras operaciones de limpieza.

Las moléculas de un agente surfactante están constituidas principalmente por dos grupos uno hidrófobo y otro hidrófilo. El grupo hidrófobo es por lo general un radical hidrocarburo y un conjunto R que contiene 10 a 20 átomos de carbono. Los grupos hidrófilos son de dos tipos, los que se ionizan en el agua y los que no se ionizan. Los surfactantes iónicos se subdividen en dos categorías diferenciadas por la carga. Un ión surfactante aniónico tiene carga negativa, por ejemplo $(\text{RSO}_3)^-\text{Na}^+$ y uno catiónico que tienen carga positiva; por ejemplo $(\text{RMe}_3\text{N})^+\text{Cl}^-$.

Los surfactantes catiónicos representan menos de una décima parte de los iónicos, y suelen usarse para la desinfección, ablandamiento de textiles y varios fines cosméticos.

Los surfactantes aniónicos se disocian en un anión y un catión, el cual es en general un metal alcalino o un amonio cuaternario.

A este tipo pertenecen los detergentes sintéticos como el sulfonato de alquil benceno, los jabones (sales de sodio de ácidos grasos), los agentes espumantes como lauril sulfato, los humectantes del tipo succinato, los dispersantes del tipo lignosulfonatos, etc.

El sulfonato de alquil benceno lineal (SAL) es el surfactante aniónico más utilizado y se emplea para estandarizar el método de SAAM. El SAL no es un compuesto sencillo, ya que puede estar constituido

de algunos o todos sus 26 isómeros y homólogos. Algunas de sus características pueden ser especificadas como en el caso del ácido dodecilbencensulfonato de sodio que está constituido por una cadena de 12 carbonos. (6)

Los agentes surfactantes que se encuentran en disolución pueden ser cuantificados por la técnica de SAAM.

2.1.- Técnica de SAAM (Sustancias Activas al Azul de Metileno)

Las sustancias activas al azul de metileno (sustancia catiónica) llevan a cabo la transferencia del azul de metileno, de una solución acuosa a un líquido orgánico inmiscible hasta el equilibrio. Esto ocurre a través de la formación de un par iónico entre el anión (sustancias activas) y el catión (azul de metileno). La intensidad de color resultante en la fase orgánica es proporcional a la cantidad de SAAM. Los surfactantes aniónicos se encuentran entre las más destacadas de muchas sustancias naturales y sintéticas que muestran actividad al azul de metileno. La técnica de SAAM es útil para valorar el contenido de surfactante aniónico de las aguas limpias y residuales, pero debe tenerse siempre en cuenta la posible presencia de otros tipos de SAAM. En la figura II-1 se muestra las formas estructurales de las moléculas de Ácido dodecilbenecen sulfonato y azul de metileno; en la figura II-2 el par iónico que se forma al reaccionar el azul de metileno con los agentes surfactantes aniónicos.

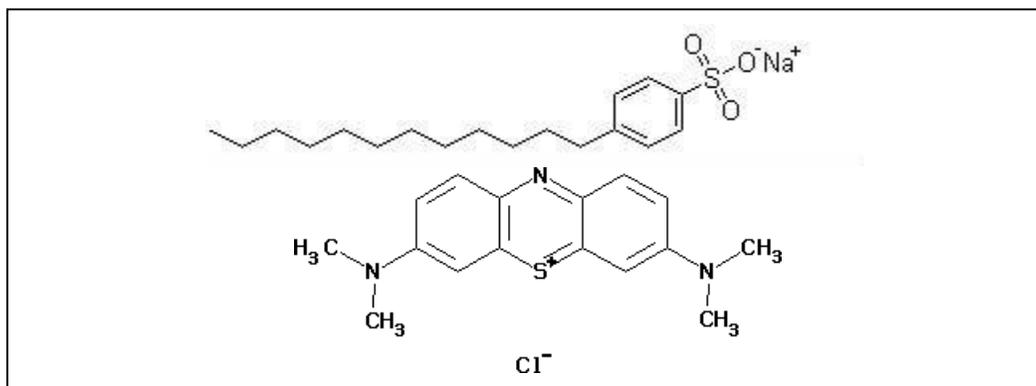


Figura II-1. Estructuras de las moléculas de Ácido dodecilbenecen sulfonato y azul de metileno.

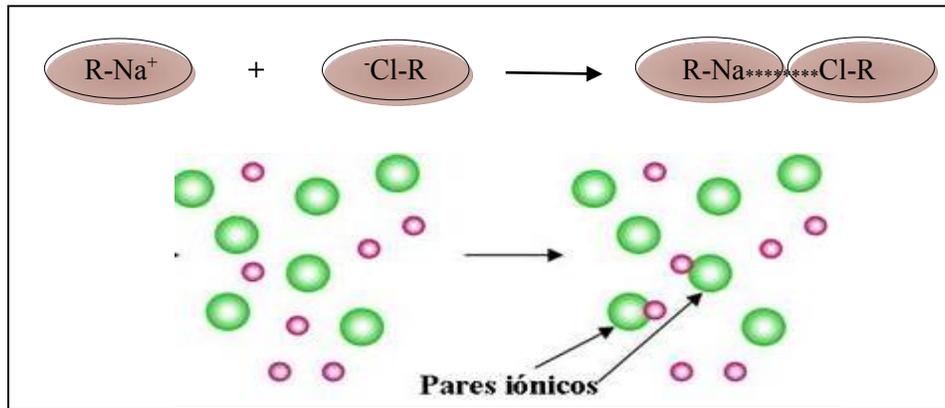


Figura II-2. El agentes surfactantes aniónicos reaccionan con la parte catiónica del azul de metileno formando un par iónico.

La técnica de SAAM es relativamente simple y precisa. Comprende tres extracciones sucesivas con cloroformo a partir de medio acuoso ácido que contenga azul de metileno en exceso, seguidas de lavado con solución de fosfatos y la determinación por espectrofotometría a una longitud de onda específica.

La técnica de SAAM no es específica para algún agente surfactante en particular, es decir todos los surfactantes presentes en la muestra por analizar serán cuantificados, pero pueden ser diferenciados unos de otros por métodos específicos, utilizando técnicas instrumentales apropiadas. (3)

2.2.- Espectrofotometría de ultravioleta-visible.

La espectrofotometría de ultravioleta-visible es una técnica de medición de concentraciones de masa de elementos y compuestos (especies) químicos, cuyo principio es la interacción entre la energía electromagnética con la materia. En forma más específica la espectrofotometría ultravioleta-visible se fundamenta en medir la radiación monocromática absorbida por un elemento o molécula causante de desplazamientos electrónicos a capas superiores, estas transiciones determinan la región del espectro en la que tiene lugar la absorción.

La ley fundamental en la que se basan los métodos espectrofotométricos es la de Bouguer-Beer, Lambert y Beer que establece:

- a) La relación entre la intensidad de la luz transmitida o energía radiante (I) y la energía radiante incidente (I_0) es una función del espesor de la celda b a través del medio absorbente, de acuerdo a la ecuación:

b)

$$\alpha = abc$$

Dónde:

α = absorbancia

b = espesor de la celda

a = absorptividad

c = concentración

c) La cantidad de energía electromagnética monocromática absorbida por un elemento es directamente proporcional a la concentración de la(s) especie(s) que absorbe(n) y a la longitud de la trayectoria de la muestra para un conjunto de condiciones instrumentales establecidas.

Si $\alpha = \log (I_0/I)$ donde: α = absorbancia

Entonces $T = (I/I_0)$ donde T = transmitancia

$\alpha = -\log T$

El intervalo de longitudes de onda consideradas generalmente para la técnica de espectrofotometría de ultravioleta-visible son:

1. De 190 a 400 nm longitud de onda de la radiación generada por lámpara de deuterio para la región de ultravioleta.
2. De 400 a 1100 nm longitud de onda de la radiación generada por lámpara de tungsteno para la región del visible e infrarrojo, como se aprecia en la figura II-4(7)

Los componentes principales de un espectrofotómetro se muestran en la figura II-3.

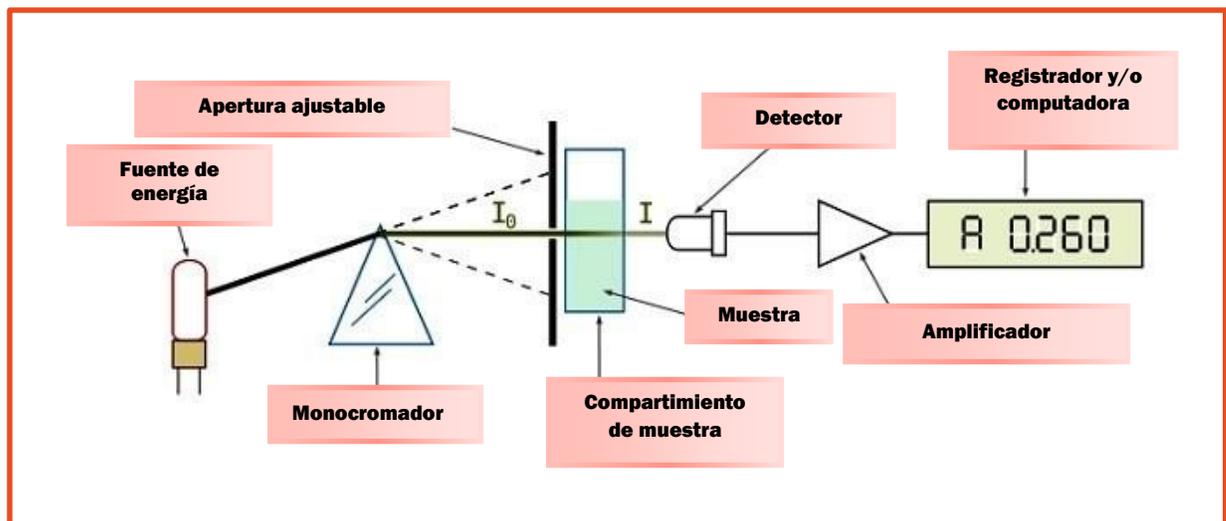


Figura II-3. Diagrama de los principales componentes de un espectrofotómetro.

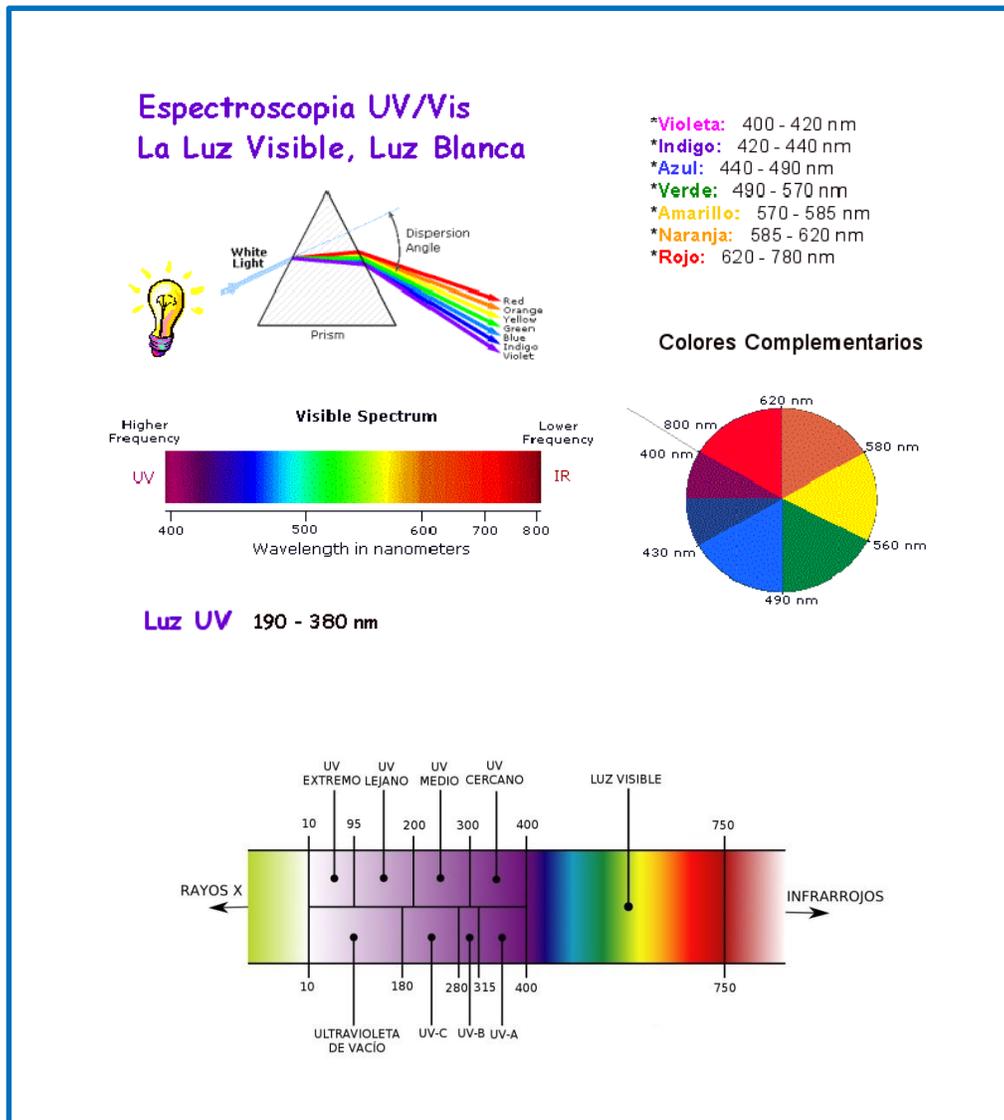


Figura II-4. Diagrama de las principales longitudes de onda. (8)



3.- Materiales de Referencia.

Material o sustancia para el cual el valor de una o de varias de sus propiedades es lo suficientemente homogéneo y bien establecido para ser usado en la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición o para la asignación de valores a los materiales.

Un MR puede presentarse bajo la forma de gas, líquido o sólido puro o mezclado. Por ejemplo el agua para la calibración de viscosímetros, el zafiro para la calibración de capacidad térmica en calorimetría y las disoluciones utilizadas para la calibración en análisis químicos. (1)

3.1.- Material de referencia certificado.

El material de referencia certificado es el que va acompañado de un certificado (que emite un organismo autorizado para producir materiales de referencia) para el cual el valor de una o de varias de sus propiedades se ha certificado por medio de un procedimiento que establece su *trazabilidad* a una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel de confianza declarado.

Los MRC son preparados generalmente en lotes para los cuales los valores de la propiedad son determinados, dentro de los límites de incertidumbre establecidos, mediante mediciones realizadas sobre muestras representativas de lotes completos.

Algunos MR y MRC tienen propiedades, las cuales no pueden ser correlacionadas con una estructura química establecida o por otras razones, no pueden ser determinadas por métodos de medición físicos o químicos definidos exactamente. Dichos materiales incluyen ciertos materiales biológicos tales como las vacunas a las cuales se les ha asignado una unidad internacional por la Organización Mundial de la Salud. (1)

3.1.1.- Certificado de Material de referencia.

Procedimiento que establece el (los) valor (es) de una o varias propiedades de un material o sustancia, por un proceso que asegura la trazabilidad a una realización exacta de las unidades en las cuales se expresan los valores de la propiedad y que lleva a la emisión de un certificado. (1)

3.2.- Características de los materiales de referencia.

Los MR y los MRC hacen posible la transferencia de los valores medidos o asignados de magnitudes (físicas, químicas, biológicas o tecnológicas) de un lugar y otro. Ellos son ampliamente usados para la calibración de instrumentos de medición, para la evaluación de métodos de análisis o ensayos y para el aseguramiento de la calidad a largo plazo de las mediciones y en el caso de ciertos MR biológico y tecnológico, para permitir expresar convenientemente las propiedades en unidades



arbitrarias. Todas las clases de MR y MRC están jugando un papel cada vez más importante en actividades de Normalización Nacional e Internacional, en ensayos de aptitud y en la acreditación de laboratorios. (1)(9)

Se usan MR para apoyar las mediciones relacionadas con composición química, propiedades biológicas, clínicas, físicas y de ingeniería así como áreas mixtas tales como sabor y olor. Ellos pueden caracterizarse para “identidad” (por ejemplo: estructura química, tipo de fibra, especies microbiológicas, etc.) o para “valores de propiedad” (por ejemplo, cantidad de entidad química especificada, dureza, etc.). Algunos tipos de materiales de referencia normalmente disponibles son los siguientes:

1. Sustancias puras caracterizadas para pureza química y/o impurezas (trazas).
2. Soluciones normalizadas y mezclas de gas, a menudo preparadas gravimétricamente a partir de sustancias puras y usadas para propósitos de calibración.
3. Materiales de referencia matrices, caracterizados por la composición del constituyente químico especificado mayor, menor o cantidad de trazas. Dichos materiales se pueden preparar a partir de matrices que contienen los componentes de interés o preparando mezclas sintéticas.
4. Materiales de referencia físico-químicos caracterizados para propiedades tales como punto de fusión, viscosidad y densidad óptica.
5. Objetos o artefactos de referencia caracterizados para propiedades funcionales como sabor, olor, número de octano, punto de inflamación y dureza. Este tipo también incluye especímenes de microscopía caracterizados para propiedades que van desde tipo de fibra a especímenes microbiológicos. (2)

3.3.- Usos y selección de MRC.

Los MRC deben ser usados sobre una base normalizada para asegurar mediciones confiables, por lo que se requiere que el usuario esté familiarizado con toda la información pertinente sobre el uso del MRC tal y como se especifica en su certificado. El usuario debe respetar el periodo de validez, las condiciones prescritas de almacenamiento, las instrucciones de uso y las especificaciones para la validez de las propiedades certificadas. Un MRC no debe usarse para otro propósito más que para el cual fue propuesto, es decir que un MRC usado apropiadamente para un propósito en un laboratorio puede ser no apropiado para otro propósito en otro laboratorio. Se recomienda que el usuario considere la conveniencia de un MRC para su propósito en cada caso.

Una de las consideraciones más importantes en la selección de un MRC para su uso, ya sea en la evaluación de la veracidad y precisión de un método o en la calibración de instrumentos en un método, es el nivel de incertidumbre requerido según el uso final del método. Obviamente el usuario no deberá utilizar un MRC de mayor incertidumbre que la permitida según el uso final. En la selección del MRC deben tomar en cuenta no solamente el nivel de incertidumbre requerido para el propósito deseado sino también su disponibilidad, costo y conveniencia física y química.



Los siguientes criterios técnicos se aplican para la adecuada selección según sean los propósitos de los MRC en general:

- El MRC y sus valores de propiedad, deben ser estables por un lapso de tiempo aceptable, bajo las condiciones reales de almacenamiento, transporte y uso.
- El MRC debe ser homogéneo de tal forma que los valores medidos de las propiedades sobre una de las porciones del lote deberá aplicar a cualquier otra porción del lote dentro de límites de incertidumbre aceptables; en caso de heterogeneidad en un gran lote, puede ser necesario certificar cada unidad del lote por separado.
- El valor de la propiedad del MRC debe haber sido establecido con una incertidumbre adecuada para el fin a que está destinado el MRC.
- La documentación clara que concierne al MRC y valores de sus propiedades deben estar disponibles. Los valores de las propiedades deben haber sido certificados, así que la documentación debe incluir un certificado.
- El MRC debe ser semejante (en matriz) a las muestras reales a ser analizadas, con el fin de incluir todos los problemas analíticos que pudieran causar errores en las mediciones. El usuario debe aplicar al material de referencia, el mismo procedimiento analítico utilizado para su muestra desconocida.
- El MRC debe tener propiedades al nivel apropiado para el cual, el proceso de medición pretende ser usado, por ejemplo la concentración.
- El MRC debe ser usado en el mismo estado de agregación que la muestra a medir.
- La cantidad del MRC debe ser suficiente para el programa experimental completo, incluyendo algunas reservas si se considera necesario. Evitar tener nuevos lotes adicionales en un proceso de medición dado. (7)

3.4.- Informe de certificación

Documento que proporciona información detallada, complementaria a la contenida en un certificado, por ejemplo, la preparación del material, los métodos de medición, los factores que afectan la exactitud, el tratamiento estadístico de los resultados y la forma en la cual se estableció la trazabilidad. (1)

3.5.- Etapas de producción de un MR y MRC.

