

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Área Académica de Carrera de Licenciatura en Ingeniería
Física

Implementación de un método primario de medida para la calibración de un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV/Vis) de alta resolución para el establecimiento de un patrón nacional en la escala de longitud de onda en el Laboratorio Costarricense de Metrología

Proyecto Final de Graduación para optar por el título de Ingeniero Físico, con el grado académico de Licenciatura

LABORATORIO COSTARRICENSE DE METROLOGÍA

Realizado por: José Abrahan Alfaro Alvarado

Correo electrónico: abrapro@estudiantec.cr

Teléfono: 8722 6650

Profesor tutor: Bryan Calderón Jiménez, Ph. D.

Profesor lector: Raziel Farid Sanabria Sandí, M. Sc.

Profesor lector: Dennis Miguel Murillo Salazar, Lic.

Asesor industrial: Jimmy Venegas Padilla, Lic.

Cartago, 14 de noviembre del 2022

Índice

Índice de figuras	IV
Índice de tablas	IV
Resumen	X
Abstract	XI
Agradecimientos	XII
Dedicatoria	XIII
Epígrafe	XIV
1. Introducción	1
1.1. Identificación de la institución	1
1.2. Justificación del proyecto	2
1.2.1. Consideraciones Personales	2
1.2.2. Consideración sobre el impacto social del LCM en el país	2
1.2.3. Problemática a solventar - trazabilidad metrológica y la espectrofotometría	2
1.3. Objetivos	4
1.4. Alcances y limitaciones del proyecto	4
2. Marco Teórico	6
2.1. Metrología y su importancia	6
2.2. Términos y definiciones importantes en Metrología	6
2.3. Espectrofotometría UV/Vis	6
2.4. Calibración de espectrofotómetros UV/Vis	6
2.4.1. Patrones de medida utilizados en la calibración de espectrofotómetros UV/Vis	7
2.4.2. Caracterización de parámetros instrumentales	10
2.5. Validación de métodos de ensayo y calibración	14
2.5.1. Principio detrás de una validación	14
2.5.2. Alcance de la validación	14
2.5.3. Parámetros de mérito en la validación	15
2.5.4. Evaluación de los resultados de validación	15
2.6. Evaluación de datos de medición	15
2.6.1. Primera etapa: calibración primaria del EFAR	16

2.6.2. Segunda etapa: evaluación de los resultados de medida asociados a los barridos espectrales del SRM 2034 a partir del EFAR.	20
2.6.3. Criterio del Error Normalizado	26
3. Metodología	27
3.1. Procedimiento ejecutado en las pruebas de caracterización de los parámetros instrumentales	27
3.1.1. Prueba de Ruido Fotométrico	27
3.1.2. Prueba de Estabilidad fotométrica	28
3.1.3. Prueba de Línea Base Plana	28
3.1.4. Prueba de Luz parásita	29
3.1.5. Verificación del ABE	31
3.2. Definición de las longitudes de onda patrón del Hg	31
3.3. Implementación del método primario de calibración	32
3.3.1. Montaje del plan de validación	32
3.3.2. Ejecución del plan de validación	35
3.3.3. Análisis de resultados	36
3.4. Generación de propuestas de documentación	36
3.5. Cronograma del Proyecto de Graduación	37
4. Equipos e instrumentos	38
5. Datos y Resultados	39
5.1. Resultados de la caracterización del EFAR	39
5.1.1. Resultados de la prueba de ruido fotométrico	39
5.1.2. Resultados de la prueba de estabilidad fotométrica	41
5.1.3. Resultados de la prueba de línea base plana	42
5.1.4. Resultados de la prueba de luz parásita	42
5.1.5. Resultados de la prueba de verificación del ABE	43
5.2. Resultados de la primera etapa del plan de validación: Calibración primaria del EFAR .	44
5.2.1. Resultados de la calibración para un ABE = 0,1 nm	45
5.2.2. Resultados de la calibración para un ABE = 0,5 nm	46
5.2.3. Resultados de la calibración para un ABE = 1 nm	47
5.2.4. Resultados de la calibración para un ABE = 2 nm	48
5.3. Resultados de la segunda etapa del plan de validación: Medición del filtro SRM 2034 . .	49
5.3.1. Diferencias por error normalizado entre el enfoque 1.1 y 1.2	49
5.3.2. Resultados de las desviaciones estándar experimentales del EFAR al medir el SRM 2034	51

5.3.3. Resultados de los sesgos y errores normalizados de longitud de onda de transmitancia mínima del EFAR en función de cada ABE y de cada RB.	51
6. Análisis de resultados	56
6.1. Caracterización de la escala fotométrica y de longitud de onda	56
6.1.1. Ruido fotométrico	56
6.1.2. Estabilidad fotométrica	57
6.1.3. Línea Base Plana	57
6.1.4. Luz parásita	57
6.1.5. Verificación del ABE	58
6.2. Calibración primaria del EFAR	60
6.2.1. Origen de los enfoques 1 y 2	60
6.2.2. Tendencias trapezoidales y normales de los errores de medida del EFAR en función del enfoque	61
6.2.3. Análisis de resultados de la primera etapa de la validación	62
6.3. Medición de las longitud de transmitancia mínima del SRM 2034	63
6.3.1. Origen de los sub-enfoques 1.1 y 1.2	63
6.3.2. Diferencias entre los enfoques 1.1 y 1.2	63
6.3.3. Análisis de resultados de la segunda etapa de la validación	63
7. Conclusiones	65
A. Apéndices	66
A.1. Terminología metrológica	66
A.2. Espectrofotometría y sus aplicaciones	69
A.3. Fundamentos físicos de la espectrofotometría de absorción molecular UV/Vis	70
A.3.1. Interacción de la luz con la materia	70
A.4. Componentes básicos de un espectrofotómetro UV/Vis	72
A.4.1. Fuentes estables de radiación	73
A.4.2. Selectores de longitud de onda	73
A.4.3. Compartimentos de muestra y de referencia	75
A.4.4. El detector	75
A.4.5. Componentes básicos del EFAR del LCM	76
A.5. Cuantificación de s_r y s_I según la norma ISO 5725-2	77
A.6. Evidencias de metodología	79
A.6.1. Filtros de densidad neutra para las pruebas de caracterización	79
A.6.2. Filtros de corte preparados para la prueba de luz parásita	80
A.6.3. Filtro utilizado para eliminar el particulado de los filtros de corte	80

A.6.4. Lámpara patrón tipo lápiz de Hg	81
A.6.5. Montaje experimental para la alineación de la lámpara de Hg	82
A.6.6. Configuraciones operacionales para la prueba de exactitud del EFAR	83
A.6.7. Preparación del filtro SRM 2034	84
A.6.8. Colocación del SRM 2034 en el EFAR para la medición de su espectro de trans- mitancia	85
A.6.9. Código de programación para la validación de la hoja de cálculo	85
A.7. Ejemplos de presupuestos de incertidumbres en la calibración primaria del EFAR	85
A.8. Ejemplos de presupuestos de incertidumbres en las mediciones finales del SRM 2034	86
B. Anexos	88
B.1. Espectro de emisión de línea de lámpara tipo lápiz de mercurio	88
B.2. Certificado de calibración del SRM 2034 emitido por el NIST	89
B.3. Especificaciones garantizadas del PerkinElmer en el momento de su adquisición	89

Índice de figuras

1.	Cadena de trazabilidad actual para mediciones espectrofotométricas en Costa Rica.	3
2.	Diseño básico de una lámpara de descarga tipo lápiz de Hg. Tomado de [1].	8
3.	Filtro de óxido de Holmio - SRM 2034: a) caja de almacenamiento, b) cubeta con solución.	8
4.	a) Espectro de emisión de descarga de arco de Hg. b) Espectro de absorción de solución de óxido de holmio en ácido perclórico. Ambos junto con algunas longitudes de onda de referencia. Tomados de [2].	9
5.	Espectros de transmitancia relativa del conjunto de filtros SRM 1930 y SRM 930e producidos por el NIST. Tomado de [3].	10
6.	Medición de las pruebas de caracterización de parámetros instrumentales. a), b), c) y d) tomadas de [4]; e) tomada de [5].	13
7.	Diagrama de Ishikawa para la cuantificación de los aportes a la incertidumbre del error de medida del EFAR.	18
8.	Diagramas de Ishikawa para la cuantificación de los aportes a la incertidumbre de la medición de las longitudes de onda de transmitancia mínima del SRM 2034 que surgen al aplicar el enfoque 1.	22
9.	Diagrama de Ishikawa para la cuantificación de los aportes a la incertidumbre de la medición de las longitudes de onda de transmitancia mínima del SRM 2034 que surgen al aplicar el enfoque 2.	25
10.	Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 0,10 nm.	39
11.	Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 0,50 nm.	40
12.	Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 1 nm.	40
13.	Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 2 nm.	41
14.	Estabilidad fotométrica en los extremos del rango UV/Vis del EFAR en función del ABE.	41
15.	Línea base plana en función del ABE, para tres rapidezces de barrido espectral.	42
16.	Luz parásita en función del ABE, usando el filtro de corte de KCl y la metodología USP/DAP.	42
17.	Luz parásita en función del ABE, según la metodología ASTM E387.	43
18.	Errores en los ABE después del cálculo de los ABE efectivos del día experimental 1.	43
19.	Errores en los ABE después del cálculo de los ABE efectivos del día experimental 2.	44
20.	Errores en los ABE después del cálculo de los ABE efectivos del día experimental 3.	44
21.	Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 0,1 nm.	46

22.	Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 0,5 nm.	47
23.	Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 1 nm.	48
24.	Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 2 nm.	49
25.	Error normalizado de las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del EFAR, a una RB = 14,91 nm/min y un ABE = 0,5 nm.	50
26.	Error normalizado de las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del EFAR, a una RB = 29,63 nm/min y un ABE = 0,5 nm.	50
27.	Error normalizado de las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del EFAR, a una RB = 72,73 nm/min y un ABE = 0,5 nm.	50
28.	Efecto del ABE en las líneas espectrales medidas a la longitud de onda de 253,65 nm.	58
29.	Efecto del ABE en las líneas espectrales medidas a las longitudes de onda de 312,57 nm y 313,17 nm.	59
30.	Efecto del ABE en las líneas espectrales medidas a las longitudes de onda de 365,02 nm; 365,48 nm y 366,33 nm.	59
31.	Error de ABE = 0,50 nm mal cuantificado en el Software NanoUVVIS debido a la pérdida de capacidad resolutive del EFAR en las longitudes de onda de 312,57 nm y 313,17 nm.	60
32.	Simulación vía Monte Carlo (código programado en Python) de la distribución de probabilidad del error de medida asociado a la longitud de onda de 253,66 nm y un ABE = 0,1 nm.	61
33.	Simulación vía Monte Carlo (NIST Uncertainty Machine) de la distribución de probabilidad del error de medida asociado a la longitud de onda de 253,66 nm y un ABE = 0,1 nm.	62
A.1.	Espectro de radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda. Tomado de [6].	71
A.2.	Fenómeno físico de la transmisión de la luz, relacionado con los conceptos de transmitancia y absorbancia en función de las potencias ópticas de los haces incidentes y salientes. Tomado de [7].	72
A.3.	Esquema de un sistema monocromador, con su rejilla de difracción y sus rendijas de entrada y salida. Tomado de [7].	74
A.4.	Salida real de un sistema monocromador compuesto por una rejilla de difracción. Tomado de [7].	74
A.5.	Se muestra un instrumento de doble haz en el espacio. Aquí, la radiación del monocromador se divide (gracias al divisor del haz) en dos haces que pasan simultáneamente a través de los compartimentos de referencia y de la muestra antes de interactuar con el último elemento, el detector. Tomado de [7].	75
A.6.	Esquema ilustrativo del interior del espectrofotómetro de alta resolución PerkinElmer LAMBDA 950. Tomado de [8].	77

A.7. Filtros de densidad neutra utilizados en las pruebas de caracterización del EFAR.	79
A.8. Filtros de corte preparados para las pruebas de luz parásita.	80
A.9. Filtro marca sartorius para eliminar el particulado de los filtros de corte para la prueba de luz parásita.	80
A.10. Lámpara de descarga de arco de Hg tipo lápiz, utilizada para la prueba de verificación del ABE y la calibración primaria del EFAR.	81
A.11. Funcionamiento de la escala graduada para el proceso de alineamiento. La escala roja es la escala útil y define las rotaciones angulares a cuantificar.	82
A.12. Limpieza del filtro SRM 2034 antes de las mediciones con el EFAR.	84
A.13. Colocación del filtro SRM 2034 en el compartimento de muestras.	85
B.14. Líneas de emisión aseguradas por el fabricante de la lámpara de Hg. Tomados de [9]. . .	88
B.15. Longitudes de onda certificadas de las 14 bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034. Tomado del certificado del LCM.	89
B.16. Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto al ruido fotométrico. Tomados de [10].	89
B.17. Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto a la estabilidad fotométrica. Tomados de [10].	90
B.18. Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto a la línea base plana. Tomados de [10].	90
B.19. Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto a la luz parásita. Tomados de [10].	90

Índice de tablas

1.	Información de contactos.	1
2.	Pruebas de caracterización asociadas a la calibración de espectrofotómetros UV/Vis. . .	5
3.	Pruebas descartadas en la caracterización y calibración del EFAR.	5
4.	Condiciones operativas del EFAR para la prueba de ruido fotométrico.	27
5.	Condiciones operativas del EFAR para la prueba de estabilidad fotométrica.	28
6.	Condiciones operativas del EFAR para la prueba de línea base plana.	29
7.	Masas requeridas para la preparación de los filtros de corte.	29
8.	Condiciones operativas del EFAR para la prueba de luz parásita usando el filtro de corte de KCl.	30
9.	Condiciones operativas del EFAR para la prueba de luz parásita usando los filtros de NaI y NaNO ₂	30
10.	Resumen de los parámetros cuantificados y su respectivo tratamiento posterior.	31
11.	Líneas espectrales de emisión del Hg recomendadas por diversas fuentes bibliográficas para la calibración de espectrofotómetros UV/Vis.	32
12.	Requisito analítico de los sesgos para la calibración primaria.	33
13.	Requisito analítico de las incertidumbres expandidas para la calibración primaria.	34
14.	Requisito analítico de las desviaciones estándar (nm) para las indicaciones del EFAR al medir el SRM 2034.	34
15.	Requisito analítico de los valores absolutos de los sesgos (nm) para las indicaciones del EFAR al medir el SRM 2034.	35
16.	Cronograma de Actividades.	37
17.	Equipos o instrumentos empleados en el proyecto de graduación.	38
18.	Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 0,1 nm.	45
19.	Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 0,5 nm.	46
20.	Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 1 nm.	47
21.	Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 2 nm.	48
22.	Desviaciones estándar (nm) máximas resultantes por ABE y RB para las indicaciones del EFAR al medir el SRM 2034.	51
23.	Resultados de los valores absolutos de los sesgos del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 14,91 nm/min.	52
24.	Resultados de los valores absolutos de los sesgos del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 29,63 nm/min.	53
25.	Resultados de los valores absolutos de los sesgos del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 72,73 nm/min.	53

26. Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 14,91 nm/min.	54
27. Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 29,63 nm/min.	54
28. Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 72,73 nm/min.	55
A.1. Fuentes comunes de radiación electromagnética para espectroscopía.	73
A.2. Descripción técnica del espectrofotómetro PerkinElmer LAMBDA 950.	76
A.3. Errores para tres días experimentales y para n repeticiones por día	78
A.4. Análisis de varianza para el ANOVA de un solo factor	78
A.5. Parámetros utilizados en las configuraciones operacionales de las pruebas de exactitud del EFAR.	83
A.6. Presupuesto de incertidumbre del enfoque 1 para determinación del error de medida del EFAR en la longitud de onda de 253,66 nm para un ABE = 0,1 nm.	86
A.7. Presupuesto de incertidumbre del enfoque 2 para determinación del error de medida del EFAR en la longitud de onda de 253,66 nm para un ABE = 0,1 nm.	86
A.8. Presupuesto de incertidumbre del enfoque 1.1 para determinación de la banda de transmitancia mínima igual a 240,97 nm del SRM 2034 a partir del EFAR para un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.	87
A.9. Presupuesto de incertidumbre del enfoque 1.2 para determinación de la banda de transmitancia mínima igual a 240,97 nm del SRM 2034 a partir del EFAR para un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.	87
A.10. Presupuesto de incertidumbre del enfoque 2 para determinación de la banda de transmitancia mínima igual a 240,97 nm del SRM 2034 a partir del EFAR para un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.	87

De acuerdo con las regulaciones del programa Licenciatura en Ingeniería Física del Instituto Tecnológico de Costa Rica, el presente documento fue revisado y aprobado por el comité formado por las siguientes personas:

Bryan Calderón Jiménez
Profesor tutor

Dennis Murillo Salazar
Profesor lector

Raziel Sanabria Sandi
Profesor lector

Keywords — lámpara de Hg, repetibilidad intermedia, incertidumbre por ABE, error normalizado, validación.

Resumen

El presente informe describe la caracterización de un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV/Vis) de alta resolución, junto con el montaje y ejecución de un plan de validación de un método primario para su calibración y establecimiento como patrón nacional en la escala de longitud de onda, en el Laboratorio Costarricense de Metrología. Se caracterizó el ruido fotométrico, la estabilidad fotométrica, la línea base plana, la luz parásita y el ancho de banda espectral, y se compararon dichos parámetros con las especificaciones del fabricante. La repetibilidad, precisión intermedia, sesgo e incertidumbre fueron los parámetros de mérito utilizados como requisitos analíticos en el plan de validación. Los resultados de la caracterización indicaron que el espectrofotómetro cumple con las especificaciones del fabricante. Diez repeticiones a lo largo de tres días experimentales fueron ejecutadas para la cuantificación de los parámetros de mérito asociados a la calibración primaria. Dicha calibración reportó incertidumbres expandidas mayores cuando se consideró la precisión intermedia de medida del equipo como una fuente de incertidumbre por encima de la repetibilidad de medida. Los resultados de la validación, declararon al método primario de medida como apto para su uso previsto, al considerar cuatro anchos de banda espectrales y tres rapidezces de barrido espectral.

Keywords — Hg lamp, intermediate precision, uncertainty by ABE, normalized error, validation.

Abstract

This report describes the characterization of a high-resolution ultraviolet-visible (UV/Vis) spectrophotometer, together with the assembly and execution of a validation plan for a primary method for its calibration and establishment as a national standard in the length scale of wavelength, at the Costa Rican Metrology Laboratory. Photometric noise, photometric stability, flat baseline, stray light, and spectral bandwidth were characterized, and these parameters were compared with the manufacturer's specifications. Repeatability, intermediate precision, bias, and uncertainty were the parameters of merit used as analytical requirements in the validation plan. The characterization results indicated that the spectrophotometer complies with the manufacturer's specifications. Ten repetitions throughout three experimental days were executed for the quantification of the merit parameters associated with the primary calibration. Said calibration reported higher expanded uncertainties when the intermediate measurement precision of the equipment was considered a source of uncertainty above the measurement repeatability. The validation results declared the primary measurement method as fit for its intended use considering four spectral bandwidths and three spectral scan speeds.

Agradecimientos

Este proyecto de graduación fue realizado en el Laboratorio Costarricense de Metrología.

Expreso mi agradecimiento a:

- El Dr. Bryan Calderón Jiménez, Jefe del Departamento de Metrología Química por su apoyo en la realización de este proyecto de graduación.
- Hago un reconocimiento al Lic. Jimmy Venegas Padilla, por la orientación brindada.

Asimismo agradezco:

A todos las profesoras y profesores de la escuela de física del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por su profesionalismo. Me enseñaron a ver el mundo con otros ojos y me formaron como físico e ingeniero durante todos estos años de estudiante en la carrera de Ingeniería Física. En especial al Lic. Dennis Murillo, por confiar en mí y creer en mis capacidades; y al M. Sc. Raziel Sanabria, por hacer de la metrología una de mis pasiones.

José Abrahan Alfaro Alvarado

Dedicatoria

Con mucho cariño

A mi madre, Cecilia Alvarado Jiménez. Gracias por todo el apoyo incondicional a lo largo de mis 23 años de vida. Eres la persona más especial de mi vida, y con este logro espero poder devolver un poco de todo lo que me has dado.

A mi padre, Ronald Alfaro Poveda. Gracias por siempre creer en mí y por colocar en mi formación todo tu esfuerzo. Eres y seguirás siendo una fuente de inspiración y admiración por tu lucha y superación en cada etapa de la vida. Eres mi ejemplo a seguir como padre y como ser humano.

A mis hermanos, Karol y Ronald, por apoyarme siempre, por ser mi ejemplo y guía para lograr mis metas.

A mi novia, Sofía, por estar siempre a mi lado.

José Abrahan Alfaro Alvarado

Epígrafes

Any measurement that you make without any knowledge of its uncertainty is completely meaningless.

MIT Prof. Walter Lewin

La ciencia comienza donde empieza la medición, no siendo posible la ciencia exacta en ausencia de mediciones.

Dmitri Ivánovich Mendeléyev

1. Introducción

1.1. Identificación de la institución

Como parte fundamental del desarrollo de la Metrología en Costa Rica, en el año 2002, mediante la Ley 8279: “Sistema Nacional para la Calidad”, se crea el **Laboratorio Costarricense de Metrología (LCM)**, órgano de desconcentración máxima, con personalidad jurídica instrumental para el desempeño de sus funciones, adscrito al Ministerio de Economía, Industria y Comercio que se registró por las normas nacionales e internacionales aplicables [11].

Específicamente, el LCM tiene como objetivo principal:

“garantizar trazabilidad de las mediciones que se ejecutan en el país hasta la realización de ellas acorde con lo establecido por el Sistema Internacional de Unidades (SI); difundir y fundamentar la metrología nacional, custodiar los patrones nacionales y fungir como laboratorio nacional de referencia en metrología.”

El LCM cuenta con una estructura institucional que le permite atender todas las responsabilidades que le atañen. Dentro de dicha estructura se encuentra el Departamento de Metrología Química (DMQ), el cual, está conformado por seis Grupos Científicos (GC). Específicamente, este **Proyecto de Graduación** es apoyado por el Grupo Científico de Soporte Metrológico a la Industria (GC-SMI). LCM [11] indica que el GC-SMI:

“tiene como propósito la prestación de servicios que comprenden ensayos, calibraciones, asesorías, auditorías y/o evaluaciones de gestión que contribuyan con el desarrollo y cumplimiento de estándares nacionales e internacionales de calidad, así como el aumento de las capacidades técnicas de empresas y otras partes interesadas. Estos procesos se llevan a cabo siguiendo los lineamientos generales de la norma INTE/ISO/IEC 17025, en su versión vigente, cuando corresponda.”

Como parte del panel para este proyecto de graduación, a continuación en la tabla 1 se presenta la información pertinente tanto del tutor como del asesor:

Tabla 1: Información de contactos.

Rol dentro del panel	Nombre	Información adicional	Información de contacto
<i>Tutor</i>	Dr. Bryan Calderón Jiménez	Director del Departamento de Metrología Química del LCM — Profesor en el Área Académica de Carrera de Licenciatura en Ingeniería Física del TEC	Correo: bcalderon@lcm.go.cr Teléfono: 2220-7516
<i>Asesor</i>	Lic. Jimmy Venegas Padilla	Investigador y metrólogo encargado del desarrollo de la estructura metrológica en mediciones inorgánicas del LCM — Encargado del desarrollo de la infraestructura metrológica para la calibración del espectrofotómetro UV-Vis	Correo: jvenegas@lcm.go.cr Teléfono: 2220-7520

1.2. Justificación del proyecto

1.2.1. Consideraciones Personales

En primer lugar, el autor, estudiante de la carrera de Licenciatura en Ingeniería Física ha tenido la oportunidad de formar parte de actividades académicas como asistente para los cursos de Física General IV, Mecánica Cuántica, Óptica y Laboratorio de Óptica, esto acompañado por un gran interés por la Metrología y su desarrollo en todos los alcances, fue pieza clave para la búsqueda de oportunidades en la modalidad de **Proyecto de Graduación** con áreas afines a la *Óptica, Física Experimental y Metrología*.

Teniendo en cuenta lo anterior, y considerando que el LCM se distingue por ser el laboratorio nacional de referencia el cual debe garantizar la trazabilidad nacional en una amplia gama de mediciones que dan sustento al Sistema Nacional para la Calidad, fue por lo que se le consideró como una institución adecuada para el desarrollo de este Proyecto de Graduación.

1.2.2. Consideración sobre el impacto social del LCM en el país

Actualmente, al Departamento de Metrología Química del LCM acuden: “laboratorios secundarios de calibración, laboratorios de ensayos fisicoquímicos, empresas de productos y servicios, academia, institutos nacionales de Metrología, laboratorios designados y otras partes interesadas que requieran servicios dentro de las capacidades técnicas del departamento” [11], con la confianza en la institución, y por ende, en las calibraciones de alto nivel de una gran variedad de equipos. El autor considera, que con este proyecto de graduación podrá aportar al desarrollo de la Metrología a nivel nacional.

1.2.3. Problemática a solventar - trazabilidad metrológica y la espectrofotometría

Para empezar, el GC-SMI del Departamento de Metrología Química del LCM cuenta con un espectrofotómetro ultravioleta - visible (UV/Vis) de alta resolución (se denominará a dicho instrumento como EFAR por Espectrofotómetro de Alta Resolución de aquí en adelante) marca *PerkinElmer* modelo *LAMBDA 950*. Actualmente el EFAR se utiliza de dos maneras:

1. **Calibración de filtros de densidad neutra, filtros de opacidad y filtros de óxido de holmio:** el EFAR funciona como un dispositivo de transferencia. El LCM cuenta con materiales de referencia certificados (MRC) para cada magnitud en las escalas: fotométrica (transmitancia, opacidad) y de longitud de onda (líneas de absorción y emisión). Por consiguiente, el EFAR es el medio comparador a partir del cual se logran cuantificar correcciones e incertidumbres para los filtros de óxido de holmio de los usuarios finales partiendo de los valores certificados de los MRC.
2. **Mediciones químicas:** el EFAR es también utilizado para realizar mediciones químicas que se basan en principios de la espectrofotometría de absorción UV/Vis siguiendo la Ley de Lambert-Beer.

Para la **escala de longitud de onda**, el MRC de mayor jerarquía metrológica a nivel nacional es un *Filtro de óxido de Holmio (en solución)* - SRM 2034 generado por el NIST (National Institute of Standards and Technology), el cual presenta una jerarquía metrológica tal, que permite calibrar los filtros de óxido de holmio de los usuarios finales usando como dispositivo de transferencia al EFAR (ver figura 1). En resumen, el EFAR

permite diseminar las características superiores metrológicas de mediciones espectrofotométricas a todos los espectrofotómetros del país, iniciando la cadena de trazabilidad metrológica a nivel nacional con el SRM 2034 y terminando con el usuario final.

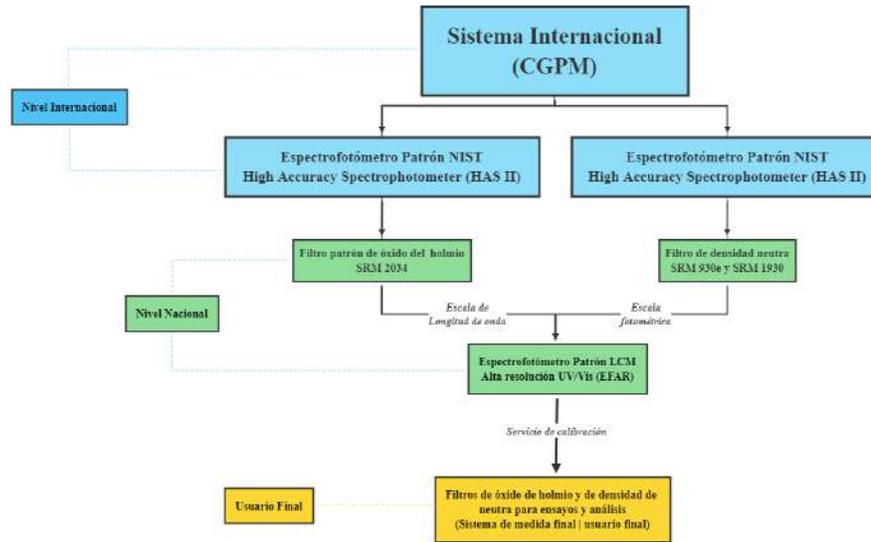


Figura 1: Cadena de trazabilidad actual para mediciones espectrofotométricas en Costa Rica.

Como puede observarse de la cadena de trazabilidad presentada en la figura 1, Costa Rica presenta una dependencia metrológica directa hacia el NIST, debido a que es dicha institución la que generó y certificó los materiales de referencia como el SRM 2034 [12]. Dichos materiales, son resultado del programa NTRM (NIST Traceable Reference Materials, por sus siglas en inglés), que desde sus inicios en la década de los noventa, ha servido como mecanismo de respuesta ante las problemáticas ocasionadas por la creciente necesidad de materiales de referencia trazables a los patrones internacionales [3]. Sin embargo, específicamente el servicio de generación, certificación y re-certificación de los filtros de óxido de holmio SRM 2034 ha sido discontinuado por el NIST. Para promover en los Estados Unidos la comercialización y producción de patrones secundarios desarrollados por otros laboratorios o marcas comerciales [12].

En este contexto, para el LCM es de vital importancia seguir brindando los servicios de calibración de filtros de óxido de holmio, así como seguir brindando la trazabilidad a nivel nacional del servicio de calibración de espectrofotómetros UV/Vis. Lo expuesto se resalta aún más, dada la importancia que tienen este tipo de instrumentos de medida, en múltiples mediciones y mensurandos, dentro de los campos de la Química, Farmacia, Biotecnología y Microbiología relacionados con sectores del desarrollo industrial, científico y tecnológico del país. En este sentido, el LCM desea eliminar la dependencia de trazabilidad en los procesos de calibración de filtros de óxido de holmio, además, ampliar la capacidad de medición del servicio, y finalmente, establecer al EFAR como patrón nacional de transferencia para la escala de longitud de onda. En otras palabras, se desea que el EFAR deje de ser un dispositivo de transferencia que asigna valores por comparación con el SRM 2034, y que

sea el propio EFAR el que brinde mediciones con un nivel metrológico tal que permita dar trazabilidad a todas las mediciones espectrofotométricas en la escala de longitud de onda que se realizan en el país.

1.3. Objetivos

Objetivo general

Implementar un método primario de medida para la calibración de un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV/Vis) de alta resolución (EFAR) para el establecimiento de un patrón nacional en la escala de longitud de onda en el Laboratorio Costarricense de Metrología.

Objetivos específicos

1. Caracterizar parámetros instrumentales del EFAR asociados al fenómeno de medición en la escala de longitud de onda y escala fotométrica.
2. Implementar la validación del método primario de medida para la calibración del EFAR con su respectivo análisis de resultados e informe de validación del método.
3. Desarrollar una propuesta documental asociada al procedimiento de calibración primario del EFAR que cumpla con los requisitos de la norma internacional INTE/ISO/IEC 17025:2017.

1.4. Alcances y limitaciones del proyecto

Este proyecto de graduación desarrolla e implementa la validación de un método primario de medida para la calibración del EFAR, con el fin de eliminar la dependencia de trazabilidad hacia el NIST en los procesos de calibración de filtros de óxido de holmio. Con esto, se amplía la capacidad de medición de los servicios de calibración espectrofotométricos del laboratorio y se establece al EFAR como el equipo primario de transferencia para la escala de longitud de onda.

Detrás de una calibración primaria, existe un proceso de caracterización y documentación meticuloso que se debe realizar, como parte del cumplimiento de la norma internacional ISO/IEC 17025:2017. Este proyecto de graduación se enfoca solo en la calibración de la escala de longitud de onda del EFAR, sin embargo, algunas de las pruebas de caracterización pertenecientes a la calibración de la escala fotométrica se realizaron por dos motivos. El primero, como método de entrenamiento y aprendizaje para que el autor de este proyecto se familiarice con las funciones tanto instrumentales como de software; y el segundo, para obtener resultados que se utilizarán en una futura calibración de la escala fotométrica. En esta línea, la tabla 2 presenta las pruebas de las cuáles se conforma la calibración de cada escala. En la última columna de la tabla 2, se indica que algunas de las pruebas no se realizaron del todo; las razones del descarte de algunas de las pruebas se mencionan en la tabla 3.

Tabla 2: Pruebas de caracterización asociadas a la calibración de espectrofotómetros UV/Vis.

Escala	Prueba	Patrón o MRC requerido	Disponibilidad del patrón o MRC en el LCM	Ejecución en el proyecto de graduación
<i>Longitud de onda</i>	Exactitud y precisión de la longitud de onda	Lámpara de Hg	✓	Sí
		Solución de óxido de holmio en ácido perclórico (HClO ₄)	✓	Sí
	Verificación del ABE	Lámpara Hg	✓	Sí
<i>Fotométrica</i>	Exactitud y precisión fotométrica	Filtros de densidad neutra	✓	No
		Filtros de metal en cuarzo	X	No
		Solución de dicromato de potasio	X	No
	Ruido fotométrico	Filtros de densidad neutra	✓	Sí
	Estabilidad fotométrica	No requiere	-	Sí
	Línea base plana	No requiere	-	Sí
	Luz parásita	Filtros de corte de KCl, NaI y NaNO ₂	✓	Sí
	Ángulo de incidencia	Filtros de densidad neutra	✓	No
Resolución	Solución de tolueno/hexano	X	No	
Linealidad de la escala fotométrica	Solución de dicromato de potasio	X	No	

Tabla 3: Pruebas descartadas en la caracterización y calibración del EFAR.

Prueba descartada	Razón de descarte o limitante
<i>Exactitud y precisión fotométrica</i>	La absorbancia y transmitancia pertenecen a la escala fotométrica. Dicha escala no se calibrará en el desarrollo de este proyecto de graduación.
<i>Ángulo de incidencia</i>	En las mediciones habituales del EFAR en el LCM, no se cambia la configuración del ángulo de incidencia en las mediciones, por lo que no es necesario cuantificar el efecto del ángulo de incidencia en los valores de transmisión
<i>Resolución</i>	La cuantificación de la resolución se hará mediante el método de la verificación del ancho de banda espectral (ABE), siendo este un método alternativo. Por otro lado, para la cuantificación común de la resolución se requiere el uso de disoluciones de referencia de tolueno en hexano al 0,02% v/v, las cuales no se encontraban disponibles a la hora de ejecutar el presente proyecto.
<i>Linealidad de la escala fotométrica</i>	La linealidad es una prueba perteneciente a la escala fotométrica, a parte de que dicha escala no se calibrará, la prueba requiere de disoluciones de dicromato de potasio de diferentes concentraciones con las cuales no se encontraban disponibles a la hora de ejecutar el presente proyecto.

Finalmente, la implementación de un método primario de calibración de esta índole implica la generación de documentación (instructivos, procedimientos, formularios e informes) necesaria para que el servicio de trazabilidad primaria en espectrofotometría pueda ser desarrollado dentro del Sistema de Gestión de Calidad (SGC) del LCM.

Tomando en consideración todo lo anterior, este proyecto solo tiene como entregables:

- un **informe técnico** sobre las pruebas de caracterización de ambas escalas (primer objetivo específico),
- un **informe sobre los resultados de la validación** del método primario (segundo objetivo específico),
- entrega de **propuestas de documentación** (tercer objetivo específico):
 - procedimiento de implementación del método primario.
 - hoja de cálculo (validada) de los mensurandos y parámetros de mérito involucrados en la validación.
 - certificado de calibración del EFAR a nivel primario.

2. Marco Teórico

En esta primera sección se presenta el estado del arte donde se ubica este proyecto de graduación.

2.1. Metrología y su importancia

La *Metrología* es la ciencia de las mediciones y sus aplicaciones, incluye todos los aspectos teóricos y prácticos de las mediciones, cualesquiera que sean su incertidumbre de medida y su campo de aplicación [13]. La Metrología en Costa Rica, conforma una parte indispensable del Sistema Nacional para la Calidad, de la mano con actividades de normalización, certificación y acreditación. Una armonía de estos factores asegura la exactitud de las mediciones, la comparabilidad internacional y por lo tanto, la intercambiabilidad de los productos a escala internacional. Es por esto que, en manos de la Metrología Industrial, Legal y Científica está la seguridad de que cualquier producto, proceso o servicio, al momento de ser adquirido o utilizado por los consumidores sea confiable para la salud y para el medio ambiente. Asimismo, en la Metrología recae el desarrollo y el bienestar económico del país, en búsqueda de altos estándares de calidad para los empresarios, productores, consumidores y las personas en general. El desarrollo de un país se mide en función de su desarrollo metrológico.

2.2. Términos y definiciones importantes en Metrología

En Metrología, los conceptos fundamentales y generales están contenidos en el Vocabulario Internacional de Metrología [13], sin embargo, en el Apéndice A.1, se citan algunas definiciones de las cuales se hará uso extenso a lo largo de este informe.

2.3. Espectrofotometría UV/Vis

Antes de profundizar en los conceptos relacionados con un proceso de calibración, es fundamental conocer tanto la importancia de la espectrofotometría UV/Vis como los principios físicos fundamentales y los componentes del instrumento de medida en cuestión. Es por esto que, en los Apéndices A.2, A.3 y A.4 se discute la importancia, los principios físicos y la instrumentación más común de la espectrofotometría UV/Vis respectivamente.

2.4. Calibración de espectrofotómetros UV/Vis

Tal y como se comentó en la sección sobre la importancia de las mediciones espectrofotométricas, para cualquier tipo de analito¹, en aplicaciones clínicas, farmacéuticas, ambientales o de investigación, es fundamental que el espectrofotómetro funcione de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y por ello es necesario realizar sobre dicho instrumento una serie de pruebas [15]. En términos generales, la caracterización y calibración de un espectrofotómetro UV/Vis consiste en:

“realizar un conjunto de operaciones que tienen como finalidad determinar la magnitud de los errores que comete el instrumento al realizar las mediciones, dichos errores son obtenidos al comparar los resultados de cada medición con los valores certificados de un material de referencia, tomando en

¹El componente de un sistema a analizar [14].

cuenta que las mediciones son realizadas bajo las mismas o similares condiciones y empleando la misma metodología. De la calibración se obtiene la incertidumbre, de esta y de la tolerancia se derivan los factores de corrección que el instrumento requiere, lo que resulta ser un indicativo de si el instrumento demanda un ajuste o no” [16].

Los espectrofotómetros cuentan con dos escalas, **la escala de longitud de onda y la escala fotométrica**; como bien se indicó en la definición anterior, para cada una de las escalas existe un método de calibración que va de la mano con patrones o materiales de referencia certificados. En los siguientes párrafos se describe; en términos generales, la calibración de cada una de las escalas junto con los patrones que se requieren en cada una.

2.4.1. Patrones de medida utilizados en la calibración de espectrofotómetros UV/Vis

Escala de longitud de onda

Chan et al. [4] define la exactitud de longitud de onda como la desviación de la indicación de la longitud de onda de una banda de absorción o emisión (λ_{medida}), de la longitud de onda conocida de dicha banda ($\lambda_{referencia}$). La *prueba de exactitud y precisión de longitud de onda* se realiza mediante un barrido espectral para un espectro de absorción (o transmitancia) conocido, se comprueba la diferencia entre la longitud de onda medida por el espectrofotómetro y la longitud de onda certificada para un material de referencia [17]. Con esta prueba se determina la habilidad del espectrofotómetro de volver repetidamente (precisión) y exactamente (veracidad + precisión) a la longitud de onda seleccionada.

Para ejecutar la prueba, en [4] y [16] se argumenta que lo más común es emplear patrones de referencia apropiados que presenten bandas de absorción estrechas en diferentes intervalos, como lo son los filtros de óxido de holmio, y patrones físicos absolutos (intrínsecos e invariables) como lo son las lámparas de descarga de gases de Hg y Xe. El espectro de emisión de descarga de arco de Hg a baja presión y el espectro de absorción (recordar que se puede convertir este espectro a uno de transmitancia a partir de la ecuación A.2) de la solución de óxido de holmio (ver figuras 4a y 4b) se especifican en la norma ASTM E275 [2], como dos de los espectros más convenientes para la calibración de la escala de longitud de onda de los espectrofotómetros.

■ **Espectro de emisión de lámparas de descarga de arco de Hg y Xe**

El espectro de emisión del Hg se obtiene de lámparas de descarga de arco tipo lápiz comerciales (ver figura 2) que se pueden encontrar con toda la instrumentación asociada para la adaptación al espectrofotómetro (recordar que es una lámpara externa a los espectrofotómetros). Dependiendo del ABE utilizado por el espectrofotómetro, los espectros de emisión del mercurio presentan de seis a nueve líneas de emisión. Una descripción análoga aplica para las lámparas de descarga de Xe, con el detalle de que estas presentan líneas de emisión en el NIR (infrarrojo cercano, por sus siglas en inglés).

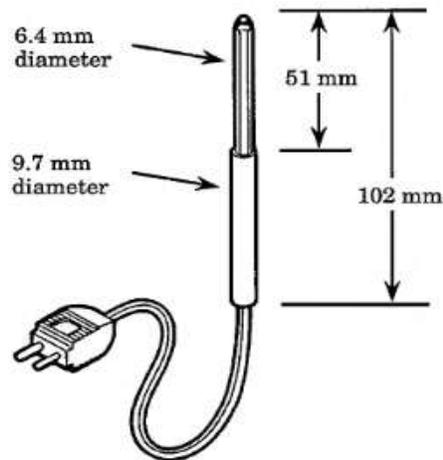


Figura 2: Diseño básico de una lámpara de descarga tipo lápiz de Hg. Tomado de [1].

■ Filtro de óxido de holmio

El espectro de absorción de la solución de óxido de holmio se obtiene midiendo una solución de aproximadamente 4% de óxido de holmio en ácido perclórico 1,4 M (40 g L^{-1}) en una cubeta de 1 cm de longitud de trayectoria. Estos filtros generados por el NIST (ver figura 3) desde la década de 1990 (pero ahora discontinuados), se pueden adquirir a partir de proveedores comerciales secundarios, o en su defecto, siguiendo los estándares adecuados de generación de materiales de referencia certificados. En general para un ABE adecuado, el óxido de holmio presenta entre catorce y dieciséis bandas de absorción en el intervalo de 240 nm a 650 nm.

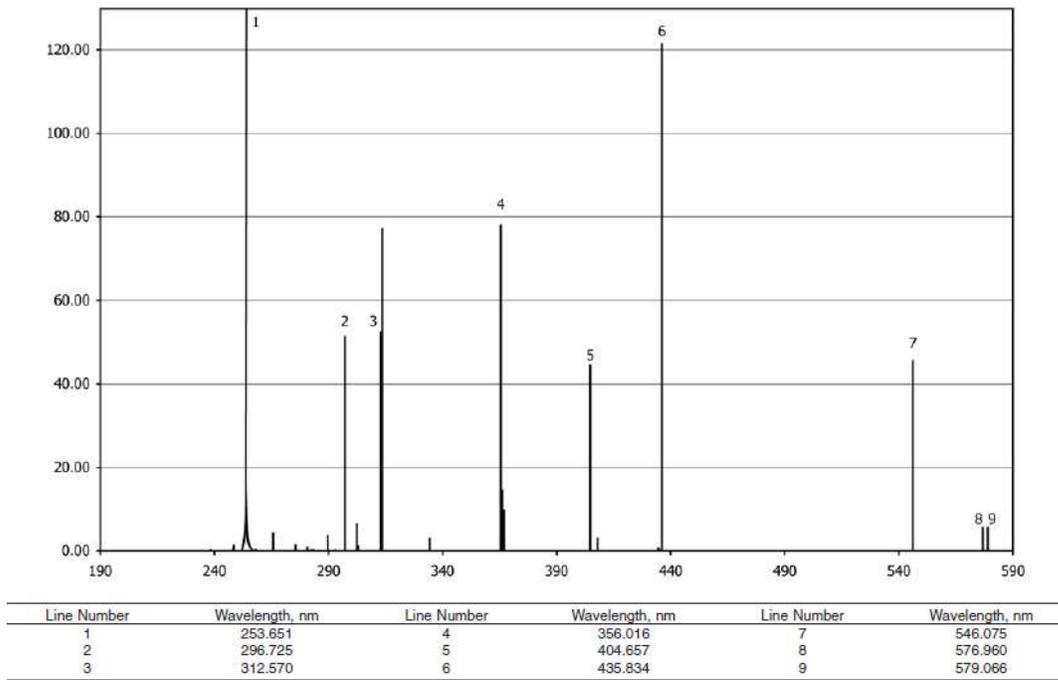


(a)

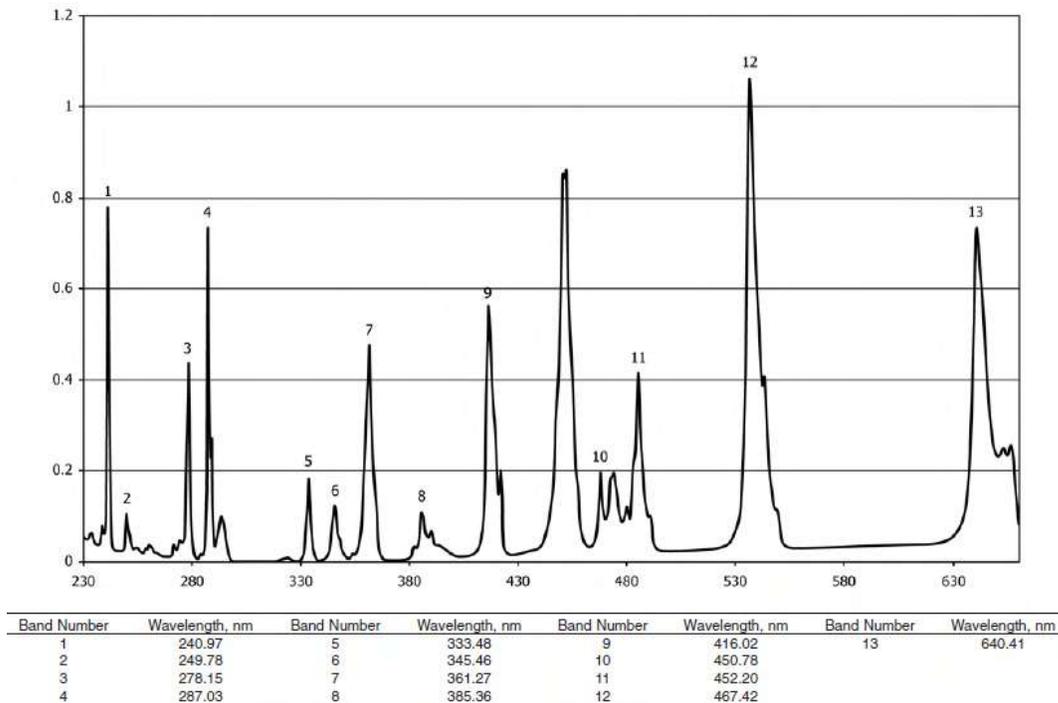


(b)

Figura 3: Filtro de óxido de Holmio - SRM 2034: a) caja de almacenamiento, b) cubeta con solución.



(a)



(b)

Figura 4: a) Espectro de emisión de descarga de arco de Hg. b) Espectro de absorción de solución de óxido de holmio en ácido perclórico. Ambos junto con algunas longitudes de onda de referencia. Tomados de [2].

Escala fotométrica

La escala fotométrica hace referencia a la escala de absorbancia o transmitancia del espectrofotómetro. La exactitud fotométrica se determina comparando la diferencia entre la absorbancia medida por el espectrofotómetro y el valor del MRC [4]. Para la *prueba de exactitud y precisión fotométrica* son necesarios MRC para cuantificar el error fotométrico del espectrofotómetro [18]. El MRC de medición debe cumplir los siguientes requisitos según [19]:

- el MRC debe ser transparente y estar libre de interferencias en el intervalo de interés del espectro UV/Vis,
- la transmitancia no debe variar significativamente con la temperatura ni con la longitud de onda. De ahí que también se les conozca como filtros de densidad neutra,
- la baja reflectancia debe estar asegurada,
- el MRC no puede ser fluorescente,
- el MRC debe ser estable y homogéneo.

Los filtros de densidad neutra comerciales que cumplen las condiciones anteriores están fabricados a partir de vidrio o metales en cuarzo. La figura 5 muestra los espectros de transmisión relativa de un conjunto de filtros de densidad neutra fabricados por el NIST (actualmente discontinuados). Dichos filtros no solo se utilizan para la prueba de exactitud y precisión fotométrica, sino que también se utilizan en la prueba de ruido fotométrico como se verá más adelante.

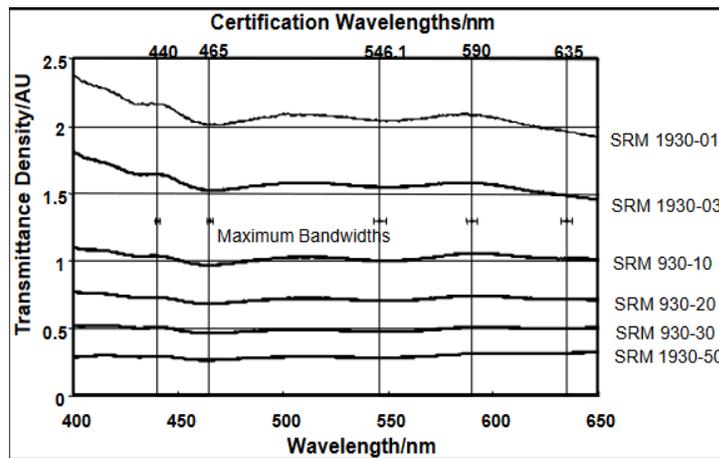


Figura 5: Espectros de transmitancia relativa del conjunto de filtros SRM 1930 y SRM 930e producidos por el NIST. Tomado de [3].

2.4.2. Caracterización de parámetros instrumentales

La caracterización de los parámetros instrumentales del espectrofotómetro es fundamental para determinar el conjunto de condiciones a las cuales se va a realizar la calibración. Cualquier combinación de los parámetros instrumentales escogidos implicará resultados de medición específicos, por lo que se recomienda que la calibración se ejecute con las mismas condiciones en las que comúnmente el espectrofotómetro ofrece los servicios [18]. Las características y requerimientos de desempeño varían de acuerdo con: la naturaleza de las pruebas, el diseño del

instrumento y los insumos con los que cuente el analista a la hora de ejecutar las pruebas [4]. Por consiguiente, para obtener mediciones fiables es necesario evaluar ciertos parámetros que podrían llegar a controlar los resultados obtenidos [2]. Dichos parámetros son:

- intervalo de datos,
- rapidez de barrido,
- ruido Fotométrico,
- estabilidad fotométrica,
- línea base plana,
- luz parásita,
- confirmación del ancho de banda espectral,
- ángulo de incidencia,
- resolución,
- linealidad de la escala fotométrica.

Como se comentó en la sección 1.4 (Alcances y limitaciones del proyecto) algunas de las pruebas no se realizarán, por lo que la teoría correspondiente para cada prueba se omitirá en esta sección y se recomienda consultar la información presentada en las referencias de [16] a [20] si se requiere mayor información. Por consiguiente, a continuación se discute cada prueba de interés en este proyecto de graduación.

1. **Intervalo de datos (ID):** hace referencia a cada cuantos nanómetros el espectrofotómetro recolectará datos (tasa de muestreo). Se relaciona directamente con su resolución y se expresa en unidades de nanómetros (nm).
2. **Rapidez de barrido (RB):** hace referencia a la rapidez a la cual el espectrofotómetro va a realizar el barrido del espectro de la escala de longitud de onda para intervalo especificado. Se expresa en unidades de nanómetros por minuto (nm min^{-1}).
3. **Ruido fotométrico:** el ruido fotométrico, como se indica en [17], es una medición de la relación señal/ruido del espectrofotómetro. Los valores de ruido en mediciones UV/Vis se originan principalmente en la fuente de luz y los componentes electrónicos y mecánicos del instrumento [4]. Adicionalmente, el ruido afecta la exactitud de las mediciones tanto a absorbancias bajas como a absorbancias altas. En [21], se comenta que el ruido de los fotones de la fuente de radiación afecta los valores a absorbancias bajas, mientras que es el ruido electrónico lo que origina la pérdida de exactitud a absorbancias altas. Se expresa en unidades de absorbancia (A).
 - *Prueba de cuantificación de ruido fotométrico:* esta prueba es monitoreada como una función del tiempo, que determina la variación de la absorbancia a través del barrido espectral en un intervalo de longitudes de onda establecido [16]. En términos generales, el ruido es determinado mediante el uso de filtros de densidad neutra y se registra el intervalo de variación pico-pico de la gráfica resultante (ver figura 6a). Posteriormente, se calcula el ruido de raíz cuadrática media (RMS) [4].
4. **Estabilidad fotométrica:** según [4], las variaciones en la intensidad de las lámparas y la salida electrónica entre las mediciones de referencia y de la muestra dan como resultado una desviación en las mediciones del espectrofotómetro. Específicamente, la intensidad y estabilidad de la lámpara es una función de su vida útil (horas de uso). El deterioro de las fuentes de radiación provoca errores en las mediciones, especialmente cuando el equipo se utiliza por un tiempo prolongado. Se expresa en unidades de absorbancia (A).

- *Prueba de estabilidad fotométrica:* la prueba de estabilidad fotométrica verifica la capacidad del instrumento de mantener un estado estable a lo largo del tiempo, de modo que los efectos de las derivas en la exactitud de las mediciones sea insignificante. En términos generales, la prueba se realiza con el compartimiento para muestras vacío y se escanea en función del tiempo la absorbancia durante un período no menor a una hora, a una longitud de onda específica (ver figura 6b). A nivel cuantitativo, se registran las desviaciones más altas y más bajas [4, 16, 17].
5. **Línea base plana:** como ya se ha comentado, la intensidad de la radiación proveniente de las fuentes varía en todo el rango UV/Vis. Precisamente, las respuestas del detector también varían a lo largo del rango espectral. Es por esto que la prueba de línea de base plana demuestra la capacidad del espectrofotómetro para normalizar las mediciones, determinando las variaciones del valor fotométrico a lo largo de toda la distribución espectral [16, 4]. Se expresa en unidades de absorbancia (A).
- *Prueba de línea base plana:* se hace un escaneo con el compartimiento de muestras vacío, se registran las deflexiones más altas y bajas (ver figura 6c), y se calcula la diferencia entre los máximos y mínimos a un intervalo de longitud de onda especificado [16]. Algunos fabricantes de espectrofotómetros con sistemas de detección de fotomultiplicador, especifican dicho intervalo de 200 nm a 800 nm, debido a que hay una pérdida de sensibilidad por encima de los 800 nm [22].
6. **Luz parásita:** Se define a la luz parásita como aquella luz detectada de cualquier longitud de onda que esté fuera del ancho de banda de la longitud de onda seleccionada. Entre las causas más comunes para la luz parásita se encuentran: la dispersión, la difracción de ordenes altos del monocromador y el diseño ineficiente del espectrofotómetro [21]. La luz parásita afecta las lecturas disminuyendo los valores de absorbancia registrados y de esta manera reduce el rango lineal del espectrofotómetro. Puede expresarse tanto en unidades de absorbancia (A) o en porcentaje de transmitancia (% T).
- *Prueba de cuantificación de la luz parásita:* para la prueba, se utilizan varios filtros de corte (soluciones) para estimar la contribución de dicha luz parásita, según las longitudes de onda de interés [4]. En términos generales, estos filtros de corte tienen la propiedad física de permitir el paso de radiación electromagnética en longitudes de onda diferentes a la longitud de onda bajo medición, lo que implica que lo que se mide es como su nombre indica, la luz parásita. La norma ASTM E387 [23], contiene toda la información que se requiere para una correcta cuantificación de la luz parásita; en dicha norma, se especifican las soluciones más comunes utilizadas como filtros de corte. Como se describe en [4], básicamente se escanea el filtro de corte de luz parásita en una cubeta de 1 cm usando aire como referencia y se mide la transmitancia (o la absorbancia) de la solución a la longitud de onda especificada (ver figura 6d).

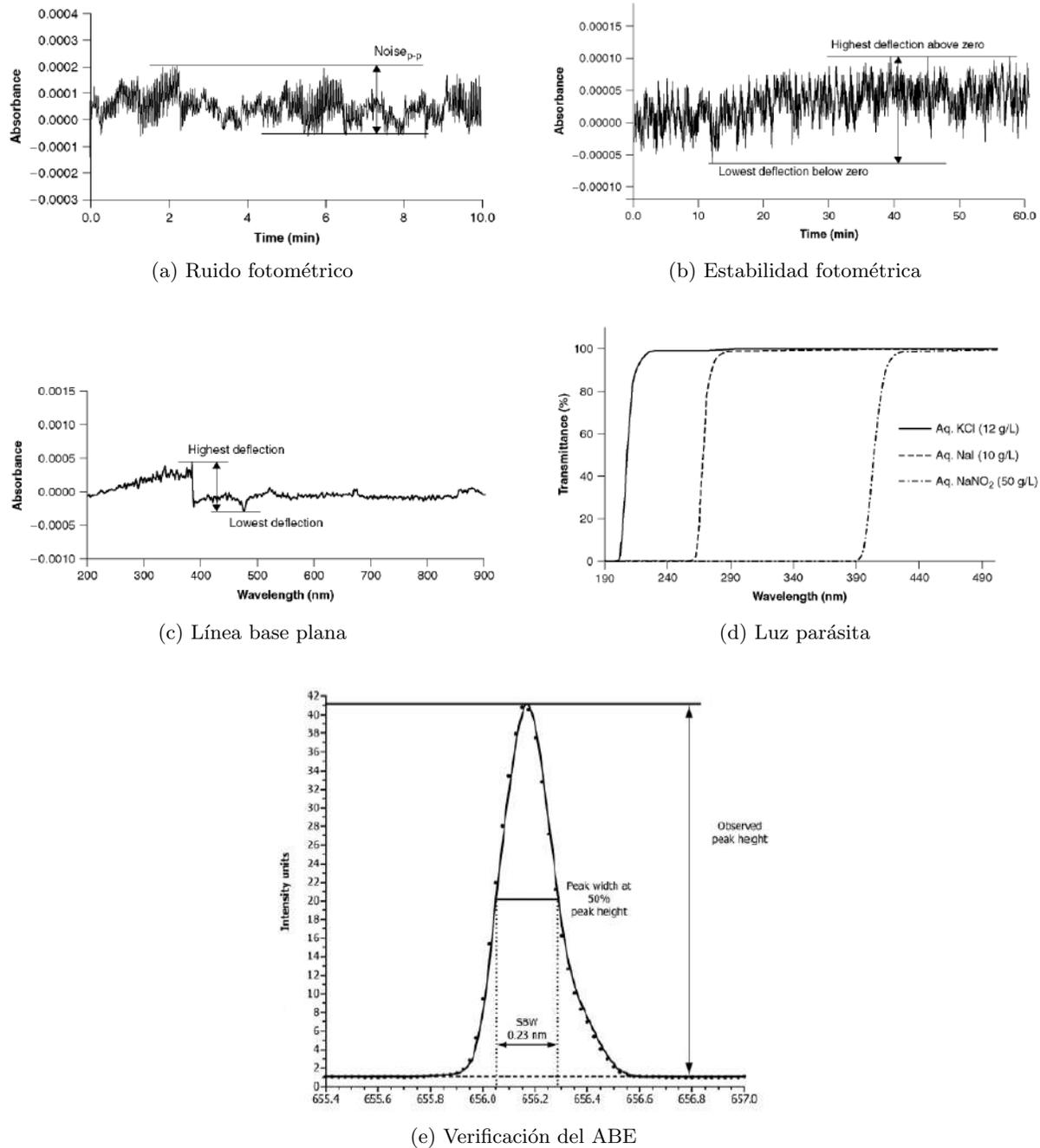


Figura 6: Medición de las pruebas de caracterización de parámetros instrumentales. a), b), c) y d) tomadas de [4]; e) tomada de [5].

7. **Verificación del ABE:** en el Apéndice A.4 se discute la importancia del ABE en la resolución del instrumento, concluyéndose que el ABE definido por el analista puede variar con respecto al ABE efectivo del instrumento, debido a la no idealidad de la salida espectral estrecha y a las variaciones mecánicas constantes debido al uso del espectrofotómetro. Por lo tanto, esta prueba consiste en comparar el ABE

seleccionado por el espectrofotómetro y el ABE efectivo, el cual es determinado a partir de un cálculo [16]. Para profundizar en los procesos de estimación de anchos de banda espectral, diríjase a la norma ASTM E958 [5]. El ABE se expresa en unidades de nanómetros (nm).

- *Prueba de verificación de ABE*: primeramente se localiza el valor de absorbancia (o transmitancia) máximo y mínimo de la banda de absorción o línea de emisión bajo estudio, se obtiene el valor fotométrico promedio correspondiente, y con dicho valor se localiza el punto de intersección de los límites de la banda, el ABE efectivo corresponde a la diferencia de dichos límites de longitudes de onda del punto medio de la banda espectral (ver figura 6e) [16].

2.5. Validación de métodos de ensayo y calibración

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los analistas químicos [24]. De igual importancia es para el correcto desempeño de las actividades de los laboratorios de ensayo y calibración, puesto que la validación de métodos es una herramienta tanto procedimental como estadística para evidenciar competencia a la hora de realizar las mediciones.

Magnusson y Örnemark [24] definen que “**validar un método** es básicamente el proceso para definir uno o más requisitos analíticos, y la confirmación de que se cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas.”

2.5.1. Principio detrás de una validación

La validación de un método consiste genéricamente en cuatro pasos según [25]:

1. el establecimiento de las condiciones por cumplir, es decir, la definición de los parámetros de mérito,
2. la determinación de los parámetros estadísticos del procedimiento,
3. la evaluación de los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones establecidas previamente,
4. la toma de decisión sobre la validez del procedimiento para el propósito establecido.

2.5.2. Alcance de la validación

Asimismo, un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Según la norma ISO/IEC 17025:2017 [26] los laboratorios deben validar:

- **métodos no normalizados**: se aplican exactamente como está descrito en la norma,
- **métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio**: elaborado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos,
- **métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación**,
- **ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados**.

Luego de tener desarrollado (al menos de manera inicial) el método, el laboratorio debe documentar en detalle todo el procedimiento de medición [24]. Existen dos estrategias claves para validar métodos: 1) mediante los

resultados interlaboratorios y 2) la validación ejecutada por el laboratorio individual. Para este proyecto de graduación, se aplica la segunda estrategia y se define la responsabilidad del LCM para asegurar la adecuación al uso del método planteado, considerando las necesidades y el alcance de la validación.

2.5.3. Parámetros de mérito en la validación

Entre las características de desempeño que se evalúan durante una validación, según [24] se pueden mencionar:

- veracidad:
 - sesgo, recuperación,
- precisión
 - repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad,
- incertidumbre de medida²
- robustez,
- selectividad
- límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ),
- intervalo de trabajo,
- sensibilidad analítica.

2.5.4. Evaluación de los resultados de validación

La documentación completa del desarrollo e implementación de la validación de un método, implica el desarrollo del informe de validación del método. Este informe debe ser preparado por el analista y posteriormente revisado y aprobado por el personal calificado [26].

Al final del informe de validación se debe hacer una declaración sobre la aptitud para la aplicación del método (lo que la Eurachem [24] denomina *fitness for purpose*), comparando los parámetros estadísticos obtenidos de la ejecución del método con los parámetros de mérito definidos en la planificación de la validación.

En algunos casos, puede ocurrir que alguno de los parámetros de mérito calculados mediante las herramientas estadísticas no concuerde con el requisito previamente establecido y que aún así, se considere adecuado. Estos casos deben fundamentarse y documentarse con su justificación respectiva en el informe de validación por el responsable de dicha validación.

2.6. Evaluación de datos de medición

A continuación, se detallan los criterios necesarios para establecer los mejores estimadores de los mensurandos y de las incertidumbres de medición, tanto en el proceso de calibración primaria del EFAR, como en el proceso del cálculo de los parámetros de mérito del plan de validación. El contenido de este apartado es técnicamente correcto, desde el punto de vista matemático y metrológico, dentro de los límites de la *Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida (GUM)* [27]. De igual manera, este apartado se apega a las definiciones dadas en Apéndice A.1.