La normatividad vigente establece que previo a la comercialización de un MR Y MRC se deberán realizar las siguientes actividades descritas en la figura II-5

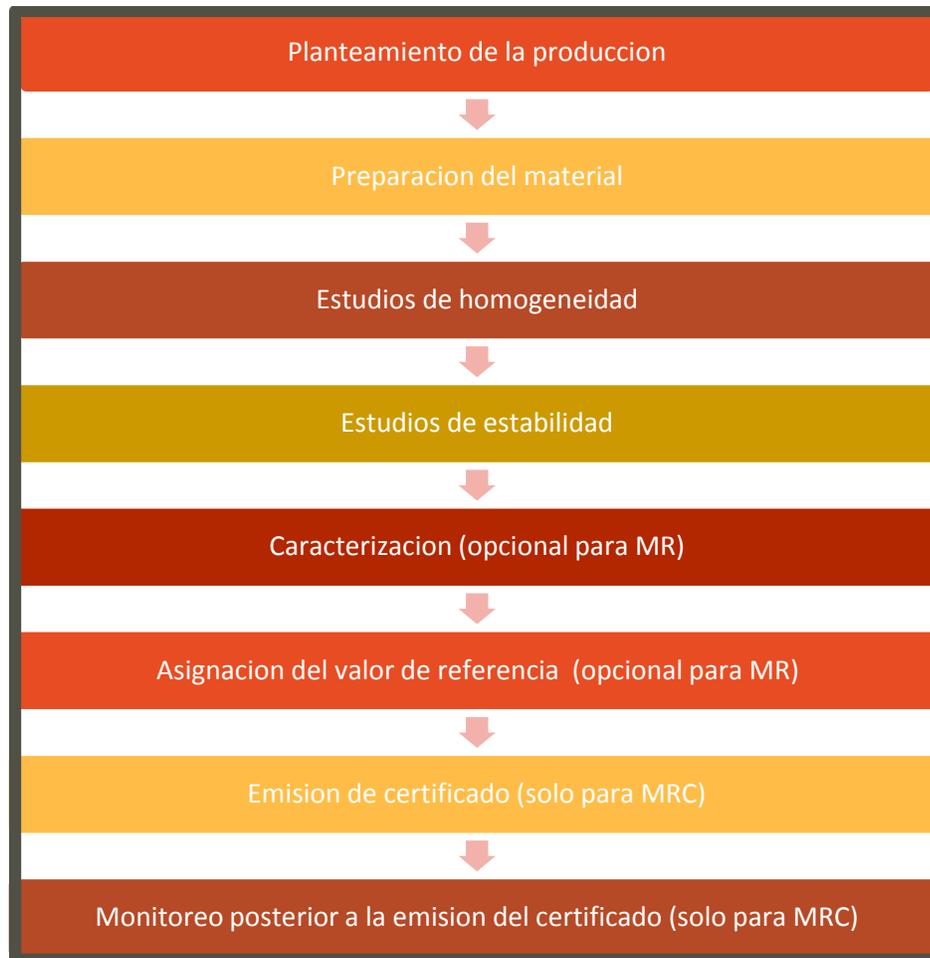


Figura II-5. Actividades realizadas previas a la comercialización de un MR y MRC.

3.6.- Organismo de certificación

Organismo técnicamente competente (organización o compañía, pública o privada) que expide un certificado de un material de referencia. Puede ser el mismo organismo o uno diferente, el que distribuye (por ejemplo el organismo que pone a disposición el material de referencia certificado) y el que realiza los ensayo (o sea la organización que lleva a cabo las mediciones dirigidas hacia la certificación). (1)



3.7.- Productor del material de referencia

Organismo técnicamente competente (organización o empresa, pública o privada) que es totalmente responsable de asignar el valor certificado o el valor de otra propiedad de los materiales de referencia que produce y distribuye, los cuales han sido producidos de acuerdo con la norma mexicana NMX-CH-161-IMNC-2006 y la ISO Guide 35. (10)

3.7.1.- Colaborador

Organismo técnicamente competente (organización o empresa, pública o privada) que se responsabiliza de aspectos de manufactura o caracterización del material de referencia (certificado) en representación del productor del material de referencia, ya sea en forma contractual (como contratista) o voluntaria. (10)

4.- Patrón primario

Patrón que es designado o reconocido ampliamente por tener las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor es aceptado sin referencia a otros patrones de la misma magnitud, dentro de un contexto específico. (1)

4.1.- Patrón secundario

Patrón cuyo valor es asignado por comparación con un patrón de la misma magnitud. La mayoría de los MRC caen dentro de esta categoría puesto que la certificación de los valores de la propiedad usualmente se lleva a cabo por un procedimiento que establece trazabilidad a un patrón primario. (1)

5- Incertidumbre (de medición).

La naturaleza nos impide conocer con certeza absoluta el valor verdadero de una magnitud siempre nos quedamos con cierto grado de incertidumbre (U) y esta aumenta a cada paso u operación que se lleva a cabo para determinar un valor de medición. La palabra incertidumbre significa duda en la validez del resultado de una medición. La incertidumbre de medición se define como el parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando. (11)

La incertidumbre del mensurando de una medición refleja la falta de conocimiento exacto del valor del mensurado. El resultado de una medición después de la corrección por efectos sistemáticos reconocidos es, aun, solo un estimado del valor del mensurando debido a la presencia de

incertidumbre por efectos aleatorios y de correcciones imperfectas de los resultados por efectos sistemáticos. En la figura II-5 se esquematiza el concepto de incertidumbre. (11)

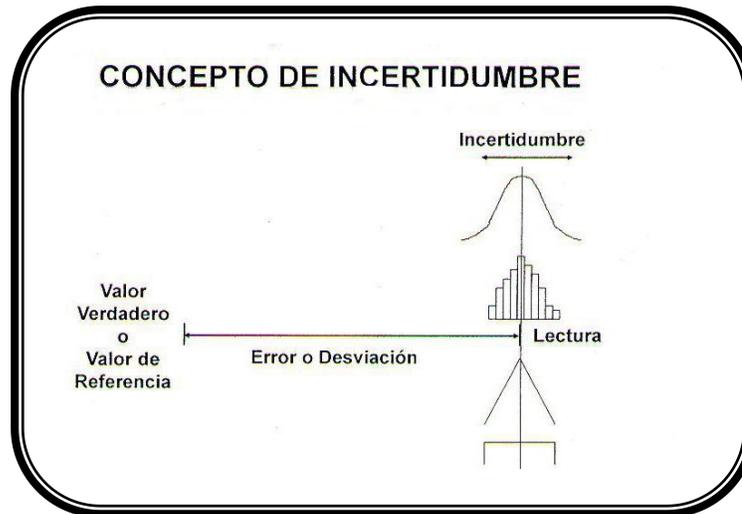


Figura II-5. Explicación gráfica del concepto de incertidumbre.
El nivel de incertidumbre apropiado para cada mesurando depende de las necesidades de cada laboratorio en particular.

En la práctica, existen muchas fuentes posibles de incertidumbre en una medición, incluyendo:

- Definición incompleta del mesurando.
- Realización imperfecta de la definición del mensurando.
- Muestreos no representativos -la muestra medida puede no representar el mensurando definido.
- Conocimientos inadecuados de los efectos de las condiciones ambientales sobre las mediciones o mediciones imperfectas de dichas condiciones ambientales.
- Errores de apreciación del operador en la lectura de instrumentos analógicos.
- Resolución finita de instrumento o umbral de discriminación finita.
- Valores inexactos de patrones de medición y materiales de referencia.
- Valores inexactos de constantes y otros parámetros obtenidos de fuentes externas y usando en los algoritmos de redacción de datos.
- Aproximaciones y suposiciones incorporadas en los métodos y procedimientos de medición.
- Variaciones en observaciones repetidas del mensurando bajo condiciones aparentemente iguales. (11)

El método ideal para evaluar y expresar la incertidumbre del resultado de una medición debe ser:

- Universal: el método debe ser aplicable a cualquier tipo de mediciones y a cualquier tipo de datos utilizados en las mediciones.



La cantidad utilizada para expresar la incertidumbre debe ser:

- Internamente consistente: debe poder obtenerse directamente a partir de los componentes que contribuyen a ella; asimismo debe ser independiente de la forma en que dichos componentes se agrupan y del método en que estas se descomponen en subcomponentes.
- Trasferible: debe ser posible utilizar directamente la incertidumbre evaluada para un resultado, con un componente, al evaluar la incertidumbre de otra medida en la cual se utiliza el primer resultado.

6.- Trazabilidad

El término trazabilidad se refiere a la propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón tal que estos pueden ser relacionados con una incertidumbre indicada, con valores de referencia establecidos, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones. La cadena ininterrumpida de comparaciones es llamada cadena de trazabilidad. La trazabilidad de especies químicas, es frecuentemente de igual o mayor importancia que la trazabilidad de la calibración de los instrumentos usados en el análisis. (1)

La caracterización de un MRC (es la determinación de uno o más valores de las propiedades físicas, químicas, biológicas o tecnológicas que son relevantes para su uso final previsto), debería idealmente ser trazable al Sistema Internacional de Unidades (SI) o a una escala de medición internacionalmente acordada.

Los materiales de referencia son herramientas importantes para la transferencia de la exactitud de la medición entre los laboratorios y sus valores de propiedad deberían, cuando sea factible, ser trazables al SI. La trazabilidad es, sin embargo, un concepto relativamente nuevo en el campo de la medición química y como consecuencia, muy pocos materiales de referencia químicos son explícitamente trazables al SI. Una jerarquía de métodos, sin embargo, se usa para asignar valores de propiedad a materiales y aun cuando no se haya declarado, su trazabilidad puede ser descrita como en la tabla II-1.

Método de medición	Trazabilidad
Método primario	SI
Método de sesgo conocido	SI / Patrón Internacional
Método (s) independiente (s)	Resultados de métodos especificados
Comparación Interlaboratorio	Resultados de métodos especificados

II-1. Descripción de la trazabilidad de los materiales.

A veces se emplea una combinación de procedimientos para asignar el valor, tal como un valor de consenso derivado de una comparación Interlaboratorio donde se usaron métodos primarios. En ausencia de trazabilidad formalmente declarada será necesario para el usuario hacer juicios acerca de la trazabilidad implícita, basada en los datos disponibles en informes y literatura técnica.



Es importante asegurar que las interferencias químicas y efectos de la matriz se traten adecuadamente para llegar al valor certificado y su incertidumbre. Niveles desconocidos de sesgo no son raros y contribuyen a la falta de acuerdo de mediciones.(2)

7.- Estudios de homogeneidad

Un estudio de homogeneidad es necesario en los proyectos de certificación por lote para demostrar que el lote de unidades es lo suficientemente homogéneo. La homogeneidad es la condición de tener estructura o una composición uniforme con respecto a una o más propiedades especificadas. Se dice que un material de referencia es homogéneo con respecto a una propiedad especificada si el valor de la propiedad, determinado por ensayos en muestras de tamaño especificado, se encuentra dentro de los límites de incertidumbre definidos, aunque las muestras sean tomadas de diferentes unidades de abastecimiento (botellas, paquetes, etc.) o de una sola unidad de abastecimiento. (1)

La mayoría de los MR son preparados como lotes de unidades (ejemplo, botellas, viales o piezas de prueba). El paso final de la preparación de muchos MR es la subdivisión a unidades utilizables. Un subconjunto del lote de unidades, se elige por un plan de muestreo para someterse a un estudio de homogeneidad.

El estudio de homogeneidad se realiza a un número representativo de unidades elegidas en forma aleatoria, sistemática o estratificada. Los planes del muestreo aleatorio o muestreo aleatorio estratificado son ampliamente utilizados en la práctica y normalmente proporciona un subconjunto que puede considerarse como representativo de todo el lote. Si se asegura que la no homogeneidad no es detectada en el lote, se pueden utilizar también los planes de muestreo sistemáticos. El plan de muestreo utilizado para seleccionarlas botellas (unidades) para el estudio de homogeneidad puede ser aleatorio, aleatorio estratificado o en algunos casos, sistemático. El plan de muestreo debería tomar en consideración la debilidad potencial en el método de preparación de las muestras, permitiendo así una revisión crítica del lote preparado. La estratificación es recomendada en muchas situaciones, ya que esto garantiza que las botellas seleccionadas para el estudio de homogeneidad estén distribuidas equivalentemente en todo el lote. Los planes sistemáticos pueden aplicarse cuando no hay prácticamente riesgo de pasar por alto los efectos sistemáticos o las tendencias en el lote (12).

Otro tipo de no homogeneidad es aquella que se da dentro de botellas, el impacto de este puede reducir considerablemente proporcionando las instrucciones adecuadas para el uso del MR. Estas instrucciones pueden incluir el re-mezclado de la muestra y, para granulados, una toma mínima de muestra, que cuando se toma correctamente, puede considerarse representativa del MR dentro del valor certificado.

Los MR preparados con disoluciones de compuestos puros se espera que tengan un alto grado de homogeneidad sobre las bases físicas. Estos materiales pueden, sin embargo, mostrar también alguna heterogeneidad por ejemplo, debida al gradiente de densidad o metales que contienen gases ocluidos. El objetivo de la prueba de homogeneidad para estos materiales es principalmente para detectar



cualquier impureza, interferencia o irregularidad que pueda deberse a problemas no detectados durante la preparación. En estos casos se espera una muy pequeña, si no es que insignificante, contribución a la incertidumbre del estudio de homogeneidad entre botellas. Aunque estos casos, en donde puede asumirse una perfecta homogeneidad, tal suposición debería verificarse experimentalmente por un estudio de homogeneidad. (9) idealmente, un MR debería caracterizarse con respecto al grado de no homogeneidad para cada propiedad de interés. Para los MR con un número relativamente grande de propiedades a ser certificadas, la estimación del grado de no homogeneidad para todas las características puede ser agobiante física y económicamente, y en algunos casos inalcanzables, sin embargo, deberá darse cuenta que la calidad de los MR producidos depende (entre otras cosas) de la estimación correcta de la homogeneidad del lote.

En la práctica, el grado de homogeneidad de las tales MR puede ser (bajo ciertas condiciones) estimado solo para las características seleccionadas cuando el enfoque elegido no sea viable. Es esencial que las características sean adecuadamente seleccionadas con base a las relaciones físicas y químicas establecidas; por ejemplo, la correlación de un inter-elemento en las fases del mineral de un MR, hace razonable la suposición de que el MR también tiene un grado similar de homogeneidad para los elementos no seleccionados.

En todos los casos, debería obtenerse evidencia adicional acerca de la homogeneidad de las propiedades no cubiertas experimentalmente por el estudio de homogeneidad. Tal evidencia puede obtenerse, por ejemplo, de la literatura, a través del estudio de estabilidad, o de la caracterización del material. La evidencia así obtenida deberá permitir transferir cuantitativamente de la magnitud de la no homogeneidad observada de una característica a otra, con evidencia suficiente de que el grado de no homogeneidad no sea sub-estimado (12).

El proceso de evaluación de la homogeneidad debe documentarse y realizarse de acuerdo con procedimientos estadísticos aceptados. (10)

Solamente después de que se ha demostrado la homogeneidad puede realizarse un estudio de estabilidad.

8.- Estudio de estabilidad

La estabilidad es la capacidad de un material de referencia, cuando se almacena bajo condiciones especificadas, para mantener el valor de una propiedad declarada dentro de los límites especificados por un periodo de tiempo establecido.(10)

La prueba de estabilidad tiene como objetivos el determinar el grado de inestabilidad del candidato a material de referencia después de su preparación o confirmar la estabilidad del mismo, incluso en algunos casos, los materiales que se consideran más estables, pueden demostrar inestabilidad para uno a más valores de sus propiedades.



Existen dos tipos de inestabilidades que pueden ser consideradas en el certificado del material de referencia:

- La estabilidad de largo plazo del material (por ejemplo vida de anaquel)
- La estabilidad de corto plazo (por ejemplo la estabilidad del material bajo condiciones de transporte). (12)

La estabilidad a largo plazo de un material de referencia es asociada con el comportamiento del MR en el almacén del productor. La estabilidad a corto plazo es asociada con cualquier efecto extra debido al transporte de las muestras. Para la validación de la incertidumbre establecida en el certificado del MRC, es tan importante una correcta estimación del efecto debido a ambas estabilidades, como la correcta evaluación de la no homogeneidad del lote, la validación de la incertidumbre que se plasma en el certificado debe ser demostrable y es de gran importancia conocer, qué pasaría con las muestras, si las condiciones apropiadas de transporte no se mantienen. Por tanto los estudios de estabilidad no solo conducen a evaluar la incertidumbre de la medición asociada con la estabilidad del material, sino que también deben ser capaces de especificar las condiciones de almacenamiento y transporte adecuadas (12).

Diseño experimental

Hay dos experimentos básicos de distribución para el estudio de estabilidad

- Estudio de estabilidad clásico
- Estudio de estabilidad isócrono

A efecto de ganar información acerca de las condiciones apropiadas de almacenamiento y a la necesidad de tomar precauciones durante el transporte, se seleccionó un estudio que dura aproximadamente dos meses, en caso de hacer variables que afecten el estudio este se puede extender de 6 a 12 meses para obtener información adicional acerca de la estabilidad a largo plazo, la experiencia ha mostrado que dos semanas es conveniente, aunque puede existir excepciones. En cualquier caso, el estudio de estabilidad a corto plazo, debería incluir las temperaturas que puedan presentarse durante el transporte por un periodo que sea al menos, tan prolongado que sea permitido para el transporte del MRC, si tal periodo, está restringido a por lo menos 3 semanas, sería suficiente de 3 a 4 semanas para el estudio de estabilidad en el corto plazo.

9.- *Análisis de tendencia*

El primer paso en la evaluación de datos provenientes de un estudio de la estabilidad es verificar si se puede observar alguna tendencia en los datos. Para pequeños problemas de inestabilidad donde el mecanismo cinético subyacente se desconoce, resulta apropiada la aproximación al modelo lineal, en casos donde un mecanismo bien definido es la razón para la inestabilidad, tal modelo se prefiere sobre el modelo lineal (empírico).



Las matemáticas son un tanto más complejas para otros modelos que el de la línea recta, pero la evaluación corre de la misma forma, usando el estadístico F para probar la significancia de la tendencia.

9.1.- Muestra

Cantidad representativa de un material extraído de un lote de un material. El método de extracción de una muestra debería asegurar que esta es representativa del lote con respecto a la propiedad o propiedades que están siendo investigadas. El término puede ser usado para cubrir ya sea una unidad de abastecimiento o una porción para análisis. (1)

9.2.- Estimación

Operación de asignar valores numéricos, a partir de resultados de un ensayo en una muestra, a los parámetros de una distribución seleccionados según el modelo estadístico de la población de la cual se toma dicha muestra. (7)

9.3.- Hipótesis nula

Hipótesis a ser rechazada o no rechazada (aceptada) como resultado de una prueba estadística. (7)

10.- Calibración

Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones, efectuando una corrección del instrumento de medición para llevarlo a las condiciones iniciales de funcionamiento. (3)

Una verificación periódica de que no han cambiado las condiciones del instrumento en una forma significativa. (3)

11.- Método primario

Un método primario es un método con las más altas calidades metrológicas, cuya operación puede ser completamente descrita y comprendida y para el cual se puede establecer completamente la incertidumbre en términos de unidades SI. Un método primario directo mide el valor de una cantidad desconocida sin una referencia a un patrón de la misma cantidad. Un método primario relativo mide la relación entre una cantidad desconocida en relación a un patrón de la misma magnitud; su operación

debe estar completamente descrita por una ecuación de medición. Los métodos identificados como potencialmente métodos primarios son: espectrometría de masa por dilución isotópica; gravimetría, cubriendo mezclas gravimétricas y “análisis gravimétrico”; titulación; colorimetría; determinación de la depresión del punto de congelamiento; colorimetría diferencia de barrido y espectroscopia por resonancia magnética nuclear. Otros métodos tales como la cromatografía con extensas aplicaciones en análisis químico orgánico también han sido propuestos. (2)

12.- Medición

A menudo una operación de medición sirve para más de un propósito de calidad y puede haber superposición de funciones como se ilustra en Figura II-6. Se requieren diferentes tipos de materiales de referencia para funciones diferentes. Por ejemplo, un material de referencia certificado podría ser deseable para la validación del método, pero un material de referencia podría ser adecuado para control de calidad en un trabajo.

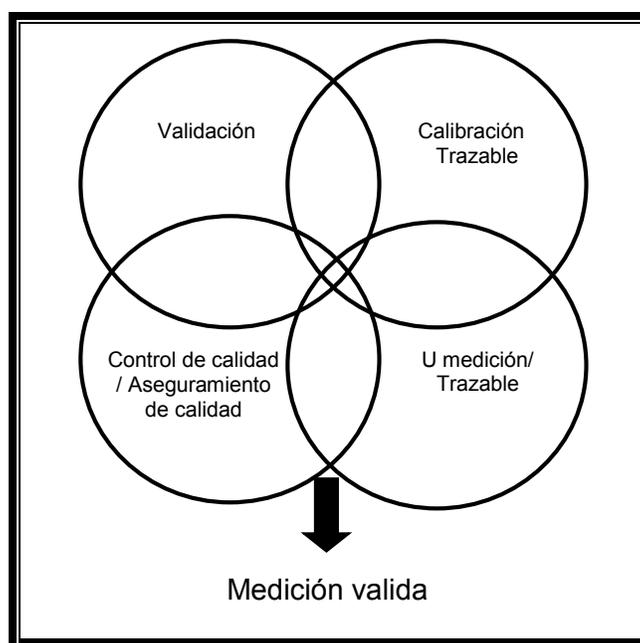


Figura II-6: Superposición entre funciones asociadas con la trazabilidad de la medición y la calidad analítica

Orientaciones más detalladas sobre el aseguramiento de la calidad de mediciones químicas, incluyendo materiales de referencia, calibración, control de calidad y validación se encuentran cubiertos en una guía conjunta de CITAC y Eurachem (2).



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Hoy en día, en México no se cuenta con un material de referencia para la determinación de sustancias activas al azul de metileno para análisis en aguas y aguas de desecho, que es realizada por los laboratorios de control ambiental acreditados en el análisis de aguas.

El CENAM que es una de las instancias nacionales encargadas de proveer a los distintos laboratorios de MR y MRC; dicha instancia consiente de la necesidad de contar con un MRC confiable para la determinación de SAAM que satisfaga y facilite a los laboratorios el análisis, ha preparado un lote piloto de disolución de Ácido dodecil bencen sulfonato de sodio como candidato a MRC, el cual deberá ser evaluado antes de su comercialización.

Cuando se pretende producir un MRC, previo a su comercialización, tal como lo establece la normatividad vigente, este se debe someter a una amplia serie de estudios que garanticen la integridad de las características tanto físicas como químicas con las que este cuenta.

Dos de las características de relevante importancia para los MRC son la Homogeneidad y la Estabilidad. La Homogeneidad nos permite establecer la uniformidad en estructura o composición de uno o más de las propiedades especificadas del MRC y la Estabilidad se refiere a la capacidad con que este cuenta en un periodo de tiempo establecido, para mantener el valor declarado en alguna de sus propiedades (concentración, dureza, entre otras)

Ambas propiedades pueden ser establecidas al realizar un Estudio de Homogeneidad y un Estudio de Estabilidad respectivamente, como se determinó en el presente trabajo y con ello contribuir al mejor conocimiento de las características y comportamiento de dicha disolución y con ello a la integración de los requerimientos necesarios para la producción de un MRC.



IV. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Desarrollar la metodología para someter a un Estudio de Homogeneidad y un Estudio de Estabilidad, una disolución de Ácido dodecil bencen sulfonato de sodio (lote: DES-70 preparado por el CENAM) como candidato a material de referencia para la determinación SAAM.

Objetivos particulares:

- Desarrollar un estudio de homogeneidad para la disolución lote DES-70.
- Desarrollar un estudio de estabilidad para la disolución lote DES-70 por un periodo de cinco meses, sometiendo a tres diferentes condiciones de temperatura (4°C, 20°C y 40°C).
- Determinar el valor de incertidumbre de la medición para el estudio de homogeneidad y estudio de estabilidad respectivamente.

V. HIPÓTESIS:

Al realizar el Estudio de Homogeneidad a la disolución, lote DES-70, se demostrara que existe una suficiente homogeneidad entre los diferentes envases que la contienen, por lo tanto se podrá proceder a realizar el Estudio de Estabilidad; la disolución permanecerá estable en su concentración a la temperaturas de 4°C y 20°C y disminuirá su concentración a 40°C después de un periodo de exposición de 5 meses, que es el tiempo que durará el estudio.



VI. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Tipo de estudio:

El diseño planteado se realiza considerando un estudio de estabilidad clásico de acuerdo a lo señalado en la guía 165-NMX-CH.INMC. (12)

Población de estudio:

Disolución de Ácido dodecil bencen sulfonato de sodio lote DES-70 con una concentración aproximada de 85 mg/L dividida en 15 frascos de vidrio ámbar conteniendo 125 mL cada una, protegidas con bolsa plástica transparente, seguida de bolsa metálica, ambas cerradas herméticamente.

Criterios de inclusión:

Disolución de Ácido dodecil bencen sulfonato de sodio, lote DES-70 dividida en 15 frascos de vidrio ámbar de 125mL, protegidas con bolsa plástica transparente, seguida de bolsa metálica, ambas cerradas herméticamente.

Criterios de exclusión:

- Cualquier sustancia ajena al lote DES-70.
- Frascos de la disolución que durante su manipulación no hayan conservado las condiciones de temperatura establecidas en el diseño del estudio.
- Sustancias que durante su manipulación hayan sido contaminadas física o químicamente.

Variables:

- Condiciones de temperatura durante el almacenamiento de las muestras (4, 20 y 40°C).
- Tiempo de exposición a condiciones de temperatura (5 meses).



VII. MATERIALES Y MÉTODO (METODOLOGÍA)

Se mencionan solo los materiales y equipos de relevancia para el presente trabajo.

- Matraces volumétricos de 50 y 100 mL.
- Embudos de separación de 500 y 250 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL
- Bureta graduada de 50 mL.
- Probetas graduadas de 25 y 50 mL.
- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda Bio20 disponible para ser utilizado de 200 a 900 nm y equipado con una celda de cuarzo con un paso óptico de luz de 1.0 cm.
- Balanza analítica Mettler Toledo AB204 con una precisión de 0,1 mg.
- Horno, marca Felisa con un rango de temperatura de 0-250°C.
- Cloroformo (CHCl_3)
- Sulfonato de alquilbenceno lineal (SAL)
- Azul de metileno
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- Fosfato de sodio dihidrogenado monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Fenolftaleína
- Fibra de vidrio. Pre-lavada con cloroformo
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Todo el material volumétrico utilizado para la realización del presente trabajo es clase A con certificado, como lo establece la normatividad vigente (2), para evitar un incremento en la incertidumbre de los resultados obtenidos. Cabe mencionar que solo será utilizado para la realización de este estudio con la finalidad de que las muestras no sean contaminadas durante su manipulación. Todo el material de vidrio debe estar libre de ralladuras y marcas de corrosión, dada la tendencia de las superficies activas a los materiales a absorber este tipo de sustancias. Su calibración fue verificada por el analista.

Los equipos utilizados cuentan con un certificado de calibración vigente, además de ser verificados periódicamente para garantizar su óptimo funcionamiento.

Todos los productos químicos usados deben ser grado reactivo analítico.



El agua con la que se prepararon las disoluciones utilizadas en el desarrollo del método y para realizar las diluciones del lote DES-70, cuenta con las siguientes características; como lo establece la NMX-AA-039-SCFI-2001 (2):

- a) Resistividad, megohm-cm a 25°C: 0,2 min;
- b) Conductividad, MS/cm a 25°C: 5,0 Máx.
- c) pH: 5,0 a 8,0.

El lote de disolución DES-70 fue preparado para evaluar la factibilidad de producir un material de referencia, el cual fue dividido en 15 envases de 125 mL a los cuales se les asignó un número, posteriormente fueron utilizadas en el Estudio de Homogeneidad y en el Estudio de Estabilidad como se describen en la tabla VII-1.

Lote: DES-70							
Analito	Condiciones de almacenamiento previo al estudio	Empaque	Presentación	Unidades enviadas	Uso	Número que identifica a los envases utilizados	Condiciones de almacenamiento durante el estudio
Ácido dodecil bencen sulfonato de sodio	Refrigeración a 4°C	Bolsa de polietileno y bolsa aluminizada	Disolución en envase de vidrio ámbar de 125 mL	15	Homogeneidad	1, 6, 11, 14,19, 24	4°C
					Estabilidad	5,15,20	4°C
						10,16,23	20°C
						3,7,9	40°C

Tabla VII-1.- Especificaciones del estudio de homogeneidad y estabilidad de la disolución.

Previo a realizar los análisis de las muestras asignadas para los Estudio de Homogeneidad y de Estabilidad se realizó un test microbiológico para descartar la presencia de hongos (los agentes surfactantes son susceptibles de contaminación únicamente por hongos, por lo que no es necesario realizar un test para el aislamiento de bacterias o parásitos) a la disolución DES-70 y a un blanco simultáneamente. En el caso específico del Estudio de Estabilidad se realizó dicha actividad cada vez que se muestreo la disolución

El test se realizó en “Placas Petrifilm 3M para el recuento de Mohos y Levaduras YM” que es un sistema de medio de cultivo listo para usarse, que contiene nutrientes de Sabouraud, dos antibióticos,



un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de fosfato (BCIP) que promueve el contraste y facilita el recuento de colonias.

El estudio de estabilidad de la disolución DES-70 se llevó a cabo en un periodo de 5 meses. Comenzando con un muestreo inicial, (tiempo 0) y posteriormente se sometieron a condiciones de temperatura establecidas.

1. El método de análisis para los estudios tanto de Homogeneidad como de Estabilidad, fueron basados en la norma NMX-AA-039-SCFI-2001 denominada “Análisis de agua, Determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas”, el cual se describe a continuación.

1.1. Preparación de curva de calibración: Se prepararon una serie de estándares en matraces volumétricos de 100 mL con la disolución patrón de Sulfonato de alquil benceno lineal (1 mg/mL) en el intervalo de 0.01-0.20 mg, (incluir un blanco de reactivos) diluyendo con agua des-ionizada.

1.2. Extracción:

1.2.1. Se colocaron los anteriores volúmenes de los estándares de forma independiente en embudos de separación de 500mL.

1.2.2. Se acidificaron con ácido sulfúrico al 7.0% y mezclaron con disolución de azul de metileno.

1.2.3. Se extrajeron de cada embudo los pares iónicos con dos lavados con cloroformo. (Azul de metileno-surfactante)

1.2.4. Se realizó una tercera extracción lavando los extractos de cloroformo con solución ácida de fosfatos.

1.2.5. Se transfirió la fase orgánica a través de un embudo con lana de vidrio a matraces volumétricos de 100 mL.

1.2.6. Se completaron los volúmenes del aforo con cloroformo.

1.2.7. Se determinaron las absorbancias de las soluciones en el espectrofotómetro ultravioleta-visible marca: Perkin Elmer modelo: Lambda Bio 20, usando una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso de haz de luz, a la longitud de onda de 652 nm, realizando por triplicado la lectura de cada concentración.

2. Previo a realizar los estudios de homogeneidad y estabilidad, se llevó a cabo la validación del método.



3. Se procedió a evaluar la homogeneidad del lote. El proceso de medición se realizó manteniendo constante al analista, al instrumento de medición, la calibración y en un periodo de tiempo corto (en un mismo día).

3.1. De cada envase asignado en la tabla VII-1 para el estudio de homogeneidad, se tomaron 2 alícuotas (S1 y S2) y se realizaron las diluciones como se describen en la tabla VII-2.

Alícuota 1 (S1 y S2)	Aforo 1	Alícuota 2	Aforo 2
5 mL	50 mL	10 mL	100 mL

TablaVII-2.- Diluciones que se realizarán a los envases que contienen la disolución DES-70.

3.2. Se preparó un blanco con agua des ionizada y una solución control de concentración conocida.

3.3. Se realizó la extracción de las soluciones, tal como se describe en el punto 1.2.

3.4. Se calcularon en mg/L las concentraciones de SAAM obtenidas (ver Anexo A).

3.5. Se estimó la incertidumbre para cada concentración (ver Anexo B).

3.6. Se realizaron los cálculos estadísticos correspondientes para determinar si el lote es Homogéneo (ver página 33-38).

3.7. Debido a que se pudo comprobar la homogeneidad del lote, se procedió a realizar el Estudio de Estabilidad.

4. Para realizar el Estudio de Estabilidad se utilizaron los envases indicados en la Tabla VII-1 (ver página 25).

4.1. Se realizó un muestreo inicial antes de someter el lote a condiciones de temperatura de 4, 20 y 40°C.

4.2. Se muestreo mensualmente durante un periodo de tiempo de 5 meses.

4.3. Se realizó el análisis de las muestras, curva de calibración y soluciones control de acuerdo con lo descrito en la metodología para el estudio de homogeneidad.

4.4. Se estimó la incertidumbre para cada concentración (ver Anexo B).

4.5. Se realizaron los cálculos estadísticos correspondientes para determinar si el lote es Estable en las diferentes condiciones de temperatura a las que fueron sometidas (ver páginas 59-65).

VIII. DIAGRAMA DE FLUJO

El procedimiento general para la evaluación de los estudios de homogeneidad y estabilidad de la disolución DES-70, se esquematiza en la Figura VIII-1.

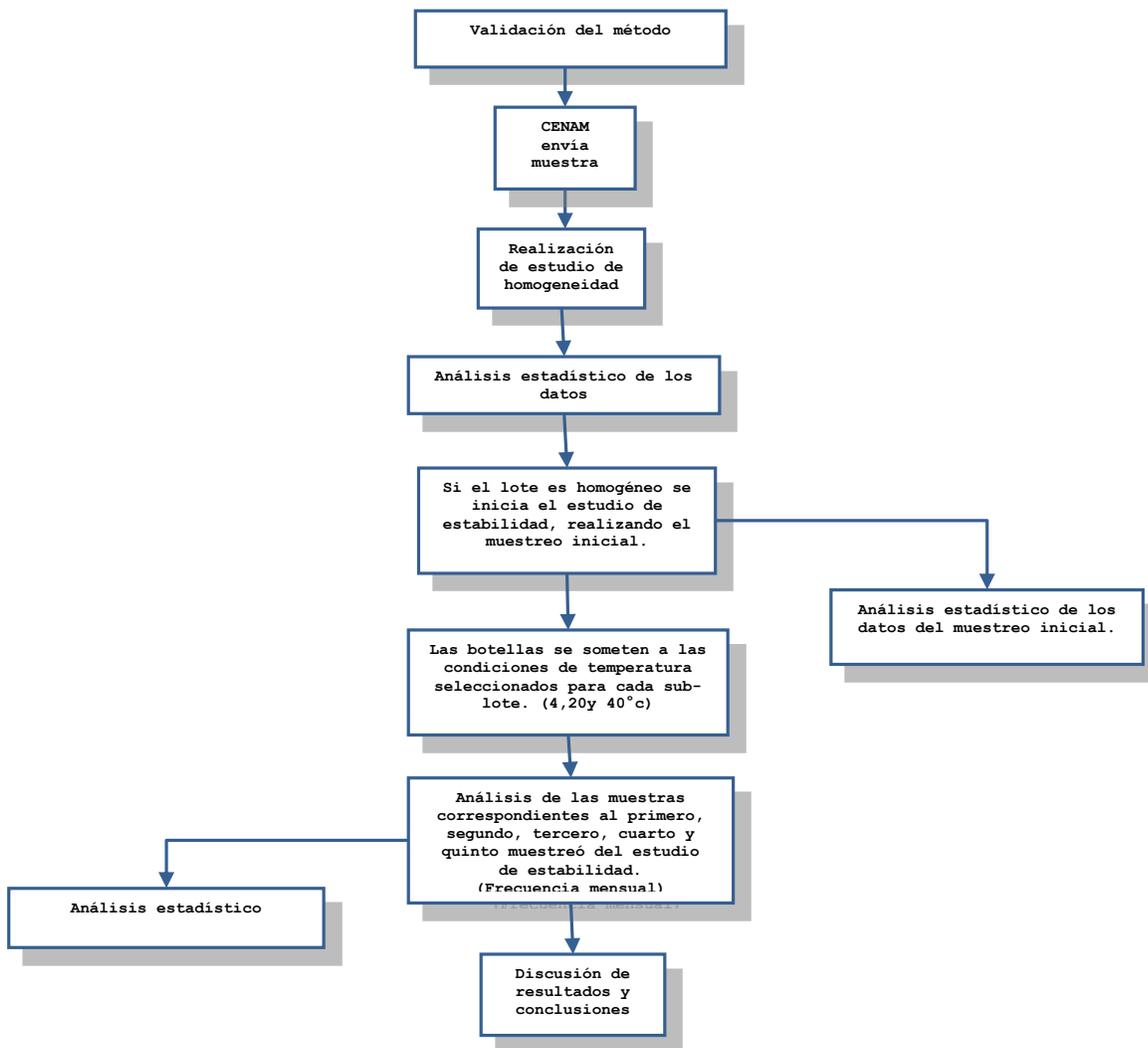


Figura VIII-1.- Descripción del desarrollo de los estudios de homogeneidad y estabilidad de la disolución DES-70



IX. DISEÑO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos por el Espectrofotómetro de UV-Vis cuando se leyeron las muestras tanto del Estudio de Homogeneidad como del Estudio de Estabilidad se trataron algebraicamente para calcular la concentración de las muestras tomando en cuenta las diluciones realizadas durante el análisis. Se calculó y expresó como SAAM la concentración del analito (ejemplo del cálculo en el apéndice A) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{SAAM, mg/L} = W * 1000/S$$

dónde:

W = son los mg/100 mL del analito en la muestra calculada a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración

S = son los mL de alícuota de la muestra

Se calculó la incertidumbre para el analito (ejemplo del cálculo en el apéndice B), según la “Guía Técnica Sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que Emplean la Técnica de Espectrofotometría de Ultravioleta-Visible” que establece el CENAM. Considerando las principales variables de impacto como son: (13)

- Curva de calibración
- Valor obteniendo para las muestras control
- Valor obteniendo para el blanco
- Peso del material de referencia de la balanza
- Factor de corrección
- Material volumétrico utilizado

Especificaciones del estudio de homogeneidad

Un modelo básico para el estudio de homogeneidad comprende $i = 1 \dots a$ botellas y $j = 1 \dots n$, mediciones puede ser expresado de la siguiente forma:

$$\xi_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

ξ_{ip} = resultado de una sola medición en el estudio

μ = esperanza matemática (media de medias cuando, número de mediciones repetidas tiende a infinito)

A_1 = varianza entre botellas

ε_{ip} = varianza de la repetitividad

Normalmente, puede asumirse que A_1 y ε_{ip} son independientes, esto es, la no homogeneidad entre botellas no influye en la repetibilidad de la medición o viceversa. Además, puede asumirse con frecuencia que la variable A_1 es distribuida normalmente, con una media de cero y una varianza σ^2 . Asimismo, puede asumirse que el error de medio aleatorio ε_{ip} es una variable distribuida normalmente con una media de cero y una varianza de σ^2 .

Para poder determinar la homogeneidad se realizó un Estudio de Homogeneidad entre botellas, en la figura IX-1 se representa el diseño de muestreo empleado, se seleccionarían botellas de manera aleatoria estratificada, pero incluyendo la primera y la última botella para poder detectar si hay una tendencia por el orden de llenado de las mismas. (12)

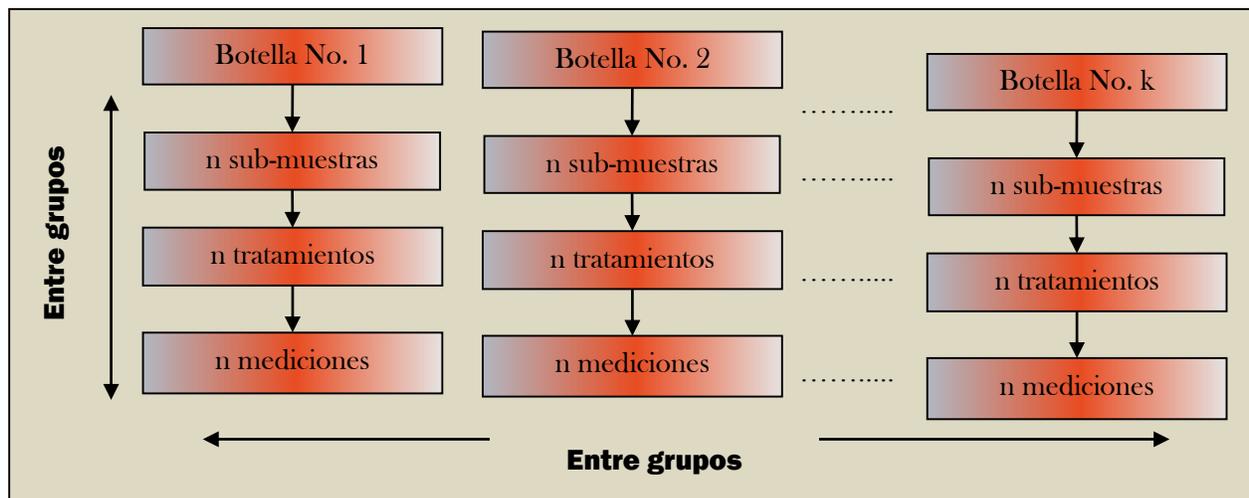


Figura IX-1. Diseño de un estudio de homogeneidad entre botellas: en el cual el sub-muestreo de las unidades es posible en este diseño, ya que múltiples porciones de muestra se han tomado de cada muestra del lote y transformado individualmente. La varianza “entre botellas” solo incluye la heterogénea entre botellas, mientras que la varianza “dentro de las botellas” incluye la incertidumbre debida a la medición, la transformación y el sub-muestreo. Esta es la situación ideal, desde una perspectiva de obtener un estimado no sesgado de la heterogeneidad del material.



Cabe mencionar que para este estudio en particular se utilizaron 6 botellas y de cada botella dos sub-muestras, a las cuales se les dio un tratamiento idéntico según norma NMX-AA-039-SCFI-2001 y se obtuvieron 5 mediciones de cada sub-muestra de las cuales se obtuvo un promedio.

Para poder concluir si el lote es homogéneo se utilizó el Análisis de Varianza que se describe en la tabla IX-1, debido a que se contaba con un lote formado por diferentes botellas. (14)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Tratamiento τ	$n - 1$ $i - 1$	$\frac{\sum Y^2 i}{n_i} - \frac{Y^2_{..}}{N} = \text{S.C.T.}$	$\frac{\text{S.C.T.}}{n - 1} = \text{M.C.T}$	$\frac{\text{M.C.T.}}{\text{M.C.E.}}$
Error experimental $E_j(i)$	$N - n$ $i_1 - i$ $i (i-1)$	$\sum \sum Y^2 ij - \sum Y^2 i = \text{S.C.E.}$	$\frac{\text{S.C.E.}}{N - n} = \text{M.C.E.}$	

Tabla IX-1. Diseño de experimentos completamente al azar con un criterio de clasificación.