Este proyecto de graduación implica la evaluación de datos de medición en dos etapas independientes. La primera es la calibración primaria del EFAR, y la segunda es el uso del EFAR (ya calibrado) para realizar las

²Según [24], estrictamente la incertidumbre de medida no es una característica del desempeño de un procedimiento de medida particular, sin embargo, refleja la calidad de los resultados obtenidos al utilizar dicho procedimiento.

mediciones del filtro patrón SRM 2034. A continuación, se presentan las consideraciones respecto a mensurandos e incertidumbres asociadas en cada etapa.

2.6.1. Primera etapa: calibración primaria del EFAR

Todo proceso de medición tiene como finalidad determinar el valor del mensurando, que según el VIM, es la magnitud que se desea medir. Para que el mensurando tenga validez y esté completo, debe ser reportado con su incertidumbre. El mensurando sujeto a medición en la calibración primaria de espectrofotómetros UV/Vis es el error de medida correspondiente a cada una de las escalas, y en el caso específico de este proyecto de graduación, a la escala de longitud de onda [28]. La calibración primaria de un espectrofotómetro se clasifica como un método directo de medición y el cálculo del error de medida para la escala de longitud de onda se presenta mediante la ecuación 2.1,

$$E_i = (\bar{\lambda}_i - \lambda_{Hg}) + \epsilon_{rep} \quad (2.1)$$

donde:

- E_i es el error de medida del EFAR en cada i -ésimo punto de calibración,
- $\bar{\lambda}_i$ es el promedio mancomunado (promedio de los promedios) de las indicaciones en cada i -ésimo punto de calibración del EFAR,
- λ_{Hg} es la longitud de onda patrón de la i -ésima línea espectral de emisión de la lámpara de Hg tipo lápiz;
- ϵ_{rep} identifica el aporte a la incertidumbre del error de medida por efecto de la precisión de medida. Este presenta media cero e incertidumbre distinta de cero.

El término asociado al efecto de la precisión de medida del EFAR se divide en dos enfoques. El primero, toma en consideración solamente a la repetibilidad de medida (precisión del EFAR bajo condiciones de repetibilidad) mientras que el segundo enfoque toma en cuenta tanto la repetibilidad de medida como la precisión intermedia de medida (precisión del EFAR bajo condiciones de precisión intermedia). En los apartados siguientes, se le da el tratamiento a cada enfoque por separado.

Identificación de las fuentes de incertidumbre

Una vez determinados el mensurando, el principio y el método de medida, se identifican a continuación las posibles fuentes de incertidumbre que provienen de los factores que influyen en la medición según se discute en [29]:

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ los resultados de la calibración del espectrofotómetro, ▪ la incertidumbre del patrón o del material de referencia, ▪ la repetibilidad en las lecturas, ▪ la reproducibilidad de las mediciones por cambio de analistas, instrumentos u otros elementos, | <ul style="list-style-type: none"> ▪ características del propio instrumento: resolución, histéresis, deriva, entre otras, ▪ variaciones en las condiciones ambientales, ▪ la definición del propio mensurando, ▪ el modelo particular de la medición, ▪ variaciones en las magnitudes de influencia. |
|---|---|

Estimación de las incertidumbres estándar

En esta sección se presentan las ecuaciones empleadas para calcular cada una de las incertidumbres estándar involucradas en el proceso de calibración de la escala de longitud de onda del EFAR. En [28], se presenta una discusión más amplia acerca de estas definiciones.

Enfoque 1

El diagrama de Ishikawa de la figura 7a muestra las fuentes de incertidumbre para cada magnitud de entrada del modelo presentado en la ecuación 2.1 considerando el enfoque 1.

- Incertidumbre por repetibilidad de medida:

Para la incertidumbre asociada a la repetibilidad de medida del EFAR, se utiliza la evaluación de la incertidumbre tipo A, siguiendo una distribución t -Student. En este caso, se efectúan $n = 10$ repeticiones y los grados de libertad a considerar son $\nu = n - 1 = 9$. La incertidumbre por repetibilidad de medida se evalúa a partir de la ecuación 2.2,

$$u_{s_r}(\epsilon_{rep}) = \frac{s_r}{\sqrt{n}} \quad (2.2)$$

donde:

- s_r es la componente de repetibilidad de medida del EFAR promedio dentro de un día. Esta componente se cuantifica estadísticamente siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 5725-2 [30]. La teoría detrás de su cuantificación, se presenta en el Apéndice A.5,
- n es el número de réplicas de la medición. Este proyecto se trabajó con experimentos balanceados, y todas las corridas experimentales se ejecutaron en $n = 10$ ocasiones.

- Incertidumbre por resolución:

Para el caso de la resolución del EFAR, se utiliza el método tipo B para la evaluación de la incertidumbre. Se considera en este caso, que la probabilidad es la misma para cualquier valor y por ende la distribución es del tipo rectangular. La incertidumbre por resolución se evalúa a partir de la ecuación 2.3 y se considera un número infinito de grados de libertad³,

$$u_{res}(\bar{\lambda}_i) = \frac{d}{\sqrt{12}} \quad (2.3)$$

donde:

- $d = 0,01$ nm es la resolución del EFAR en la escala de longitud de onda.

- Incertidumbre del patrón:

En este caso, se debe entender que la calibración del EFAR se está realizando mediante el uso de una lámpara de descarga de arco tipo lápiz de Hg, y las líneas espectrales de emisión del Hg están tabuladas y son consideradas patrones intrínsecos de la naturaleza. Debido a que dichas líneas se miden experimentalmente y se corroboran con los resultados de la mecánica cuántica, a dichas líneas espectrales se les asocia

³Infinitos grados de libertad se asocian a distribuciones rectangulares de probabilidad.

una incertidumbre igual a cero por convención. Esto implica que la lámpara de Hg tipo lápiz, es el patrón primario en la escala de longitud de onda en Costa Rica y que el EFAR es el patrón secundario y patrón nacional.

$$u_{\lambda_{Hg}}(\lambda_{Hg}) = 0 \tag{2.4}$$

■ Incertidumbre por ABE:

La incertidumbre por el ABE del EFAR, se asocia al método tipo B para la evaluación de la incertidumbre. Los ABE efectivos calculados, presentan una desviación estándar que representa su grado de dispersión, y dicha desviación varía ligeramente en función de la longitud de onda de prueba. Por lo que se considera que, la incertidumbre por ABE sigue una distribución rectangular con límites $-\bar{s}_{m\acute{a}x}$ y $\bar{s}_{m\acute{a}x}$. La incertidumbre por ABE se evalúa a partir de la ecuación 2.5 y se considera un número infinito de grados de libertad,

$$u_{ABE}(\bar{\lambda}_i) = \frac{2\bar{s}_{m\acute{a}x}}{\sqrt{12}} = \frac{\bar{s}_{m\acute{a}x}}{\sqrt{3}} \tag{2.5}$$

donde:

- para el cálculo de $\bar{s}_{m\acute{a}x}$, lo que se promedia es la varianza; seguidamente se calcula la raíz cuadrada del resultado y se escoge el valor máximo por ABE.

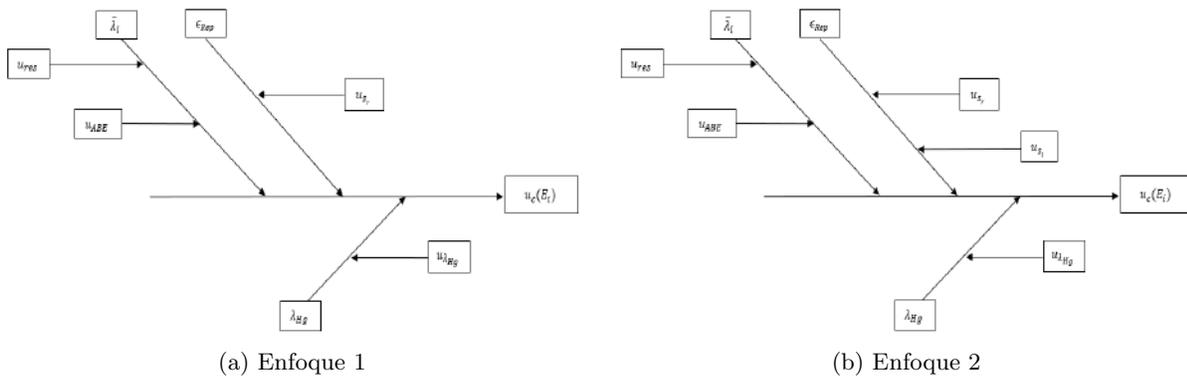


Figura 7: Diagrama de Ishikawa para la cuantificación de los aportes a la incertidumbre del error de medida del EFAR.

Enfoque 2

El diagrama de Ishikawa de la figura 7b muestra las fuentes de incertidumbre para cada magnitud de entrada del modelo presentado en la ecuación 2.1 considerando el enfoque 2. En este caso se siguen considerando de manera idéntica las fuentes de incertidumbre por resolución y por ABE, pero, ahora se considera un nuevo aporte: la incertidumbre por precisión intermedia.

■ Incertidumbre por reproducibilidad de medida:

Para la incertidumbre asociada a la reproducibilidad de medida del EFAR se utiliza la evaluación de la incertidumbre tipo A, siguiendo una distribución *t – Student*. En este caso se efectúan $n = 10$ repeticiones durante $k = 3$ días, por lo que los grados de libertad a considerar son $\nu = kn - 1 = 29$. La incertidumbre

por reproducibilidad de medida se evalúa a partir de la ecuación 2.6,

$$u_{reproducibilidad}(\epsilon_{rep}) = \sqrt{u_{s_I}^2(\epsilon_{rep}) + u_{s_r}^2(\epsilon_{rep})} = \sqrt{s_I^2 + \left(\frac{s_r}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (2.6)$$

donde:

- u_{s_r} es la incertidumbre por repetibilidad analizada en el enfoque 1 (ver ecuación 2.2),
- u_{s_I} es la incertidumbre por precisión intermedia del EFAR,
- s_r es la componente de repetibilidad de medida del EFAR promedio dentro de un día. s_I es la componente de precisión intermedia del EFAR que considera su precisión a lo largo de tres días. Nuevamente, esta componentes se cuantifican estadísticamente siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 5725-2 [30], la forma de cuantificarlas se presenta en el Apéndice A.5.

Evaluación de la incertidumbre estándar combinada asociada al error de medida

Según la *Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida* [27], la incertidumbre estándar combinada es la raíz cuadrada positiva de la varianza combinada. Lo anterior, se muestra en las ecuaciones 2.7 y 2.8 para el caso del error de indicación E_i en el enfoque 1 y 2 respectivamente. Para esto, se utilizan las fuentes de incertidumbre presentadas en la sección anterior.

$$u_c(E_i) = \sqrt{\left(\frac{\partial E_i}{\partial \bar{\lambda}_i}\right)^2 \cdot [u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i)] + \left(\frac{\partial E_i}{\partial \epsilon_{rep}}\right)^2 \cdot u_{s_r}^2(\epsilon_{rep})} \quad (2.7)$$

$$u_c(E_i) = \sqrt{\left(\frac{\partial E_i}{\partial \bar{\lambda}_i}\right)^2 \cdot [u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i)] + \left(\frac{\partial E_i}{\partial \epsilon_{rep}}\right)^2 \cdot u_{reproducibilidad}^2(\epsilon_{rep})} \quad (2.8)$$

Como los parámetros que contribuyen a la incertidumbre de la medición están en las mismas unidades y son independientes entre sí, los coeficientes de sensibilidad resultan ser igual a 1, por consiguiente, las ecuaciones 2.9 y 2.10 presentan la forma final en la que se evaluará la incertidumbre combinada asociada a cada error de medida en la calibración primaria para ambos enfoques.

$$u_c(E_i) = \sqrt{u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{s_r}^2(\epsilon_{rep})} \rightarrow \text{Enfoque 1} \quad (2.9)$$

$$u_c(E_i) = \sqrt{u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{reproducibilidad}^2(\epsilon_{rep})} \rightarrow \text{Enfoque 2} \quad (2.10)$$

donde:

- $u_c(E_i)$ es la incertidumbre estándar combinada del error de medición para cada i -ésimo punto de calibración,
- $u_{s_r}(\epsilon_{rep})$ es la incertidumbre por repetibilidad,
- $u_{reproducibilidad}(\epsilon_{rep})$ es la incertidumbre por reproducibilidad,
- $u_{res}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por resolución,
- $u_{ABE}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por ABE.

Determinación de los grados de libertad y evaluación del Teorema del límite central

La incertidumbre expandida es proporcional a la incertidumbre estándar combinada. El factor de proporcionalidad se denomina factor de cobertura k . El factor de cobertura, se determina con una probabilidad de cobertura de 95,45 %. Dicho factor de cobertura, depende de la distribución resultante del mensurando. Esta distribución será una convolución de todas las distribuciones de probabilidad de las magnitudes de entrada al modelo de medición. Por lo que, es necesario calcular los grados de libertad efectivos utilizando la fórmula de Welch-Satterthwaite representada mediante la ecuación 2.11.

$$\nu_{eff(E_i)} = \frac{u_c^4(E_i)}{\sum_{j=1}^n \frac{u_j^4}{\nu_j}} \quad (2.11)$$

Cuando se presenten casos donde una fuente de incertidumbre con distribución de probabilidad $t - Student$ aporte grados de libertad $\nu = n - 1$, la ecuación 2.11 se simplifica a la ecuación 2.12 y es dicha ecuación 2.12 la que se utiliza.

$$\nu_{eff(E_i)} = (n - 1) \left(\frac{u_c(E_i)}{u_{Dist-t-Student}} \right)^4 \quad (2.12)$$

Para efectos de este proyecto de graduación, se tomará $k = 2$ para el 95,45 % cuando $\nu_{eff} > 100$ [31]. Esto implica que la distribución de probabilidad final se aproxima a la distribución normal. En el caso de que no se logren alcanzar los grados de libertad requeridos, se utilizan los datos de factores de cobertura asociados a las distribuciones $t - Student$.

Cálculo de la incertidumbre expandida U

La incertidumbre expandida U se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar combinada $u_c(E_i)$ de cada i -ésimo punto de calibración por el factor de cobertura k respectivo, como lo muestra la ecuación 2.13.

$$U_i = k \cdot u_c(E_i) \quad (2.13)$$

Expresar la incertidumbre asociada al error de medida de esta manera, resulta conveniente debido a la forma en que comúnmente se presentan los resultados ($E = e \pm U$). Se interpretan pensando en que, la mejor estimación del valor atribuible al mensurando (en este caso el error de medida E) es e , y que puede esperarse que en el intervalo que va desde $e - U$ a $e + U$ esté comprendida una fracción importante de valores que podrían ser razonablemente atribuidos al error de medida E con un nivel de confianza del 95,45 %.

2.6.2. Segunda etapa: evaluación de los resultados de medida asociados a los barridos espectrales del SRM 2034 a partir del EFAR.

En esta segunda etapa, el modelo matemático de medición cambia debido a que el mensurando también cambia. Ahora lo que se quiere cuantificar, es la longitud de onda de transmitancia mínima indicada por el EFAR al barrer el espectro del SRM 2034. Para ello, se utiliza toda la información de la calibración primaria previa.

Se debe tener presente que la calibración primaria del EFAR ofrece dos enfoques:

- en el **enfoque 1**, se toma en consideración a la repetibilidad de medida del EFAR como una fuente de incertidumbre. Es decir, la dispersión de los valores de medida del EFAR solo dentro de un día de medición

es lo que representa su precisión de medida.

- en el **enfoque 2**, se toma en consideración tanto a la repetibilidad de medida como a la precisión intermedia de medida del EFAR. Esto se denominó **incertidumbre por reproducibilidad de medida del EFAR** (ver ecuación 2.6). Es decir, la dispersión de los valores de medida del EFAR dentro de un día y a lo largo de diferentes días de medición experimental es lo que representa su precisión de medida.

Diferentes enfoques conllevan a diferentes resultados en el plan de la validación. Un resultado que se prevé es que el enfoque 1 implica la mejor capacidad de medición del LCM, puesto que aporta (en magnitud) las incertidumbres más bajas ($u_{sr} \ll u_{reproducibilidad}$).

Evaluación de los resultados de medición: SRM 2034 y enfoque 1

Se pueden definir dos sub-enfoques, para utilizar la información de la calibración primaria resultante del enfoque 1.

- **Enfoque 1.1:** se utilizan los errores de medida del EFAR para determinar una corrección. Habrá una corrección por cada ABE. Dicha corrección es el promedio de todos los errores de medida encontrados en cada ABE. La mayor incertidumbre expandida del error de medida por ABE, se toma para definir la incertidumbre de la corrección.
- **Enfoque 1.2:** se utilizan los errores de medida del EFAR para determinar una corrección. Dicha corrección proviene de una **curva de calibración** originada a partir de un ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinarios aplicado a los errores de medida. Habrá una curva de calibración por cada ABE. La incertidumbre global debida al ajuste, se define como la incertidumbre de la corrección.

Mensurando e incertidumbres asociadas al implementar el enfoque 1.1

El mensurando sujeto a medición en este caso, es la medición del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034. El método de medición vuelve a ser un método directo y el cálculo se presenta mediante la ecuación 2.14,

$$\lambda_{EFAR_i} = \bar{\lambda}_i + C_{enf1,1} \quad (2.14)$$

donde:

- λ_{EFAR_i} es la indicación corregida del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $\bar{\lambda}_i$ es el promedio de las n indicaciones del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $C_{enf1,1}$ es la corrección aplicada. Definida como el negativo del promedio de todos los errores de medida encontrados por ABE en la calibración primaria,

$$C_{enf1,1} = -\frac{\sum_{i=1}^p E_i}{p} = -\bar{E}_i \quad (2.15)$$

donde p es la cantidad de puntos de calibración por ABE.

Tanto la incertidumbre por resolución como la incertidumbre por ABE siguen siendo las definidas en las ecuaciones 2.3 y 2.5 respectivamente. El diagrama de Ishikawa de la figura 8a muestra las fuentes de incertidumbre para cada magnitud del modelo presentado en la ecuación 2.14.

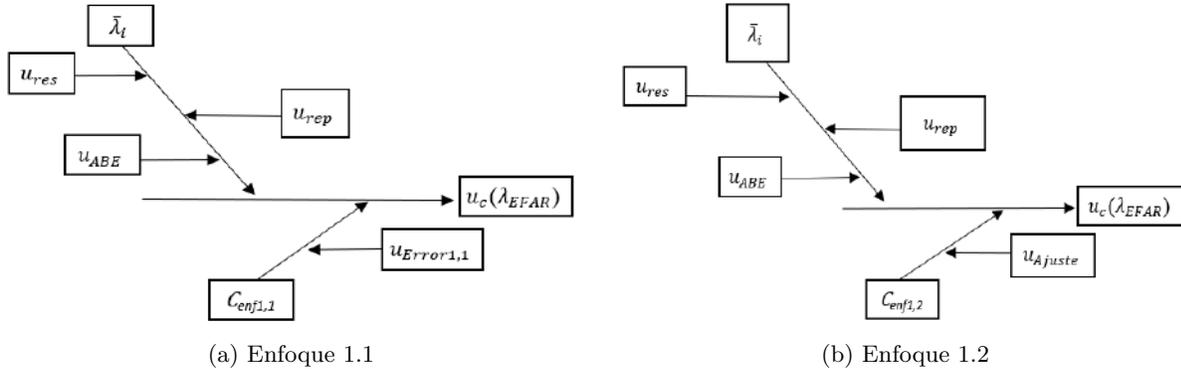


Figura 8: Diagramas de Ishikawa para la cuantificación de los aportes a la incertidumbre de la medición de las longitudes de onda de transmitancia mínima del SRM 2034 que surgen al aplicar el enfoque 1.

■ Incertidumbre por repetibilidad de medida:

Para la incertidumbre asociada a la repetibilidad de medida del EFAR al medir el filtro SRM 2034, se utiliza nuevamente la evaluación de la incertidumbre tipo A, siguiendo una distribución t -Student. En este caso se efectúan nuevamente $n = 10$ repeticiones y los grados de libertad a considerar son $\nu = n - 1 = 9$. Esta incertidumbre se evalúa a partir de la ecuación 2.16,

$$u_{rep}(\bar{\lambda}_i) = \frac{s(\lambda_i)}{\sqrt{n}} \quad (2.16)$$

donde $s(\lambda_i)$ es la desviación estándar asociada a las 10 repeticiones medidas en la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034.

■ Incertidumbre de la corrección:

Para la incertidumbre asociada a la corrección, se utiliza la evaluación de la incertidumbre tipo B, siguiendo una distribución rectangular. Esta incertidumbre se evalúa a partir de la ecuación 2.17,

$$u_{C_{enf1,1}} = \frac{U_{máx_{enf1,1}}}{\sqrt{3}} \quad (2.17)$$

donde:

- $u_{C_{enf1,1}}$ es la incertidumbre estándar de la corrección generada por la información de la calibración primaria tomando el enfoque 1.1,
- $U_{máx_{enf1,1}}$ es la incertidumbre expandida máxima por ABE de los resultados de los errores de medida obtenidos de la calibración primaria tomando el enfoque 1,
- se aclara que, la distribución de probabilidad de los errores de medida provenientes de la calibración en el enfoque 1 es trapezoidal (hay un predominio de las distribuciones rectangulares en la convolución). Por consiguiente, se toma la postura del principio de máxima entropía y se sobrestima (sin afectación

posterior) el valor de la incertidumbre de la corrección como una distribución rectangular con límites $-U_{máx_{enf1,1}}$ y $U_{máx_{enf1,1}}$.

Mensurando e incertidumbres asociadas al implementar el enfoque 1.2

El mensurando sujeto a medición en este caso, es nuevamente la medición del EFAR en la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del filtro SRM 2034. El método de medición vuelve a ser un método directo y el cálculo se presenta mediante la ecuación 2.18,

$$\lambda_{EFAR_i} = \bar{\lambda}_i + C_{enf1,2} \quad (2.18)$$

donde:

- λ_{EFAR_i} es la indicación corregida del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $\bar{\lambda}_i$ es el promedio de las n indicaciones del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $C_{enf1,2}$ es la corrección aplicada. Definida como el negativo del error de medida predicho por un modelo lineal de ajuste de los errores de medida de la calibración primaria por ABE.

$$C_{enf1,2} = -\hat{E}_i = -(\hat{m} \cdot \lambda_i + \hat{b}) \quad (2.19)$$

donde:

- \hat{m} es el valor de la pendiente de la recta, que surge del ajuste lineal,
- \hat{b} es el valor de la intersección de la recta con el eje de las ordenadas, que surge del ajuste lineal,
- λ_i es el valor de la longitud de onda a evaluar en el ajuste lineal.

Tanto la incertidumbre por resolución como la incertidumbre por ABE siguen siendo las definidas en las ecuaciones 2.3 y 2.5 respectivamente. El diagrama de Ishikawa de la figura 8b muestra las fuentes de incertidumbre para cada magnitud del modelo presentado en la ecuación 2.18.

- Incertidumbre por repetibilidad de medida:

Idéntica a la definida en la ecuación 2.16,

- Incertidumbre de la corrección:

Para la incertidumbre asociada a la corrección, se utiliza la evaluación de la incertidumbre tipo A, siguiendo una distribución $t - Student$. Esta incertidumbre se evalúa a partir de la ecuación 2.20,

$$u_{C_{enf1,2}} = u_{Ajuste} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (\text{Residuos})^2}{p-1}} \quad (2.20)$$

donde:

- $u_{C_{enf1,2}}$ es la incertidumbre estándar de la corrección generada por la información de la calibración primaria tomando el enfoque 1.2,

- u_{Ajuste} es la incertidumbre global del ajuste mediante la metodología mínimos cuadrados ordinarios,
- se aclara que, los residuos de los errores se cuantifican como la diferencia entre el error de medida del EFAR real y el valor predicho por el ajuste lineal. Se le asocia a dichos residuos una distribución $t - Student$ con $\nu = p - 1$ grados de libertad.

Evaluación de la incertidumbre estándar combinada

Como los parámetros que contribuyen a la incertidumbre de la medición están en las mismas unidades y son independientes entre sí, los coeficientes de sensibilidad resultan nuevamente ser igual a 1 (ver ecuaciones 2.14 y 2.18). Las ecuaciones 2.21 y 2.22 presentan la forma final en la que se evalúa la incertidumbre estándar combinada asociada a cada medición de las longitudes de onda de transmitancia mínima del SRM 2034 para ambos sub-enfoques.

$$u_c(\lambda_{EFAR_i}) = \sqrt{u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{rep}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{C_{enf1,1}}^2} \rightarrow \text{Enfoque 1.1} \quad (2.21)$$

$$u_c(\lambda_{EFAR_i}) = \sqrt{u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{rep}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{C_{enf1,2}}^2} \rightarrow \text{Enfoque 1.2} \quad (2.22)$$

donde:

- $u_c(\lambda_{EFAR_i})$ es la incertidumbre estándar combinada de la medición de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $u_{res}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por resolución,
- $u_{ABE}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por ABE,
- $u_{rep}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por repetibilidad de medida,
- $u_{C_{enf1,1}}$ es la incertidumbre estándar asociada a la corrección del enfoque 1.1,
- $u_{C_{enf1,2}}$ es la incertidumbre estándar asociada a la corrección del enfoque 1.2.

La cuantificación de los grados efectivos de libertad y de las incertidumbres expandidas asociadas se realiza mediante el uso de las ecuaciones 2.11 y 2.13 respectivamente.

Evaluación de los resultados de medición: SRM 2034 y enfoque 2

En este caso, **no** se corrigen las indicaciones del EFAR. Pero se incluye un término asociado a la mayor incertidumbre estándar combinada del error de medida por ABE del enfoque 2.

Mensurando e incertidumbres asociadas: enfoque 2

El mensurando final sujeto a medición en este último caso, es la medición del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034. El método vuelve a ser directo y el cálculo se presenta mediante la ecuación 2.23,

$$\lambda_{EFAR_i} = \bar{\lambda}_i + \epsilon_{Error} \quad (2.23)$$

donde:

- λ_{EFAR_i} es la indicación **no** corregida del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $\bar{\lambda}_i$ es el promedio de las n indicaciones del EFAR de la i -ésima longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- ϵ_{Error} es el aporte del error de medida del enfoque 2. Este presenta media cero e incertidumbre distinta de cero.

La incertidumbre por resolución, por ABE y por repetibilidad de medida del EFAR son las definidas por las ecuaciones 2.3, 2.5 y 2.16 respectivamente. El diagrama de Ishikawa de la figura 9 muestra las fuentes de incertidumbre para cada magnitud del modelo presentado en la ecuación 2.23.

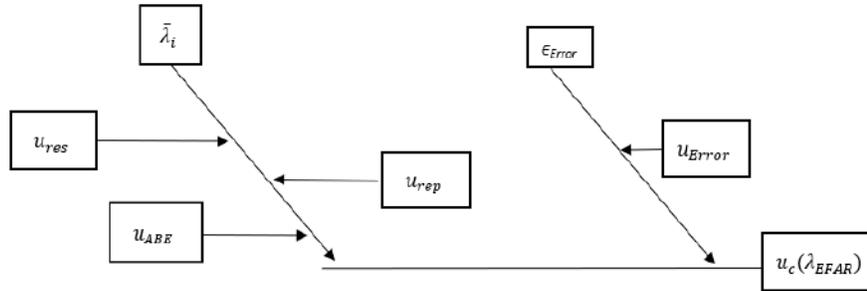


Figura 9: Diagrama de Ishikawa para la cuantificación de los aportes a la incertidumbre de la medición de las longitudes de onda de transmitancia mínima del SRM 2034 que surgen al aplicar el enfoque 2.

- Incertidumbre por error de medida:

Para la incertidumbre asociada al error de medida del enfoque 2, se utiliza la evaluación de la incertidumbre tipo A, siguiendo una distribución $t - Student$. Esta incertidumbre se evalúa a partir de la ecuación 2.24,

$$u_{Error_{enf2}} = u_{c_{máx}} \quad (2.24)$$

donde:

- $u_{c_{máx}}$ es la incertidumbre estándar combinada máxima de los errores de medida resultantes de la calibración primaria mediante el enfoque 2.

Evaluación de la incertidumbre estándar combinada

La ecuación 2.25 presenta la forma final en la que se evalúa la incertidumbre estándar combinada asociada a cada medición de longitudes de onda de transmitancia del SRM 2034 mínima utilizando el enfoque 2.

$$u_c(\lambda_{EFAR_i}) = \sqrt{u_{res}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{ABE}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{rep}^2(\bar{\lambda}_i) + u_{Error_{enf2}}^2} \rightarrow \text{Enfoque 2} \quad (2.25)$$

donde:

- $u_c(\lambda_{EFAR_i})$ es la incertidumbre estándar combinada de la medición de la i -ésima banda de transmitancia mínima del SRM 2034,
- $u_{res}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por resolución,

- $u_{ABE}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por ABE,
- $u_{rep}(\bar{\lambda}_i)$ es la incertidumbre por repetibilidad de medida,
- $u_{Error_{enf2}}$ es la incertidumbre estándar asociada al aporte del error de medida primario del enfoque 2,

Finalmente, la cuantificación de los grados efectivos de libertad y las incertidumbres expandidas asociadas, se realiza mediante el uso de las ecuaciones 2.11 y 2.13 respectivamente.

2.6.3. Criterio del Error Normalizado

Este criterio de aceptación es uno de los más comunes dentro de las comparaciones entre laboratorios [28]. Para este criterio se requiere un valor de referencia con su correspondiente incertidumbre y se tienen en consideración las siguientes suposiciones:

- los errores de los laboratorios respecto al valor de referencia siguen una curva normal,
- las incertidumbres de los errores y de los valores de referencia están expresados con el mismo factor de cobertura, por lo general igual a 2,
- esto supone que la desviación estándar de la función de distribución de probabilidad de errores es la mitad del denominador del error normalizado.

Así, para calcular el error normalizado, se utiliza la ecuación 2.26,

$$E_n = \frac{\lambda_{EFAR} - \lambda_{SRM2034}}{\sqrt{U_{EFAR}^2 + U_{SRM2034}^2}} \quad (2.26)$$

donde:

- λ_{EFAR} es el estimado por el laboratorio,
- $\lambda_{SRM2034}$ es el valor de referencia,
- U_{EFAR} es la incertidumbre expandida del resultado del laboratorio,
- $U_{SRM2034}$ es la incertidumbre expandida del resultado del valor de referencia.

El criterio de aceptación se aplica utilizando la ecuación 2.27.

$$-1 \leq E_n \leq 1 \quad (2.27)$$

3. Metodología

A continuación se presenta el procedimiento seguido para la implementación de las *pruebas de caracterización de los parámetros instrumentales del EFAR*, la *implementación del plan de validación* y la *generación de la documentación asociada* como parte del cumplimiento de los objetivos de este proyecto de graduación.

3.1. Procedimiento ejecutado en las pruebas de caracterización de los parámetros instrumentales

Con los datos resultantes del proceso de caracterización, se analizó el estado del equipo respecto a las especificaciones del fabricante. Para cada una de las pruebas de la caracterización de los parámetros instrumentales se implementó:

- una hora de calentamiento previo (warm-up) del equipo encendido, para llevar al EFAR al punto de estabilidad óptima de las fuentes de radiación,
- una calibración interna semanal.

3.1.1. Prueba de Ruido Fotométrico

Se cuantificó la relación de señal/ruido del EFAR. Se utilizó el software **UV WinLab Explorer** (instalado en la computadora del EFAR) con el método de medición **Timedrive**. Se midió la variación de la absorbancia indicada por el EFAR. Los filtros de densidad neutra SRM 930e y SRM 1930 fueron los patrones utilizados (ver figura A.7). Las condiciones operativas para esta prueba se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Condiciones operativas del EFAR para la prueba de ruido fotométrico.