Modelo: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{j(i)}$

S.C.T. = Suma de cuadrados del tratamiento

M.C.T. = Media de cuadrados del tratamiento

S.C.E. = Suma de cuadrados del error

M.C.E. = Media de cuadrados del error

N = Total de unidades experimentales

n_i = Número de unidades de la i -ésima nivel del factor

Se planteó la hipótesis nula:

H_0 : No hay diferencia significativa entre botellas

H_a : hay diferencia significativa entre botellas

Se realizara el cálculo para el estadístico F, bajo los criterios de que si F calculada es menor a F crítica (tablas), solo entonces se acepta H_0 y se determinará que el lote es homogéneo.(10)



Especificaciones del Estudio de Estabilidad

Para este estudio en particular se utilizaron 9 botellas y de cada botella 2 sub-muestras, a los cuales se les dio un tratamiento idéntico según norma NMX-AA-039-SCFI-2001 y se obtuvieron 5 mediciones de cada sub-muestra de las cuales se obtuvo un promedio.

Para poder concluir si el lote es estable a las diferentes temperaturas de exposición, se utilizó el Análisis de Varianza que se describe en la tabla IX-2 debido a que se contaba con un lote formado por diferentes botellas.(14)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Tratamiento τ_i	$n - 1$ $i - 1$	$\frac{\sum Y^2_i}{n_i} - \frac{Y^2_{..}}{N} = \text{S.C.T.}$	$\frac{\text{S.C.T.}}{n - 1} = \text{M.C.T}$	$\frac{\text{M.C.T.}}{\text{M.C.E.}}$
Error experimental $E_j(i)$	$N - n$ $i_1 - i$ $i (i-1)$	$\sum \sum Y^2_{ij} - \frac{\sum Y^2_i}{n_i} = \text{S.C.E.}$	$\frac{\text{S.C.E.}}{N - n} = \text{M.C.E.}$	

Tabla IX-2. Diseño de experimentos completamente al azar con un criterio de clasificación.

Modelo: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{j(i)}$

S.C.T. = Suma de cuadrados del tratamiento

M.C.T. = Media de cuadrados del tratamiento

S.C.E. = Suma de cuadrados del error

M.C.E. = Media de cuadrados del error

N = Total de unidades experimentales

n_i = Número de unidades de la i -ésima nivel del factor

Se planteó la hipótesis nula:

H_0 : No hay diferencia significativa entre muestreos

H_a : hay diferencia significativa entre muestreos

Se realizó el cálculo para el estadístico F, bajo los criterios de que si F calculada es menor a F crítica (tablas), solo entonces se acepta H_0 y se determinó que el lote es estable a cada una de las temperaturas de exposición respectivamente. (10)

X. RESULTADOS:

Estudio de homogeneidad.

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras que se sometieron al Estudio de Homogeneidad, se puede observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-1 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la Figura X-2.

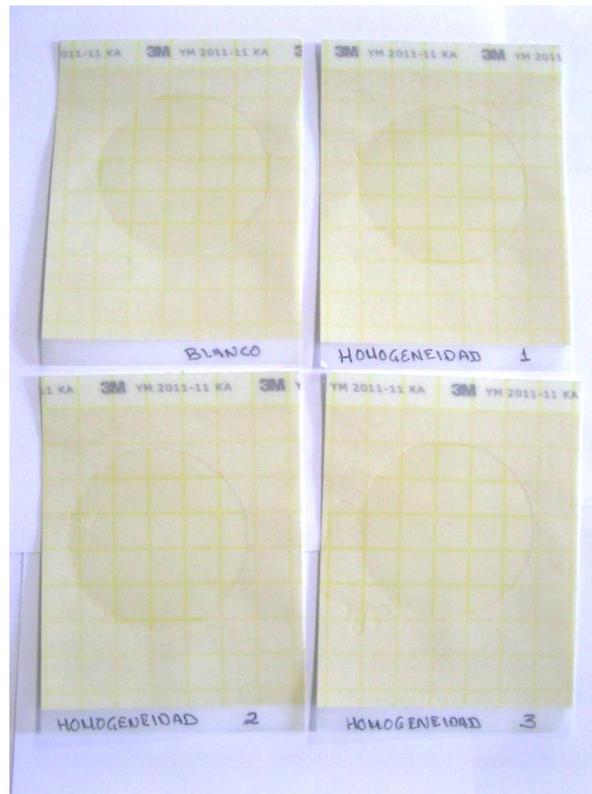


Figura X-1. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

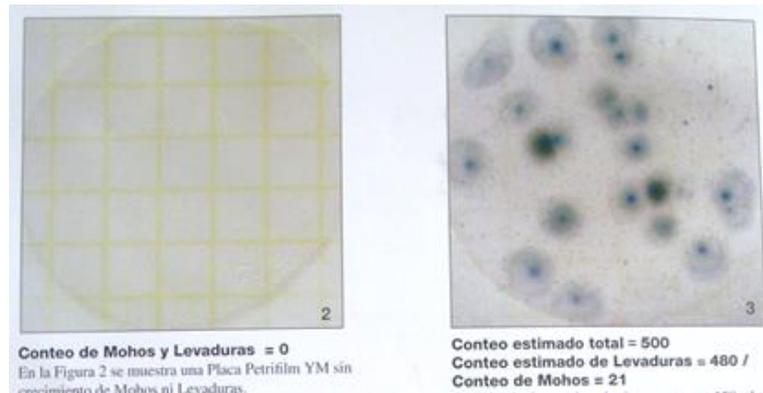


Figura X-2. Foto tomada de la guía de interpretación para Placas Petrifilm 3M para el recuento de mohos y levaduras YM.

Para realizar el estudio de homogeneidad fue necesario realizar una curva de calibración con un patrón de Lauril sulfato de sodio (LSS) de la cual se utilizaron los siguientes puntos de concentración para la realización de la curva 0, 10, 30, 50, 70, 90, 120, 150, 180 y 200 μg de LSS que se detalla en el cuadro X-1 y en la gráfica X-1.

La curva de calibración debía cumplir con un criterio de:

- Coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.998

La curva de calibración y las muestras se analizaron según la norma 039 NMX-AA-SCFI-2001, en el siguiente consecutivo:

- Preparación de material.
- Preparación de disoluciones.
- Formación del par iónico analito-azul de metileno.
- Extracción de analito con cloroformo.
- Medición de la absorbancia (Abs) de los estándares y las muestras a 652nm.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0001
10	0,0363
30	0,0817
50	0,1275
70	0,1864
90	0,2292
120	0,3134
150	0,3974
180	0,4721
200	0,5252

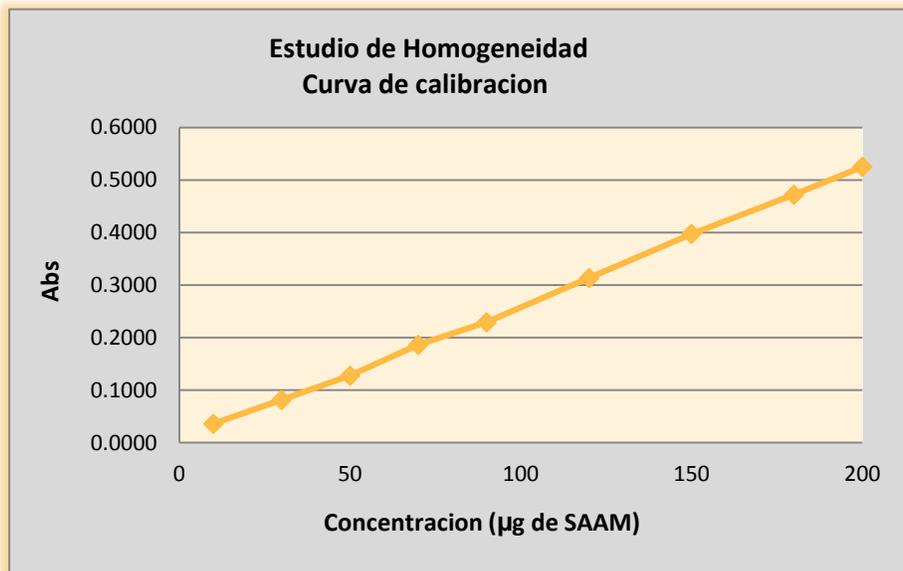
Datos obtenidos de la curva de calibración empleada para desarrollar el Estudio de Homogeneidad

Ecuación: $y = b + m \cdot x$
 $y = 0.0030 + 0.00260 \cdot x$
 Coeficiente de correlación
 $r^2 = 0,9996$

Pendiente
 $m = 0,00260$

Ordenada al origen
 $b = 0,0030$

Cuadro X-1. Especificaciones de la curva de calibración empleada para leer las muestras utilizadas para desarrollar el Estudio de Homogeneidad.



Gráfica X-1. Gráfica de la curva de calibración empleada para leer las muestras utilizadas para desarrollar el Estudio de Homogeneidad.



Los estándares y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV-Vis con las siguientes características

- Marca: Perkin Elmer
- Modelo: Lambda Bio20
- Longitud de onda utilizada: 652 nm
- Datos obtenidos: Absorbancia y concentración.

Las absorbancias detectadas por el espectrofotómetro UV-Vis para las muestras fueron extrapoladas en la curva y calculada su concentración con la ecuación de la recta:

$$\text{Ecuación: } y = b + m * x$$
$$y = 0.0030 + 0.00260 * x$$

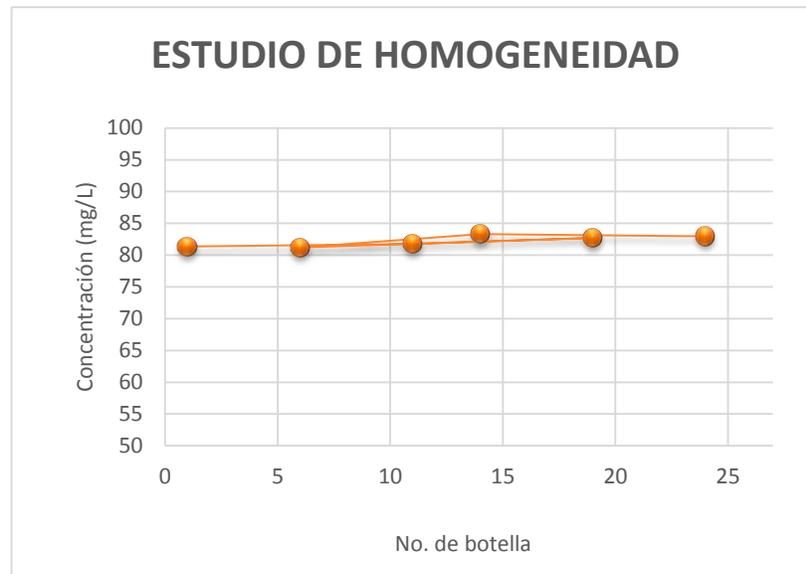
Posteriormente las concentraciones fueron tratadas en una hoja de cálculo de computadora en paquete EXCEL con la finalidad de obtener concentraciones en mg/L de SAAM tomando en cuenta el tratamiento que se les dio y las diluciones realizadas (ejemplo del cálculo de concentración en mg/L de SAAM en el anexo A).

En la tabla X-2 se observan las concentraciones obtenidas en cada una de las 2 sub-muestra extraídas de cada botella utilizada en el estudio de homogeneidad, así como el promedio general con su respectivo cálculo de incertidumbre (ejemplo del cálculo de incertidumbre en el anexo B).

Concentraciones obtenidas del Estudio de Homogeneidad				
Numero de Botella	Submuestra 1 (mg/L)	Submuestra 2 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Promedio general $\pm U$ (mg/L)
1	82.010	80.691	81.351	82.208 \pm 0.82991
11	81.267	82.202	81.735	
19	81.485	83.944	82.715	
6	82.804	79.590	81.197	
14	82.740	83.880	83.310	
24	80.409	85.468	82.939	

Tabla X-2. Valores en concentraciones obtenidas para cada una de las botellas de la disolución DES-70 sometidas al estudio de homogeneidad.

La grafica X-2 muestra el comportamiento de las botellas de la disolución DES-70 sometidas al estudio de homogeneidad.



Grafica X-2. Concentraciones obtenidas para cada botella sometida al estudio de homogeneidad.

Se calculó F Fisher como se muestra en la tabla X-3.

- Se planteó la hipótesis nula:
“Ho: no hay diferencia significativa entre botellas”.
- Se estableció el siguiente criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis nula:
“Si F calculada es menor a F crítica (tablas), solo entonces se acepta la Ho y se determinará si el lote es homogéneo, de lo contrario se rechaza la Ho”.
- Se realizó el Análisis de varianza.
- Se comparó F calculada contra F tablas.



ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

RESUMEN

<i>Botellas</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
1	2	162.701	81.3506314	0.8700627
11	2	163.469693	81.7348463	0.43704064
19	2	165.429189	82.7145946	3.02328131
6	2	162.393891	81.1969454	5.16682253
14	2	166.620256	83.3101278	0.6496151
24	2	165.87744	82.93872	12.7958839

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7.97292304	5	1.59458461	0.417	0.822	4.387
Dentro de los grupos	22.9427062	6	3.82378437			
Total	30.9156293	11				

Tabla X-3. Cálculo del estadístico F para la determinación de la Homogeneidad del lote DES-70.



Estudio de estabilidad.

El Estudio de Estabilidad se desarrolló basado en la metodología usada en el Estudio de Homogeneidad, utilizando el mismo material y equipos, pero con la variante de que se realizaron muestreos mensuales durante un periodo de 5 meses para observar el comportamiento de la disolución DES-70.

Para realizar el estudio de estabilidad fue necesario realizar curvas de calibración utilizando como patrón una disolución de Lauril sulfato de sodio y con un rango de la curva de 0-200 μg .

La curva de calibración se realizó con una frecuencia mensual y en los mismos días en que se realizaron los muestreos y previo al análisis de muestras.

La curva de calibración debía cumplir con un criterio de: coeficiente de correlación $(r^2) \geq 0.998$

La curva de calibración y las muestras se analizaron según la norma 039 NMX-AA-SCFI-2001, en el siguiente consecutivo:

- Preparación de material.
- Preparación de disoluciones.
- Formación del par iónico analito-azul de metileno.
- Extracción de analitos con cloroformo
- Medición de la absorbancia de los estándares y las muestras a 652nm

Los estándares y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV-Vis con las siguientes características

- Marca: Perkin Elmer
- Modelo: Lambda Bio20
- Longitud de onda utilizada: 652 nm
- Datos obtenidos: Absorbancia y concentración.

Las absorbancias detectadas por el espectrofotómetro UV-Vis para las muestras fueron extrapoladas en la curva y calculada su concentración con la ecuación de la recta:

$$\text{Ecuación: } y = b + m * x$$

Posteriormente las concentraciones fueron tratadas en una hoja de cálculo de computadora en paquete EXCEL con la finalidad de obtener concentraciones en mg/L de SAAM tomando en cuenta el tratamiento que se les dio y las diluciones realizadas (ejemplo del cálculo de concentración en mg/L de SAAM en el anexo A).



Al iniciar el Estudio de Estabilidad se realizó un primer muestreo y análisis de muestras. Una vez culminado el estudio, se sometieron las muestras asignadas a condiciones de temperatura respectivamente. Como se indica en la tabla X-4

No. de muestreo	Tiempo (meses)	Condiciones de temperatura
1	0	Sin someter a condiciones
2	1	4, 20 y 40°C respectivamente
3	2	4, 20 y 40°C respectivamente
4	3	4, 20 y 40°C respectivamente
5	4	4, 20 y 40°C respectivamente
6	5	4, 20 y 40°C respectivamente

Tabla X-4. Condiciones de las muestras según del número de muestreo de la disolución DES-70 para el Estudio de Estabilidad.

“Primer muestreo”

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras del primer muestreo del Estudio de Estabilidad, se pudo observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-3 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la figura X-2.

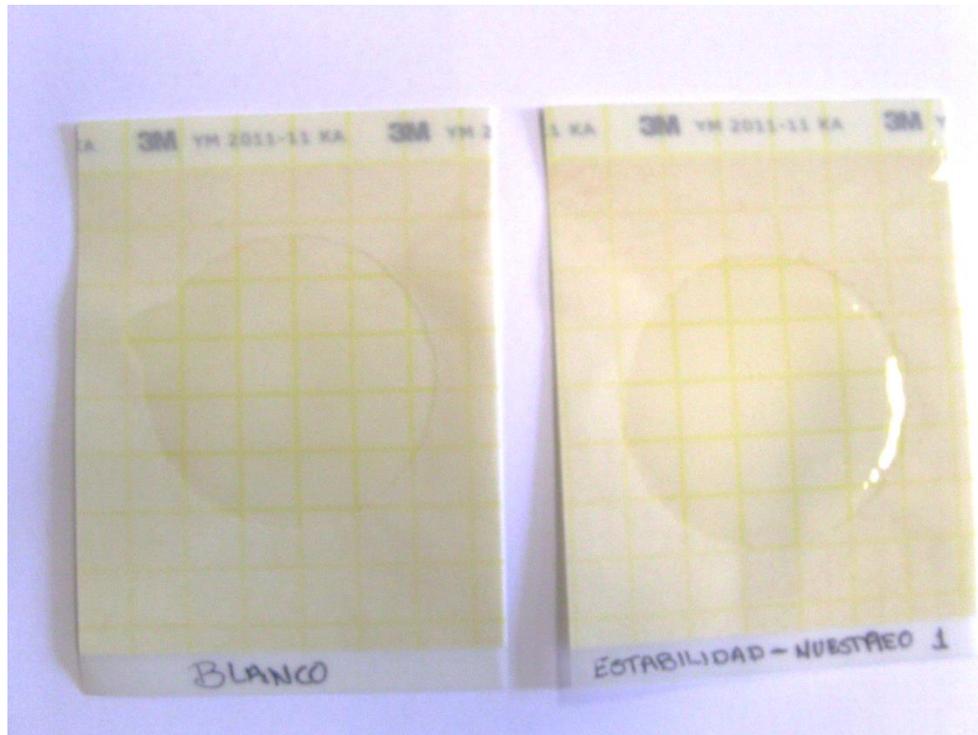
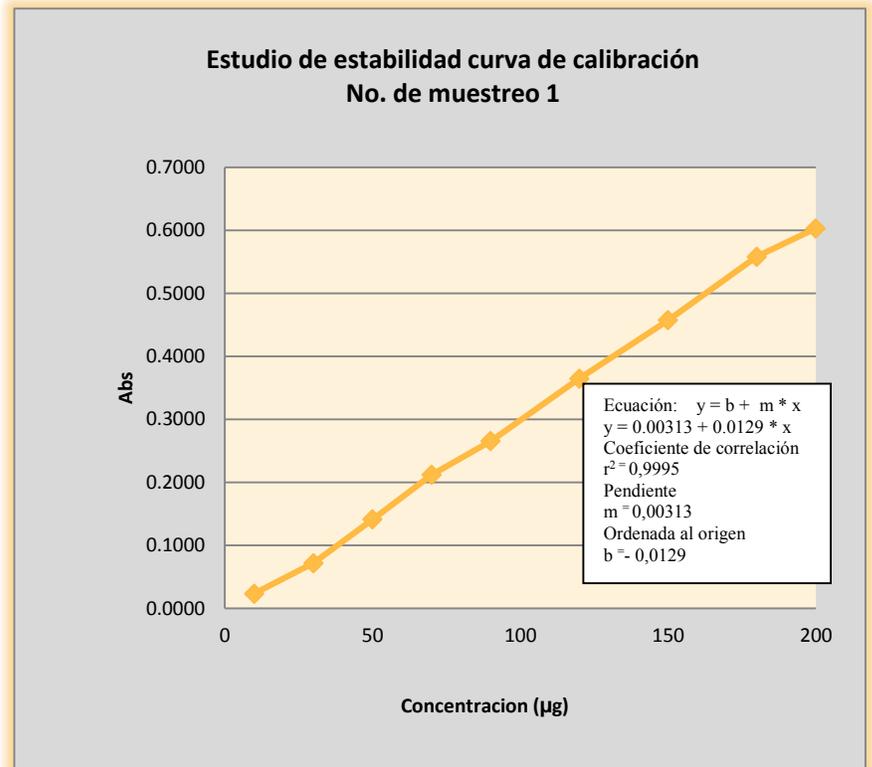


Figura X-3. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

La curva de calibración elaborada para el primer muestreo del estudio de estabilidad se describe en el cuadro X-5 y en la gráfica X-3.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0000
10	0,0234
30	0,0720
50	0,1414
70	0,2120
90	0,2656
120	0,3648
150	0,4575
180	0,5583
200	0,6033

Cuadro X-5. Especificaciones de la curva de calibración empleada para el primer muestreo del estudio de estabilidad.



Gráfica X-3. Gráfica de la curva de calibración empleada el primer muestreo del estudio de estabilidad.