Longitudes de onda para la prueba (nm)	360,0; 440,0; 465,0; 546,1; 590,0; 635,0; 800,0
Filtros usados	SRM 1930-211 (1, 3, 50) % y SRM 930e-2375 (10, 20, 30) %
Tiempo total (min)	2
Intervalo de datos (s)	1
Modo de la ordenada	A
Rendija (ABE) (nm)	0,1; 0,5; 1,0; 2,0
Repeticiones	tres repeticiones en cada longitud de onda: ascendente (360 nm a 800 nm), descendente (800 nm a 360 nm), ascendente (360 nm a 800 nm).
Configuración del detector (PMT) (s)	0,2
Correcciones realizadas automáticamente	al (100 % y 0 %) T , para cada longitud de onda.

Las gráficas de la variación de absorbancia en función del tiempo se procesaron, determinando el pico máximo y mínimo de absorbancia. Se calculó el intervalo de variación (la resta entre el valor máximo y mínimo de absorbancia) y se registró en la hoja de cálculo diseñada para dicho fin.

3.1.2. Prueba de Estabilidad fotométrica

Se cuantificó la estabilidad de las lámparas en función del tiempo. Se utilizó el software **UV WinLab Explorer** con el método de medición **Timedrive**. La estabilidad de la absorbancia indicada por el EFAR se cuantificó con el compartimento de muestras vacío, en las longitudes de onda de 360 nm y 800 nm. Dichos valores de longitud de onda de prueba fueron escogidos debido a que son los extremos del rango UV/Vis; estudiando así, la estabilidad en todo el rango. Las condiciones operativas del EFAR se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones operativas del EFAR para la prueba de estabilidad fotométrica.

Longitudes de onda para la prueba (nm)	360,0 y 800,0
Tiempo total (min)	90
Intervalo de datos (s)	1
Modo de la ordenada	A
Rendija (ABE) (nm)	0,1; 0,5; 1,0; 2,0
Repeticiones	se tomó una sola repetición para cada ABE.
Configuración del detector (PMT) (s)	0,2
Correcciones realizadas automáticamente	al (100 % y 0 %) T , para cada longitud de onda.

Las gráficas de la variación de absorbancia en función del tiempo se procesaron, determinando el pico máximo y mínimo de absorbancia. Se calculó el intervalo de variación y se registró en la hoja de cálculo diseñada para dicho fin.

3.1.3. Prueba de Línea Base Plana

Se cuantificó la absorbancia medida por el EFAR para todo el rango UV/Vis con el compartimento de muestras vacío. Se utilizó el software **UV WinLab Explorer** con el método de medición **Scan**. Las condiciones operativas del EFAR para la prueba de se presentan en la tabla 6.

Las gráficas de la variación de absorbancia en función de la longitud de onda se procesaron. Se determinaron las deflexiones más altas y bajas. Seguidamente, se calculó el intervalo de variación y la desviación estándar de la muestra de las tres repeticiones de cada medición.

Tabla 6: Condiciones operativas del EFAR para la prueba de línea base plana.

Longitudes de onda para la prueba (nm)	rango de 200,0 a 800,0
Configuración del detector (PMT) (s)	0,2
Intervalo de datos (nm)	0,05; 0,10; 0,25
Modo de la ordenada	A
Rendija (ABE) (nm)	0,1; 0,5; 1,0; 2,0
Repeticiones	3
Tiempo de espera entre repeticiones (s)	10
Correcciones realizadas automáticamente	al (100 % y 0 %) T , para cada longitud de onda.

3.1.4. Prueba de Luz parásita

Preparación de los filtros

La preparación de los filtros de corte se ejecutó mediante el método volumétrico. Se realizó todo el protocolo de limpieza de cristalería y equipos a utilizar para la preparación de las soluciones. Las sales de KCl, NaI y NaNO_2 se colocaron en un horno de secado a 110 °C en un tiempo aproximado de cuatro horas (para mayor información sobre equipos e instrumentos, diríjase a la tabla 17). Se calculó la cantidad de masa de cada una de las sales que se requería para obtener las concentraciones de cada filtro en función del volumen de los balones aforados y de la pureza de las sales. La tabla 7 muestra los resultados del cálculo de la cantidad de masa esperada para la preparación. Las masas se disolvieron y vertieron en los respectivos balones aforados mediante lavados cuantitativos hasta llevar a la marca de aforo.

Tabla 7: Masas requeridas para la preparación de los filtros de corte.

Filtro de corte	Concentración (g L⁻¹)	Pureza de la sal (%)	Volumen (mL)	Masa requerida (g)
KCl	12	99,500	25	0,3015
NaI	10	99,999	25	0,2500
NaNO_2	50	99,000	25	1,2662

Luego de la preparación, cada solución se filtró con filtros de 0,45 μm (ver figura A.9) y se colocaron en unas cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria.

Luz parásita con el filtro de KCl

Se cuantificó la absorbancia del filtro por debajo de la longitud de onda de corte $\lambda_{\text{corte}} = 200$ nm en función de la longitud de onda. Para cada ABE = (0,10; 0,5; 1 y 2) nm, se realizaron tres repeticiones barriendo el rango de (190 a 210) nm. Las condiciones operacionales de la prueba se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Condiciones operativas del EFAR para la prueba de luz parásita usando el filtro de corte de KCl.

Longitudes de onda para la prueba (nm)	rango de 190,0 a 210,0
Configuración del detector (PMT) (s)	0,2
Intervalo de datos (nm)	0,10
Modo de la ordenada	A
Rendija (ABE) (nm)	0,1; 0,5; 1,0; 2,0
Repeticiones	3
Longitud de onda de corte (nm)	200

Las gráficas de la variación de absorbancia en función de la longitud de onda se procesaron, determinando las deflexiones más altas y bajas antes de la longitud de onda de corte.

Luz parásita con el filtro de NaI

Se cuantificó la transmitancia del filtro por debajo de la longitud de onda de corte $\lambda_{corte} = 259$ nm en función del tiempo. Para cada ABE = (0,10; 0,5; 1,0 y 2,0) nm, se realizaron tres repeticiones en la longitud de onda de prueba $\lambda_{prueba} = 220$ nm. Las condiciones operacionales de la prueba se presentan en la tabla 9.

Tabla 9: Condiciones operativas del EFAR para la prueba de luz parásita usando los filtros de NaI y NaNO₂.

Filtro de corte	NaI	NaNO ₂
Longitud de onda de prueba (nm)	220,0	340,0 y 370,0
Configuración del detector (PMT) (s)	0,2	
Tiempo total (s)	60	
Intervalo de datos (s)	1	
Modo de la ordenada	% <i>T</i>	
Rendija (ABE) (nm)	0,1; 0,5; 1,0; 2,0	
Repeticiones	3	
Longitud de onda de corte (nm)	259,0	385,0

Las gráficas de la variación de la transmitancia en función del tiempo se procesaron, determinando las deflexiones más altas y bajas.

Luz parásita con el filtro de NaNO₂

Se cuantificó la transmitancia del filtro por debajo de la longitud de onda de corte $\lambda_{corte} = 385$ nm en función del

tiempo. Para cada ABE = (0,10; 0,5; 1,0 y 2,0) nm, se realizaron tres repeticiones en las dos longitudes de onda de prueba $\lambda_{prueba} = 340$ nm y $\lambda_{prueba} = 370$ nm. Las condiciones operacionales de la prueba se presentan de igual manera en la tabla 9. El procedimiento de los datos fue análogo al realizado para la prueba de luz parásita con el filtro de NaI.

3.1.5. Verificación del ABE

La verificación del ABE se realiza de manera simultánea a la calibración primaria del EFAR, por lo que la descripción metodológica de esta sección se detalla en la sección 3.3.2.

Finalmente, en la tabla 10 se presenta un resumen de los parámetros cuantificados en las pruebas de caracterización, así como una breve mención del tratamiento y funcionalidad de cada uno.

Tabla 10: Resumen de los parámetros cuantificados y su respectivo tratamiento posterior.

Prueba de caracterización	Parámetro cuantificado	Tratamiento que se le dio	Funcionalidad posterior
<i>Ruido fotométrico</i>	Intervalo de variación de la absorbancia ($A_{máx} - A_{mín}$) y su respectivo valor RMS.	Los valores fueron comparados con las especificaciones del fabricante y se reportaron en el informe técnico asociado al primer objetivo específico.	Se utilizarán en una calibración primaria futura sobre la escala fotométrica.
<i>Estabilidad fotométrica</i>	Intervalo de variación de la absorbancia ($A_{máx} - A_{mín}$).		
<i>Línea base plana</i>	Desviación estándar del intervalo de variación de las deflexiones máximas y mínimas.		
<i>Luz parásita</i>	Absorbancia promedio del filtro KCl por debajo de 200 nm.		
	Transmitancia promedio del filtro NaI por debajo de los 259 nm.		
	Transmitancia promedio del filtro NaNO ₂ por debajo de los 385 nm.		
<i>Verificación del ABE</i>	ABE efectivos.	Los resultados fueron documentados en el informe técnico.	Forman parte de los parámetros que influyen en la incertidumbre de la calibración de la escala de longitud de onda.

3.2. Definición de las longitudes de onda patrón del Hg

Las líneas espectrales de emisión de la lámpara de descarga de arco de Hg (ver figura A.10) que se tomaron como patrones intrínsecos se presentan en la última columna (demarcada con verde) de la tabla 11. Se consideraron a los valores del NIST como los valores de referencia, debido a su alta exactitud.

Tabla 11: Líneas espectrales de emisión del Hg recomendadas por diversas fuentes bibliográficas para la calibración de espectrofotómetros UV/Vis.

N° de línea espectral	Referencia			
	Oriel Lamps (nm)	ASTM E275 (nm)	ASTM E958 (nm)	NIST (nm)
1	253,65	253,651	253,65	253,6517
2	312,57	312,57	312,57	312,5668
3	313,17	-	-	313,1839
4	365,02	-	365,02	365,0153
5	365,48	-	-	365,4836
6	366,33	-	-	366,3279
7	404,66	404,657	404,66	404,6563
8	435,84	435,834	435,83	435,8328
9	546,07	546,075	546,08	546,0735

3.3. Implementación del método primario de calibración

3.3.1. Montaje del plan de validación

Como parte de la documentación asociada que solicita la norma ISO/IEC 17025:2017 [26] (ver sección 2.5), fue necesario diseñar el método a validar. Para este motivo, se creó un documento denominado **Validación de método (planificación y reporte): GS-SMI-PR-01 - Método primario para la calibración del espectrofotómetro UV/Vis de alta resolución para el establecimiento de un patrón nacional en la escala de longitud de onda**. Dicho documento se creó con el objetivo de brindar evidencia suficiente del adecuado desempeño del método **GS-SMI-PR-01**. Para dicha validación se definieron y utilizaron tres parámetros de mérito:

- sesgo,
- precisión de medida,
- incertidumbre.

Definición de los requisitos del LCM

Se definió como requisito del LCM, el poseer un método que fuese dependiente de un patrón primario (la lámpara tipo lápiz de Hg), adecuado para la calibración del EFAR en la escala de longitud de onda. Para brindar servicios de calibración y verificación de espectrofotómetros y filtros de óxido de holmio.

Definición del alcance y objetivo del método

El método se diseñó para que aplicase en la determinación de la longitud de onda de bandas de transmitancia mínima de filtros de óxido de holmio, a partir de las indicaciones del EFAR, y a diferentes configuraciones instrumentales (cuatro ABE y tres RB). Primeramente calibrando el EFAR a nivel primario con un patrón primario intrínseco de líneas de emisión de descarga de arco de Hg, y luego, comparando dichas indicaciones el SRM 2034.

El intervalo de trabajo para el cual el método aplica es de (200 a 700) nm en la escala de longitud de onda.

Especificación de los parámetros de mérito

El plan de validación se dividió por dos etapas: la primera asociada a los resultados del procedimiento de calibración primaria, y la segunda asociada a los resultados de la medición del filtro de óxido de holmio SRM 2034.

Definición de los parámetros de mérito para la primera etapa: resultados de la calibración primaria

El primer parámetro de mérito definido para la calibración primaria fue la **precisión intermedia**. Se analizaron las indicaciones del EFAR de las longitudes de onda de las nueve principales líneas espectrales de emisión del Hg en función de cuatro anchos de banda espectral: ABE = (0,1; 0,5; 1,0 y 2) nm. Al menos diez réplicas de los barridos espectrales en cada longitud de onda de prueba fueron realizadas a lo largo de tres días experimentales. Se estimó la repetibilidad de medida s_r y la precisión intermedia de medida s_I para cada una de las líneas espectrales según el ABE respectivo. Esto último siguiendo la metodología ANOVA presentada en el Apéndice A.5. El requisito analítico a cumplir se presenta en la ecuación 3.1.

$$\boxed{s_r < s_I} \quad (3.1)$$

El segundo parámetro de mérito definido en esta etapa fue el **sesgo**. Se analizaron los errores de medida del EFAR cuando dichos errores se cuantificaron usando como patrón, a las líneas espectrales de emisión del Hg en función de los cuatro ABE. Al menos diez réplicas de los barridos espectrales en cada longitud de onda de prueba fueron realizadas a lo largo de tres días experimentales. Se estimó el sesgo para cada una de las líneas espectrales según el ABE respectivo, siguiendo lo planteado en la ecuación 2.1. Los requisitos analíticos a cumplir se presentan en la tabla 12.

Tabla 12: Requisito analítico de los sesgos para la calibración primaria.

	ABE (nm)			
	0,1	0,5	1	2
Sesgo < (nm)	0,02	0,02	0,02	0,03

El tercer y último parámetro de mérito definido en esta etapa fue la **incertidumbre de medida**. Se analizaron las incertidumbres expandidas asociadas a cada uno de los errores de medida del EFAR de la calibración primaria en función de los cuatro ABE. Lo anterior, se realizó a partir de los dos enfoques definidos en las ecuaciones 2.9, 2.10, 2.11, y 2.13⁴. Los requisitos analíticos para todos los ABE en relación a la incertidumbre de medida se presentan en la tabla 13.

⁴Las convolución de las distribuciones de probabilidad originó una distribución trapezoidal en los resultados de los errores de medida a partir del enfoque 1. Por consiguiente, el factor de cobertura se asignó mediante los resultados de una simulación con Monte Carlo.

Tabla 13: Requisito analítico de las incertidumbres expandidas para la calibración primaria.

	Enfoque 1	Enfoque 2
$U \leq$ (nm)	0,04	0,10

Definición de los parámetros de mérito para la segunda etapa: resultados de la medición del filtro SRM 2034. El primer parámetro de mérito definido para la cuantificación de las bandas de transmitancia mínima del SRM 2034 fue la **repetibilidad de medida**. Se analizaron las indicaciones de longitud de onda de las catorce bandas de transmitancia mínima del SRM 2034 (ver Anexo B.2) en función de los cuatro ABE⁵, y además, de tres rapidezces de barrido espectral $RB = (14,91; 29,63 \text{ y } 72,73) \text{ nm min}^{-1}$. Al menos diez réplicas de los barridos espectrales por cada ABE y por cada RB fueron realizadas. Se estimó la desviación estándar para cada una de las indicaciones del EFAR de las bandas de transmitancia mínima del SRM 2034. Como requisito analítico, las desviaciones estándar de las longitudes de onda medidas debieron ser menores a los valores reportados en la tabla 14.

Tabla 14: Requisito analítico de las desviaciones estándar (nm) para las indicaciones del EFAR al medir el SRM 2034.

	Rapidez de barrido (nm/min)		
ABE (nm)	14,91	29,63	72,73
0,1	< 0,03	N/A	N/A
0,5	< 0,03	< 0,03	< 0,03
1	< 0,03	< 0,05	< 0,03
2	< 0,04	< 0,04	< 0,03

El segundo parámetro de mérito definido en esta etapa fue el **sesgo**. Se analizaron los errores de medida del EFAR cuando dichos errores se cuantificaron usando como patrón a las bandas de transmitancia mínima del SRM 2034 (ver Anexo B.2) y las indicaciones del EFAR siguiendo los presentado en las ecuaciones 2.14, 2.18 y 2.23. Los requisitos analíticos de valores absolutos de los sesgos debieron ser menores a los valores reportados en la tabla 15.

⁵Las velocidades de barrido de (29,36 y 72,73) nm/min se asocian a intervalos de datos ID iguales o mayores a 0,10 nm. La teoría indica que no es correcto hacer coincidir el ID con el ABE, por pérdidas de información debido a las tasas de muestreo del EFAR. Es por esto que, el ABE = 0,10 nm se omite en dichos casos.

Tabla 15: Requisito analítico de los valores absolutos de los sesgos (nm) para las indicaciones del EFAR al medir el SRM 2034.

ABE (nm)	Rapidez de barrido (nm/min)		
	14,91	29,63	72,73
0,1	< 0,05	N/A	N/A
0,5	< 0,08	< 0,06	< 0,07
1	< 0,06	< 0,06	< 0,06
2	< 0,10	< 0,09	< 0,13

El tercer y último parámetro de mérito definido en esta etapa fue la **incertidumbre de medida**. Se analizaron las incertidumbres expandidas asociadas a la medición del EFAR de las catorce bandas de transmitancia mínima del SRM 2034, tomando en consideración las incertidumbres de todos los enfoques con las ecuaciones 2.21, 2.22, 2.25, 2.11 y 2.13. Esto se realizó para los cuatro ABE y para las tres RB. Para poder analizar la comparabilidad metrológica entre las mediciones del EFAR y el certificado del SRM 2034 (ver Anexo B.2) se calcularon los errores normalizados respectivos siguiendo lo presentado en la ecuación 2.26. El requisito analítico para evaluar este parámetro de desempeño se definió a partir de la ecuación 2.27, pero se recuerda que se requiere que el error normalizado sea mayor a -1 y menor a 1.

3.3.2. Ejecución del plan de validación

Alineación de la lámpara de Hg

Para la calibración primaria de la escala de longitud de onda del EFAR, se utilizaron espectros de líneas de emisión del Hg que se obtienen de una lámpara tipo lápiz de Hg. El LCM contó con una de dichas lámparas (ver figura A.10) marca ORIEL INSTRUMENTS. La lámpara se instaló en el compartimento de lámparas utilizando las herramientas disponibles para dicho fin.

Antes de dar inicio con la calibración primaria, se encontró la posición de alineación óptima de la lámpara. Se diseñó una escala circular graduada para dar una guía al proceso de alineación, girando solo en ciertos ángulos (ver figura A.11). Se realizaron barridos espectrales cerca de la línea de emisión de 546,07 nm para el ABE = 0,1 nm, con una velocidad de barrido de 3 nm min⁻¹ (ID = 0,01 nm). Las ganancias del detector se variaron dependiendo de la intensidad relativa de la línea de emisión, por lo que el proceso de alineamiento finalizó al encontrar las intensidades relativas máximas.

Proceso de calibración del EFAR a nivel primario

Se realizaron diez barridos espectrales para cada longitud de onda de prueba (columna verde de la tabla 11) para cada ABE = (0,1; 0,5; 1 y 2) nm. Los parámetros experimentales utilizados en las pruebas de exactitud del EFAR se presentan en la tabla A.5. El procedimiento descrito anteriormente se realizó a lo largo de tres días experimentales con el fin de cuantificar los parámetros de precisión intermedia. Los datos fueron procesados mediante el software NanoUVVIS [32] y se cuantificaron los errores de medida, incertidumbres expandidas asociadas a cada error de medida en la calibración primaria del EFAR y los respectivos parámetros de mérito.

Proceso de medición del filtro SRM 2034 con el EFAR calibrado a nivel primario

Se preparó el SRM 2034 limpiando las superficies pulidas de su cubeta contenedora mediante la técnica de soplado con nitrógeno. Cada cara pulida del filtro se limpió de cualquier presencia de polvo o partículas como se muestra en la figura A.12. Seguidamente se colocó el filtro en el compartimento de muestra (ver figura A.13) y la medición de las catorce bandas de transmitancia mínima del filtro de óxido de holmio SRM 2034 se realizó para cada ABE y para cada RB haciendo un barrido espectral desde los 220 nm hasta los 680 nm. Cada uno de los barridos se realizó diez veces. Al finalizar la experimentación, se calcularon los mejores estimadores de las longitudes de onda de transmitancia mínima, sus incertidumbres expandidas asociadas y los parámetros de mérito respectivos.

3.3.3. Análisis de resultados

Cada uno de los parámetros de mérito tanto para la primera etapa asociada a la calibración primaria como para la segunda etapa asociada a las mediciones del SRM 2034, fue comparado contra el requisito analítico para cada uno de los ABE, RB y enfoques de incertidumbre respectivos. Esto permitió desarrollar el reporte de la validación respectivo, donde se definió la aptitud del método primario bajo validación.

3.4. Generación de propuestas de documentación

Se documentó todo el procedimiento del método primario implementado en el documento denominado: **Procedimiento primario de calibración del espectrofotómetro UV/Vis**. Se diseñó el formulario (Libro en Excel) denominado: **GS-SMI-FM-01 - Medición de parámetros de mérito para la validación del método primario de calibración de la escala de longitud de onda del EFAR**. Asimismo, se realizó la validación de dicho formulario utilizando la metodología Monte Carlo (puede acceder al código de programación en el Apéndice A.6.9). Se diseñó el informe de validación del formulario denominado: **Validación del formulario GS-SMI-FM-01**. Al final, se creó el certificado de calibración del EFAR a partir de los resultados del plan de la validación.

3.5. Cronograma del Proyecto de Graduación

A continuación en la tabla 16 se presenta el cronograma de trabajo realizado durante el desarrollo del proyecto de graduación.

Tabla 16: Cronograma de Actividades.

Objetivo específico	Actividad	Semanas															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
OE1	Prueba de Ruido Fotométrico	✓															
	Prueba de Estabilidad Fotométrica	✓															
	Prueba de Línea Base Plana		✓	✓													
	Prueba de Luz Parásita			✓	✓												
	Alineación de lámpara y Verificación de ABE					✓	✓										
	Avance I del Informe Final - TFG					✓											
	Presentación de informe técnico al LCM						✓	✓									
OE2	Montaje del plan de validación					✓	✓	✓	✓	✓	✓						
	Cuantificación de sesgos						✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
	Avance en la escritura de Informe Final - TFG						✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
	Cálculos de incertidumbres											✓	✓	✓			
	Pruebas de repetibilidad intermedia										✓	✓	✓	✓			
	Avance II del Informe Final - TFG										✓	✓	✓	✓			
	Análisis de resultados												✓	✓	✓	✓	
Presentación de informe de validación al LCM																✓	
OE3	Documentación del procedimiento primario							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
	Documentación de las hojas de cálculo							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
	Avance en la escritura de Informe Final - TFG										✓	✓	✓	✓			
	Validación de las hojas de cálculo												✓	✓	✓	✓	
	Generación de propuesta de certificado de calibración																✓
	Finalización del Informe Final - TFG																✓

4. Equipos e instrumentos

Un resumen de los equipos e instrumentos de medida utilizados se muestra en la tabla 17.

Tabla 17: Equipos o instrumentos empleados en el proyecto de graduación.

Equipo o instrumento de medida	Marca	Modelo	Código Interno	Intervalo nominal de indicaciones	Resolución
Espectrofotómetro de alta resolución (EFAR)	PerkinElmer	Lambda 950 UV/Vis Spectrometer	707210	175 nm a 3300 nm	Su ABE variable va desde los 0,05 nm hasta los 5 nm
Barotermohigrómetro	Ruska	2456-LEM	0999000808	Temperatura: (18 a 28) °C Presión atmosférica: (700 a 1150) mbar Humedad relativa: 5 % al 95 %	Temperatura: $\pm 0,1$ °C Presión atmosférica: $\pm 1,3$ mBar Humedad relativa: ± 3 %
MRC: Filtros de densidad neutra	NIST	SRM 930e	706497	Transmitancia: 10 %, 20 % y 30 %	N/A
MRC: Filtros de densidad neutra	NIST	SRM 1930	706495	Transmitancia: 1 %, 3 % y 50 %	N/A
MRC: Filtro de óxido de holmio	NIST	SRM 2034	-	Medido y caracterizado en el rango de (240 a 650) nm	N/A
Lámpara de Hg tipo lápiz para calibración espectral	ORIEL Instruments	6035 Hg(Ar)	-	Seis líneas de emisión (nm) - UV/Vis: 253,65; 312,57; 365,02 404,66; 435,84; 546,07	N/A
Lámpara de Hg tipo lápiz para calibración espectral	ORIEL Instruments	6033 Xe	-	Nueve líneas de emisión (nm) - IR: 823,16; 895,2; 980,0 992,3; 1262,3; 1365,7 1473,3; 1541,8; 1672,8	N/A
Escudo de larga apertura	Newport	6040	-	N/A	N/A
Balanza analítica	Mettler Toledo	XPE205	0999000418	Capacidad máxima: 220 g	0,01 mg
Multímetro industrial	FLUKE	289	-	Rango: 50,000 mA	0,001 mA
Horno de Laboratorio	ThermoFisher Scientific	PRECISION	0999000036	50 °C a 250 °C	1 °C
Baño de ultrasonido	Fisher Scientific	FS 7652	705565	N/A	N/A
Fuente de potencia para lámparas tipo lápiz	ORIEL	Oriel 6060	-	0 mA a 20 mA	N/A
Computadora del EFAR	hp	-	707248	N/A	N/A
Balones aforados	-	-	-	25 mL de volumen nominal	N/A

5. Datos y Resultados

En esta sección se presentan los resultados tanto del proceso de la caracterización del EFAR, como de la ejecución del plan de validación. Se presentan los cuadros resumen del proceso de la validación del método primario y presupuestos de incertidumbres, mediante los cuales se analizaron los resultados de la validación.

5.1. Resultados de la caracterización del EFAR

5.1.1. Resultados de la prueba de ruido fotométrico

A continuación, se presentan cuatro figuras (de la 10 a la 13) que resumen en su totalidad a la prueba de ruido fotométrico. Como se observa, las longitudes de onda correspondientes a 360 nm y 800 nm no aparecen en los resultados graficados. El motivo de su ausencia recae en los altos niveles de dispersión que presentaron los resultados. Esto se justifica debido a que dichas longitudes de onda no pertenecen al intervalo certificado de longitudes de onda de los filtros de densidad neutra.

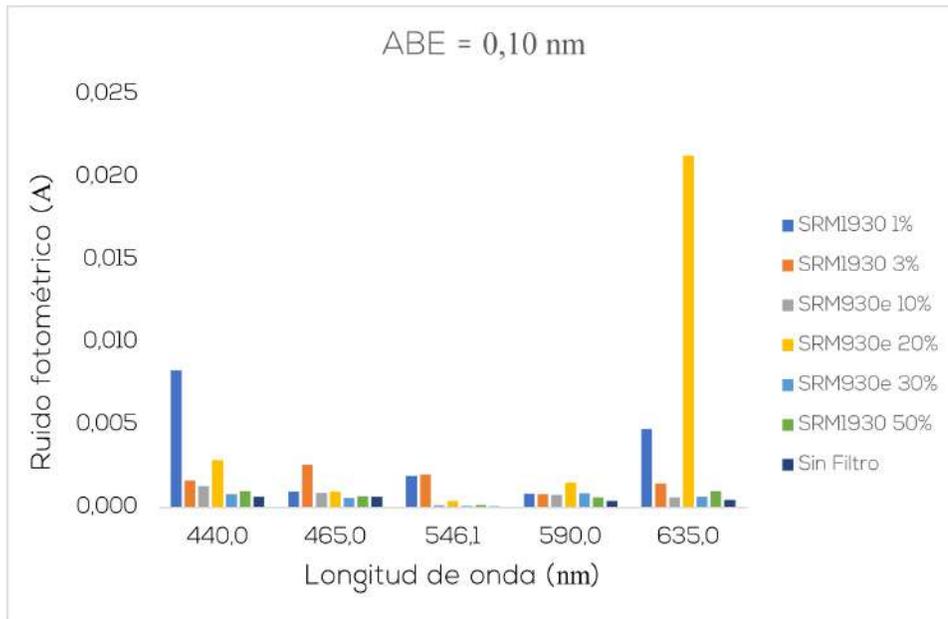


Figura 10: Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 0,10 nm.

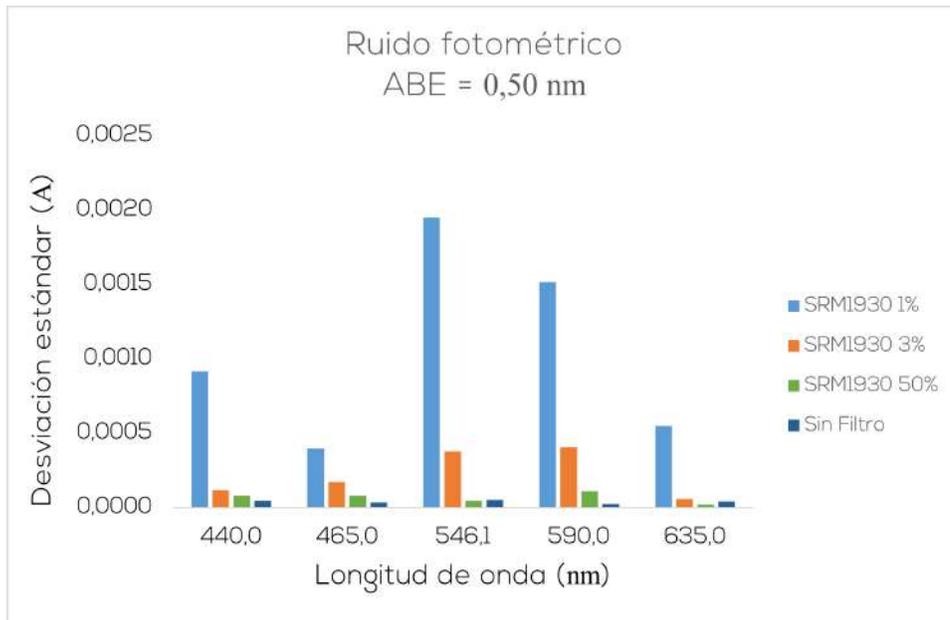


Figura 11: Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 0,50 nm.

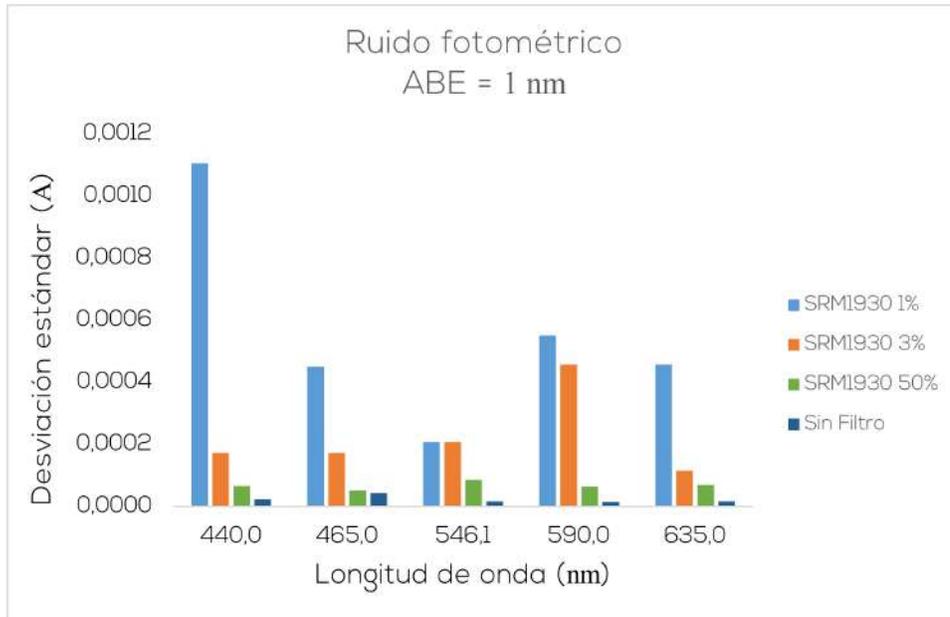


Figura 12: Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 1 nm.

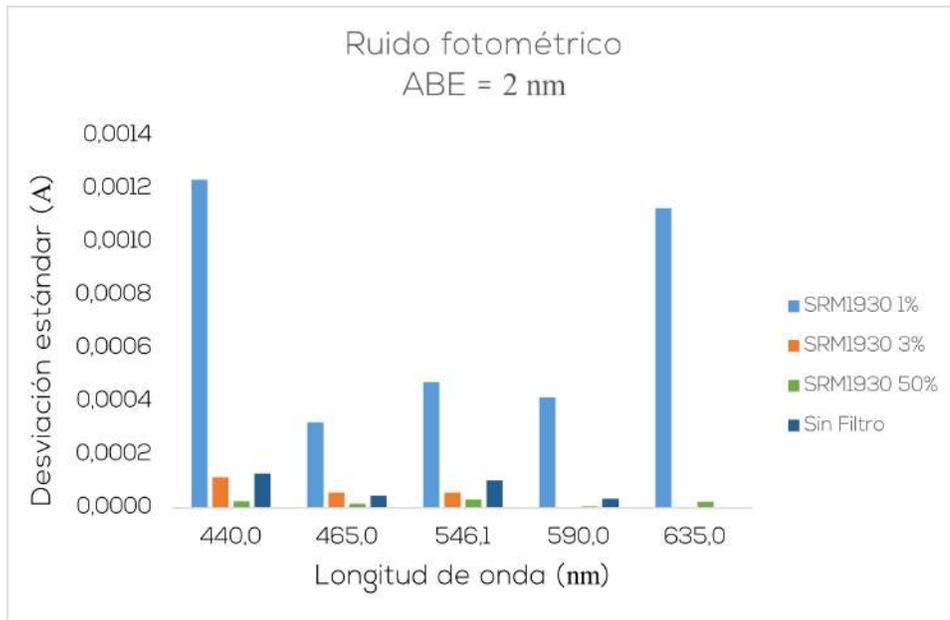


Figura 13: Ruido fotométrico en función de la longitud de onda de prueba y del filtro de densidad neutra utilizado para un ABE = 2 nm.

5.1.2. Resultados de la prueba de estabilidad fotométrica

A continuación, se adjunta la figura 14, la cual presenta un resumen de los resultados de la prueba de estabilidad fotométrica en su totalidad.

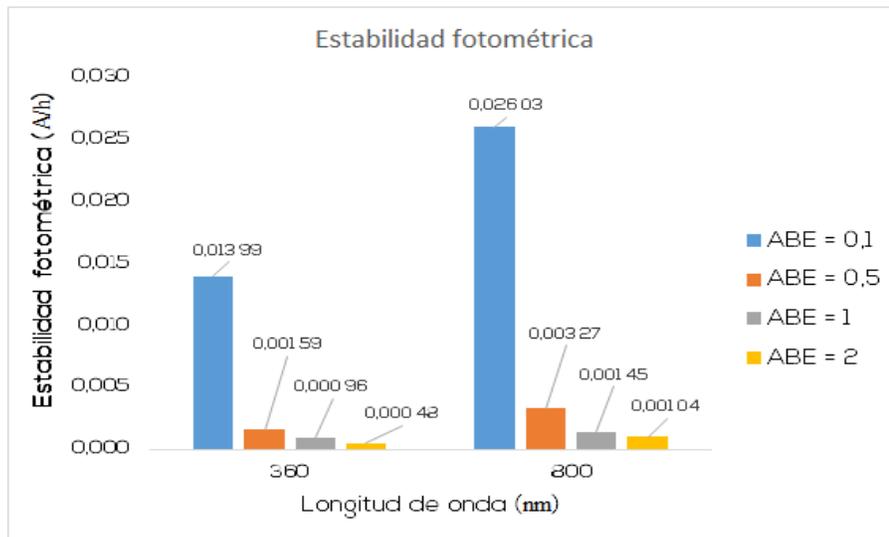


Figura 14: Estabilidad fotométrica en los extremos del rango UV/Vis del EFAR en función del ABE.

5.1.3. Resultados de la prueba de línea base plana

A continuación, se adjunta la figura 15, la cual presenta un resumen de los resultados de la prueba de línea base plana en su totalidad.

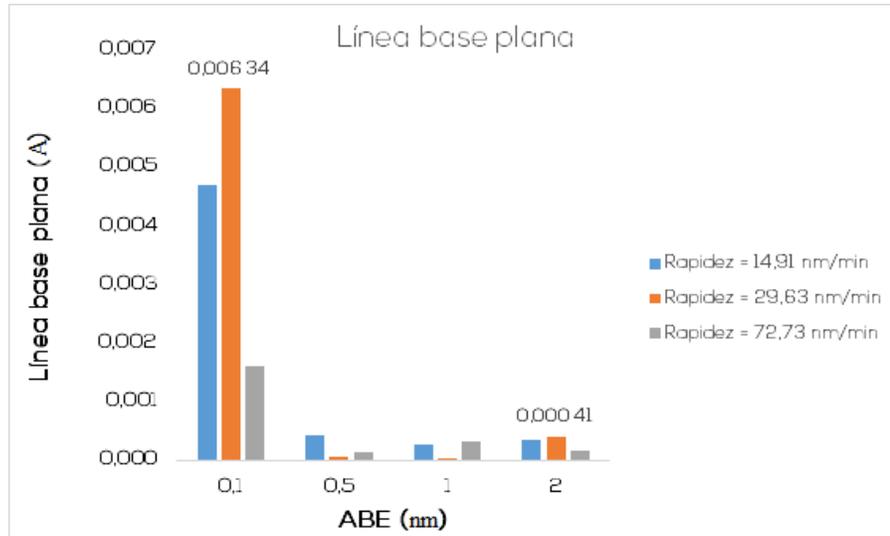


Figura 15: Línea base plana en función del ABE, para tres rapidezces de barrido espectral.

5.1.4. Resultados de la prueba de luz parásita

A continuación, se presentan las figuras 16 y 17, las cuales presentan un resumen de los resultados de la prueba de luz parásita en su totalidad.

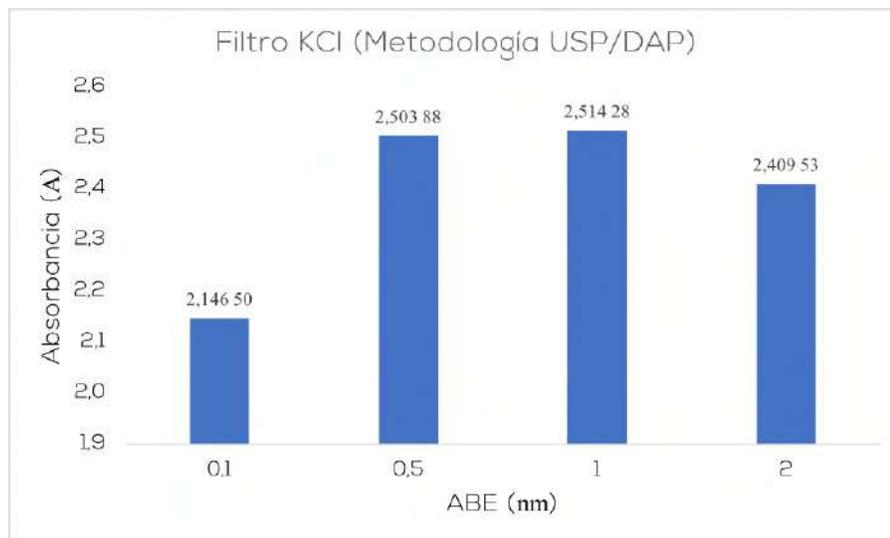


Figura 16: Luz parásita en función del ABE, usando el filtro de corte de KCl y la metodología USP/DAP.

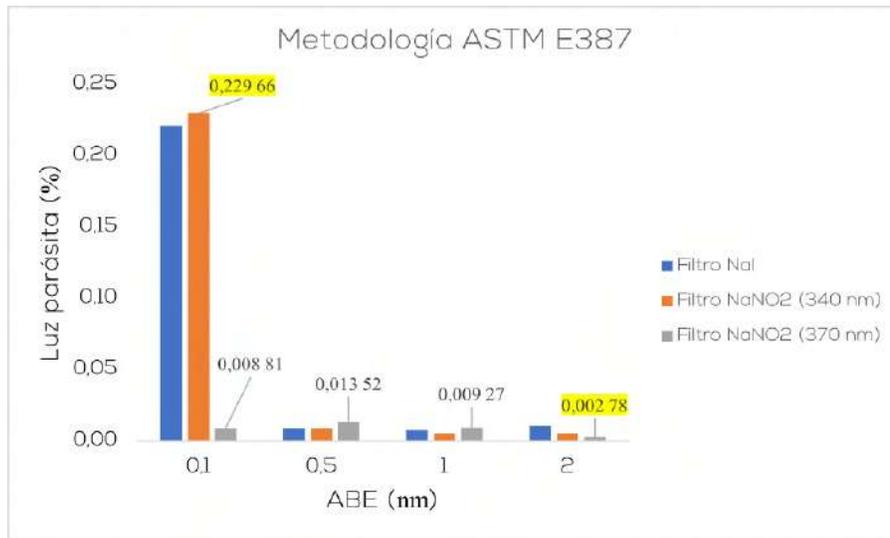


Figura 17: Luz parásita en función del ABE, según la metodología ASTM E387.

5.1.5. Resultados de la prueba de verificación del ABE

A continuación, se presentan las figuras 18, 19 y 20, las cuales presentan un resumen de los resultados de la prueba de verificación del ABE para cada uno de los tres días experimentales de las mediciones con la lámpara de Hg.

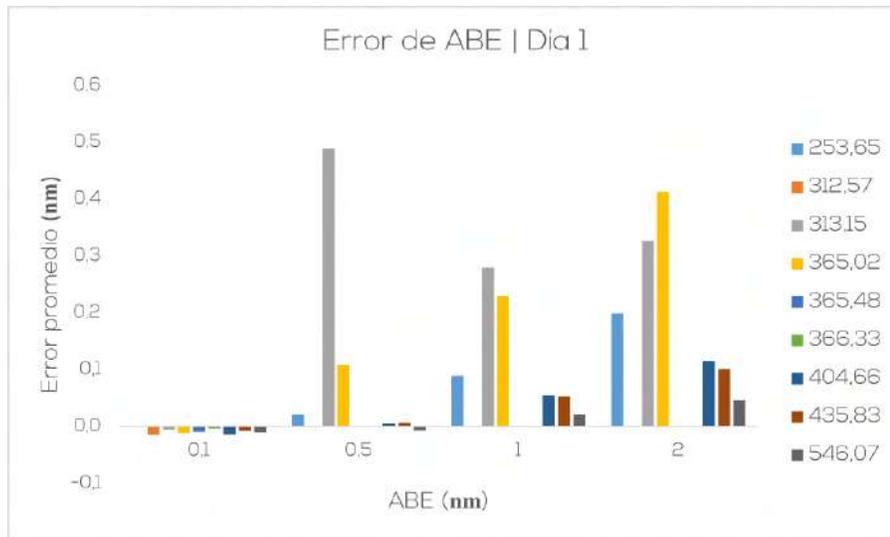


Figura 18: Errores en los ABE después del cálculo de los ABE efectivos del día experimental 1.

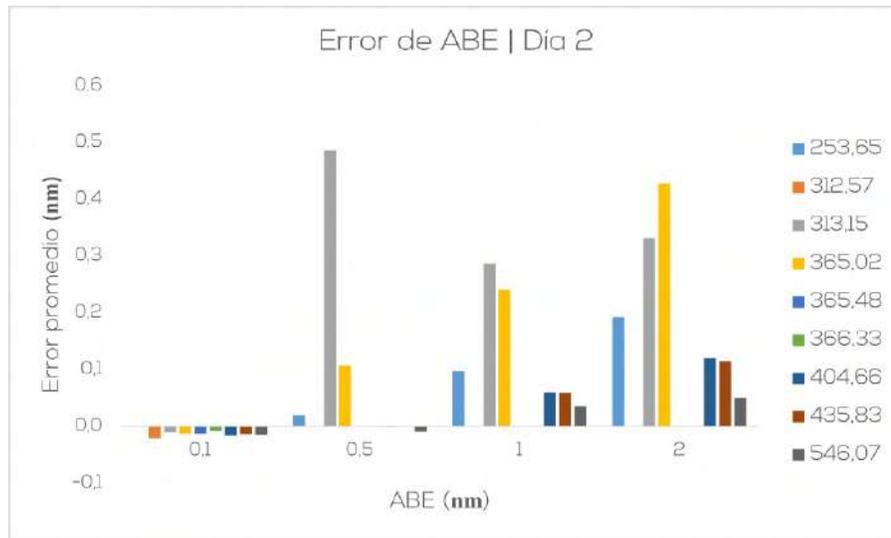


Figura 19: Errores en los ABE después del cálculo de los ABE efectivos del día experimental 2.

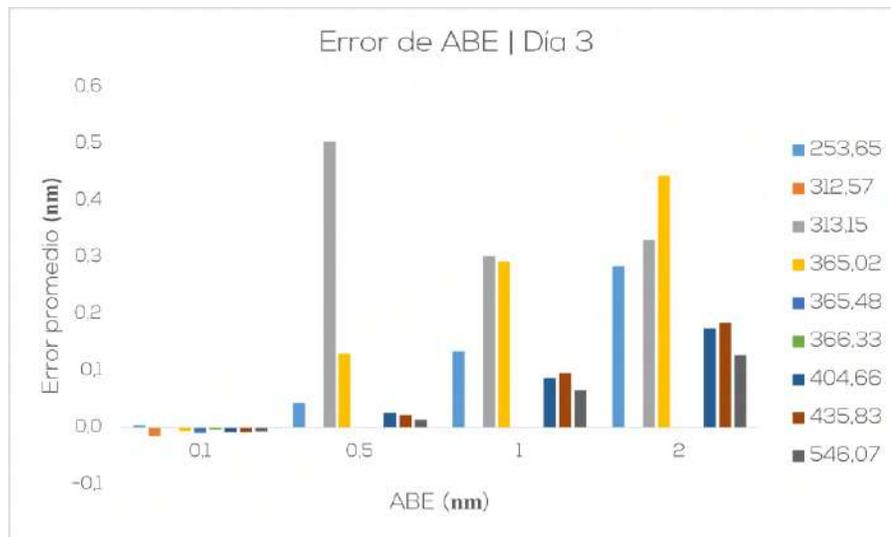


Figura 20: Errores en los ABE después del cálculo de los ABE efectivos del día experimental 3.

5.2. Resultados de la primera etapa del plan de validación: Calibración primaria del EFAR

En esta sección, se presentan los principales resultados de la calibración primaria del EFAR para cada uno de los ABE. Mediante la cuantificación de las tres fuentes de incertidumbre asociadas a cada uno de los enfoques en la determinación del error de medida del EFAR, se construyeron los presupuestos de incertidumbres asociados cada cada longitud de onda de prueba y algunos ejemplos de dichos presupuestos se presentan en el Apéndice A.7.

Los resultados finales de la calibración primaria del EFAR para cada ABE, se presentan en las siguientes sub-secciones. Las tablas de la 18 a la 21, presentan la indicación del EFAR, la longitud de onda de referencia (ver tabla 11), la repetibilidad de medida s_r , la precisión intermedia de medida s_I , los sesgos y las incertidumbres expandidas⁶ para cada uno de los puntos de calibración definidos para cada ABE en la escala de longitud de onda.

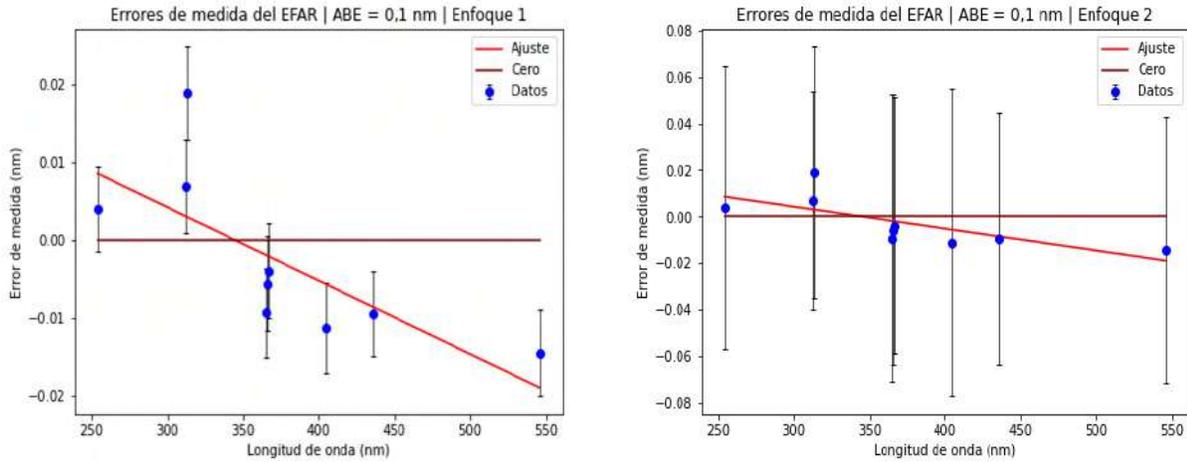
Además, con el uso de los valores de sesgos e incertidumbres expandidas se construyeron las figuras de la 21 a la 24. Las cuales reflejan el comportamiento de los errores de medida del EFAR en función de la longitud de onda de prueba y en función del enfoque tratado.

5.2.1. Resultados de la calibración para un ABE = 0,1 nm

Tabla 18: Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 0,1 nm.

ABE = 0,1 nm							
Longitud de onda EFAR (nm)	Longitud de onda del Hg (nm)	s_r (nm)	s_I (nm)	Sesgo (nm)	Sesgo (nm)	Enfoque 1 U (nm)	Enfoque 2 U (nm)
253,6557	253,6517	0,002 79	0,0289	0,003 97	0,003 97	0,0055	0,061
312,5737	312,5668	0,004 26	0,0223	0,006 87	0,006 87	0,0060	0,047
313,1737	313,1548	0,004 26	0,0257	0,018 87	0,018 87	0,0060	0,054
365,0060	365,0153	0,003 65	0,0294	-0,009 30	0,009 30	0,0058	0,062
365,4780	365,4836	0,004 55	0,0275	-0,005 60	0,005 60	0,0061	0,058
366,3240	366,3279	0,004 55	0,0262	-0,003 90	0,003 90	0,0061	0,055
404,6450	404,6563	0,003 80	0,0314	-0,011 30	0,011 30	0,0058	0,066
435,8233	435,8328	0,002 58	0,0258	-0,009 47	0,009 47	0,0054	0,054
546,0590	546,0735	0,003 04	0,0272	-0,014 50	0,014 50	0,0055	0,057

⁶Los factores de cobertura asociados al enfoque 1 nos se muestran, debido a que se cuantificaron mediante simulación por Monte Carlo, y fueron cambiando en función de la longitud de onda de prueba. Por otro lado, los factores de cobertura asociadas a las incertidumbres del enfoque 2 se asocian a distribuciones t – *Student* con bajos grados de libertad, por lo tanto, no se presentan debido a que dichos valores varían para cada longitud de onda de prueba.



(a) Enfoque 1: incertidumbre por repetibilidad.

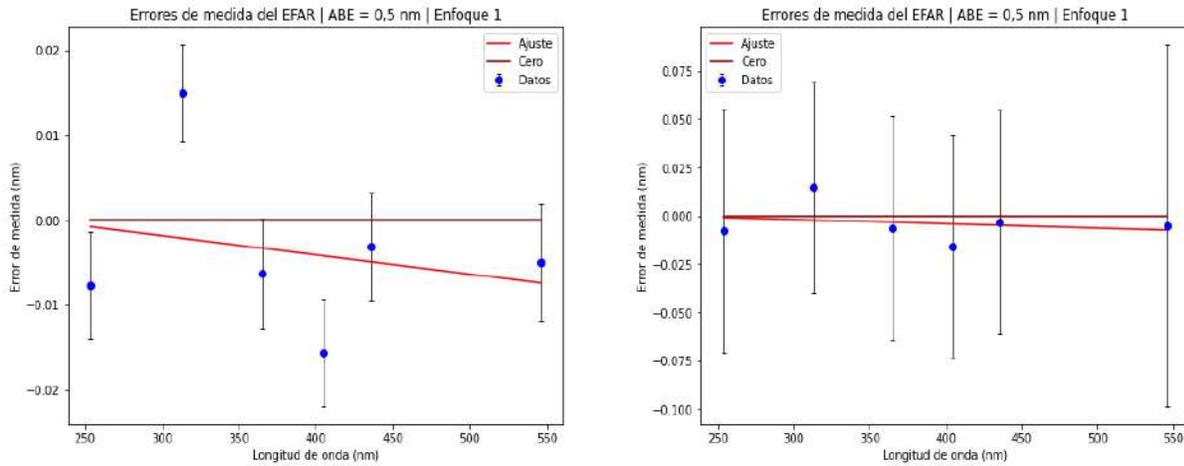
(b) Enfoque 2: incertidumbre por reproducibilidad.

Figura 21: Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 0,1 nm.

5.2.2. Resultados de la calibración para un ABE = 0,5 nm

Tabla 19: Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 0,5 nm.

ABE = 0,5 nm							
Longitud de onda EFAR (nm)	Longitud de onda del Hg (nm)	s_r (nm)	s_I (nm)	Sesgo (nm)	Sesgo (nm)	Enfoque 1 U (nm)	Enfoque 2 U (nm)
253,6440	253,6517	0,004 13	0,0300	-0,007 70	0,007 70	0,0063	0,063
313,1697	313,1548	0,001 83	0,0259	0,014 87	0,014 87	0,0057	0,054
365,0090	365,0153	0,004 75	0,0276	-0,006 30	0,006 30	0,0065	0,058
404,6407	404,6563	0,004 13	0,0273	-0,015 63	0,015 63	0,0063	0,057
435,8297	435,8328	0,004 08	0,0276	-0,003 13	0,003 13	0,0063	0,058
546,0685	546,0735	0,005 91	0,0446	-0,005 00	0,005 00	0,0069	0,093



(a) Enfoque 1: incertidumbre por repetibilidad.

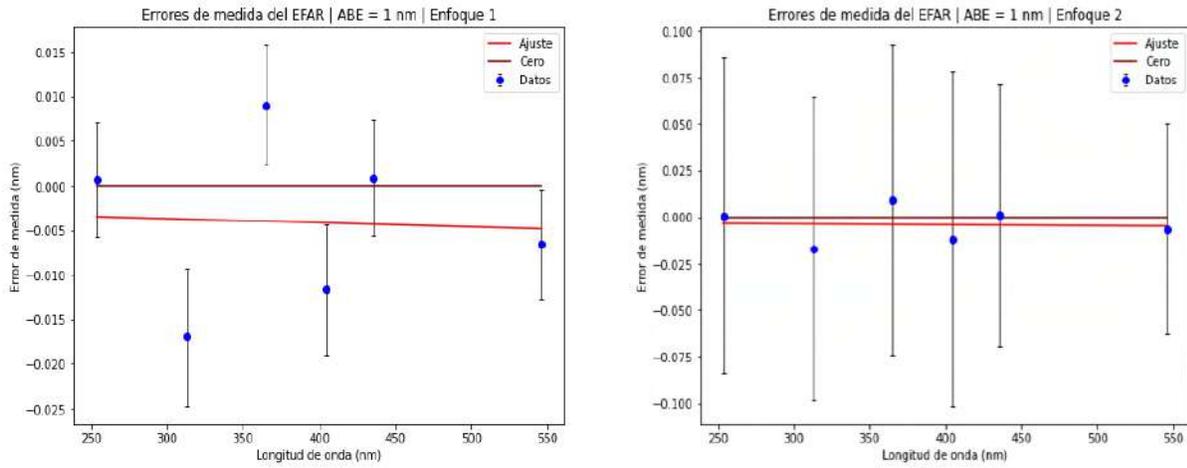
(b) Enfoque 2: incertidumbre por reproducibilidad.

Figura 22: Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 0,5 nm.

5.2.3. Resultados de la calibración para un ABE = 1 nm

Tabla 20: Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 1 nm.

ABE = 1 nm							
Longitud de onda EFAR (nm)	Longitud de onda del Hg (nm)	s_r (nm)	s_I (nm)	Sesgo (nm)	Sesgo (nm)	Enfoque 1 U (nm)	Enfoque 2 U (nm)
253,6523	253,6517	0,004 75	0,0404	0,000 63	0,000 63	0,0064	0,085
313,1378	313,1548	0,007 96	0,0388	-0,016 97	0,016 97	0,0077	0,081
365,0243	365,0153	0,005 61	0,0398	0,009 03	0,009 03	0,0067	0,083
404,6447	404,6563	0,006 99	0,0429	-0,011 63	0,011 63	0,0073	0,090
435,8337	435,8328	0,004 91	0,0335	0,000 87	0,000 87	0,0065	0,070
546,0670	546,0735	0,003 90	0,0268	-0,006 50	0,006 50	0,0062	0,056



(a) Enfoque 1: incertidumbre por repetibilidad.

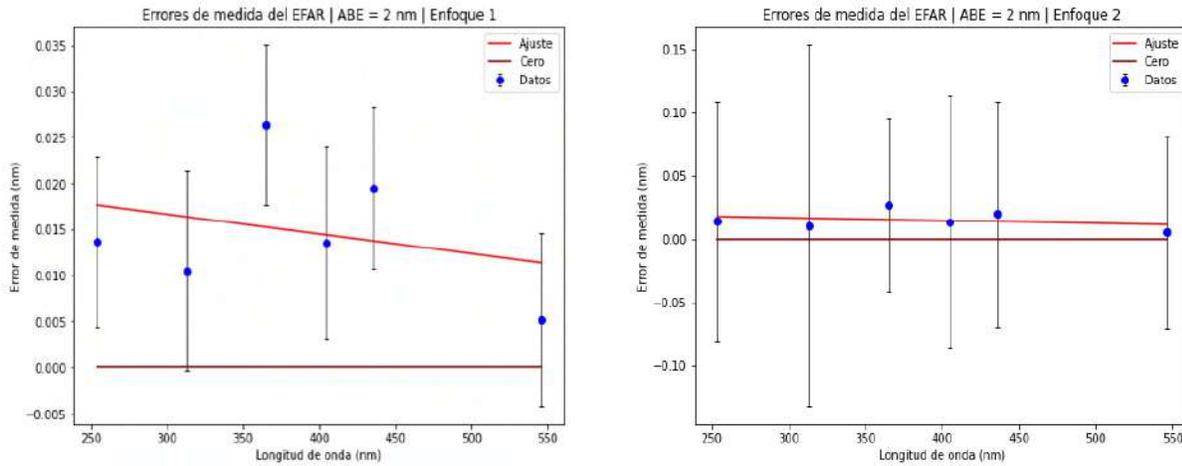
(b) Enfoque 2: incertidumbre por reproducibilidad.

Figura 23: Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 1 nm.

5.2.4. Resultados de la calibración para un ABE = 2 nm

Tabla 21: Resumen de los resultados para la calibración primaria del EFAR para un ABE = 2 nm.

ABE = 2 nm							
Longitud de onda EFAR (nm)	Longitud de onda del Hg (nm)	s_r (nm)	s_I (nm)	Sesgo (nm)	Sesgo (nm)	Enfoque 1 U (nm)	Enfoque 2 U (nm)
253,6653	253,6517	0,008 69	0,0449	0,013 63	0,013 63	0,0093	0,094
313,1653	313,1548	0,012 35	0,0680	0,010 53	0,010 53	0,0108	0,143
365,0417	365,0153	0,007 02	0,0324	0,026 37	0,026 37	0,0087	0,068
404,6698	404,6563	0,011 63	0,0475	0,013 53	0,013 53	0,0105	0,100
435,8523	435,8328	0,007 33	0,0424	0,019 53	0,019 53	0,0088	0,089
546,0787	546,0735	0,008 90	0,0361	0,005 17	0,005 17	0,0094	0,076



(a) Enfoque 1: incertidumbre por repetibilidad.

(b) Enfoque 2: incertidumbre por reproducibilidad.

Figura 24: Gráficas de los errores de medida del EFAR para un ABE = 2 nm.

5.3. Resultados de la segunda etapa del plan de validación: Medición del filtro SRM 2034

En esta sección se presentan los principales resultados asociados a los parámetros de mérito cuantificados para la segunda etapa del plan de validación. En una primera instancia, se presentan los resultados que permitieron tomar decisiones sobre las diferencias entre los enfoques 1.1 y 1.2, y seguidamente se presentan las tablas resumen de los resultados de interés restantes de la validación.

5.3.1. Diferencias por error normalizado entre el enfoque 1.1 y 1.2

Los primeros resultados importantes a mencionar son las diferencias entre los enfoques 1.1 y 1.2 para la determinación de las longitudes de onda de las bandas de transmitancia mínima del SRM 2034. Dichas diferencias se presentan a continuación en las figuras de la 25 a la 27. Estas representan el efecto de cada enfoque tomando el ABE = 0,5 nm y cada RB. Se presenta solo este ABE a manera de ejemplo debido a que la tendencia fue la misma para los otros ABE.

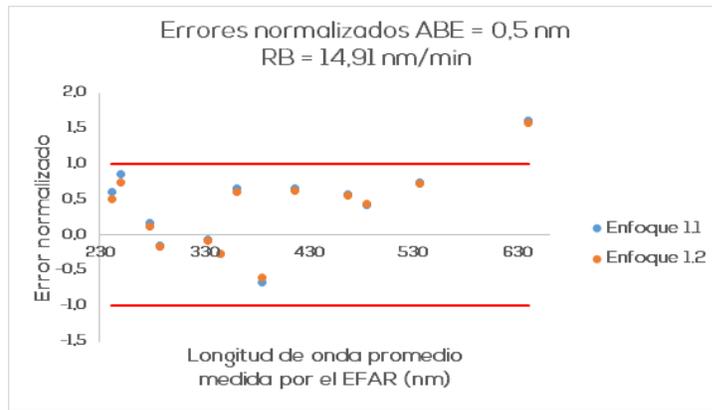


Figura 25: Error normalizado de las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del EFAR, a una RB = 14,91 nm/min y un ABE = 0,5 nm.

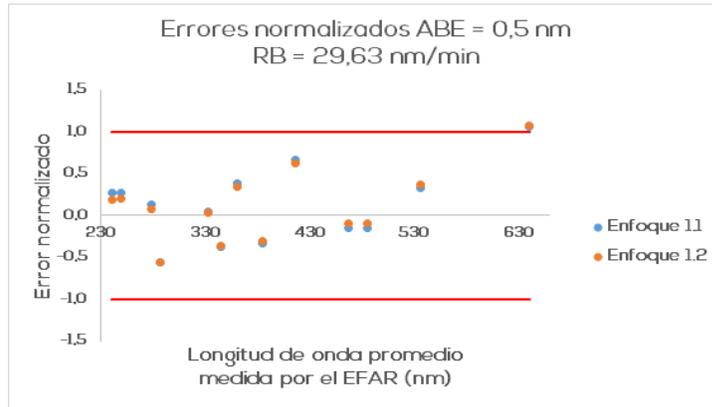


Figura 26: Error normalizado de las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del EFAR, a una RB = 29,63 nm/min y un ABE = 0,5 nm.

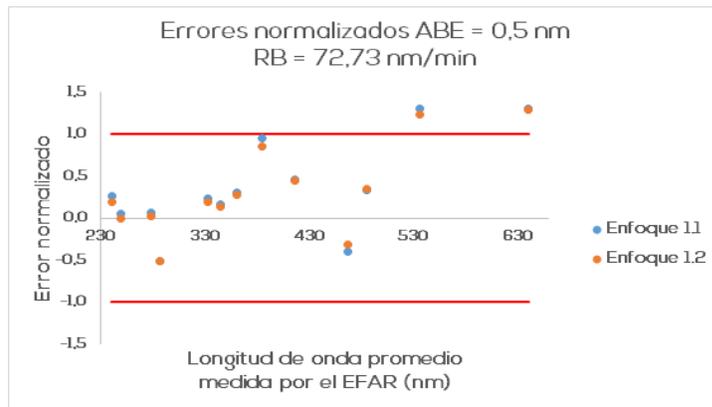


Figura 27: Error normalizado de las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del EFAR, a una RB = 72,73 nm/min y un ABE = 0,5 nm.

5.3.2. Resultados de las desviaciones estándar experimentales del EFAR al medir el SRM 2034

Los resultados de las desviaciones estándar máximas del EFAR al medir las catorce bandas de transmitancia mínima para cada ABE y para cada RB se presentan en la tabla 22.

Tabla 22: Desviaciones estándar (nm) máximas resultantes por ABE y RB para las indicaciones del EFAR al medir el SRM 2034.