En la tabla X-6 se presentan las concentraciones obtenidas en el primer muestreo (tiempo 0) para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

Número de Botella	Temperatura de almacenamiento	No. de muestreo	Concentración de masa de SAAM (mg/L)		
			Submuestra 1	Submuestra 2	Promedio
3	40	1	70.405	70.202	70.304
5	4	1	71.919	73.103	72.511
7	40	1	70.288	69.669	69.978
9	40	1	70.128	70.682	70.405
10	20	1	71.833	72.004	71.919
15	4	1	72.697	72.122	72.410
16	20	1	71.172	72.143	71.658
18	20	1	71.865	71.940	71.903
20	4	1	73.187	72.388	72.788

Tabla X-6. Resultados obtenidos en el primer muestreo del estudio de estabilidad realizado a la disolución DES-70.

La grafica X-4 muestra el efecto de la temperatura en el primer muestreo para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

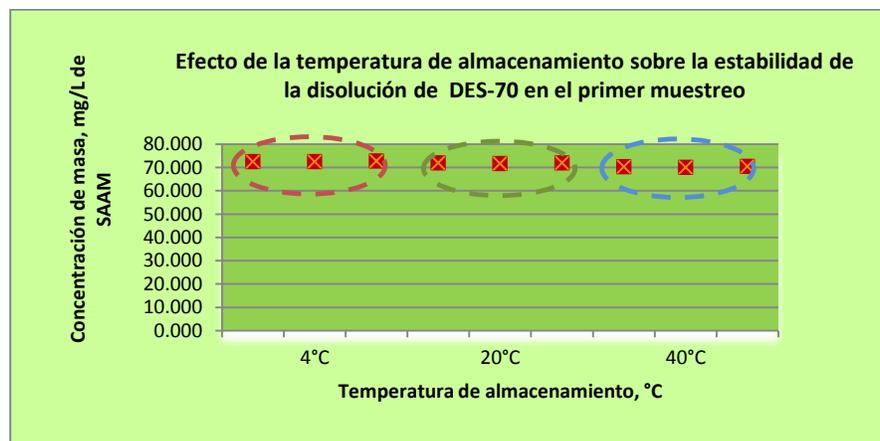


Tabla X-4. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la concentración en la disolución DES- 70 en el primer muestreo,

“Segundo muestreo”

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras del segundo muestreo del estudio de estabilidad, se pudo observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-4 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la Figura X-2.

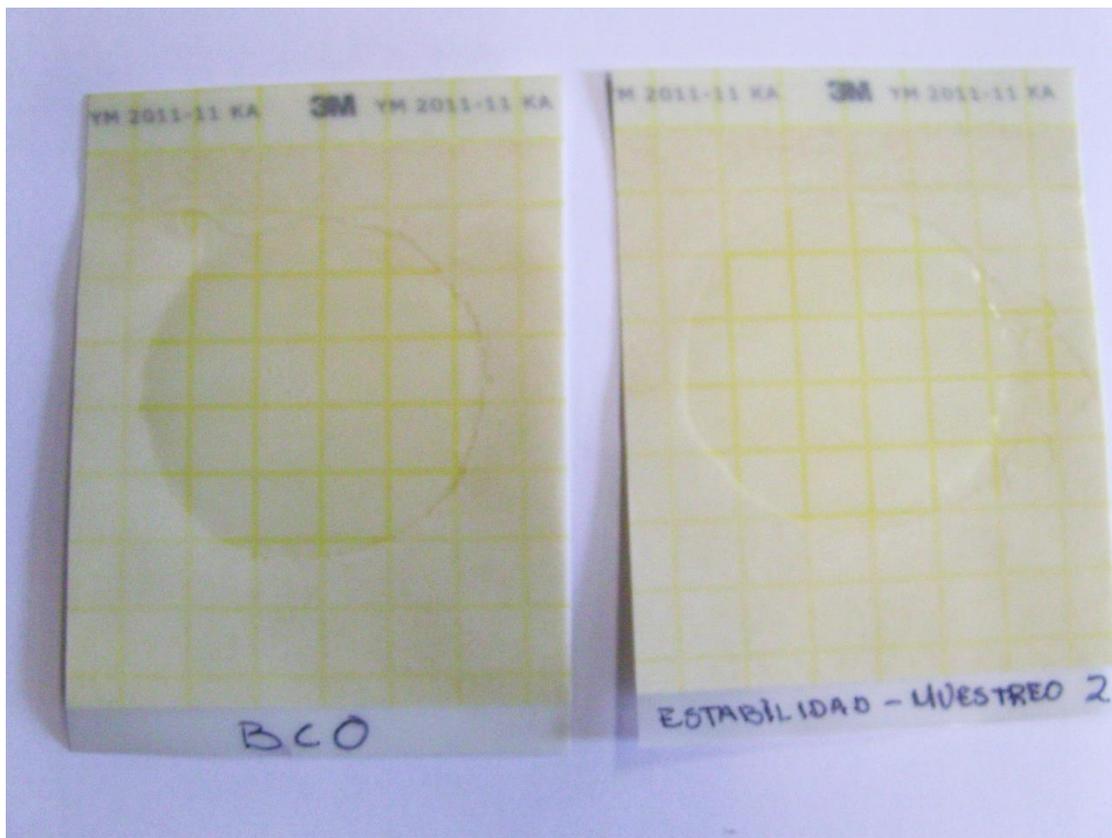
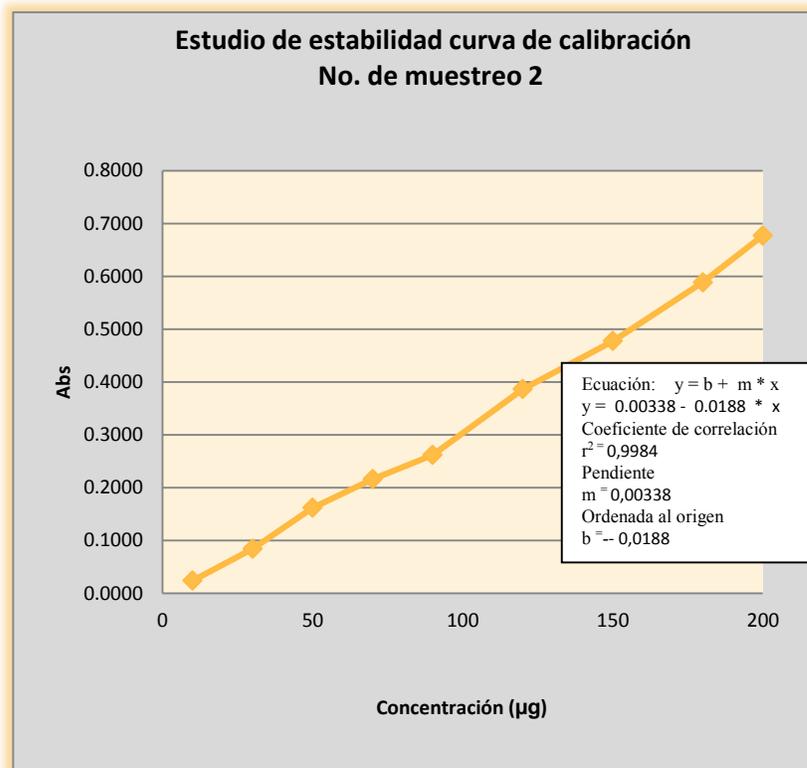


Figura X-4. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

La curva de calibración elaborada para el segundo muestreo del estudio de estabilidad se describe en el cuadro X-7 y en la gráfica X-5.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0004
10	0,0237
30	0,0841
50	0,1618
70	0,2160
90	0,2618
120	0,3863
150	0,4773
180	0,5886
200	0,6770

Cuadro X-7. Especificaciones de la curva de calibración empleada para el segundo muestreo del estudio de estabilidad.



Gráfica X-5. Gráfica de la curva de calibración empleando el segundo muestreo del estudio de estabilidad.

En la tabla X-8 se presentan las concentraciones obtenidas en el segundo muestreo (después del primer mes) para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

Número de Botella	Temperatura de almacenamiento	No. de muestreo	Concentración de masa de SAAM (mg/L)		
			Sub-muestra 1	Sub-muestra 2	Promedio
3	40	2	57.329	58.530	57.929
5	4	2	70.289	69.738	70.013
7	40	2	58.343	58.008	58.176
9	40	2	59.761	59.633	59.697
10	20	2	62.794	62.755	62.775
15	4	2	67.630	68.152	67.891
16	20	2	63.996	64.291	64.144
18	20	2	64.636	65.286	64.961
20	4	2	66.813	66.754	66.783

Tabla X-8. Resultados obtenidos en el segundo muestreo del estudio de estabilidad realizado a la disolución DES-70.

La gráfica X-6 muestra el efecto de la temperatura en el segundo muestreo para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

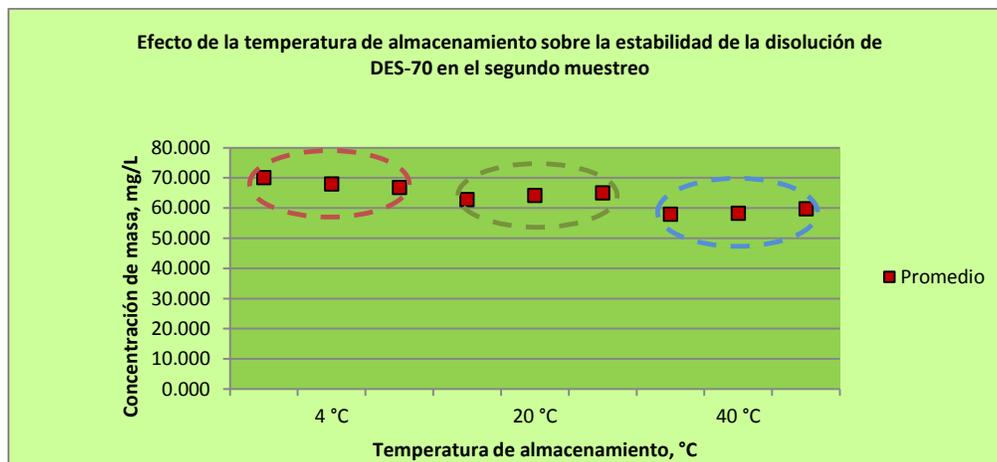


Tabla X-6. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la concentración en la disolución DES- 70 en el segundo muestreo.

“Tercer muestreo”

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras del tercer muestreo del Estudio de Estabilidad, se pudo observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-5 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la Figura X-2.

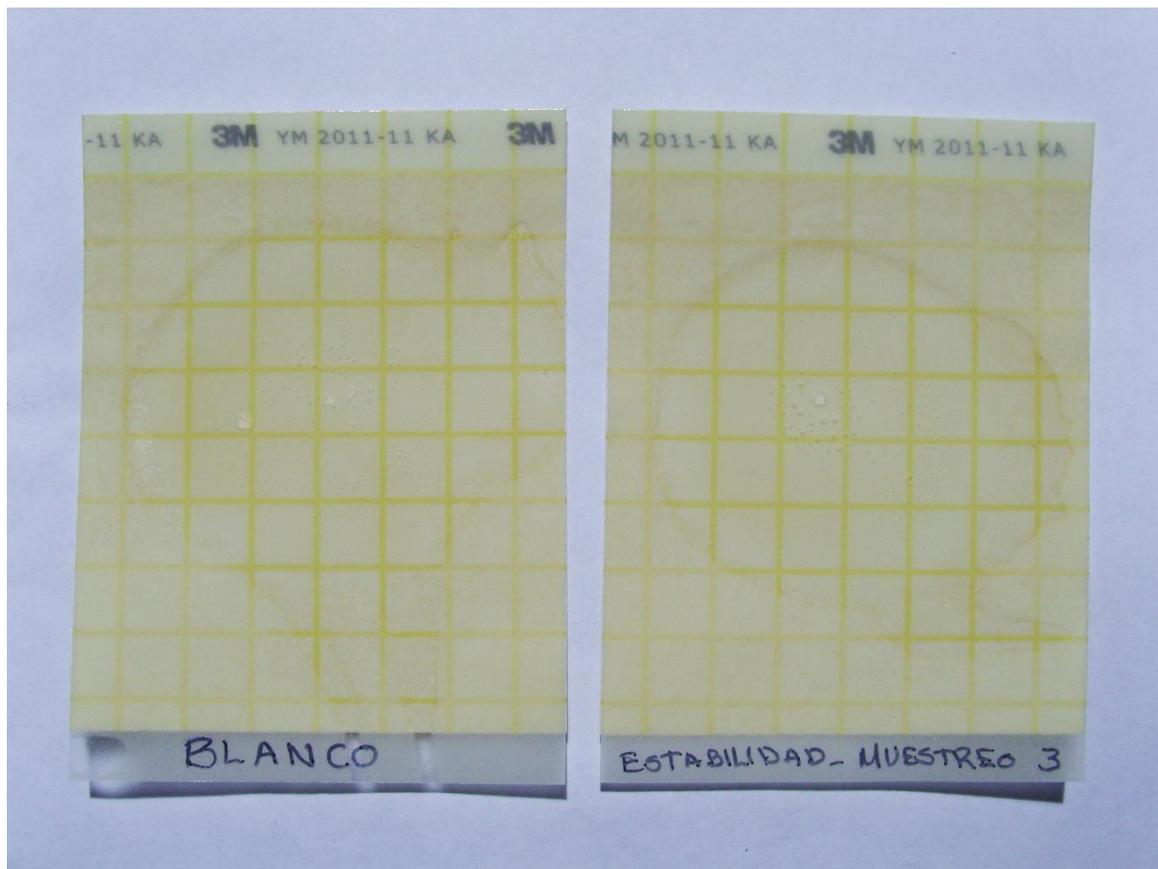
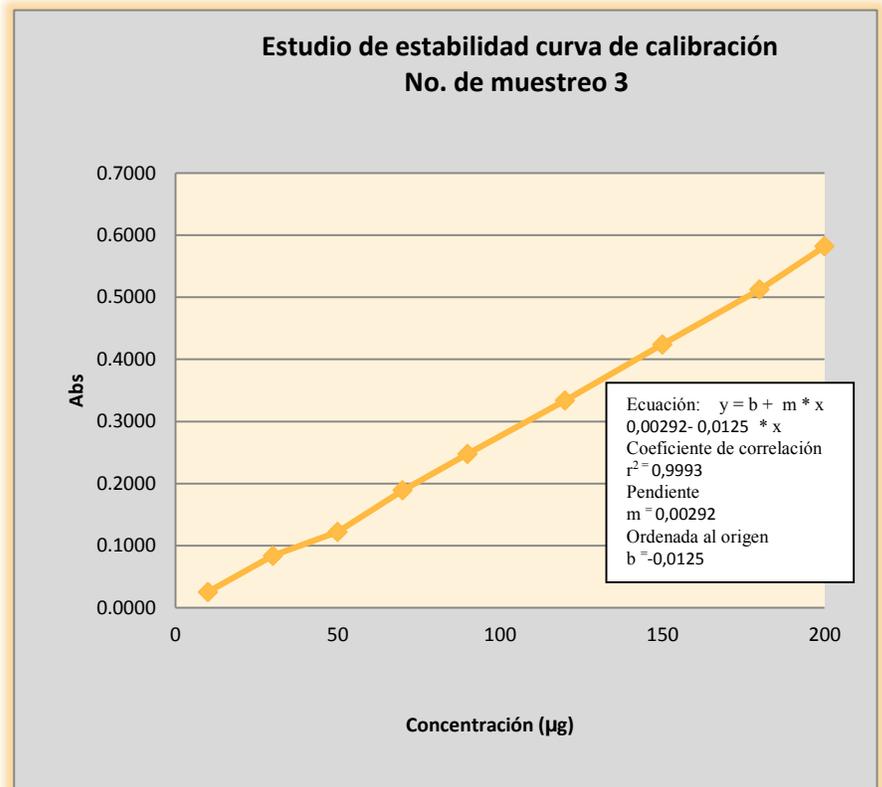


Figura X-5. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

La curva de calibración elaborada para el tercer muestreo del estudio de estabilidad se describe en el cuadro X-9 y en la gráfica X-7.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0002
10	0,0252
30	0,0837
50	0,1222
70	0,1890
90	0,2477
120	0,3335
150	0,4240
180	0,5124
200	0,5820

Cuadro X-9. Especificaciones de la curva de calibración empleada para el tercer muestreo del estudio de estabilidad.



Gráfica X-7. Gráfica de la curva de calibración empleada el tercer muestreo del estudio de estabilidad

En la tabla X-10 se presentan las concentraciones obtenidas en el tercer muestreo (después del segundo mes) para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

Número de Botella	Temperatura de almacenamiento	No. de muestreo	Concentración de masa de SAAM (mg/L)		
			Sub-muestra 1	Sub-muestra 2	Promedio
3	40	3	48.946	50.394	49.670
5	4	3	70.068	71.641	70.855
7	40	3	49.926	49.311	49.619
9	40	3	49.197	50.770	49.983
10	20	3	62.910	67.059	64.984
15	4	3	71.128	71.903	71.516
16	20	3	68.632	69.555	69.094
18	20	3	66.626	65.702	66.164
20	4	3	72.587	70.513	71.550

Tabla X-10. Resultados obtenidos en el tercer muestreo del estudio de estabilidad realizado a la disolución DES-70.

La grafica X-8 muestra el efecto de la temperatura en el tercer muestreo para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

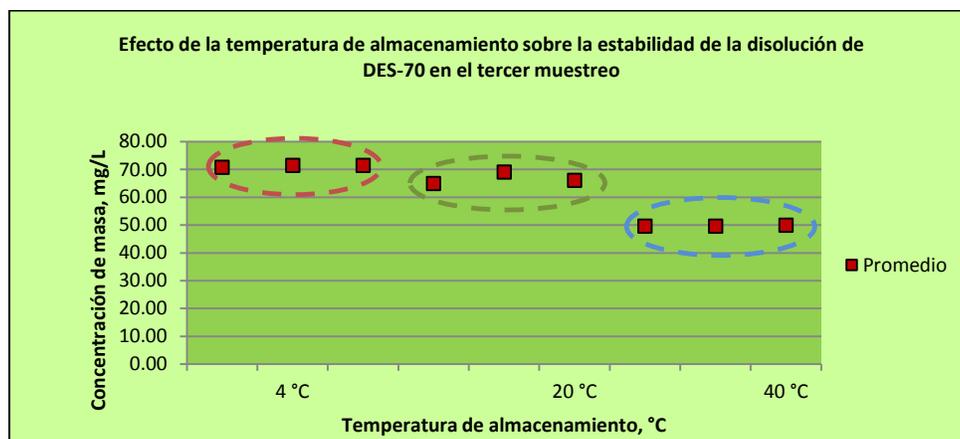


Tabla X-8. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la concentración en la disolución DES- 70 en el tercer muestreo.

“Cuarto muestreo”

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras del cuarto muestreo del estudio de estabilidad, se pudo observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-6 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la Figura X-2.