ABE (nm)	Rapidez de barrido (nm/min)		
	14,91	29,63	72,73
0,1	0,026	N/A	N/A
0,5	0,018	0,027	0,017
1	0,020	0,042	0,016
2	0,032	0,030	0,021

5.3.3. Resultados de los sesgos y errores normalizados de longitud de onda de transmitancia mínima del EFAR en función de cada ABE y de cada RB.

En esta sección, se presentan los principales resultados de las mediciones del EFAR ya calibrado (dependiendo del enfoque) para cada uno de los ABE y para cada RB. Mediante la cuantificación de las fuentes de incertidumbre asociadas a las mediciones de las bandas de transmitancia mínima del SRM 2034, se construyeron los presupuestos de incertidumbres asociados para cada banda y algunos ejemplos de dichos presupuestos se presentan en el Apéndice A.8.

Las tablas de la 23 a la 28, presentan los: sesgos y errores normalizados para cada banda en función del ABE y de las RB. Estos resultados son los necesarios para analizar la validez del método de calibración primaria implementado.

Valores absolutos de sesgos

Tabla 23: Resultados de los valores absolutos de los sesgos del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 14,91 nm/min.

N°	Enfoque 1.2				Enfoque 2			
	ABE (nm)				ABE (nm)			
	0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2
1	0,006	0,028	0,015	0,088	0,004	0,027	0,012	0,070
2	0,040	0,041	0,018	0,015	0,030	0,040	0,021	0,003
3	0,034	0,006	0,004	0,077	0,040	0,005	0,000	0,060
4	0,026	0,009	0,010	0,097	0,021	0,011	0,014	0,080
5	0,021	0,004	0,004	0,036	0,020	0,007	0,000	0,020
6	0,039	0,015	0,024	0,036	0,039	0,018	0,020	0,020
7	0,013	0,033	0,024	0,015	0,011	0,030	0,020	0,030
8	0,000	0,028	0,040	0,029	0,004	0,032	0,036	0,044
9	0,025	0,034	0,048	0,016	0,018	0,030	0,044	0,030
10			0,004	0,033			0,000	0,020
11	0,012	0,026	0,014	0,037	0,000	0,020	0,010	0,050
12	0,013	0,020	0,035	0,013	0,000	0,014	0,030	0,000
13	0,043	0,034	0,025	0,008	0,025	0,027	0,020	0,020
14	0,020	0,075	0,055	0,001	0,008	0,065	0,050	0,010

Tabla 24: Resultados de los valores absolutos de los sesgos del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 29,63 nm/min.

N°	Enfoque 1.2			Enfoque 2		
	ABE (nm)			ABE (nm)		
	0,5	1	2	0,5	1	2
1	0,011	0,007	0,067	0,010	0,004	0,049
2	0,012	0,013	0,068	0,011	0,010	0,050
3	0,004	0,006	0,077	0,003	0,010	0,060
4	0,030	0,016	0,087	0,032	0,020	0,070
5	0,002	0,004	0,086	0,001	0,008	0,070
6	0,021	0,045	0,016	0,024	0,041	0,000
7	0,019	0,034	0,015	0,016	0,030	0,000
8	0,014	0,044	0,015	0,018	0,040	0,000
9	0,034	0,031	0,016	0,030	0,027	0,030
10		0,046	0,083		0,050	0,070
11	0,004	0,019	0,013	0,010	0,015	0,000
12	0,004	0,035	0,007	0,010	0,030	0,020
13	0,017	0,005	0,028	0,010	0,000	0,040
14	0,050	0,055	0,001	0,040	0,050	0,010

Tabla 25: Resultados de los valores absolutos de los sesgos del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 72,73 nm/min.

N°	Enfoque 1.2			Enfoque 2		
	ABE (nm)			ABE (nm)		
	0,5	1	2	0,5	1	2
1	0,011	0,017	0,108	0,010	0,020	0,090
2	0,000	0,003	0,087	0,001	0,006	0,069
3	0,001	0,026	0,117	0,000	0,030	0,100
4	0,028	0,016	0,117	0,030	0,020	0,100
5	0,011	0,007	0,086	0,008	0,011	0,070
6	0,008	0,017	0,068	0,005	0,013	0,052
7	0,015	0,004	0,035	0,012	0,000	0,020
8	0,041	0,011	0,065	0,037	0,015	0,050
9	0,024	0,034	0,014	0,020	0,030	0,000
10		0,046	0,083		0,050	0,070
11	0,014	0,006	0,053	0,020	0,010	0,040
12	0,016	0,015	0,013	0,010	0,010	0,000
13	0,057	0,015	0,022	0,050	0,010	0,010
14	0,060	0,045	0,011	0,050	0,040	0,020

Errores normalizados

Tabla 26: Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 14,91 nm/min.

N°	Enfoque 1.2				Enfoque 2			
	ABE (nm)				ABE (nm)			
	0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2
1	-0,110	0,500	0,281	-1,660	0,049	0,263	0,120	-0,481
2	-0,756	0,741	-0,313	-0,265	-0,371	0,390	-0,209	0,020
3	0,621	0,116	0,065	-1,456	0,489	0,049	0,000	-0,412
4	-0,493	-0,171	-0,189	-1,712	-0,258	-0,107	-0,140	-0,545
5	-0,466	-0,079	0,069	-0,678	-0,263	-0,068	0,000	-0,137
6	-0,717	-0,269	0,438	-0,674	-0,476	-0,174	0,201	-0,137
7	0,229	0,605	0,436	0,273	0,134	0,292	0,200	0,206
8	-0,004	-0,605	0,872	0,652	-0,049	-0,325	0,378	0,308
9	0,463	0,627	0,874	0,299	0,222	0,292	0,440	0,206
10			0,081	-0,765			0,000	-0,140
11	0,250	0,548	0,313	0,847	0,000	0,203	0,105	0,351
12	0,305	0,431	0,757	-0,290	0,000	0,142	0,316	0,000
13	0,969	0,732	0,543	0,193	0,331	0,274	0,210	0,140
14	0,456	1,581	1,211	0,015	-0,107	0,659	0,526	0,070

Tabla 27: Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 29,63 nm/min.

N°	Enfoque 1.2			Enfoque 2		
	ABE (nm)			ABE (nm)		
	0,5	1	2	0,5	1	2
1	0,191	0,136	-1,262	0,097	0,040	-0,337
2	0,207	0,246	-1,278	0,106	0,100	-0,344
3	0,079	-0,117	-1,456	0,029	-0,100	-0,412
4	-0,553	-0,300	-1,641	-0,312	-0,201	-0,481
5	0,029	-0,068	-1,622	-0,010	-0,077	-0,481
6	-0,366	0,772	-0,296	-0,231	0,403	0,000
7	0,347	0,622	-0,290	0,155	0,301	0,000
8	-0,299	0,966	-0,339	-0,182	0,421	0,000
9	0,627	0,568	0,299	0,292	0,270	0,206
10		-0,835	-1,911		-0,501	-0,492
11	-0,094	0,425	-0,299	-0,102	0,158	0,000
12	-0,086	0,757	0,168	-0,102	0,316	0,140
13	0,374	0,105	0,651	0,102	0,000	0,281
14	1,076	1,211	0,015	0,407	0,526	0,070

Tabla 28: Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir las bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034 en función del ABE a una RB = 72,73 nm/min.

N°	Enfoque 1.2			Enfoque 2		
	ABE (nm)			ABE (nm)		
	0,5	1	2	0,5	1	2
1	0,191	-0,304	-2,037	0,097	-0,201	-0,618
2	-0,005	-0,046	-1,589	-0,010	-0,060	-0,472
3	0,025	-0,483	-2,211	0,000	-0,301	-0,687
4	-0,517	-0,300	-2,207	-0,292	-0,201	-0,687
5	0,193	-0,130	-1,622	0,078	-0,110	-0,481
6	0,141	0,305	-1,253	0,048	0,130	-0,356
7	0,277	0,073	-0,667	0,117	0,000	-0,137
8	0,862	-0,236	-1,485	0,375	-0,157	-0,351
9	0,445	0,627	-0,267	0,195	0,301	0,000
10		-0,835	-1,911		-0,501	-0,492
11	-0,311	-0,121	-1,215	-0,204	-0,105	-0,281
12	0,348	0,319	-0,290	0,102	0,105	0,000
13	1,242	0,324	-0,494	0,509	0,105	-0,070
14	1,293	0,992	0,244	0,509	0,421	0,140

6. Análisis de resultados

A continuación, se presenta la discusión sobre los resultados presentados en la sección previa.

6.1. Caracterización de la escala fotométrica y de longitud de onda

Es importante resaltar, que las especificaciones garantizadas del fabricante del EFAR son presentadas considerando que fueron obtenidas bajo condiciones de prueba estándar y bajo especificaciones que pueden no coincidir con las realizadas para esta caracterización particular.

6.1.1. Ruido fotométrico

La prueba de ruido fotométrico fue ejecutada para cuatro ABE = (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0) nm en las longitudes de onda de (360,0; 440,0; 465,0; 546,1; 590,0; 635,0; 800,0) nm, debido a que los filtros de densidad neutra están certificados en dichos valores (dejando por fuera los 360 nm y 800 nm).

El ruido del EFAR es la relación señal/ruido debido a las fuentes de radiación y a sus componentes eléctricos y opto-mecánicos. Dicha interferencia causa incertidumbres en las mediciones fotométricas. La figura 10 presenta los resultados del ruido fotométrico para el ABE = 0,1 nm. Se observa una clara variación del ruido fotométrico a lo largo de todo el espectro UV/Vis, y es específico de cada longitud de onda de prueba. Se observa un ruido fotométrico menor a 0,01 A para la mayoría de las longitudes de onda de prueba. El uso de filtros de densidad neutra permite estudiar el ruido también a diferentes niveles de absorbancia. Para el filtro de 20 % de transmitancia a la longitud de onda de 635 nm, el nivel de ruido tan alto se debe a la alta dispersión de los valores de intervalos de variación medidos. En términos generales, los niveles de ruido a un ABE = 0,1 nm son relativamente altos debido al incremento en la resolución del instrumento y a su capacidad de detectar menos longitudes de onda.

Asimismo, la figura 11 muestra los resultados del ruido fotométrico a cada longitud de onda de prueba con el ABE = 0,5 nm. Se observa en general niveles de ruido fotométrico menores a los 0,0020 A. En este ABE, el filtro que presenta más ruido es el referente a una transmitancia del 1 %, mientras que los demás filtros se adjudicaron niveles de ruido fotométrico menores a 0,0005 A.

La tendencia a la baja en el ruido también se cumplió para el ABE = 1 nm. La figura 12, muestra que los valores de ruido para cada filtro y para cada longitud de onda fueron menores a 0,0012 A.

Finalmente, la figura 13 muestra los niveles de ruido presentados a cada longitud de onda para un ABE = 2 nm. En esta configuración instrumental es posible hacer una comparación con las especificaciones garantizadas del fabricante (ver figura B.16), si se piensa que la longitud de onda más cercana a 500 nm es la de 465 nm. Donde se encuentra que para un nivel de absorbancia de 0 A (lo que es análogo a decir que no se usa un filtro) los niveles de ruido fotométrico coinciden en 0,0005 A. Asimismo, para un nivel de absorbancia de 2 A (lo que es análogo a decir que se usa el filtro de 1 % de transmitancia), el valor especificado de ruido del fabricante es de 0,000 20 A, mientras que para el valor cuantificado ronda los 0,000 32 A.

6.1.2. Estabilidad fotométrica

La prueba de estabilidad fotométrica fue ejecutada para cuatro ABE = (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0) nm para las longitudes de onda de (360 y 800) nm, debido a que estas longitudes de onda delimitan el rango UV/Vis del EFAR.

La prueba de estabilidad fotométrica permite medir el grado de deriva en las indicaciones fotométricas del espectrofotómetro en un periodo especificado de tiempo. La estabilidad fotométrica es un problema cuando se estudian transmitancias del 100 % (absorbancia de 0) que derivan a lo largo de mediciones repetidas. La figura 14 indica que la máxima deriva del equipo correspondiente a 0,026 03 A/h se dio a un ABE = 0,1 nm y en la longitud de onda de 800 nm. A nivel comparativo, según la figura B.17, la deriva del EFAR debe ser menor o igual a 0,0002 A/h para un ABE = 2 nm y una longitud de onda de prueba de 500 nm. Considerando la figura 14, se puede observar que la deriva del EFAR a un ABE = 2 nm, es de 0,000 48 A/h y de 0,001 04 A/h para las longitudes de onda de 360 nm y 800 nm respectivamente. Lo que concuerda relativamente bien con la especificación del fabricante.

6.1.3. Línea Base Plana

La prueba de línea base plana fue ejecutada para cuatro ABE = (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0) nm, tres rapidezces de barrido espectral (14,91; 29,63 y 72,73) nm/min y para el rango espectral de longitudes de onda de (200 a 800) nm, debido a que este rango es el rango UV/Vis del EFAR.

Cuando un espectro es medido sobre todo un rango de longitudes de onda de una muestra o de una referencia, se puede definir la estabilidad de línea base plana. Esta línea siempre presenta un poco de ruido de los componentes ópticos y electrónicos del espectrofotómetro, especialmente en los extremos del rango UV/Vis. La figura 15, indica que la mayor desviación estándar en los intervalos de variación de la absorbancia fue de 0,006 34 A. De manera comparativa, la figura B.18 referente a la línea base plana especificada por el fabricante indica que debe rondar los $\pm 0,0008$ A (de desviación estándar) a un ABE = 2 nm. Los resultados a ese ABE de la caracterización indican una desviación estándar de 0,000 41 A, esto indica una concordancia respecto a los valores presentados por el fabricante.

Con respecto a las rapidezces de barrido, en la figura 15 se observa que a menor rapidez, mayor desviación en la línea base plana. Esto tiene su origen en el tiempo que toma el equipo para muestrear más detenidamente las mediciones fotométricas.

6.1.4. Luz parásita

La prueba de luz parásita fue ejecutada para cuatro ABE = (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0) nm, y usando tres filtros de corte: KCl ($\lambda_{corte} = 200$ nm), NaI ($\lambda_{corte} = 259$ nm) y NaNO₂ ($\lambda_{corte} = 385$ nm).

Al usar el filtro de KCl se registraron las mediciones de absorbancia del filtro para cada ABE en un rango espectral cercado a la longitud de onda de corte. Según las especificaciones de la figura B.19, el valor de la absorbancia debe ser mayor a 2 A. Lo resultados de la figura 16 indican que el valor de absorbancia para cada ABE registrado supera los 2 A.

Con el filtro de NaI, los valores de luz parásita (ver figura 17) para el ABE = 0,10 nm, superaron el 0,22 % T, mientras que, para los demás ABE, los niveles de luz parásita cayeron cerca del 0,009 %. Por otro lado, al usar

el filtro de NaNO_2 a la $\lambda_{prueba} = 340$ nm, surgieron resultados similares a los obtenidos con el filtro de NaI . El $\text{ABE} = 0,10$ nm fue el que presentó una mayor indicación de luz parásita alcanzado los 0,23 %. Mientras que para los demás ABE la luz parásita no superó los 0,009 %. Caso contrario fue lo ocurrido al usar el filtro de NaNO_2 a la $\lambda_{prueba} = 370$ nm. Puesto que todos los ABE presentaron valores de luz parásita menores al 0,013 %.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de luz parásita son alentadores debido a que la recomendación es que el valor de luz parásita sea menor a 0,01 %. Sin embargo, los resultados están muy lejos de los valores de luz parásita que garantizó el fabricante a la hora de adquisición del equipo.

6.1.5. Verificación del ABE

Se calculó el ABE efectivo mediante el uso del software *NanoUVVis* en las longitudes de onda de emisión de una lámpara de mercurio tipo lápiz (ver figura B.14). Se ejecutó cada prueba de verificación diez veces cada una a lo largo de tres días experimentales, y se obtuvo el promedio de los errores del ABE cuantificados para cada longitud de onda de prueba.

En la figura 18, se observa que los errores para el $\text{ABE} = 0,10$ nm son pequeños y negativos (valor experimental menor al teórico). Para el $\text{ABE} = 0,50$ nm presenta errores significativamente mayores en algunas longitudes de onda específicas. La razón de ello se debe a la no resolución de dobletes o tripletes. El EFAR al perder resolución debido al aumento en los ABE , combina algunos picos que antes eran líneas de emisión bien definidas, generando así que la cuantificación del ABE efectivo realizado por el software se desvíe en gran manera. Las figuras 19 y 20, evidencian que el comportamiento anterior fue constante a lo largo de varios días.

Las figuras 28, 29 y 30, presentan la variación de la resolución del EFAR en función del ABE utilizado. Como se puede observar, para las longitudes de onda de líneas de emisión del mercurio correspondientes a (312,57; 313,17) nm y (365,02; 365,48; 366,33) nm, se forman dobletes y tripletes respectivamente. El EFAR al configurar un ABE mayor, pierde su capacidad resolutoria como ya se comentó. Esto provocó lo que se presenta en la figura 31, una mala cuantificación del ABE efectivo por parte del NanoUVVIS.

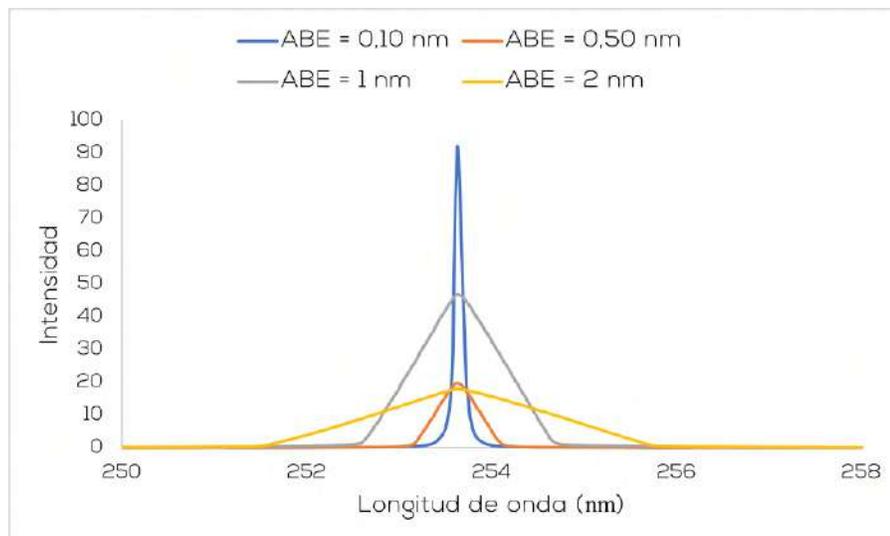


Figura 28: Efecto del ABE en las líneas espectrales medidas a la longitud de onda de 253,65 nm.

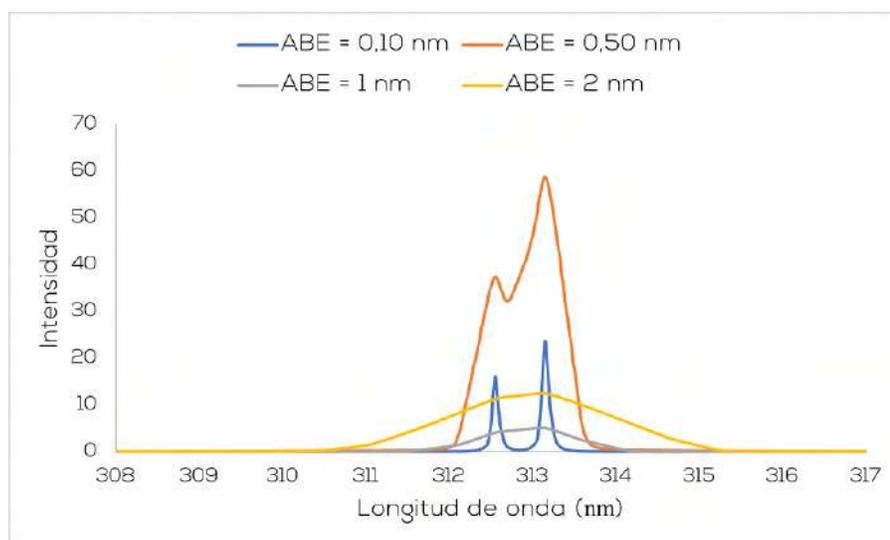


Figura 29: Efecto del ABE en las líneas espectrales medidas a las longitudes de onda de 312,57 nm y 313,17 nm.

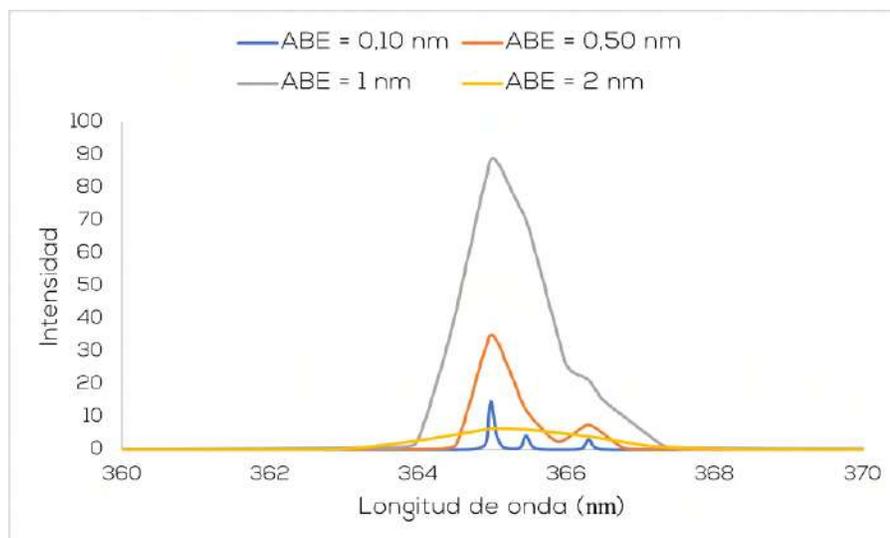


Figura 30: Efecto del ABE en las líneas espectrales medidas a las longitudes de onda de 365,02 nm; 365,48 nm y 366,33 nm.

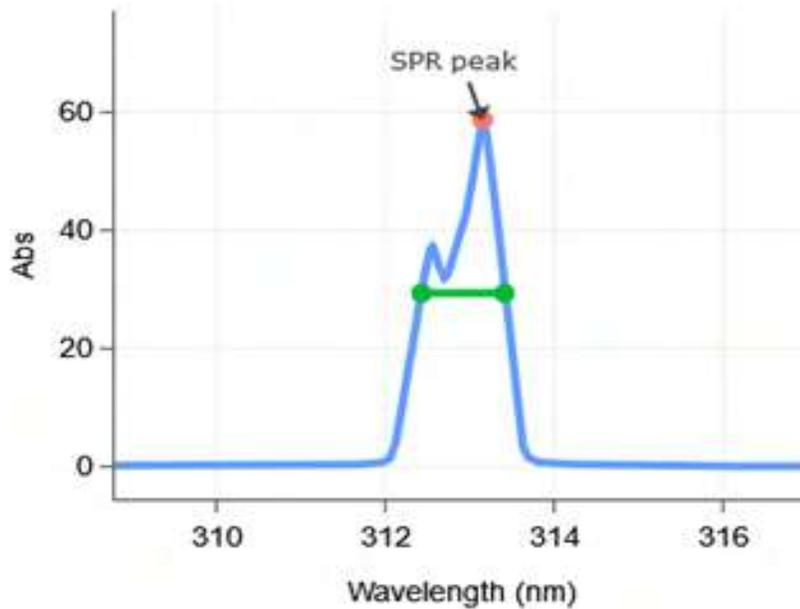


Figura 31: Error de ABE = 0,50 nm mal cuantificado en el Software NanoUVVIS debido a la pérdida de capacidad resolutive del EFAR en las longitudes de onda de 312,57 nm y 313,17 nm.

Omitiendo estos errores en la cuantificación debido al factor resolutive del software, se puede observar que los errores en el ABE disminuyen conforme disminuye el ABE y la tendencia se mantuvo para los demás dos días experimentales (ver figuras 19 y 20).

6.2. Calibración primaria del EFAR

6.2.1. Origen de los enfoques 1 y 2

Hasta el momento, no se ha justificado la razón de la definición de dos enfoques a la hora de analizar los errores de medida del EFAR. Los enfoques surgen, por la aplicabilidad del método por parte del LCM. Esto quiere decir, que dependiendo de cómo realice el LCM las mediciones en un futuro, así se escogerá el enfoque a utilizar. Por ejemplo, si se realiza un servicio de calibración en un solo día, solo sería necesario introducir el aporte de la repetibilidad de medida del EFAR (enfoque 1) en los presupuestos de incertidumbre. Por el contrario, si algún servicio se realiza a lo largo de varios días, entonces será necesario introducir el aporte de la reproducibilidad de medida del EFAR (enfoque 2) en los presupuestos de incertidumbre. En términos comparativos y como se evidencia en las curvas de calibración de las figuras de la 21a a la 24b, el enfoque 2 presenta las mayores incertidumbres expandidas asociadas a cada error de medida del EFAR. Por lo que, la mejor capacidad de medición del LCM recae en el enfoque 1, es decir, su menor incertidumbre de medida.

6.2.2. Tendencias trapezoidales y normales de los errores de medida del EFAR en función del enfoque

La calibración primaria del EFAR permitió el estudio de dos enfoques. El enfoque 1, toma en cuenta un incertidumbre por repetibilidad de medida. El peso que tiene esta fuente de incertidumbre respecto a las incertidumbres por resolución y por ABE es muy bajo (ver ultima columna de la tabla A.6).

Esto ocasionó que la convolución de las distribuciones de probabilidad resultara en una distribución trapezoidal para cada error de medida del EFAR en función de cada ABE. La evidencia de dicha tendencia se presenta en las figuras 32a y 33a. La primera fue simulada por el autor a partir del código de la validación del formulario (ver Apéndice A.6.9), la segunda por otro lado, fue simulada con la herramienta **NIST Uncertainty Machine**. El alejamiento de los errores de medida del EFAR a partir del enfoque 1 de una tendencia normal se evidencia con la línea punteada roja de la figura 33a. Debido a esto, toda la calibración del EFAR tomando el enfoque 1, requirió la cuantificación de los factores de cobertura vía simulación de Monte Carlo.

Todo lo contrario, sucedió al utilizar el enfoque 2. Puesto que como se observa de la ultima columna de la tabla A.7, la distribución de probabilidad $t - Student$ es la que tiene mayor peso en la incertidumbre estándar combinada. Así lo evidencian los comportamientos normales de las figuras 32b y 33b.

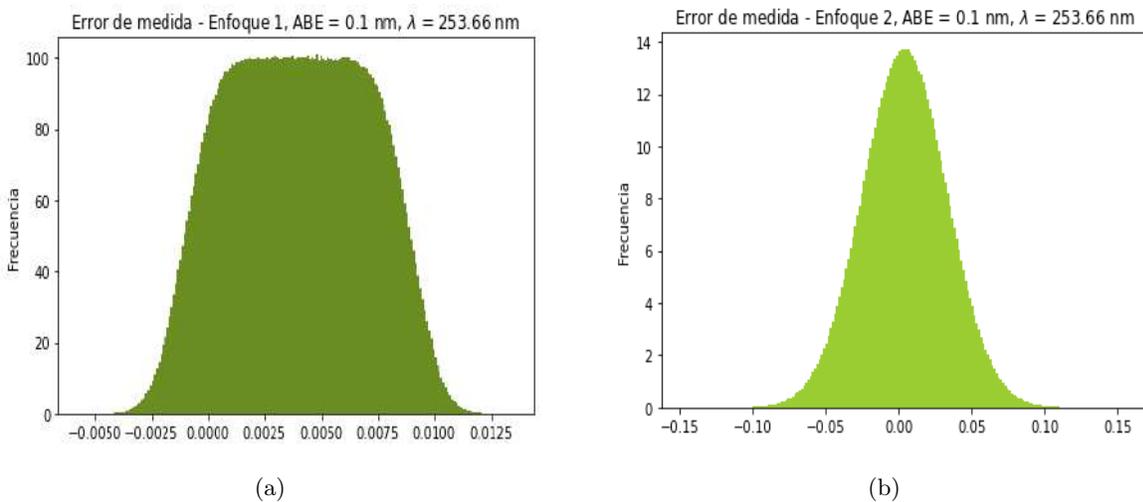


Figura 32: Simulación vía Monte Carlo (código programado en Python) de la distribución de probabilidad del error de medida asociado a la longitud de onda de 253,66 nm y un ABE = 0,1 nm.

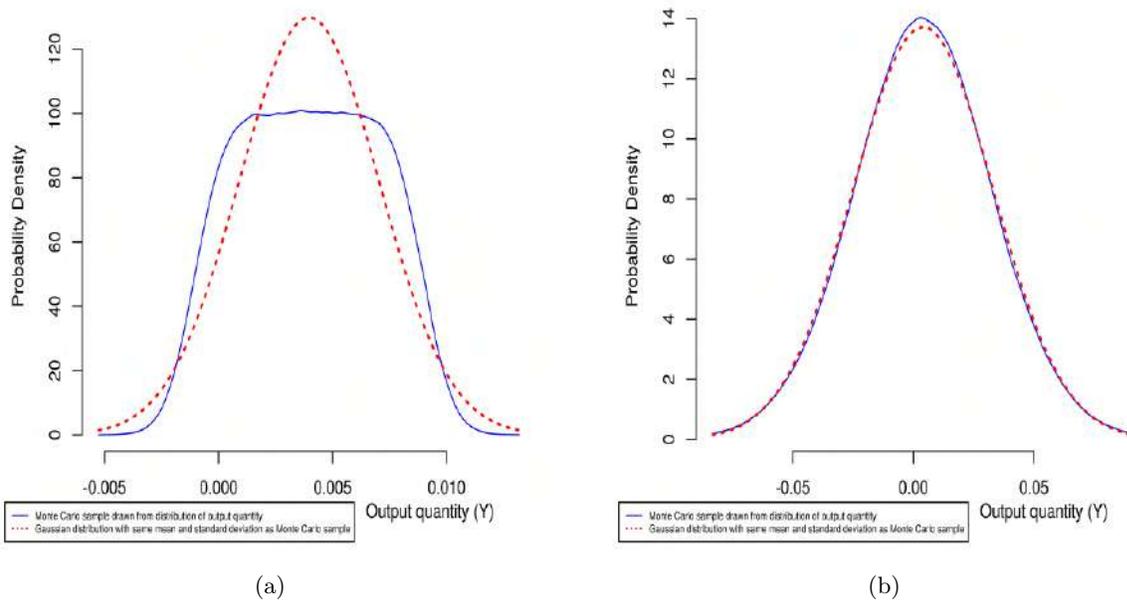


Figura 33: Simulación vía Monte Carlo (NIST Uncertainty Machine) de la distribución de probabilidad del error de medida asociado a la longitud de onda de 253,66 nm y un ABE = 0,1 nm.

6.2.3. Análisis de resultados de la primera etapa de la validación

En esta sección, se evalúan los resultados de la validación de la implementación de la calibración primaria del EFAR. Simplemente, se comparan los resultados experimentales de s_r , s_I , sesgos e incertidumbres expandidas contra los requisitos analíticos (parámetros de mérito) definidos en el plan de la validación.

Resultados de s_r y s_I

Como se evidencia de las columnas 3 y 4 de las tablas desde la 18 a la 21, los valores de la repetibilidad de medida s_r fueron estrictamente menores a los valores de la precisión intermedia de medida s_I . Por lo que se cumple con el requisito analítico de la ecuación 3.1.

Resultados de los sesgos originados de la calibración primaria

Como se evidencia en la columna 6 de las tablas desde la 18 a la 21, los valores absolutos de los sesgos en cada punto de calibración fueron menores a los valores indicados en la tabla 12. Por lo que se cumple con el requisito analítico.

Resultados de las incertidumbres expandidas originadas de la calibración primaria

Como se evidencia en las dos últimas columnas de las tablas desde la 18 a la 21, los valores de las incertidumbres expandidas asociadas a cada enfoque fueron menores a los valores indicados en la tabla 13. Por lo que se cumple con el requisito analítico.

6.3. Medición de las longitud de transmitancia mínima del SRM 2034

6.3.1. Origen de los sub-enfoques 1.1 y 1.2

Para entender el origen de los sub-enfoques 1.1 y 1.2, es necesario repasar nuevamente la esencia del enfoque 1. Dicho enfoque, es la mejor capacidad de medición del LCM (la que aporta menor incertidumbre). Se consigue cuando se toma a la repetibilidad de medida como la fuente de incertidumbre debida a la precisión del EFAR en un solo día de medición. Por consiguiente, al intentar transferir la información de la calibración primaria fundamentada en el enfoque 1 a las mediciones del SRM 2034, se pueden tomar dos caminos distintos: los sub-enfoques 1.1 y 1.2.

Estos sub-enfoques surgen intuitivamente al estudiar el comportamiento de los errores de medida del EFAR en las figuras 21a, 22a, 23a y 24a. Si se recurre a las definiciones de la sección 2.6.2, ambos sub-enfoques implican distintas correcciones e incertidumbres debidas a dicha corrección. Las dos metodologías fueron aplicadas y su comparación se presenta en el siguiente apartado.

6.3.2. Diferencias entre los enfoques 1.1 y 1.2

Cada longitud de onda de transmitancia mínima del SRM 2034 fue medida por el EFAR. Para ello, se consideraron los cuatro ABE y las tres RB. Aunado a esto, cada longitud de onda medida fue cuantificada siguiendo los dos sub-enfoques, y algunos ejemplos⁷ de los resultados obtenidos se presentaron en las figuras 25, 26 y 27.

Las figuras muestran el comportamiento de los errores normalizados del EFAR en función de la longitud de onda de transmitancia mínima medida y del sub-enfoque utilizado. Las diferencias entre ambos sub-enfoques son muy sutiles, sin embargo, el sub-enfoque 1.2 implica errores normalizados más bajos (los puntos color naranja tienden a acercarse más al eje del cero) en comparación con el sub-enfoque 1.1. Esto hace que el sub-enfoque 1.2 sea más el idóneo en búsqueda de la mejor capacidad de medición y por lo tanto es el que se toma para evaluar los datos de la validación.

6.3.3. Análisis de resultados de la segunda etapa de la validación

En esta sección, se evalúan los resultados de la validación de las mediciones del SRM 2034 con el EFAR calibrado. Simplemente, se comparan los resultados experimentales de las desviaciones estándar experimentales, los sesgos y errores normalizados del EFAR contra los requisitos analíticos (parámetros de mérito) definidos en el plan de la validación.

Resultados de las desviaciones estándar experimentales del EFAR al medir el SRM 2034

Como se evidencia en la tabla 22, los valores de la desviación estándar experimental del EFAR al medir el SRM 2034 fueron estrictamente menores a los valores indicados en la tabla 14. Por lo que se cumple con el requisito analítica para cada ABE y para cada RB.

Resultados de los sesgos del EFAR al medir el SRM 2034

Como se evidencia en las tablas 23, 24 y 25, los valores absolutos de los sesgos del EFAR en cada longitud de

⁷Solo se presentaron los resultados asociados al ABE = 0,5 nm y las tres RB, debido a que el comportamiento fue el mismo para los demás ABE.

onda de transmitancia mínima del SRM 2034, para cada ABE y RB fueron estrictamente menores a los valores indicados en la tabla 15. Por lo que se cumple con el requisito analítico.

Resultados de los errores normalizados del EFAR al medir el SRM 2034

En este caso, el análisis se hace por aparte debido a que hubo casos en los cuales el requisito analítico no se cumplió.

La tabla 25, presenta los errores normalizados del EFAR para una RB = 14,91 nm/min. Analizando los resultados del enfoque 1.2, solo para el ABE = 0,1 nm, se cumple con el requisito analítico. Para los ABE = (0,5; 1 y 2) nm, uno o más puntos no cumplen con el requisito analítico. Sin embargo, al tomar el enfoque 2, todos los puntos cumplen con el requisito analítico.

La tabla 26, presenta los errores normalizados del EFAR para una RB = 29,63 nm/min. Analizando los resultados del enfoque 1.2, para ningún ABE se cumple con el requisito analítico, pues uno o más puntos no cumplen. Sin embargo, al tomar el enfoque 2, todos los puntos cumplen con el requisito analítico.

La tabla 27, presenta los errores normalizados del EFAR para una RB = 72,73 nm/min. Analizando los resultados del enfoque 1.2, para ningún ABE se cumple con el requisito analítico, pues uno o más puntos no cumplen. Sin embargo, al tomar el enfoque 2, todos los puntos cumplen con el requisito analítico.

En resumen, el método se considera apto para su uso en las siguientes condiciones:

- al usar la rapidez de barrido más baja (RB = 14,91 nm/min), se valida el enfoque 1.2 a un ABE = 0.1 nm. Esta representa la mejor capacidad de medición del LCM. Además, para esta RB se valida el enfoque 2 con los cuatro ABE,
- al usar las rapidezces de barrido RB = (29,63 y 72,73) nm/min, se valida por completo el uso del enfoque 2 con los cuatro ABE.

7. Conclusiones

La caracterización del ruido fotométrico, estabilidad fotométrica, línea base plana, luz parásita y verificación del ABE aporta la evidencia necesaria para determinar que el EFAR cumple con la mayoría de las características de desempeño necesarias para la medición metrológica de la escala de longitud de onda y escala fotométrica. Dichas evidencias fueron documentadas y discutidas en un informe técnico detallado, que permitirá al LCM tener los resultados experimentales necesarios para una futura calibración primaria de la escala fotométrica. Lo anterior, a mediano plazo abriría la posibilidad de fortalecer la infraestructura metrológica en la caracterización completa de filtros de densidad neutra y filtros de opacidad; los cuales, son sumamente utilizados en diversos sectores industriales del país.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de graduación, dejan patente la implementación de un método primario de medida para la calibración de la escala de longitud de onda del EFAR, que permitirá al LCM contar con una infraestructura metrológica robusta para poder satisfacer las necesidades de trazabilidad en la escala de longitud de onda, la cual es muy importante para los campos de la Química, Farmacia, Biotecnología y Microbiología relacionados con sectores del desarrollo industrial, científico y tecnológico del país.

Diversos documentos tales como el informe técnico, el informe de validación del método, el procedimiento de implementación del método primario, la hoja de cálculo y el certificado de calibración del EFAR dotarán al LCM de un avance significativo en la documentación de calidad necesaria para que el servicio y alcance del método primario pueda ser desarrollado dentro del Sistema de Gestión de Calidad del LCM cumpliendo adecuadamente con los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017.

A. Apéndices

A.1. Terminología metrológica

Calibración

Operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación. Dicha calibración puede expresarse mediante una declaración, una función de calibración, un diagrama de calibración, una curva de calibración o una tabla de calibración. En algunos casos, puede consistir en una corrección aditiva o multiplicativa de la indicación con su incertidumbre correspondiente.

Condición de repetibilidad de medida de una medición

Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

Condición de precisión intermedia de una medición

Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones.

Cadena de trazabilidad metrológica

Sucesión de patrones y calibraciones que relacionan un resultado de medida con una referencia.

Corrección

Compensación de un efecto sistemático estimado, o sea del sesgo.

Curva de calibración

Expresión de la relación entre una indicación y el valor medido correspondiente.

Dispositivo de transferencia

Dispositivo utilizado como intermediario para comparar patrones de medida.

Error de medida

Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.

Exactitud

Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando. La exactitud no puede expresarse cuantitativamente, se dice que el grado de exactitud aumenta conforme disminuye el error de medida. Además, la exactitud incluye a los conceptos de veracidad y precisión.

Factor de cobertura

Número mayor que uno por el que se multiplica una incertidumbre típica combinada para obtener una incertidumbre expandida.

Incertidumbre de medida

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza. La incertidumbre de medida incluye componentes procedentes de efectos sistemáticos, tales como componentes asociadas a correcciones y a valores asignados a patrones, así como la incertidumbre debida a la definición. Algunas veces no se corrigen los efectos sistemáticos estimados y en su lugar se tratan como componentes de incertidumbre. El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación típica, en cuyo caso se denomina incertidumbre típica de medida (o un múltiplo de ella), o una semiamplitud con una probabilidad de cobertura determinada.

Intervalo de cobertura

Intervalo que contiene el conjunto de valores verdaderos de un mensurando con una probabilidad determinada, basada en la información disponible.

Jerarquía de calibración

Secuencia de calibraciones desde una referencia hasta el sistema de medida final, en la cual el resultado de cada calibración depende del resultado de calibración precedente.

Magnitud

Propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia.

Medición

Proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud.

Método de medida

Descripción genérica de la secuencia lógica de operaciones utilizadas en una medición.

Material de referencia

Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas.

Material de referencia certificado (MRC)

Material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos.

Precisión de medida

Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. La precisión se utiliza para definir la repetibilidad de medida, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

Precisión intermedia de medida

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia.

Probabilidad de cobertura

Probabilidad de que el conjunto de valores verdaderos de un mensurando esté contenido en un intervalo de cobertura especificado.

Patrón de medida (PM)

Realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada, tomada como referencia.

Procedimiento de medida primario

Procedimiento de medida de referencia utilizado para obtener un resultado de medida, independientemente de cualquier patrón de medida de una magnitud de la misma naturaleza.

Patrón nacional de medida

Patrón reconocido por una autoridad nacional para servir, en un estado o economía, como base para la asignación de valores a otros patrones de magnitudes de la misma naturaleza.

Patrón primario de medida

Patrón establecido mediante un procedimiento de medida primario o creado como un objeto, elegido por convenio.

Patrón secundario de medida

Patrón establecido por medio de una calibración respecto a un patrón primario de una magnitud de la misma naturaleza.

Patrón intrínseco de medida

Patrón basado en una propiedad intrínseca y reproducible de un fenómeno o sustancia.

Repetibilidad de medida

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Resolución

Mínima variación de la magnitud medida que da lugar a una variación perceptible de la indicación correspondiente.

Trazabilidad metrológica

Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida.

Veracidad de medida

Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia, esta no puede expresarse cuantitativamente.

Verificación

Aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados.

Validación

Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para su uso previsto.

A.2. Espectrofotometría y sus aplicaciones

El término *espectroscopía* etimológicamente está compuesto del sustantivo *espectro* y del sufijo *scopia* indicando así la acción de ver o examinar espectros. Más específicamente, la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, por sus siglas en inglés) [14] define a la espectroscopía como la rama de la ciencia de la Química Analítica que se ocupa del estudio de sistemas físicos mediante el análisis de la radiación electromagnética con la que interactúan o emiten. La espectrometría por otro lado, es la medición de dicha radiación como un medio para obtener información sobre los sistemas y sus componentes. A nivel experimental, los métodos espectroscópicos están considerados dentro de las herramientas fundamentales para el estudio de algunas propiedades estructurales,

ópticas y de composición de la materia. En ellas, el analista realiza mediciones de la luz (o haces de partículas) que absorbe, emite, refleja o transmite el analito bajo estudio [15].

Existe una amplia clasificación de las diversas técnicas espectroscópicas que van desde la espectroscopía atómica, hasta la espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Todas ellas clasificadas en función del tipo de radiación que emplean y de cómo esta, interactúa con la materia. La técnica de interés para este proyecto de graduación es la **espectroscopía de absorción/emisión/fluorescencia ultravioleta-visible (UV/Vis)**, que como su nombre indica, utiliza luz en el rango ultravioleta (180 a 400) nm y el visible (400 a 780) nm del espectro electromagnético.

Con respecto a la instrumentación, un *espectrómetro* es un instrumento de medida que provee información acerca de la intensidad de la radiación como una función de la longitud de onda [7], mientras que un *espectrofotómetro*, es un espectrómetro equipado con una o más rendijas de salida y transductores fotoeléctricos que permiten la determinación de la razón entre la potencia radiante de dos haces como una función de la longitud de onda [7]. Los espectrofotómetros presentan dos escalas: la escala fotométrica (transmitancia y absorbancia) y la escala de longitud de onda.

Dentro de este marco, la historia ha evidenciado el papel protagónico de la espectroscopía en el desarrollo tanto de la teoría atómica moderna, como en su utilización como método espectrométrico de análisis para los estudios cualitativos y cuantitativos de compuestos orgánicos e inorgánicos, en una amplia gama de laboratorios de investigación privada, académica e industria de aseguramiento de la calidad [33].

Por consiguiente, como describe [22], para cualquier determinación crítica, ya sea en ámbitos clínicos, farmacéuticos, biotecnológicos, microbiológicos, alimenticios, control de calidad industrial, análisis ambiental o investigación, es esencial que el espectrofotómetro funcione de acuerdo con las especificaciones del fabricante, lo que implica un control metrológico para asegurar la trazabilidad y confiabilidad de las mediciones.

A.3. Fundamentos físicos de la espectrofotometría de absorción molecular UV/Vis

A.3.1. Interacción de la luz con la materia

Espectro electromagnético: desde el plano de la física moderna, la radiación electromagnética está compuesta por un conjunto de partículas sin masa (llamadas fotones), donde cada una viaja en un patrón similar a una onda a la velocidad de la luz. Según la mecánica clásica, la radiación electromagnética se compone de campos magnéticos y eléctricos oscilantes viajando a la rapidez de la luz en la dirección de propagación. Ambos enfoques confluyen y son considerados actualmente válidos paralelamente, en lo que se denomina dualidad onda-partícula de la radiación electromagnética (luz). Cada fotón perteneciente a la radiación electromagnética posee una cierta cantidad de energía y es dicha energía la que clasifica los distintos rangos del espectro electromagnético [6]. La figura A.1 muestra un espectro electromagnético y sus rangos correspondientes. En este proyecto de graduación se emitirá y detectará radiación perteneciente al rango ultravioleta-visible (UV/Vis)

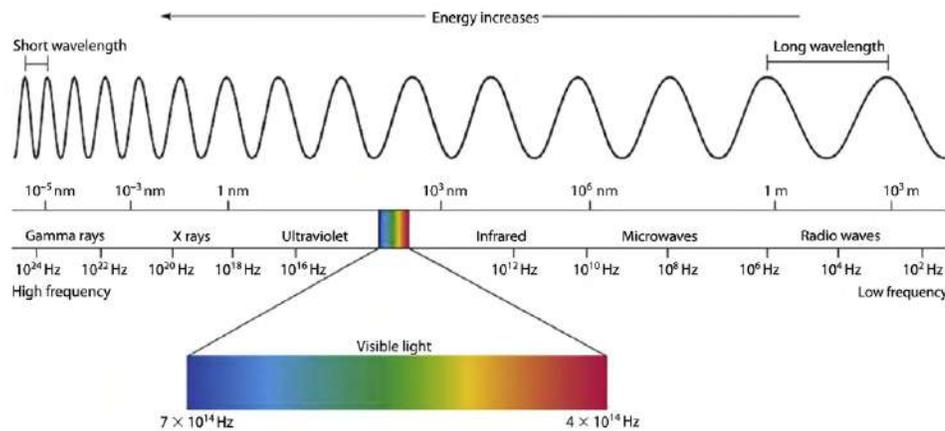


Figura A.1: Espectro de radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda. Tomado de [6].

Absorción de la luz: es el proceso en el que interactúan los fotones de la radiación electromagnética con los átomos o moléculas que componen la materia. A grandes rasgos, la radiación electromagnética incidente interactúa con los electrones presentes en la materia haciéndolos cambiar sus estados energéticos. Se puede entender la absorción de la luz imaginando que los electrones están enlazados a los átomos a partir de resortes que presentan diferentes frecuencias vibracionales. Cuando la frecuencia de la radiación incidente coincide con la vibración natural del sistema átomo-electrón se producen intercambios de energía llevando al electrón a estados excitados. Dicho electrón, posteriormente interactúa con los átomos adyacentes y la energía ganada se disipa en forma de energía térmica. Posteriormente, la onda de luz con esa frecuencia dada es absorbida por el objeto, para nunca más ser liberada en forma de luz. La absorción selectiva de la radiación depende de las características de composición y estructurales del sistema con el que está interactuando la radiación, permitiendo la absorción solo a ciertas frecuencias (o longitudes de onda específicas).

Transmisión de la luz: la transmisión de la luz se puede entender si se recurre nuevamente al concepto de frecuencia natural de vibración electrónica. La transmisión específicamente se produce cuando la frecuencia de la onda electromagnética no coincide con la frecuencia natural de los sistemas átomo-electrón. Dichas frecuencias al no coincidir, implican que el electrón vibre, pero no a grandes magnitudes, por lo que la radiación es emitida debido a la relajación del estado energético del electrón; así, hasta llegar al otro extremo del sistema físico transparente a la radiación.

Transmitancia y absorbancia como ya se comentó, cuando la luz interacciona con la materia, se pueden dar una serie de fenómenos físicos tales como la absorción, transmisión, reflexión, refracción y dispersión de la luz. El método de la espectrofotometría UV-Vis se fundamenta en la medición de la transmitancia T (o en su defecto de la absorbancia A) de soluciones que están en cubetas (también conocidas como celdas) transparentes con longitud de trayectoria b [7]. La radiación electromagnética que proporciona el espectrofotómetro es absorbida por el analito y se cuantifica precisamente esto, la cantidad de absorción (o transmisión) de la luz [15]. A nivel óptico, la potencia de radiación incidente en un área (definida como *irradiancia* en [34], energía transferida por unidad de área por unidad de tiempo) de la muestra disminuye a medida que la atraviesa (ver figura A.2).

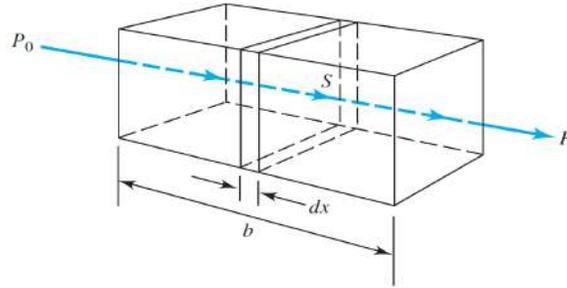


Figura A.2: Fenómeno físico de la transmisión de la luz, relacionado con los conceptos de transmitancia y absorbancia en función de las potencias ópticas de los haces incidentes y salientes. Tomado de [7].

Dicha disminución en la potencia de radiación se puede cuantificar para aplicaciones de análisis tanto cuantitativo como cualitativo. En ambos casos, los términos de *transmitancia* y la *absorbancia* juegan un papel protagónico en los procesos de caracterización y calibración de espectrofotómetros (pues es lo que se mide, como se verá más adelante). A continuación se discute cada uno de ellos, al igual que en [15]:

- **Transmitancia:** la transmitancia T , es la fracción de la radiación electromagnética incidente a una longitud de onda específica que pasa a través de una muestra, su definición matemática se presenta en la ecuación (A.1),

$$T = \frac{P}{P_0} \rightarrow T(\%) = \frac{P}{P_0} \times 100 \quad (\text{A.1})$$

donde, P_0 es la potencia de la radiación incidente y P es la potencia de la radiación que sale de la muestra.

- **Absorbancia:** la absorbancia A , es la fracción de la radiación electromagnética absorbida por la muestra en una longitud de onda especificada. Para líquidos la absorbancia está relacionada con la transmitancia según la ecuación (A.2).

$$A = -\log_{10}(T) \quad (\text{A.2})$$

Dados los fenómenos físicos presentados en la sección anterior, a continuación se inicia con la discusión de los componentes de un espectrofotómetro UV-Vis.

A.4. Componentes básicos de un espectrofotómetro UV/Vis

Como bien se indica en [7], y como se reiteró en las aplicaciones mencionadas de la espectroscopía de absorción molecular, muchos sectores de la industria requieren espectrofotómetros para medir los espectros resultantes de la interacción de la radiación electromagnética en los rangos UV/Vis con la materia. En términos básicos un espectrofotómetro se compone por: 1) fuentes de radiación, 2) selectores de longitud de onda, 3) compartimentos de muestra y de referencia y finalmente 4) el detector [7]. A continuación se describe el funcionamiento general de los componentes específicos de un espectrofotómetro UV/Vis. En el Anexo A.4.5 se describe la instrumentación específica del EFAR.

A.4.1. Fuentes estables de radiación

Como se especifica en [15], una fuente de radiación electromagnética debe ser la adecuada para utilizarse en este tipo de instrumentaciones, cumpliendo especificaciones de alta potencia y estabilidad para su fácil detección en periodos de tiempo razonables. Las hay de dos tipos: lineal y continua, las fuentes lineales de radiación son aquellas que emiten la radiación en líneas o bandas continuas definidas, mientras que las fuentes continuas proporcionan radiación electromagnética en regiones extendidas del espectro. La tabla A.1 muestra las fuentes más comunes de radiación utilizadas en espectrofotómetros; en [7] y [15] se profundiza más su funcionamiento y aplicabilidad.

Tabla A.1: Fuentes comunes de radiación electromagnética para espectroscopía.

Fuente	Región del espectro	Usos
Lámparas de H ₂ y D ₂	Fuente continua de (160 a 380) nm	Absorción molecular UV
Lámpara de Tungsteno/halógeno	Fuente continua de (320 a 2400) nm	Absorción molecular Vis
Lámpara de arco de Xe	Fuente continua de (200 a 1000) nm	Fluorescencia molecular
Lámpara de vapor de Hg	Fuente lineal en UV/Vis	Fluorescencia molecular

A.4.2. Selectores de longitud de onda

En espectrofotometría, el espectrofotómetro selecciona cual longitud de onda se utilizará para los análisis. Esto se logra separando los espectros continuos de radiación provenientes de las fuentes, en delgadas líneas o bandas espectrales angostas [7]. Lo más común en espectrofotómetros UV/Vis de alta resolución es el uso de rejillas de difracción en combinación con dos rendijas: una de entrada y otra de salida [15], lo que generalmente se denomina **sistema monocromador**. El principio físico de las rejillas de difracción y de los monocromadores se presenta muy detalladamente en [7] y [34]. Sin embargo, en términos generales el sistema rendija - rejilla de difracción - rendija, tiene una función análoga a la de un prisma que divide un haz de luz blanca en sus diferentes colores componentes, con la diferencia de que la rejilla de difracción lo hace de una manera más eficiente. La rejilla de difracción junto con las rendijas, permiten que solo un rango (delgadas líneas o bandas) muy estrecho de longitudes de onda lleguen al compartimiento de muestras y así pasen finalmente al detector [15]; esto se presenta esquemáticamente en la figura A.3.

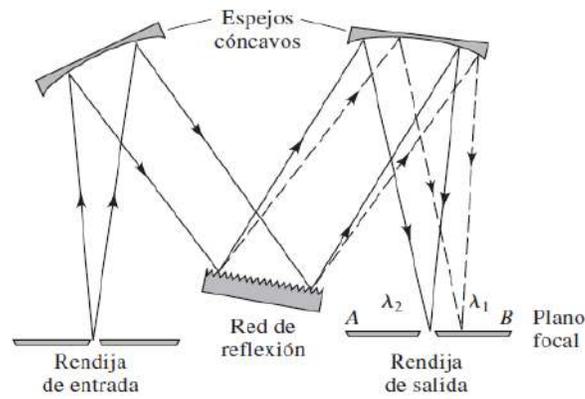


Figura A.3: Esquema de un sistema monocromador, con su rejilla de difracción y sus rendijas de entrada y salida. Tomado de [7].

El ancho de la rendija de salida es un concepto fundamental en la caracterización de espectrofotómetros, y por ende, en su posterior calibración. Por lo tanto, ahora se discutirá brevemente sobre su papel en las mediciones.

El ancho de rendija de salida también denominado **Ancho de Banda Espectral** o ABE (por sus siglas en español), se define como el espaciado de salida de las longitudes de onda seleccionadas previamente por la rejilla de difracción. Cuando dicho ABE es muy angosto, se intensifican las señales, o en otras palabras, se tiene mayor resolución en el instrumento debido a su mejor capacidad de seleccionar cada vez menos longitudes de onda. La salida del sistema monocromador idealmente debería ser una sola longitud de onda, sin embargo, como bien menciona [7], ningún monocromador real se aproxima a esa clase de resolución ideal; más bien, lo que se obtiene es una banda como la que se presenta en la figura A.4.

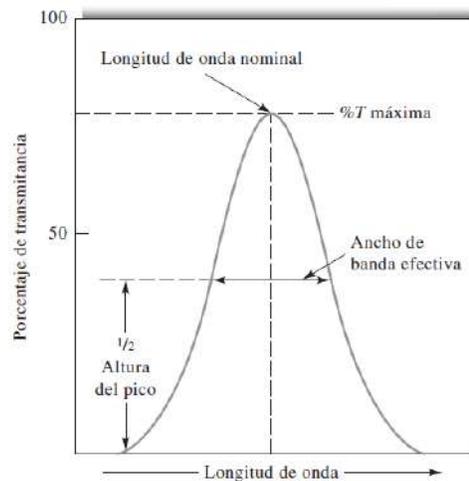


Figura A.4: Salida real de un sistema monocromador compuesto por una rejilla de difracción. Tomado de [7].

En dicha figura, se grafica la salida de transmitancia en función de la longitud de onda. El ancho de banda efectivo (ancho de banda espectral efectivo) se define como la diferencia de longitudes de onda del punto medio

de la banda [16]. En espectrofotómetros donde el ABE se puede modificar, existirán variaciones mecánicas con el tiempo de uso del instrumento, y es por esto que una de las primeras pruebas de caracterización que se realiza, es la verificación del ABE.

A.4.3. Compartimentos de muestra y de referencia

Luego de salir del sistema monocromador el haz de luz se divide en dos haces independientes que permiten la medición de la potencia de radiación incidente P_0 sobre la muestra y la potencia de radiación que sale de la muestra P . Un espectrofotómetro que realiza dicha acción se denomina espectrofotómetro de doble haz en el espacio [15]. El espectrofotómetro del LCM, está en esta clasificación, y un esquema básico del funcionamiento se presenta en la figura A.5.

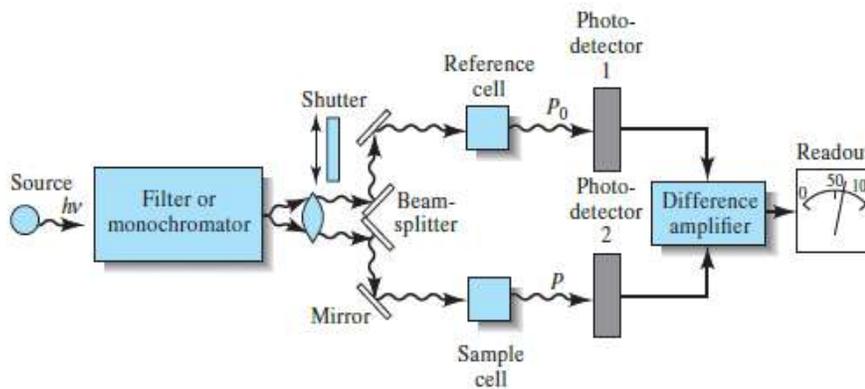


Figura A.5: Se muestra un instrumento de doble haz en el espacio. Aquí, la radiación del monocromador se divide (gracias al divisor del haz) en dos haces que pasan simultáneamente a través de los compartimentos de referencia y de la muestra antes de interactuar con el último elemento, el detector. Tomado de [7].

En la figura A.5, se puede observar que existen dos compartimentos: uno para la muestra y otro para la referencia. En dichos compartimentos se colocan cubetas (o celdas) que son pequeños recipientes rectangulares ya sea de plástico, vidrio o cuarzo [4]. Generalmente vienen diseñados con un ancho de 1 cm (este es el parámetro b , que identifica la longitud de trayectoria de la radiación a través del analito), y es en dichas cubetas, donde se colocan los analitos a estudiar. Como bien lo indica la figura A.5, la potencia de radiación incidente P_0 se extrae del haz de referencia (puesto que la radiación no se ve afectada por la muestra), mientras que la potencia de radiación saliente P se extrae del haz que sale del compartimento de la muestra. Los haces de radiación que atraviesan estos compartimentos entran finalmente al detector.

A.4.4. El detector

Es el último componente básico de los espectrofotómetros. Comúnmente, como sistemas de detección se utilizan los fotomultiplicadores y los fotodiodos de silicio para las regiones UV/Vis [4]. En términos generales, los detectores son dispositivos transductores que convierten a la energía de la radiación electromagnética (energía radiante) en energía representada por magnitudes eléctricas como voltajes o corrientes (energía eléctrica). Un explicación detallada de los sistemas más comunes de detección se presenta en [4].

A.4.5. Componentes básicos del EFAR del LCM

Dado el repaso general de los componentes principales de un espectrofotómetro, a continuación se presenta la tabla A.2 con la instrumentación general del EFAR con el que cuenta el DMQ del LCM.

Tabla A.2: Descripción técnica del espectrofotómetro PerkinElmer LAMBDA 950.

Principio fundamental	Espectrofotómetro de doble haz, doble monocromador, registro de razón de potencia óptica UV/Vis/NIR con microcomputadora electrónica, controlado por una computadora compatible.
Sistema óptico	Sistema óptico totalmente reflectante (recubierto de SiO ₂) con monocromador de rejilla holográfica con 1440 líneas/mm UV/Vis encendido a 240 nm y 360 líneas/mm NIR encendido a 1100 nm, montaje Littrow, óptica detectora compensada por espesor de muestra.
Sistema de división de haz	Chopper (46+ Hz, Ciclo: Oscuro/Muestra/Oscuro/Referencia, Corrección de Señal de Segmento de Chopper CSSC).
Sistema de detección	Fotomultiplicador R6872 para alta energía en todo el rango de longitud de onda UV/Vis. Detector de PbS enfriado por Peltier para NIR.
Fuentes de radiación	Lámparas prealineadas de tungsteno-halógeno y deuterio.
Rango de longitudes de onda	175 nm a 3300 nm.

En la figura A.6, se esquematiza cada uno de los principales componentes del espectrofotómetro de alta resolución, donde:

1. **Fuentes de tungsteno-halógeno y deuterio:** prealineadas y preenfocadas para su rápido reemplazo y máxima puesta en marcha.
2. **Doble monocromador de rejilla holográfica:** para un rendimiento de luz parásita ultra baja.
3. **Máscara de rayo común:** permite un ajuste preciso de la altura del haz para que coincida con muestras de diferentes dimensiones.
4. **Depolarizador de rayo común:** corrige la polarización inherente del instrumento para permitir mediciones precisas de muestras birrefringentes (opcional).
5. **Chopper:** cambia entre muestra y haz de referencia. El diseño de cuatro segmentos proporciona lecturas en blanco individuales para muestra y referencia, lo que aumenta la precisión de la medición.
6. **Atenuadores del haz de muestra y de referencia:** para mediciones extremadamente sensibles y precisas en muestras altamente absorbentes.
7. **Compartimento de muestras:** permite un fácil acceso a una amplia variedad de accesorios de muestreo y tipos de muestras.
8. **Detectores de PbS controlados por peltier y fotomultiplicadores de alta sensibilidad:** proporciona cobertura UV/Vis/NIR de rango completo de 175 a 3300 nm.

9. **Segunda zona de muestreo:** aloja una variedad de módulos de muestreo a presión que incluyen óptica de transmisión (en la imagen), esferas integradoras de 60 mm y 150 mm y el accesorio de reflectancia universal (URA) para mediciones de reflectancia absoluta de alta precisión.