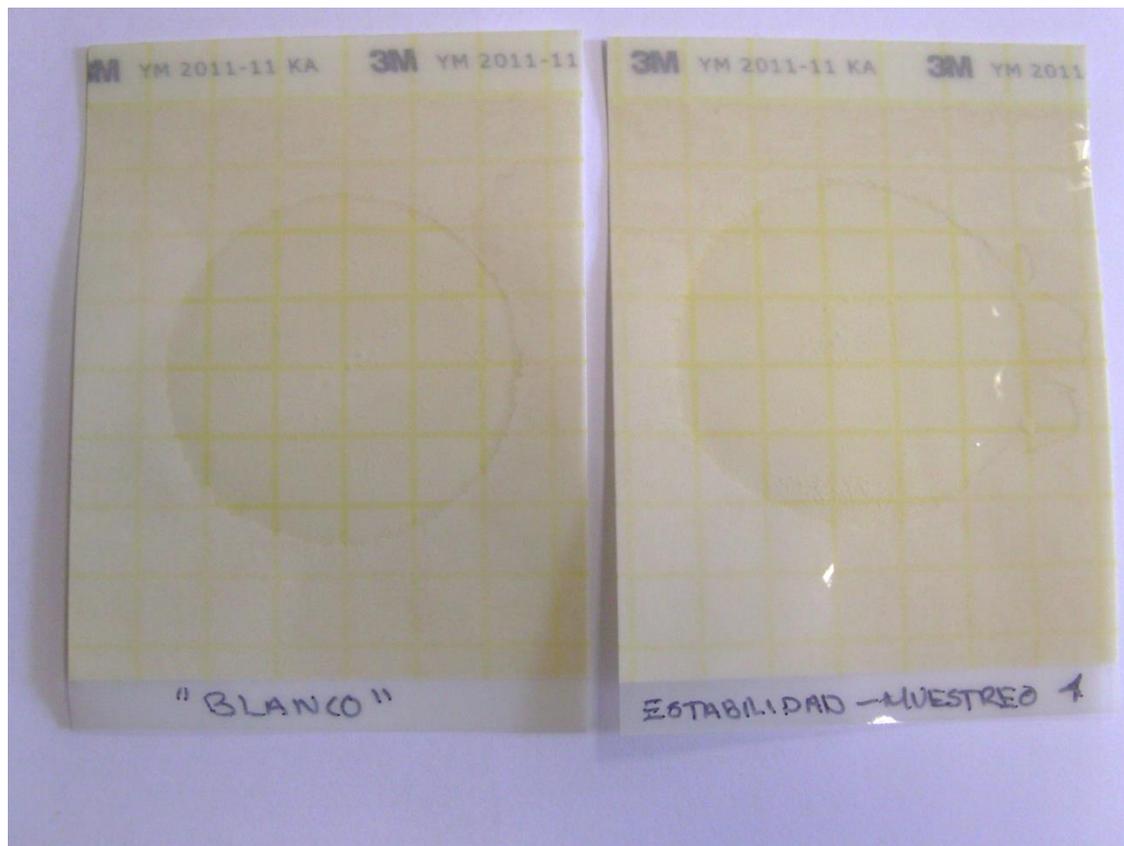
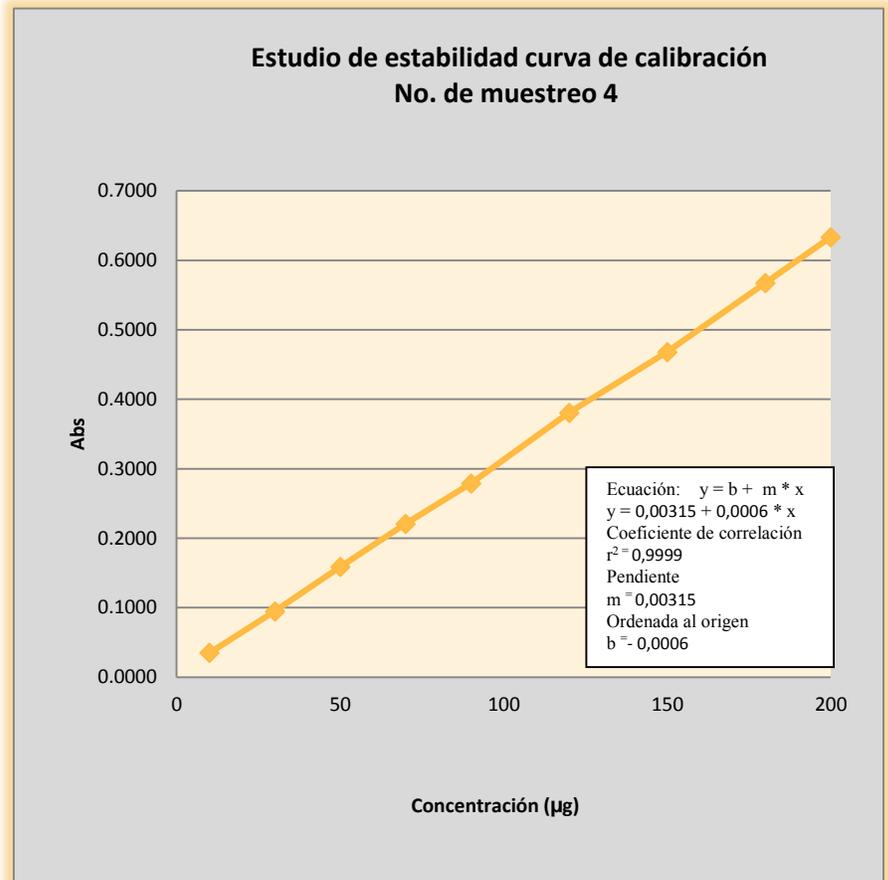


Figura X-6. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

La curva de calibración elaborada para el cuarto muestreo del estudio de estabilidad se describe en el cuadro X-11 y en la gráfica X-9.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0004
10	0,0349
30	0,0946
50	0,1587
70	0,2206
90	0,2790
120	0,3805
150	0,4681
180	0,5675
200	0,6333

Cuadro X-11. Especificaciones de la curva de calibración empleada para el cuarto muestreo del estudio de estabilidad.



Gráfica X-9. Gráfica de la curva de calibración empleada el cuarto muestreo del estudio de estabilidad

En la tabla X-12 se presentan las concentraciones obtenidas en el cuarto muestreo (después del tercer mes) para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

Número de Botella	Temperatura de almacenamiento	No. de muestreo	Concentración de masa de SAAM (mg/L)		
			Submuestra 1	Submuestra 2	Promedio
3	40	4	44.799	43.846	44.322
5	4	4	70.543	70.151	70.347
7	40	4	47.278	49.334	48.306
9	40	4	49.291	48.242	48.767
10	20	4	64.738	64.462	64.600
15	4	4	70.172	74.082	72.127
16	20	4	65.193	65.681	65.437
18	20	4	67.238	65.956	66.597
20	4	4	69.569	68.933	69.251

Tabla X-12. Resultados obtenidos en el cuarto muestreo del estudio de estabilidad realizado a la disolución DES-70.

La gráfica X-10 muestra el efecto de la temperatura en el cuarto muestreo para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

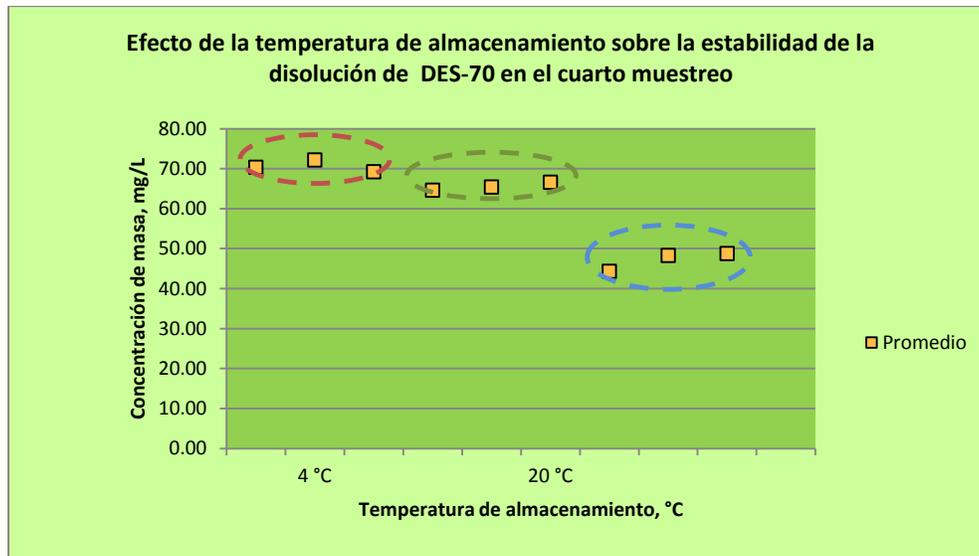


Tabla X-10. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la concentración en la disolución DES- 70 en el cuarto muestreo.

“Quinto muestreo”

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras del quinto muestreo del estudio de estabilidad, se pudo observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-7 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la Figura X-2.

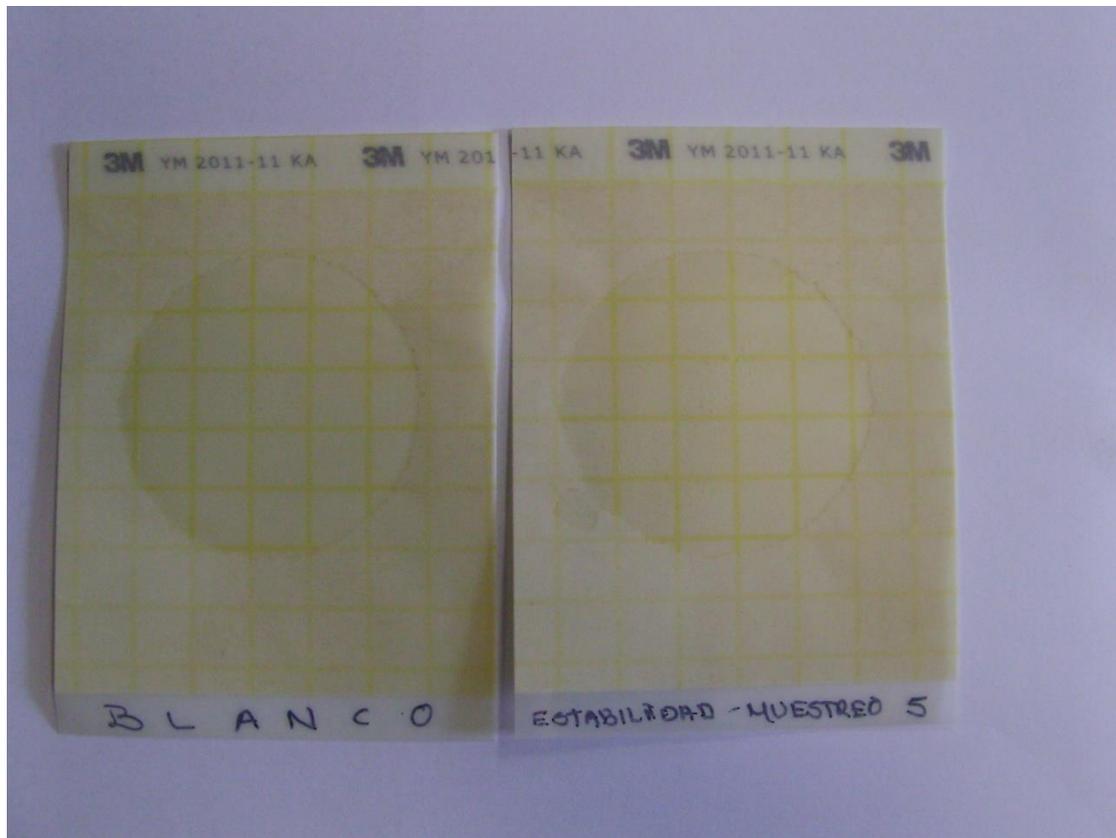
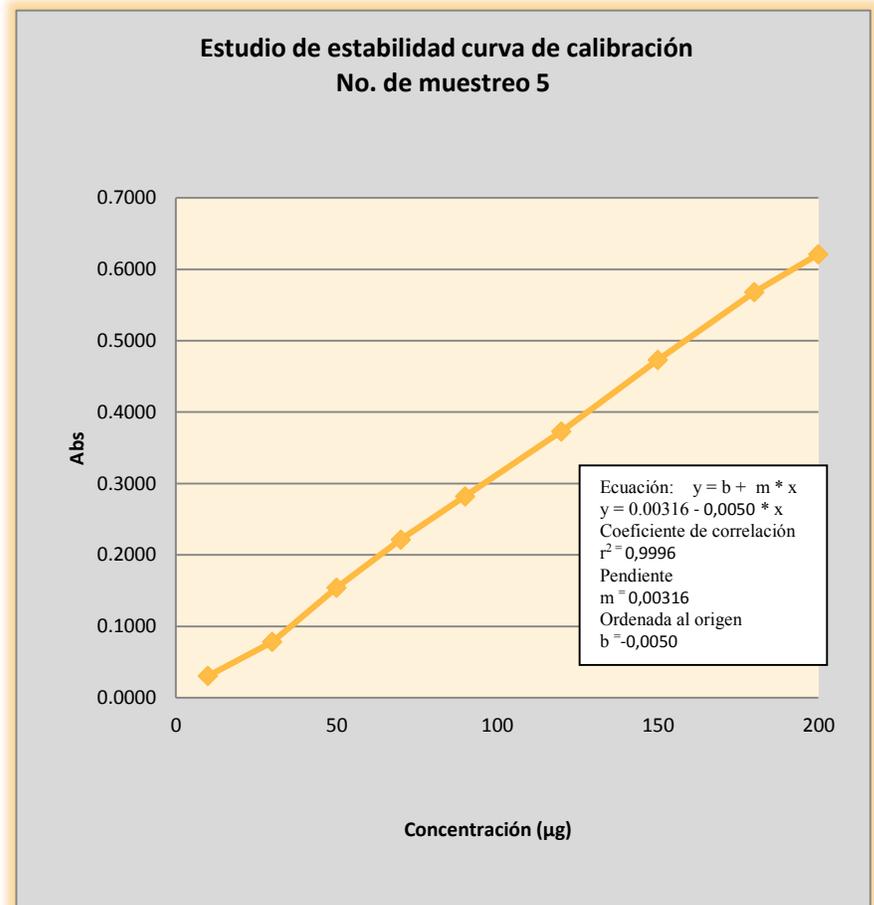


Figura X-7. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

La curva de calibración elaborada para el quinto muestreo del estudio de estabilidad se describe en el cuadro X-13 y en la gráfica X-11.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0001
10	0,0306
30	0,0784
50	0,1540
70	0,2216
90	0,2822
120	0,3731
150	0,4731
180	0,5681
200	0,6213

Cuadro X-13. Especificaciones de la curva de calibración empleada para el quinto muestreo del estudio de estabilidad.



Gráfica X-11. Gráfica de la curva de calibración empleada el quinto muestreo del estudio de estabilidad.

En la tabla X-14 se presentan las concentraciones obtenidas en el quinto muestreo (después del cuarto mes) para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

Número de Botella	Temperatura de almacenamiento	No. de muestreo	Concentración de masa de SAAM (mg/L)		
			Submuestra 1	Submuestra 2	Promedio
3	40	5	35.969	36.316	36.142
5	4	5	72.439	73.366	72.902
7	40	5	35.610	35.726	35.668
9	40	5	35.726	35.905	35.816
10	20	5	64.253	65.686	64.970
15	4	5	71.849	71.901	71.875
16	20	5	65.812	65.676	65.744
18	20	5	64.496	64.938	64.717
20	4	5	71.543	71.016	71.280

Tabla X-14. Resultados obtenidos en el quinto muestreo del estudio de estabilidad realizado a la disolución DES-70.

La gráfica X-13 muestra el efecto de la temperatura en el quinto muestreo para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

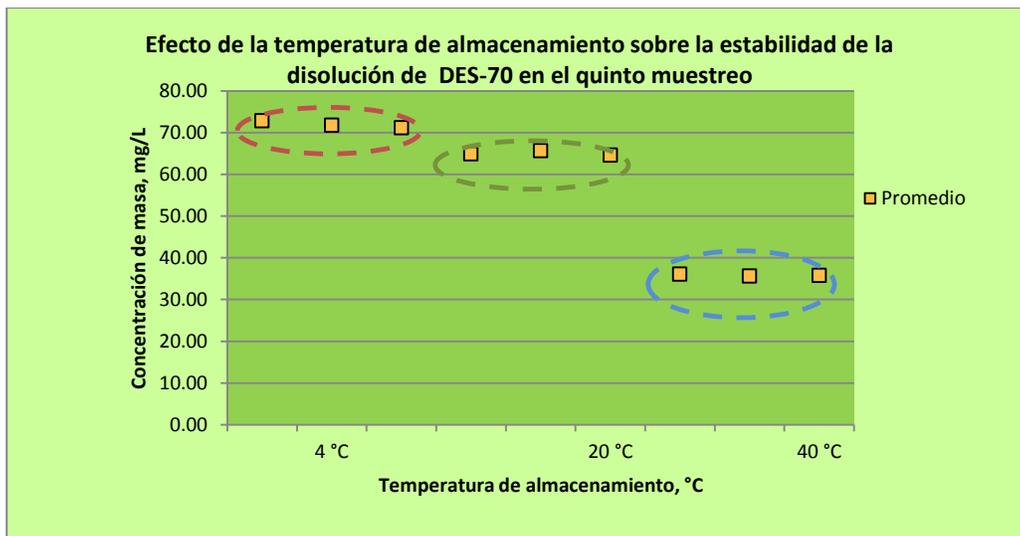


Tabla X-13. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la concentración en la disolución DES- 70 en el quinto muestreo

Sexto muestreo:

En el test para la identificación de hongos realizado a las muestras del sexto muestreo del estudio de estabilidad, se pudo observar que no se presentó crecimiento microbiano pasadas 24 y 36 horas (tiempo estimado en el instructivo de uso) después de la siembra en las placas para el recuento de Mohos y Levaduras. Como se puede observar en la figura X-8 y realizando la comparación con las imágenes que nos proporciona la guía para la interpretación de las placas que se muestran en la Figura X-2.

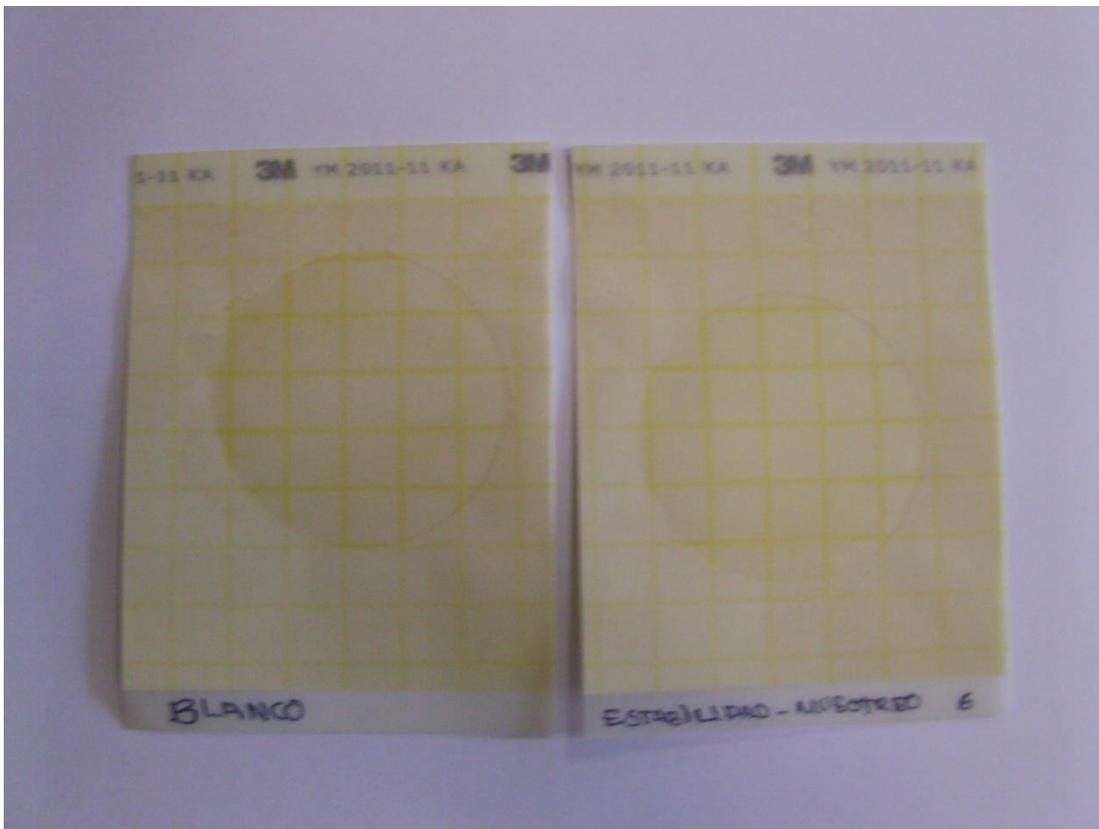
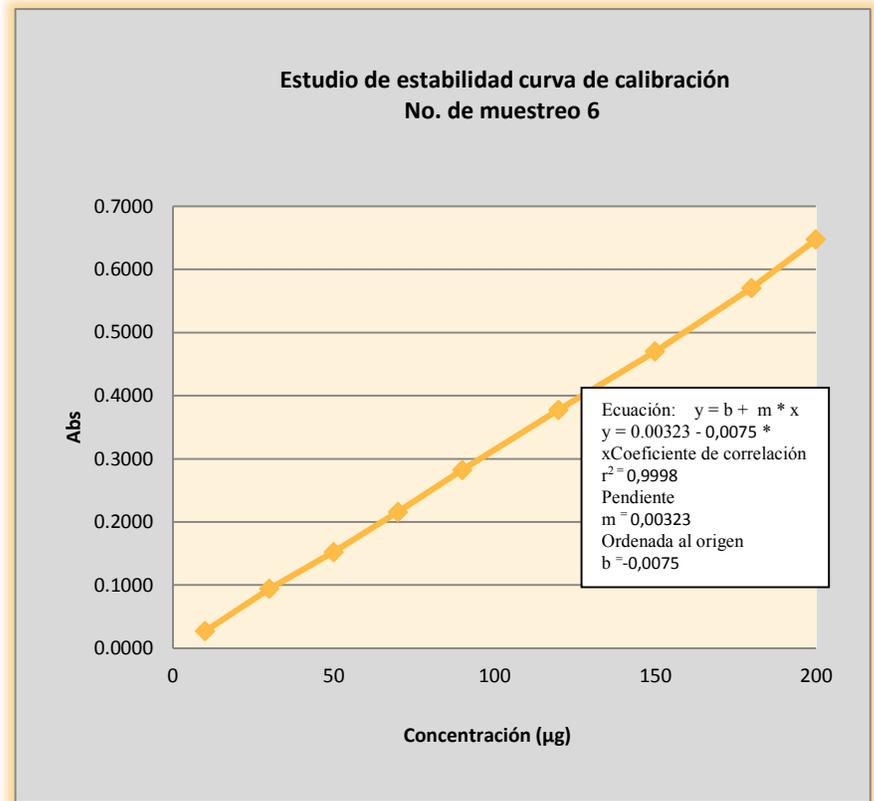


Figura X-8. Foto tomada a las muestras sembradas en test microbiológico para la identificación de hongos.

La curva de calibración elaborada para el sexto muestreo del estudio de estabilidad se describe en el cuadro X-15 y en la gráfica X-13.

Concentración (µg)	Abs promedio
0	0,0000
10	0,0270
30	0,0941
50	0,1522
70	0,2158
90	0,2822
120	0,3775
150	0,4700
180	0,5706
200	0,6474

Cuadro X-15. Especificaciones de la curva de calibración empleada para el sexto muestreo del estudio de estabilidad.



Gráfica X-13. Gráfica de la curva de calibración empleada el sexto muestreo del estudio de estabilidad.

En la tabla X-16 se presentan las concentraciones obtenidas en el sexto muestreo (después del quinto mes) para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

Número de Botella	Temperatura de almacenamiento	No. de Muestreo	Concentración de masa de SAAM (mg/L)		
			Submuestra 1	Submuestra 2	Promedio
3	40	6	30.911	31.076	30.993
5	4	6	68.607	68.266	68.436
7	40	6	30.962	30.921	30.942
9	40	6	30.828	30.849	30.838
10	20	6	68.762	68.741	68.751
15	4	6	68.886	68.720	68.803
16	20	6	69.805	69.123	69.464
18	20	6	69.929	69.960	69.945
20	4	6	70.012	69.650	69.831

Tabla X-16. Resultados obtenidos en el sexto muestreo del estudio de estabilidad realizado a la disolución DES-70.

La gráfica X-14 muestra el efecto de la temperatura en el sexto muestreo para cada botella utilizada en el estudio de estabilidad.

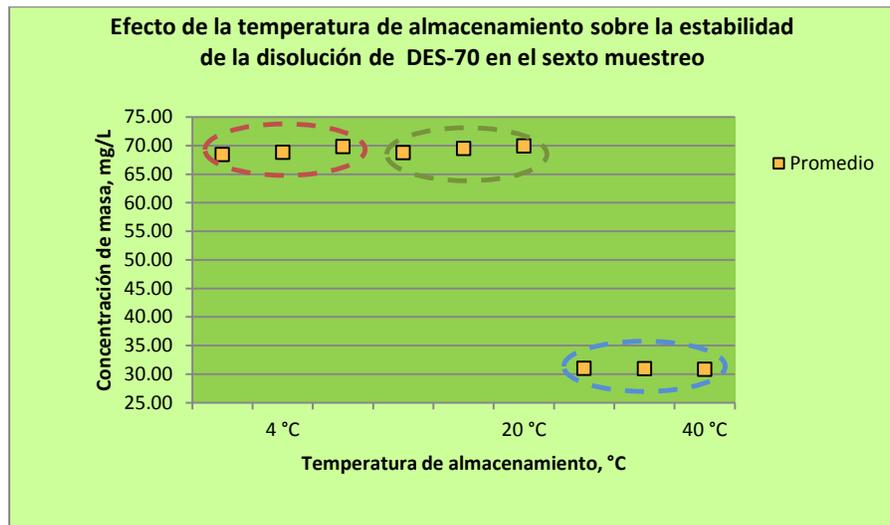


Tabla X-14. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la concentración en la disolución DES- 70 en el sexto muestreo.

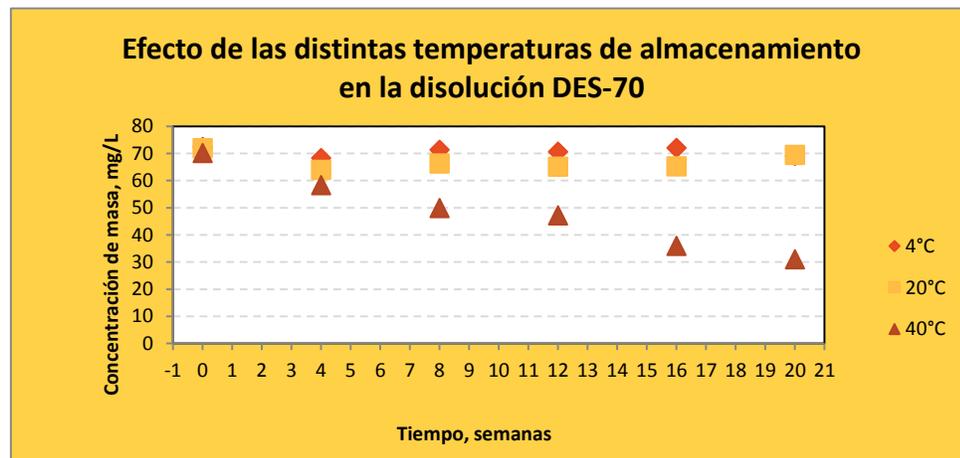
Una vez culminado el tiempo asignado al estudio de estabilidad y realizado el análisis de las muestras para obtener la concentración de cada una en los diferentes tiempos, se prosiguió a calcular los promedios de cada uno de los muestreos en las diferentes temperaturas.

La tabla X-17 muestra el comportamiento de la disolución bajo el efecto de la temperatura a lo largo de los cinco meses en los que se llevó a cabo el estudio de estabilidad, con sus respectivos cálculos de incertidumbre.

No. de muestreo	Tiempo, semanas	Promedio general de la concentración para cada muestreo \pm U (mg/L)		
		4 °C \pm U	20 °C \pm U	40 °C \pm U
1	0	72.569 \pm 0.328	71.827 \pm 0.271	70.229 \pm 0.359
2	4	68.229 \pm 2.003	63.960 \pm 1.383	58.601 \pm 1.213
3	8	71.307 \pm 0.555	66.747 \pm 2.545	49.757 \pm 0.330
4	12	70.575 \pm 1.776	65.545 \pm 1.258	47.132 \pm 2.922
5	16	72.019 \pm 1.049	65.144 \pm 0.719	35.876 \pm 0.381
6	20	69.023 \pm 0.936	69.387 \pm 0.794	30.924 \pm 0.192

Tabla X-17. Efecto de las temperaturas de almacenamiento en la concentración de la disolución DES-70 durante el estudio de estabilidad y cálculo de incertidumbre.

En la gráfica X-15 se muestra el efecto de las diferentes temperaturas de almacenamiento en la concentración en cada muestreo realizado durante el estudio de estabilidad.



Gráfica X-15. Efecto de las temperaturas de almacenamiento en la concentración de la disolución DES-70 durante el estudio de estabilidad.



Estadístico “F” para el cálculo de la estabilidad a condiciones de 4°C.

Con los valores calculando m y b de la curva de calibración realizada para leer las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 4°C, se calcularon las desviaciones estándar y los grados de libertad como se muestra en la tabla X-18. Para posteriormente realizar el cálculo de “F” de Fisher.

Tiempo (semanas)	Promedio de concentraciones de las muestras (mg/L) a 4 °C	Desviación estándar	No. de datos
0	72.371	0.172	n = 6
4	68.229	1.641	
8	71.307	0.392	
12	70.575	1.452	Grados de libertad
16	72.019	0.821	n-1 6 -1
20	69.023	0.723	

Tabla X-18. Cálculo de la desviación estándar y grados de libertad de las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 4°C.

Se calculó “F” Fisher como se muestra en la tabla X-19.

Se planteó la hipótesis nula:

- “Ho: No hay diferencia significativa entre muestreos”.

Se estableció el siguiente criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis nula:

- Si $F_{calculada} < F_{tablas}$ el analito es estable.
- Si $F_{calculada} > F_{tablas}$ el analito no es estable.

Se realizó el Análisis de varianza.

Se comparó F calculada contra F tablas.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,223
Coefficiente de determinación R ²	0,0495
R ² ajustado	-0,188
Error típico	8,156
Observaciones	6

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	13,881	13,881	0,208	0,671
Residuos	4	266,118	66,529		
Total	5	280			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	79,105	151,325	0,522	0,628	-341,040	499,25	-341,040	499,251
Variable X 1	-0,978	2,142	-0,456	0,671	-6,926	4,969	-6,926	4,969

Tabla X-19. Cálculo del estadístico F para la determinación de la estabilidad del lote DES-70 en condiciones de 4°C.



Estadístico “F” para el cálculo de la estabilidad a condiciones de 20°C.

Con los valores calculando m y b de la curva de calibración realizada para leer las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 20°C, se calcularon las desviaciones estándar y los grados de libertad como se muestra en la tabla X-20. Para posteriormente realizar el cálculo de “F” de Fisher.

Tiempo (semanas)	Promedio de concentraciones de las muestras (mg/L) 20 °C	Desviación Estándar	No. de datos
0	71,827	0,146	n = 6
4	63,960	1,105	
8	66,747	2,116	
12	65,545	1,003	Grados de libertad
16	65,144	0,535	n-1 6 -1
20	69,387	0,600	

Tabla X-20. Cálculo de la desviación estándar y grados de libertad de las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 20°C.

Se calculó “F” Fisher como se muestra en la tabla X-21.

Se planteó la hipótesis nula:

- “Ho: no hay diferencia significativa entre muestreos”.

Se estableció el siguiente criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis nula:

- Si $F_{calculada} < F_{tablas}$ el analito es estable.
- Si $F_{calculada} > F_{tablas}$ el analito no es estable.

Se realizó el Análisis de varianza.

Se comparó F calculada contra F tablas.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,177
Coefficiente de determinación R ²	0,0316
R ² ajustado	-0,210
Error típico	8,233
Observaciones	6

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	8,863	8,863	0,130	0,735
Residuos	4	271,136	67,784		
Total	5	280			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	40,184	83,539	0,481	0,655	-191,75	272,128	-191,759	272,128
Variable X 1	-0,449	1,243	-0,361	0,735	-3,903	3,003	-3,903	3,003

Tabla X-21. Cálculo del estadístico F para la determinación de la estabilidad del lote DES-70 en condiciones de 20°C.

Estadístico “F” para el cálculo de la estabilidad a condiciones de 40°C.

Con los valores calculando m y b de la curva de calibración realizada para leer las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 40°C, se calcularon las desviaciones estándar y los grados de libertad como se muestra en la tabla X-22. Para posteriormente realizar el cálculo de “F” de Fisher.

Tiempo (semanas)	Promedio de concentraciones de las muestras (mg/L) 40 °C	Desviación estándar	No. de datos
0	70,229	0,314	n = 6
4	58,601	1,104	
8	49,757	0,234	
12	47,132	2,444	Grados de libertad
16	35,876	0,243	n-1
20	30,924	0,079	6 -1

Tabla X-22. Cálculo de la desviación estándar y grados de libertad de las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 40°C.

Se calculó “F” Fisher como se muestra en la tabla X-23.

Se planteó la hipótesis nula:

- “Ho: no hay diferencia significativa entre muestreos”

Se estableció el siguiente criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis nula:

- Si $F_{calculada} < F_{tablas}$ el analito es estable.
- Si $F_{calculada} > F_{tablas}$ el analito no es estable.

Se realizó el Análisis de varianza.

Se comparó F calculada contra F tablas.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,988
Coefficiente de determinación R ²	0,976
R ² ajustado	0,970
Error típico	1,284
Observaciones	6

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	273,402	273,402	165,766	0,0002
Residuos	4	6,597	1,649		
Total	5	280			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	34,930	2,006	17,412	6,386E-05	29,360	40,500	29,360	40,50
Variable X 1	-0,511	0,0397	-12,875	0,0002	-0,621	-0,401	-0,621	-0,401

Tabla X-23. Calculo del estadístico F para la determinación de la estabilidad del lote DES-70 en condiciones de 40°C.



XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS:

El test microbiológico realizado tanto en el estudio de Homogeneidad y de Estabilidad nos permite interpretar la inocuidad microbiológica (hongos y levaduras) que presenta las muestras durante su manipulación debido a que no hay presencia de crecimiento de colonias en las placas inoculadas.

Las curvas de calibración empleadas para el análisis de las muestras tanto del Estudio de Homogeneidad y como de Estabilidad cumple con el criterio de $r^2 = 0.998$ y las lecturas obtenidas en las muestras se encuentran muy cercanas al punto medio de la curva por lo cual podemos atribuir confiabilidad a las lecturas obtenidas.

En cada corrida de muestras se analizaron simultáneamente controles de concentraciones conocidas de SAAM y blancos con la finalidad de asegurar la confiabilidad de los resultados reportados en el presente trabajo.

Además, previo al análisis se realizó la validación del método y se demostró la capacidad técnica de los analistas. Sin pasar por alto que los equipos utilizados durante la determinación se calibraron y verificaron periódicamente según el programa interno del laboratorio para garantizar su óptima funcionalidad.

El Estudio de Estabilidad debido a su duración (5 meses) nos permite establecer la condiciones de transporte y almacenamiento según lo establece la norma “NMX-CH-165IMNC-2008. Materiales de referencia – Principios generales y estadísticos para certificación” que nos establece un estudio de 3 meses o más para un Estudio de Estabilidad a Corto Plazo.



Estudio de Homogeneidad

Analizando la gráfica X-2 podemos observar una clara tendencia a formar una línea recta a lo largo de la concentración estimada con cada una de las botellas utilizadas en el estudio de homogeneidad.

Haciendo el cálculo de la concentración promedio de todas las muestras obtenemos una concentración de 82.208 mg/L de SAAM con una incertidumbre asociada de 0.829 (ver página 36), que podemos estimar como la concentración de la disolución DES-70 al momento de realizar el estudio de homogeneidad. El valor de incertidumbre calculado se considera aceptable debido a que cumple con el criterio de ser <10% de la concentración estimada para la disolución DES-70 según lo establece el procedimiento de control de calidad del laboratorio.

Como pudimos observar en la tabla X-2 los resultados obtenidos en el análisis de las muestras que se evaluaron con la finalidad de desarrollar el estudio de homogeneidad, obtuvimos concentraciones que oscila entre 81.197 y 83.310 mg/L de SAAM (ver página 36). La desviación que se aprecia entre estos valores es aceptable según el criterio del laboratorio que es de % Recobro = 90-110 con respecto al valor de la concentración promedio y esta estadísticamente justificada con el cálculo de la incertidumbre que por definición nos indica que es la suma de las desviaciones estándar atribuidas a la medición.

En el cálculo de F de Fisher tomando en cuenta los 5 grados de libertad establecidos en el estudio obtenemos una F tablas de 4.387, que es mucho mayor al valor obtenido en la F calculada que fue de 0.417 (ver página 38), por lo que de acuerdo a el criterio establecidos anteriormente, podemos tomar la decisión de aceptar la hipótesis nula (H_0 : no hay diferencia significativa entre botellas).



Estudio de Estabilidad

Para los resultados obtenidos en las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 4°C.

Como se puede observar en la tabla X-17 los promedios obtenidos en la concentración de las muestras sometidas a condiciones de 4°C que se analizaron para evaluar el estudio de estabilidad, presentan una concentración que oscila entre 72.569-68.229 mg/L de SAAM (ver página 61).

Con el tratamiento estadístico de análisis de varianza al que se sometieron estos resultados obtuvimos los siguientes valores para F con un nivel de confianza del 95%:

$$F_{\text{calculada}} = 0,208$$

$$F_{\text{tablas}} = 0,671 \text{ (ver página 62)}$$

Esto con la finalidad de poder comparar con los criterios que establecimos para este modelo estadístico y aceptar la hipótesis nula:

Ho: No hay diferencia significativa entre muestreos

Es importante mencionar que las variaciones en las concentraciones de SAAM mostradas en la tabla X-17 son atribuidas a que la técnica que se empleó para el análisis de las muestras (anteriormente descrita en el procedimiento), requiere una extracción por agitación en embudos de separación, que se realiza manualmente y está perfectamente justificada dentro de los controles de calidad establecidos en el laboratorio, que nos especifican que la variación entre repeticiones de las mismas muestras no deberá ser mayor de 10% en porcentaje de recobro.

Para los resultados obtenidos en las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 20°C.

Como se puede observar en la tabla X-17 los promedios obtenidos en la concentración de las muestras sometidas a condiciones de 20°C que se analizaron para evaluar el estudio de estabilidad, presentan una concentración que oscila entre 71.827-63.960 mg/L de SAAM (ver página 62).

Con el tratamiento estadístico de F de Fisher al que se sometieron estos resultados obtuvimos los siguientes valores para F:

$$F_{\text{calculada}} = 0,130$$

$$F_{\text{tablas}} = 0,735 \text{ (ver página 63)}$$



Esto con la finalidad de poder comparar con los criterios que establecimos para este modelo estadístico y aceptar la hipótesis nula:

Ho: No hay diferencia significativa entre muestreos

La variación en la concentración de SAAM, puede apreciarse en la tabla X-17 es atribuida a la técnica que se empleó para el análisis de las muestras y cumplen con el criterio de $100 \pm 10\%$ en porciento de recobro entre repeticiones.

Para los resultados obtenidos en las muestras sometidas a condiciones de temperatura de 40°C.

Como se puede observar en la tabla X-17 los promedios obtenidos en la concentración de las muestras sometidas a condiciones de 40°C, que se analizaron para evaluar el estudio de estabilidad, presentan una concentración que oscila entre 70.229-30.924 mg/L de SAAM (ver página 64).

Con el tratamiento estadístico de F de Fisher al que se sometieron estos resultados obtuvimos los siguientes valores para F:

$$F_{\text{calculada}} = 165,766$$

$$F_{\text{tablas}} = 0,002 \text{ (ver página 65)}$$

Esto con la finalidad de poder comparar con los criterios que establecimos para este modelo estadístico y este caso en particular se rechaza la hipótesis nula debido a que $F_{\text{calculada}}$ es un valor mucho mayor de F_{tablas} .

El decremento en la concentración del analito puede ser atribuido a la degradación del mismo por consecuencia a la constante exposición a la temperatura. Podemos apreciar una tendencia a formar una pendiente negativa desde el análisis del segundo muestreo, que se confirma al observar las siguientes concentraciones en la gráfica X-17.



XII. CONCLUSIONES

Estudio de Homogeneidad

Con los resultados observados en las placas inoculadas podemos concluir que el lote se encuentra libre de contaminación microbiológica, específicamente hongos y levaduras, que pudieran interferir en las mediciones analíticas referentes a la cuantificación del analito.

Con los datos obtenidos en el cálculo estadístico de análisis de varianza (F Fisher) al cual fueron sometidos los resultados de concentraciones para las muestras que se seleccionaron en este estudio y de acuerdo a los resultados obtenidos para F de tablas y F calculada se concluye que el efecto entre botellas es que no existe diferencia significativa y por lo tanto se determina que el candidato a material de referencia es homogéneo.

Estudio de Estabilidad

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la disolución DES-70 es estable en condiciones de temperatura de 4 y 20 °C y que presenta problemas de degradación si se somete a condiciones de temperatura de 40°C.

Esto nos permite establecer que las condiciones de transporte y almacenamiento del Candidato a MRC del lote DES-70 que deben ser: a temperaturas de 4°C o 20°C y respetando el material de empaque en el que se distribuye (envase de vidrio ámbar seguido de una Bolsa de polietileno y una bolsa aluminizada), además podemos afirmar que su manipulación a una temperatura controlada de 20°C no afecta su concentración siempre y cuando no se vea comprometida su integridad física y química.

Como perspectiva de este trabajo se continuaran monitoreando las muestras que obtuvieron los mejores resultados de estabilidad, empleado la misma metodología de análisis, con la finalidad de evaluar la posibilidad de establecer el periodo de vida útil del lote.



XIII. SUGERENCIAS

Al desarrollar las diferentes etapas del presente trabajo y documentar cada una de sus componentes, pudimos identificar algunos puntos que, a nuestra opinión, pudieran mejorarse e incluso implementarse para mejorar y enriquecer futuros trabajos.

Como primer punto el método de análisis que nos referencia la NOM-AA-039-SCFI-2001 está clasificado analíticamente como un método secundario y sería conveniente con fines de comparación, analizar las muestras que se utilizan durante los estudio de homogeneidad y estabilidad, a la par con método primario. Dicho método no existe referenciado hasta el momento en la bibliografía, por lo que el desarrollo del mismo puede ser el propósito del estudio de una tesis a nivel de maestría.

La técnica de la NOM-AA-039-SCFI-2001 nos indica el punto 9 (procedimiento) realizar dos extracciones del par iónico (surfactante-azul de metileno) con cloroformo y una tercera con solución de lavado de fosfatos, utilizando para ello embudos de separación y realizando una agitación manual por un periodo de tiempo de 30 segundos respectivamente. La experiencia que tuvimos a lo largo del Estudio de Estabilidad es que cuando se realizan jornadas de trabajo muy extensas en las que se tienen una gran cantidad de muestras que tuvieran que ser analizadas el mismo día, la agitación manual difícilmente se puede mantener constante, debido al agotamiento físico del analista. Dicho inconveniente se pudiese mejorar utilizando un dispositivo de agitación mecánico.

Es importante hacer mención que las celdas de cuarzo que se requieren para leer las muestras en el espectrofotómetro de UV-Visible después de una jornada de trabajo en la que se introducen muestras con azul de metileno, adquieren una coloración azul poco perceptible a la vista, pero que sin embargo, aumenta la concentración de las muestras a la largo del tiempo. Esto puede evitarse si los laboratorios que realizan la técnica, incluyen en sus procedimiento que las celdas de cuarzo se dejen remojando en solución jabonosa libre de fosfatos por un periodo de 12 horas después de ser utilizadas.

Aunque las normas de referencia relacionadas con el Estudio de Estabilidad para MR y MRC no hacen mención de asegurar que los candidatos a MR estén libres de contaminación microbiológica a lo largo del desarrollo del estudio, consideramos importante realizar un test microbiológico (con un agar apropiado para hongos en el caso de agentes surfactantes), con la finalidad de asegurar que se mantiene intacta su composición, únicamente en las siguientes circunstancias:

- Cada vez que se manipule el candidato a MR para obtener una alícuota en los diferentes muestreos que requiere el Estudio de Estabilidad
- Cuando el MR se encuentre contenido en una matriz líquida o apropiada para la proliferación de microorganismos.



XIV. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

µg	microgramos
Abs	Absorbancia
C	Centígrados
CENAM	Centro Nacional de Metrología
CIITEC	Centro de investigación e Innovación tecnológica
IPN	Instituto Politécnico Nacional
L	Litros
LSS	Lauril sulfato de sodio
Mg	Miligramos
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado
QA	Aseguramiento de la calidad externo o ensayo de aptitud
QC	Control de calidad interno
SAAM	Sustancias Activas al Azul de Metileno
SAL	Sulfonato de alquil benceno lineal
SI	Sistema internacional de unidades



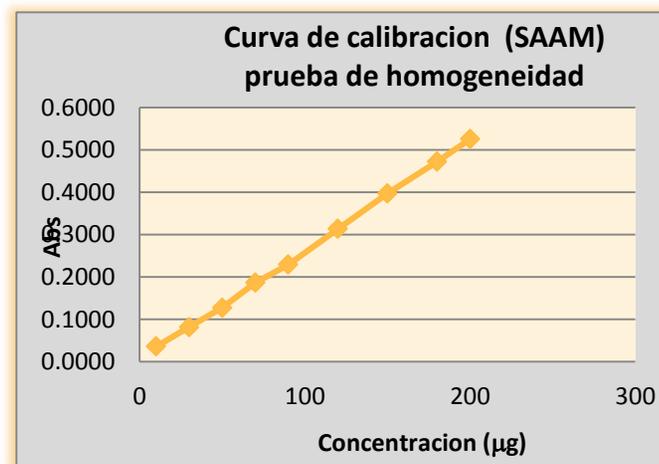
XV. ANEXO A

Cálculos para obtener la concentración de SAAM

Ejemplo de cálculo de concentración de SAAM

Curva de calibración analítica

Concentración	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Absorbancia promedio
0	0,0001	0,0001	0,0000	0,0001
10	0,0362	0,0365	0,0364	0,0363
30	0,0819	0,0819	0,0815	0,0817
50	0,1274	0,1277	0,1277	0,1275
70	0,1863	0,1866	0,1866	0,1864
90	0,2296	0,2288	0,2295	0,2292
120	0,3136	0,3133	0,3136	0,3134
150	0,3972	0,3976	0,3975	0,3974
180	0,4723	0,4722	0,4720	0,4721
200	0,5253	0,5251	0,5254	0,5252



Coeficiente de determinación r^2 Pendiente Ordenada al origen
 0,9996 0,00260 0,0030
 ECUACIÓN $y = 0.002984 + 0.0026027 * x$



Resultados de la Muestra en unidades de absorbancia

BOTELLA No.	Sub-muestras	1a. DILUCIÓN, mL		Lecturas. Unidades de Absorbancia			Promedio	Concentración en curva ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Concentración en curva ($\text{mg}/100\text{mL}$)	Concentración de la ecuación de SAAM (mg/L)	Factor de dilución	Concentración aplicando el factor de dilución (mg/L)
		ALÍCUOTA	AFORO	A1	A2	A3	Unidades de absorbancia					
1	Sub-muestra 1	5	50	0,2164	0,2168	0,2161	0,2164	82,010	0,08201	8,2010	10	82,0102
	Sub-muestra 2	5	50	0,2130	0,2130	0,2130	0,2130	80,691	0,08069	8,0691	10	80,6911
11	Sub-muestra 1	5	50	0,2145	0,2146	0,2144	0,2145	81,267	0,08127	8,1267	10	81,2674
	Sub-muestra 2	5	50	0,2172	0,2171	0,2165	0,2169	82,202	0,08220	8,2202	10	82,2023
19	Sub-muestra 1	5	50	0,2152	0,2151	0,2149	0,2151	81,485	0,08149	8,1485	10	81,4851
	Sub-muestra 2	5	50	0,2216	0,2214	0,2214	0,2215	83,944	0,08394	8,3944	10	83,9441
6	Sub-muestra 1	5	50	0,2184	0,2185	0,2186	0,2185	82,804	0,08280	8,2804	10	82,8042
	Sub-muestra 2	5	50	0,2102	0,2102	0,2100	0,2101	79,590	0,07959	7,9590	10	79,5896
14	Sub-muestra 1	5	50	0,2185	0,2184	0,2181	0,2183	82,740	0,08274	8,2740	10	82,7402
	Sub-muestra 2	5	50	0,2214	0,2213	0,2212	0,2213	83,880	0,08388	8,3880	10	83,8800
24	Sub-muestra 1	5	50	0,2121	0,2124	0,2123	0,2123	80,409	0,08041	8,0409	10	80,4093
	Sub-muestra 2	5	50	0,2254	0,2256	0,2253	0,2254	85,468	0,08547	8,5468	10	85,4681



ANEXO B

Estimación de incertidumbre



ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO (SAAM)
PARA ESTUDIO DE ESTABILIDAD (MUESTREO 1)

1. Concentración de la masa (mg/L) de SAAM medido del instrumento a través de la curva de Calibración.

$$\gamma_{(x-B)}$$

Para esta magnitud se consideran 3 fuentes de incertidumbre :

a) Respuesta del instrumento $\gamma_{(x)_i}$

b) El MRC γ_{MRC}

c) Valor del blanco γ_B

NOTA: La sal utilizada como MRC no cuenta con certificado, debido a que este no existe en el mercado, por lo que los cálculos se realizaron utilizando las especificados del marbete, cabe mencionar que para fines de redacción se utilizaran las siglas MRC pero en nuestro caso en particular no es un MRC

Donde (a) se basa en la expresión de la curva de calibración.

$$y = b_1 x + b_0 \quad \text{Ec 1}$$

Para lo cual se despeja "x" que es la concentración de la masa de SAAM

$$x = (y - b_0) / b_1 \quad \text{Ec. 2}$$

Substituyendo en términos de concentración de masa $\gamma_{(SAAM - B)}$ y señal del instrumento α se obtiene.

$$\gamma_{(x)_i} = \frac{(\alpha - b_0)}{b_1} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

$\gamma_{(x)_i}$ Concentración de masa (mg/L) de SAAM, resultado de la curva de calibración.

α Lectura observada en el instrumento, en este caso la magnitud absorbancia

b_0 Ordenada al origen de la curva de calibración

b_1 Pendiente de la curva de calibración



Concentración (ug)	Absorbancia			Promedio
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.0000	0.0234	0.0234	0.0233	0.0234
30.0000	0.0720	0.0720	0.0719	0.0720
50.0000	0.1414	0.1414	0.1415	0.1414
70.0000	0.2120	0.2120	0.2119	0.2120
90.0000	0.2656	0.2656	0.2656	0.2656
120.0000	0.3648	0.3649	0.3647	0.3648
150.0000	0.4575	0.4574	0.4575	0.4575
180.0000	0.5585	0.5583	0.5582	0.5583
200.0000	0.6033	0.6033	0.6032	0.6033

Pendiente = 0.00310
 Coeficiente de correlación = 0.99949
 Ordenada = -0.00925

La desviación estándar residual de la suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas S_{xx} , se calculan a partir de las ecuaciones 4 y 5.

$$S_{xx} = \sum_{j=i}^n (\gamma - \bar{\gamma})^2 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

- γ_i = Concentración de masa de cada disolución de referencia (MRC) empleadas en la curva de calibración.
- $\bar{\gamma}$ = Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones de referencias empleadas en cada uno e los puntos de la curva de calibración.
- S_{xx} = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas por la curva de calibración.

Concentración (μg)	Concentración Corregida γ	Absorbancia Corregida $\bar{\alpha}$	Absorbancia α	$(\alpha - \bar{\alpha})^2$	$(\gamma - \bar{\gamma})^2$
0	2.985	-0.009	0.000	0.000	7571.666
10	10.520	0.022	0.023	0.000	6317.024
30	26.193	0.084	0.072	0.000	4071.270
50	48.596	0.146	0.141	0.000	1714.285
70	71.343	0.208	0.212	0.000	348.097
90	88.639	0.270	0.266	0.000	1.852
120	120.630	0.363	0.365	0.000	938.226
150	150.515	0.456	0.457	0.000	3662.055
180	183.044	0.549	0.558	0.000	8657.150
200	197.535	0.611	0.603	0.000	11563.676

Promedio = 90 $\Sigma =$ 0.00044

$S_{xx} = 44845.3$



$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=i}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2}{n-2}}$$

Donde:

- α_j = Las "j" lecturas observadas correspondientes a γ_{MRC} conocidas con las que se calibró el instrumento.
- α_i = Las "i" lecturas observadas correspondientes a γ_{MRC} conocidas del instrumento en las curvas de calibración.
- S = Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal.

$$S = 0.0039441$$

Con los datos obtenidos se determina la ecuación de la línea recta que representa la curva de calibración. La incertidumbre estándar de la concentración de la masa del elemento químico a medir " γ " mediante la respuesta del instrumento " α " se calcula como:

$$u_{(\gamma_i)} = \frac{S}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\gamma - \bar{\gamma})^2}{S_{xx}}}$$

Donde:

- $u_{(\gamma_i)}$ = Incertidumbre del mensurando obtenida por el instrumento calibrado
- S = Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal
- b_1 = Pendiente de la línea recta
- p = Número de réplicas de la muestra en estudio
- n = Número de disoluciones (puntos) empleados en la curva de calibración multiplicado por el número de réplicas (lecturas) de cada disolución (punto), total de datos (i^*)
- $\gamma_{(x)i}$ = Concentración de masa (μg) en estudio
- $\bar{\gamma}_{MRC}$ = Se recomienda que sea la muestra control cuando se realice la validación del método
Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones empleadas en la curva de calibración
- S_{xx} = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas

$u_{(\gamma_x)}$ cuando γ es el valor del SAAM como MRC es de: 90 μg

CONTROL

$$u_{(\gamma_x)} = 0.77020605$$

2. Incertidumbre del material de referencia certificado MRC, se obtiene a partir del certificado.

$$\begin{aligned}
 u &= 0.01 & 99/100 &= 0.99 \\
 U_{MRC} &= U_{EXP} / K & K &= 2 \\
 U_{MRC} &= 0.005
 \end{aligned}$$



Si se realizaron diluciones para preparar el control MRC tomar en cuenta esa incertidumbre

$$\bar{\gamma}_{MRC} = \gamma_{MRC} * fd_1 * \dots * fd_n$$

$$fd_n = V_2/V_1$$

dónde:

fdn = Factor de dilución n

V2 = Volumen de aforo

V1 = Volumen de alícuota

Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente a la masa del MRC en la balanza

Linealidad de la balanza

La incertidumbre de la linealidad de la balanza es: 0.1 mg con un nivel de confianza de 95%

$$U = u/2 = 0.05 \text{ mg}$$

Alícuota	1010.6	mg de Lauril sulfato de sodio	} solución a
Aforo	100	mL con agua	
		fd1=	0.09895112
Alícuota	10	mL de solución a	} solución b
Aforo	1000	mL Agua acidificada pH 2 con ácido sulfúrico	
		fd2=	100
Alícuota	9	mL de solución b	} solución c
Aforo	100	mL con agua	
		fd3=	11.1111111

2a. Cálculo de incertidumbre de la respetabilidad del material volumétrico 100mL (clave: MV- 385-FQ), pipeta volumétrica de 10 mL (clave: PV-01-FQ) y 1000mL (clave: MV-100-FQ) los datos del material:

Nota: Se les asignaron claves al material volumétrico según la numeración interna del laboratorio.

Matraz volumétrico de 1000mL

u _{rep} =	0.0	Incertidumbre del analista
u _T =	0.489974	Incertidumbre de la temperatura
u _f =	0.23094	Incertidumbre del fabricante
u _{Cmatraz} =	2.93408E-07	Incertidumbre combinada

$$\frac{u_{V_n}}{V_n} = \sqrt{\left(\frac{u_R}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{\Delta T}}{V_n}\right)^2 + \left(\frac{u_{tol}}{V_n}\right)^2}$$

$$\frac{u_{V_n}}{V_n} = 2.9341E-07$$



Matraz volumétrico de 100 mL

$u_{rep} =$	0.0000632	Incertidumbre del analista
$u_T =$	0.0485	Incertidumbre de la temperatura
$u_f =$	0.1847	Incertidumbre del fabricante
$u_{Cmatraz} =$	9.96663E-08	Incertidumbre combinada

$$\frac{u_{v_n}}{V_n} = \sqrt{\left(\frac{u_R}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{\Delta T}}{V_n}\right)^2 + \left(\frac{u_{tol}}{V_n}\right)^2}$$

$$\frac{u_{v_n}}{V_n} = 9.9666E-08$$

Pipeta volumétrica de 10 mL

$u_{rep} =$	0.000032	Incertidumbre del analista
$u_T =$	0.0048	Incertidumbre de la temperatura
$u_f =$	0.0173	Incertidumbre del fabricante
$u_{Cpipeta vol.} =$	6.4233E-06	Incertidumbre combinada

$$\frac{u_{fd_n}}{fd_n} = \sqrt{(u_{v1}/V1)^2 + (u_{v2}/V2)^2} \quad \frac{u_{v_2}}{V_n} = 6.4233E-06$$

$$\frac{u_{fd_n}}{fd_n} = 0.05$$

Entonces la estimación de incertidumbre relativa final del MRC es estimada por:

$$u_{\gamma_{diMRCSAAM}} / \gamma_{diMRCSAAM} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{MRC}}}{\gamma_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{fd_n}}{fd_n}\right)^2}$$

$$u_{\gamma_{diMRCSAAM}} / \gamma_{diMRCSAAM} = 0.05$$

3. Incertidumbre debida al valor del blanco

$$u_{\gamma_B} = \frac{S_B}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

$S_B =$ Desviación estándar de las lecturas en concentración de masa de los blancos

$n =$ número de lecturas del blanco



	Concentración			S	u_{γ_B}
Blanco	3.1798	3.044	3.0154	0.08783	0.05070994

4. Incertidumbre estándar de la concentración de masa (mg/L) de SAAM, $\gamma_{(x-B)}$ y se estima al combinar las incertidumbres de

$$\gamma_{(x)i} \quad \bar{\gamma}_{MRC} \quad \text{y} \quad \gamma_B$$

$$u_{\gamma_{(x-B)}} = \sqrt{(u_{\gamma_{(x)i}})^2 + (u_{\gamma_B})^2 + (u_{MRC})^2}$$

5. Factor de corrección

$$u_{\gamma_{(x-B)}} = 0.771889792$$

El factor de corrección indica la pérdida del mensurando por el tratamiento de la muestra o interferencias al mensurando, por lo que se mide a través de una muestra control ó empleando un método de adición de MRC y se calcula empleando el siguiente modelo matemático.

$$fc = \frac{\gamma_{MRC}}{\gamma_{n \text{ exp}}}$$

Dónde:

- fc = Factor de corrección
- γ_{MRC} = Concentración en masa del MRC (μg) 90.00
- γ_{exp} = Promedio de las concentraciones experimentales del MRC (mg/L) 89.99

$$fc = 1.0000$$

La incertidumbre relativa del factor de corrección se realiza combinando la incertidumbre del estándar de la concentración de masa del MRC γ_{MRC} y la incertidumbre estándar de la concentración de masa experimental (de n mediciones) del MRC de forma relativa y cuadrática, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{u_{fc}}{fc} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{MRC}}}{\gamma_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\gamma_{\text{exp}}}}{\gamma_{\text{exp}}}\right)^2}$$

Incertidumbre de la concentración de la masa del MRC, se obtiene a partir del certificado.

$$u_{\gamma_{MRC}} = \frac{U\gamma_{MRC}}{K}$$

$$u_{\gamma_{MRC}} = 0.495$$

Si se realizaron diluciones para preparar el control MRC tomar en cuenta esa incertidumbre

$$\bar{\gamma}_{MRC} = \gamma_{MRC} * fd_1 * \dots * fd_n$$

NOTA: tomar datos de las disoluciones calculadas arriba



Entonces la estimación de incertidumbre relativa final del MRC es estimada por:

$$u_{\gamma_{dilMRCZn}} / \gamma_{dilMRCZn} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{MRC}}}{\gamma_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{fd_n}}{fd_n}\right)^2}$$

$$u_{\gamma_{dilMRCZn}} / \gamma_{dilMRCZn} = 0.05$$

Estimación de la incertidumbre estándar de concentración de la masa experimental de n mediciones del MRC.

EXP CONTROL	
Conc. (µg)	Abs
90.052	0.2700
89.984	0.2698
89.962	0.2697

promedio 89.999
SD 0.04691837

$$u_{\gamma_{exp}} = \frac{SD_{exp}}{\sqrt{n}}$$

$$u_{\gamma_{exp}} = 0.02708833$$

$$\frac{u_{fc}}{fc} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{MRC}}}{\gamma_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\gamma_{exp}}}{\gamma_{exp}}\right)^2}$$

$$\frac{u_{fc}}{fc} = 0.00063185$$

6. Estimación de la incertidumbre estándar de la concentración de la masa de SAAM.

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{(x-B)}}}{\gamma_{(x-B)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{fc}}{fc}\right)^2}$$

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = 0.05073417$$



7. Estimación de incertidumbre estándar combinada de la concentración de la masa (muestra) de SAAM

Nota: se recomienda que la medición de muestras sea de al menos 6 muestras y se calcula de la siguiente manera:

$$\gamma_{SAAM} = \gamma_{SAAM_i} + \beta$$

Dónde:

γ_{SAAM} = Concentración de masa obtenida del modelo matemático de medición para una muestra
 β = Fuente de incertidumbre debida a la reproducibilidad obtenida a partir de la medición de n= 6 muestras.

Muestras a 4°C muestra 1 (mg/L)
72.511
72.410
72.788

$$\beta = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$\beta = 0.11312$$

Promedio	72.569
SD	0.19592608

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{(x-B)}}}{\gamma_{(x-B)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{fc}}{fc}\right)^2 + \left(\frac{u_{\beta}}{\beta}\right)^2}$$

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = 0.16385215$$

Multiplicando por el factor K igual a 2

$$\gamma_{Zn} = 72.569 \pm 0.328$$

Muestras a 20°C muestra 1 (mg/L)
71.919
71.658
71.903

$$\beta = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$\beta = 0.08453$$

Promedio	71.8267
SD	0.14640174

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{(x-B)}}}{\gamma_{(x-B)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{fc}}{fc}\right)^2 + \left(\frac{u_{\beta}}{\beta}\right)^2}$$

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = 0.13525926$$



Multiplicando por el factor K igual a 2

$$\gamma_{Zn} = 71.827 \pm 0.271$$

Muestras a 40°C muestra 1 (mg/L)
70.304
69.979
70.405

$$\beta = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$\beta = 0.12863$$

Promedio 70.2294
SD 0.22279787

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{(x-B)}}}{\gamma_{(x-B)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{fc}}{fc}\right)^2 + \left(\frac{u_{\beta}}{\beta}\right)^2}$$

$$\frac{u_{\gamma_{Zn}}}{\gamma_{Zn}} = 0.17936658$$

Multiplicando por el factor K igual a 2

$$\gamma_{Zn} = 70.229 \pm 0.359$$



XVI. LISTA DE REFERENCIAS CONSULTADAS:

- 1) Materiales de referencia – Términos y definiciones, 160 NMX-CH. IMNC (2006).
- 2) GUIA ILAC G-9
- 3) Determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas, 039 NMX-AA.SCFI (2001).
- 4) Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, 17025 NMX-EC-IMNC-(2006).
- 5) Ayres GH. Análisis químicos cuantitativos. Oxford UniversityPress. México. 2001
- 6) Eaton AD, Clesceri LS, Graenberg AE. Standard Methods for the Examination of Water and Whastewater. 19th Ed. Washington DC. American Public Health Association. 1995.
- 7) Materiales de referencia – Calibración en química analítica y el uso de materiales de referencia certificados, 162 NMX-CH. IMNC (2006).
- 8) Espectroscopia de UV-VIS. Fecha de consulta: agosto 2013. Disponible en: <http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/ABSUV.htm>
- 9) Materiales de referencia – Uso de los materiales de referencia certificados, 163 NMX-CH. IMNC (2006).
- 10) Materiales de referencia – Requerimientos generales para la competencia de productos de materiales de referencia, 164 NMX-CH. IMNC (2006).
- 11) Centro Nacional de Metrología (CENAM). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de espectrofotometría de ultravioleta visible. México. 2008
- 12) Materiales de referencia – Principios generales y estadísticos para certificación, 165 NMX-CH. IMNC (2008).
- 13) Estabilidad de Fármacos y Medicamentos, NOM 073-SSA1 (2005).
- 14) Sanchez, JF. Introduccion al análisis de datoas en farmacia y química clínica, UNAM, FES Zaragoza. Mexico 1997.
- 15) Guía para la expresión de incertidumbre de las mediciones. 140 NMX-CH IMNC (2002)



-
- 16) American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Water Environment Federation
 - 17) Análisis de aguas – Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos, 115 NMX-AA. SCFI (2001)
 - 18) Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. 2ª ed. LimusaWiley. México. 2007
 - 19) García MA. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. México 2002