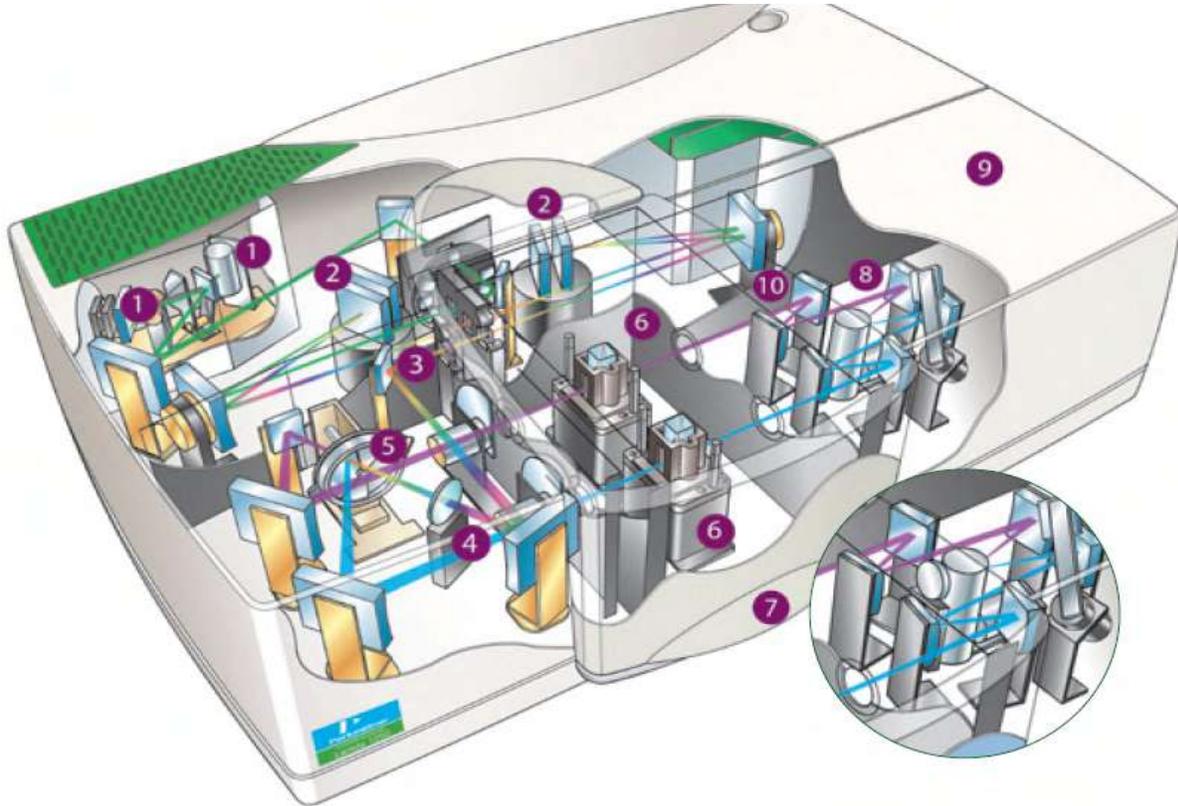


Figura A.6: Esquema ilustrativo del interior del espectrofotómetro de alta resolución PerkinElmer LAMBDA 950. Tomado de [8].

A.5. Cuantificación de s_r y s_I según la norma ISO 5725-2

Los desarrollos matemáticos presentados en este Apéndice, se pueden encontrar en profundidad en el capítulo 13: Experimentos con un solo factor: generales, del libro de texto *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* [31] y la estimación específica de los parámetros s_r y s_I se puede encontrar en la sección 4: Estimación de los parámetros del modelo básico de la norma ISO 5725-2 [30].

Sea que e_{ij} denote la j -ésima observación del i -ésimo tratamiento, y el acomodo de los datos es el que se observa en la tabla A.3. La expresión que modela el comportamiento de los errores de medida del EFAR se presenta mediante la ecuación (A.3).

$$e_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij} \quad (\text{A.3})$$

donde:

- e_{ij} es el estimado del error de medida del EFAR,

- μ es la media general,
- α_i se denomina **efecto** del i -ésimo tratamiento,
- ϵ_{ij} representa el error aleatorio.

Tabla A.3: Errores para tres días experimentales y para n repeticiones por día

Tratamientos:	Día 1	Día 2	Día 3	
	e_{11}	e_{21}	e_{31}	
	e_{12}	e_{22}	e_{32}	
	\vdots	\vdots	\vdots	
	e_{1n}	e_{2n}	e_{3n}	
Total	$E_{1.}$	$E_{2.}$	$E_{3.}$	$E_{..}$
Varianza	$s_{1.}^2$	$s_{2.}^2$	$s_{3.}^2$	s_r^2
Media	$\bar{e}_{1.}$	$\bar{e}_{2.}$	$\bar{e}_{3.}$	$\bar{e}_{..}$

Para los análisis se deben definir tres medidas importantes de variabilidad, y dichas medidas son:

$$STC = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^{10} (e_{ij} - \bar{e}_{..})^2 = \text{suma total de cuadrados} \quad (\text{A.4})$$

$$SCT = n \sum_{j=1}^3 (\bar{e}_{i.} - \bar{e}_{..})^2 = \text{suma de los cuadrados del tratamiento} \quad (\text{A.5})$$

$$SCE = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^{10} (e_{ij} - \bar{e}_{i.})^2 = \text{suma de cuadrados del error} \quad (\text{A.6})$$

Los cálculos para un problema de análisis de varianza por lo general se resumen en forma tabular, como se observa en la tabla A.4

Tabla A.4: Análisis de varianza para el ANOVA de un solo factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada
Tratamientos	SCT	$3 - 1 = 2$	$s_1^2 = \frac{SCT}{2}$	$\frac{s_1^2}{s^2}$
Error	SCE	$3 \cdot (10 - 1) = 27$	$s^2 = \frac{SCE}{27}$	
Total	STC	$3 \cdot 10 - 1 = 29$		

Finalmente, como se puede ver de la tabla A.3 para cada tratamiento (día) se calculan tres varianzas $s_{1.}^2$, $s_{2.}^2$ y $s_{3.}^2$, a partir de dichos datos se puede cuantificar la varianza promedio dentro de los días a partir de la ecuación (A.7),

$$s_r^2 = \frac{s_{1.}^2 + s_{2.}^2 + s_{3.}^2}{3} \quad (\text{A.7})$$

con el resultado anterior, se define finalmente la desviación por repetibilidad del EFAR, la cual se presenta en la ecuación (A.8).

$$s_r = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}{3}} \quad (\text{A.8})$$

Asimismo, la varianza del EFAR entre los días se cuantifica siguiendo lo presentado en la ecuación (A.9),

$$s_I^2 = \frac{s_1^2 - s_r^2}{10} \quad (\text{A.9})$$

y finalmente, se puede cuantificar la precisión intermedia del EFAR según la ecuación (A.10).

$$s_I = \sqrt{\frac{s_1^2 - s_r^2}{10}} \quad (\text{A.10})$$

A.6. Evidencias de metodología

En la serie de sub-secciones siguientes, se muestran imágenes ilustrativas de algunos materiales utilizados y procedimientos ejecutados.

A.6.1. Filtros de densidad neutra para las pruebas de caracterización



Figura A.7: Filtros de densidad neutra utilizados en las pruebas de caracterización del EFAR.

A.6.2. Filtros de corte preparados para la prueba de luz parásita

Figura A.8: Filtros de corte preparados para las pruebas de luz parásita.

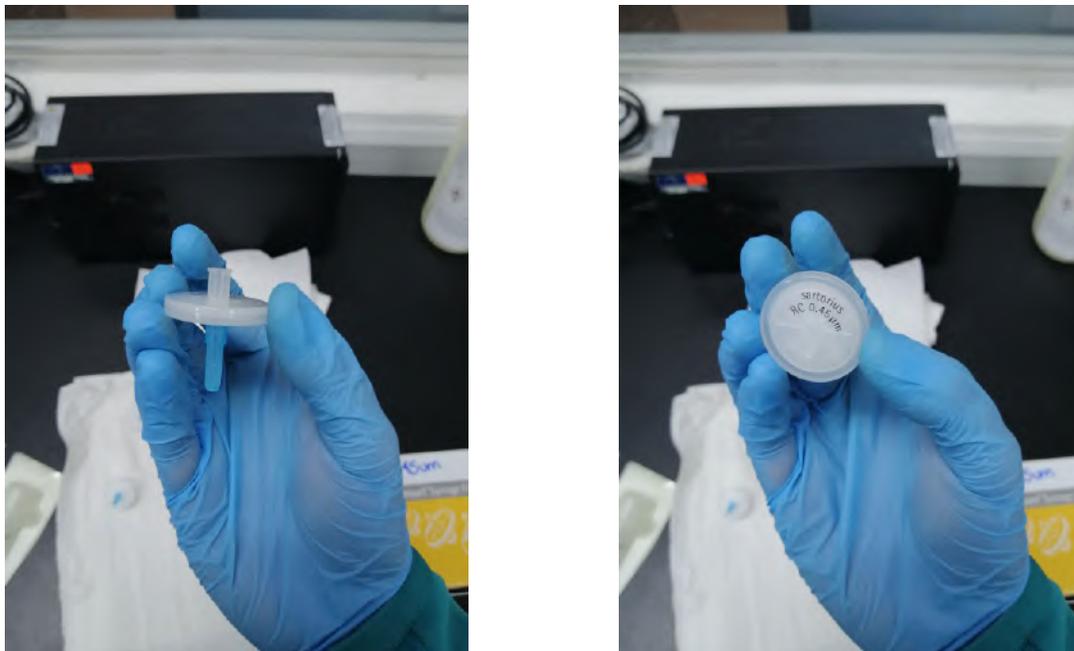
A.6.3. Filtro utilizado para eliminar el particulado de los filtros de corte

Figura A.9: Filtro marca sartorius para eliminar el particulado de los filtros de corte para la prueba de luz parásita.

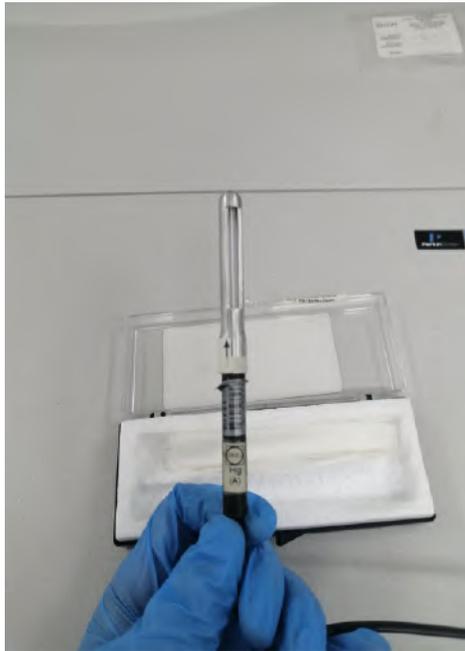
A.6.4. Lámpara patrón tipo lápiz de Hg

Figura A.10: Lámpara de descarga de arco de Hg tipo lápiz, utilizada para la prueba de verificación del ABE y la calibración primaria del EFAR.

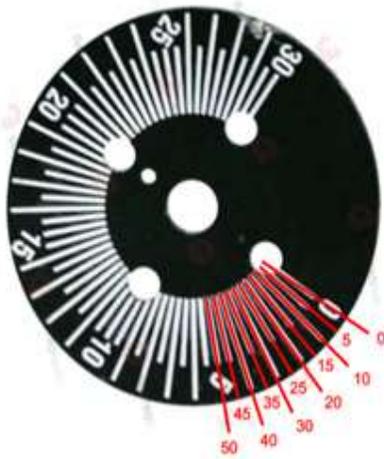
A.6.5. Montaje experimental para la alineación de la lámpara de Hg

Figura A.11: Funcionamiento de la escala graduada para el proceso de alineamiento. La escala roja es la escala útil y define las rotaciones angulares a cuantificar.

A.6.6. Configuraciones operacionales para la prueba de exactitud del EFAR

Tabla A.5: Parámetros utilizados en las configuraciones operacionales de las pruebas de exactitud del EFAR.

Longitud de onda de prueba (nm)	ABE (nm)	Límite inferior del barrido (nm)	Límite superior del barrido (nm)	Gain del detector	Se presentan dobletes o tripletes (nm)	El EFAR logra resolverlos	Longitud de onda pico (nm)
253,65	0,1	251,15	256,15	70	No	N/A	253,65
	0,5	248,65	258,65	40			
	1			30			
	2			30			
312,57	0,1	310,07	315,07	80	Doblete: 312,57 313,17	Sí	312,57; 313,17
	0,5	307,57	317,57	60		No	313,17
	1			40			313,17
	2			40			313,17
365,02	0,1	362,52	367,52	80	Triplete: 365,02 365,48 366,33	Sí	365,02; 365,48; 366,33
	0,5	360,02	370,02	60		No	365,02
	1			40			365,02
	2			40			365,02
404,66	0,1	402,16	407,16	80	No	N/A	404,66
	0,5	399,66	409,66	60			
	1			50			
	2			50			
435,83	0,1	433,34	438,34	80	No	N/A	435,83
	0,5	430,83	440,83	50			
	1			40			
	2			40			
546,08	0,1	543,58	548,58	80	No	N/A	546,08
	0,5	541,08	551,08	50			
	1			40			
	2			40			

A.6.7. Preparación del filtro SRM 2034

Figura A.12: Limpieza del filtro SRM 2034 antes de las mediciones con el EFAR.

A.6.8. Colocación del SRM 2034 en el EFAR para la medición de su espectro de transmitancia

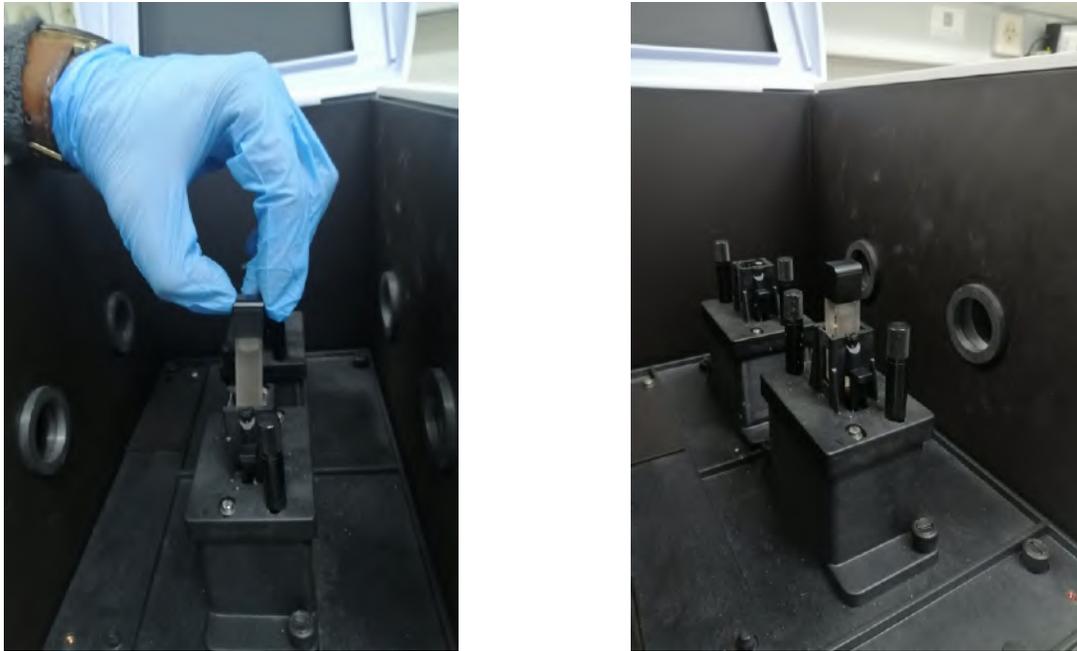


Figura A.13: Colocación del filtro SRM 2034 en el compartimento de muestras.

A.6.9. Código de programación para la validación de la hoja de cálculo

Puede ingresar al código de programación mediante el siguiente [enlace](#).

A.7. Ejemplos de presupuestos de incertidumbres en la calibración primaria del EFAR

Debido a que para cada ABE se presentan dos enfoques de análisis y más de seis longitudes de onda de prueba, a continuación solo se presentan a manera de ejemplo, los presupuestos de incertidumbre asociados a los errores de medida del EFAR en $\lambda = 253,65 \text{ nm}$ a un $ABE = 0,1 \text{ nm}$.

Tabla A.6: Presupuesto de incertidumbre del enfoque 1 para determinación del error de medida del EFAR en la longitud de onda de 253,66 nm para un ABE = 0,1 nm.

Variables de entrada - Enfoque 1										
Magnitud de entrada	Valor	Incertidumbre estándar					Incertidumbre combinada	Coeficiente de sensibilidad	Aporte	%
		Componente	Tipo de distribución	Grados Lib	Fórmula	Valor				
Longitud de onda promedio de los promedios	253,66	Resolución	Rectangular	Inf	$d/\sqrt{12}$	0,002 887	0,002 95	1	0,002 95	91,78
		ABE	Rectangular	Inf	$\bar{s}_{máx}/\sqrt{3}$	0,000 592				
Longitud de onda patrón del Hg	253,65	Incertidumbre patrón	N/A	N/A	N/A	0,000	0,000	-1	0,000	0,00
Error por repetibilidad	0,00	Repetibilidad	$t - Student$	9	s_r/\sqrt{n}	0,000 882	0,000 882	1	0,000 882	8,22
Variable de salida: Error de medida (nm)										
							Valor	0,003 97		
							Incertidumbre estándar combinada	0,003 08		
							Grados de libertad efectivos	N/A		
							k (Calculado con Monte Carlo debido a que hay una dominancia de las distribuciones rectangulares)	1,78		
							Incertidumbre expandida 95,45 %	0,0055		

Tabla A.7: Presupuesto de incertidumbre del enfoque 2 para determinación del error de medida del EFAR en la longitud de onda de 253,66 nm para un ABE = 0,1 nm.

Variables de entrada - Enfoque 2										
Magnitud de entrada	Valor	Incertidumbre estándar					Incertidumbre combinada	Coeficiente de sensibilidad	Aporte	%
		Componente	Tipo de distribución	Grados Lib	Fórmula	Valor				
Longitud de onda promedio de los promedios	253,656	Resolución	Rectangular	Inf	$d/\sqrt{12}$	0,002 887	0,002 95	1	0,002 95	1,03
		ABE	Rectangular	Inf	$\bar{s}_{máx}/\sqrt{3}$	0,000 592				
Longitud de onda patrón del Hg	253,652	Incertidumbre patrón	N/A	N/A	N/A	0,000	0,000	-1	0,000	0,00
Error por repetibilidad	0,00	Reproducibilidad	$t - Student$	29	$\sqrt{s_j^2 + \left(\frac{s_c}{\sqrt{n}}\right)^2}$	0,028 919	0,028 92	1	0,028 92	98,97
Variable de salida: Error de medida (nm)										
							Valor	0,003 97		
							Incertidumbre estándar combinada	0,029 07		
							Grados de libertad efectivos	29		
							k	2,09		
							Incertidumbre expandida 95,45 %	0,061		

A.8. Ejemplos de presupuestos de incertidumbres en las mediciones finales del SRM 2034

Debido a que para cada ABE y para cada RB se presentan tres enfoques de análisis y catorce bandas de transmitancia mínima, a continuación solo se presentan a manera de ejemplo, los presupuestos de incertidumbres asociados a la longitud de onda de transmitancia mínima medida por el EFAR en $\lambda = 240,97$ nm a un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.

Tabla A.8: Presupuesto de incertidumbre del enfoque 1.1 para determinación de la banda de transmitancia mínima igual a 240,97 nm del SRM 2034 a partir del EFAR para un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.

Variables de entrada - Enfoque 1.1										
Magnitud de entrada	Valor	Incertidumbre estándar					Incertidumbre combinada	Coeficiente de sensibilidad	Aporte	%
		Componente	Tipo de distribución	Grados Lib	Fórmula	Valor				
Longitud de onda promedio	240,974	Resolución	Rectangular	Inf	$d/\sqrt{12}$	0,002 89	0,003 37	1	0,003 37	44,18
		ABE	Rectangular	Inf	$\bar{s}_{máx}/\sqrt{3}$	0,000 59				
		Repetibilidad	$t - Student$	9	s/\sqrt{n}	0,001 63				
Corrección	0,00271	Error primario	Rectangular	Inf	$U_{Error_{máx}}/\sqrt{3}$	0,003 79	0,003 79	1	0,003 79	55,82
Variable de salida: Longitud de onda de transmitancia mínima (nm)										
							Valor	240,977		
							Incertidumbre estándar combinada	0,0051		
							Grados de libertad efectivos	N/A		
							k (Calculado con Monte Carlo debido a que hay una dominancia de las distribuciones rectangulares)	1,9		
							Incertidumbre expandida 95,45 %	0,010		

Tabla A.9: Presupuesto de incertidumbre del enfoque 1.2 para determinación de la banda de transmitancia mínima igual a 240,97 nm del SRM 2034 a partir del EFAR para un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.

Variables de entrada - Enfoque 1.2										
Magnitud de entrada	Valor	Incertidumbre estándar					Incertidumbre combinada	Coeficiente de sensibilidad	Aporte	%
		Componente	Tipo de distribución	Grados Lib	Fórmula	Valor				
Longitud de onda promedio	240,974	Resolución	Rectangular	Inf	$d/\sqrt{12}$	0,002 89	0,003 37	1	0,003 37	16,14
		ABE	Rectangular	Inf	$\bar{s}_{máx}/\sqrt{3}$	0,000 59				
		Repetibilidad	$t - Student$	9	s/\sqrt{n}	0,001 63				
Corrección	-0,009779	Ajuste	$t - Student$	7	u_{Ajuste}	0,007 68	0,007 68	1	0,007 68	83,86
Variable de salida: Longitud de onda de transmitancia mínima (nm)										
							Valor	240,964		
							Incertidumbre estándar combinada	0,00839		
							Grados de libertad efectivos	10		
							k	2,3		
							Incertidumbre expandida 95,45 %	0,019		

Tabla A.10: Presupuesto de incertidumbre del enfoque 2 para determinación de la banda de transmitancia mínima igual a 240,97 nm del SRM 2034 a partir del EFAR para un ABE = 0,1 nm y una RB = 14,91 nm/min.

Variables de entrada - Enfoque 2										
Magnitud de entrada	Valor	Incertidumbre estándar					Incertidumbre combinada	Coeficiente de sensibilidad	Aporte	%
		Componente	Tipo de distribución	Grados Lib	Fórmula	Valor				
Longitud de onda promedio	240,974	Resolución	Rectangular	Inf	$d/\sqrt{12}$	0,002 89	0,003 37	1	0,003 37	1,13
		ABE	Rectangular	Inf	$\bar{s}_{máx}/\sqrt{3}$	0,000 59				
		Repetibilidad	$t - Student$	9	s/\sqrt{n}	0,001 63				
Componente del error primario	0,00	Error primario	$t - Student$	N/A	u_{Error}	0,031 57	0,031 57	1	0,031 57	98,87
Variable de salida: Longitud de onda de transmitancia mínima (nm)										
							Valor	240,974		
							Incertidumbre estándar combinada	0,0317		
							Grados de libertad efectivos	N/A		
							k	2		
							Incertidumbre expandida 95,45 %	0,063		

B. Anexos

B.1. Espectro de emisión de línea de lámpara tipo lápiz de mercurio

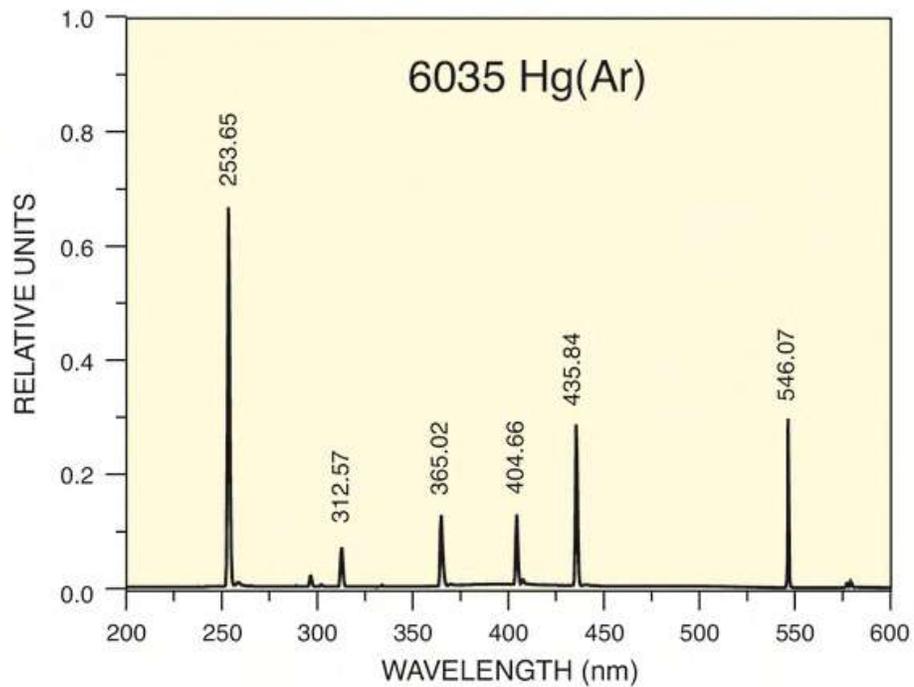


Figura B.14: Líneas de emisión aseguradas por el fabricante de la lámpara de Hg. Tomados de [9].

B.2. Certificado de calibración del SRM 2034 emitido por el NIST

Table 1. SRM 2034 Certified Wavelengths (nm) of Minimum Transmittance and Uncertainties^(a) for 14 Bands at Six Spectral Bandwidths, Referenced to Air

Band No.	0.1 nm	0.3 nm	0.5 nm	1 nm	2 nm	3 nm
1	240.97 ± 0.05	240.98 ± 0.05	241.02 ± 0.05	241.12 ± 0.05	241.12 ± 0.05	241.04 ± 0.05
2	249.78 ± 0.05	249.79 ± 0.05	249.81 ± 0.05	249.89 ± 0.05	250.03 ± 0.05	250.07 ± 0.05
3	278.15 ± 0.05	278.15 ± 0.05	278.15 ± 0.05	278.13 ± 0.05	278.10 ± 0.05	278.05 ± 0.05
4	287.03 ± 0.05	287.04 ± 0.05	287.08 ± 0.05	287.22 ± 0.05	287.52 ± 0.05	287.57 ± 0.05
5	333.48 ± 0.04	333.47 ± 0.05	333.47 ± 0.05	333.48 ± 0.05	333.47 ± 0.05	333.47 ± 0.05
6	345.46 ± 0.05	345.45 ± 0.05	345.43 ± 0.05	345.38 ± 0.05	345.42 ± 0.05	345.53 ± 0.05
7	361.27 ± 0.05	361.27 ± 0.05	361.27 ± 0.05	361.25 ± 0.05	361.12 ± 0.05	361.11 ± 0.05
8	385.36 ± 0.05	385.39 ± 0.04	385.45 ± 0.04	385.61 ± 0.04	385.80 ± 0.04	386.00 ± 0.04
9	416.02 ± 0.05	416.04 ± 0.05	416.07 ± 0.05	416.25 ± 0.05	416.57 ± 0.05	416.89 ± 0.05
10	----- ^(b)	----- ^(b)	----- ^(b)	451.45 ± 0.05	451.32 ± 0.04	451.36 ± 0.04
11	467.78 ± 0.04	467.79 ± 0.04	467.80 ± 0.04	467.82 ± 0.04	467.90 ± 0.04	468.11 ± 0.04
12	485.20 ± 0.04	485.21 ± 0.04	485.21 ± 0.04	485.23 ± 0.04	485.25 ± 0.04	485.21 ± 0.04
13	536.42 ± 0.04	536.43 ± 0.04	536.45 ± 0.04	536.56 ± 0.04	536.86 ± 0.04	537.21 ± 0.04
14	640.41 ± 0.04	640.41 ± 0.04	640.43 ± 0.04	640.50 ± 0.04	640.79 ± 0.04	641.15 ± 0.04

^(a) The uncertainties represent U_{95} , the expanded uncertainty calculated in accordance with reference 1.

^(b) The wavelengths for the three narrowest spectral bandwidths for Band No. 10 are not given because this band resolves into two transmittance minima for spectral bandwidths of nominally less than 1 nm.

Figura B.15: Longitudes de onda certificadas de las 14 bandas de transmitancia mínima del filtro SRM 2034. Tomado del certificado del LCM.

B.3. Especificaciones garantizadas del PerkinElmer en el momento de su adquisición

Photometric Noise RMS	
0 Å and 190 nm	≤ 0.00010 Å
0 Å and 500 nm	≤ 0.00005 Å
2 Å and 500 nm	≤ 0.00020 Å
4 Å and 500 nm	≤ 0.00100 Å
6 Å and 500 nm	≤ 0.00500 Å
0 Å and 1500 nm	≤ 0.00004 Å
2 Å and 1500 nm	≤ 0.00100 Å
3 Å and 1500 nm	≤ 0.00300 Å
	Typically ≤ 0.00165 Å
(2-nm Slit, 1-sec. integration time, Gain 1 NIR)	

Figura B.16: Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto al ruido fotométrico. Tomados de [10].

Photometric Stability	
(After warm-up at 500 nm, 0 A, 2-nm Slit, 2-sec. integration time, Peak to Peak)	$\leq 0.0002 \text{ A/h}$

Figura B.17: Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto a la estabilidad fotométrica. Tomados de [10].

Baseline Flatness	
(LAMBDA™ 950: 190 nm–3100 nm, 2-nm Slit, Gain 1 NIR, 0.20-sec. UV/Vis–0.24-sec. NIR integration time, no smoothing applied)	$\pm 0.0008 \text{ A}$ Typically $\pm 0.0007 \text{ A}$

Figura B.18: Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto a la línea base plana. Tomados de [10].

Stray Light	
At 200 nm (12 g/l KCl USP/DAP method)	$> 2 \text{ A}$
At 220 nm (10 g/l NaI ASTM method)	$\leq 0.00007 \%T$ Typically $\approx 0.00005 \%T$
At 340 nm (50 mg/l NaNO ₂ , ASTM method)	$\leq 0.00007 \%T$ Typically $\approx 0.00002 \%T$
At 370 nm (50 mg/l NaNO ₂ , ASTM method)	$\leq 0.00007 \%T$ Typically $\approx 0.00003 \%T$
At 1420 nm (H ₂ O 1-cm pathlength)	$\leq 0.00040 \%T$ Typically $\approx 0.00032 \%T$
At 1690 nm (CHCl ₃ 4-cm pathlength)	$\leq 0.0015 \%T$ Typically $\approx 0.00065 \%T$
At 2365 nm (CHCl ₃ 1-cm pathlength)	$\leq .0005 \%T$

Figura B.19: Especificaciones garantizadas por el fabricante del EFAR respecto a la luz parásita. Tomados de [10].

Referencias

- [1] C. J. Sansonetti, M. L. Salit, and J. Reader, “Wavelengths of spectral lines in mercury pencil lamps,” *Applied Optics*, vol. 35, no. 1, pp. 74–77, Jan. 1996, publisher: Optica Publishing Group. [Online]. Available: <https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-35-1-74>
- [2] ASTM, “E275 - 2022 - Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet and Visible Spectrophotometers,” 2022.
- [3] G. W. Kramer, M. V. Smith, and J. C. Travis, “Standard Reference Materials: Technical specifications for certification of spectrophotometric NTRMs,” National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, Tech. Rep. NIST SP 260-140, 2000, edition: 0. [Online]. Available: <https://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/Legacy/SP/nistspecialpublication260-140.pdf>
- [4] C. Chan, Y. Lee, H. Lam, and X. Zhang, *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2004.
- [5] ASTM, “E387 - 2013 - Standard Practice for Estimation of the Spectral Bandwidth of Ultraviolet-Visible Spectrophotometers,” 2013.
- [6] B. Kafilé, *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*. Elsevier Science, 2019, pp. 3–9.
- [7] D. Skoog, F. Holler, T. Nieman, and M. Gómez, *Principles of Instrumental Analysis*. McGraw-Hill, 2000, pp. 186–188.
- [8] PerkinElmer, “The new industry-standard LAMBDA™ UV/Vis/NIR and UV/Vis spectrophotometers – 950, 850, and 650 from PerkinElmer,” PerkinElmer, 710 Bridgeport Avenue, Tech. Rep., 2004. [Online]. Available: https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_Lambda950850650Americas.pdf
- [9] Newport, “Pencil Style Calibration Lamps,” Aug. 2022. [Online]. Available: <https://www.newport.com/f/pencil-style-calibration-lamps>
- [10] PerkinElmer, “Technical Specifications for the LAMBDA 950 UV/Vis/NIR and LAMBDA 850 UV/Vis Spectrophotometers.” [Online]. Available: <https://cmdis.rpi.edu/sites/default/files/UVVis-PerkinElmer-Lambda950-Specifications.pdf>
- [11] LCM. Nuestra historia. [Online]. Available: https://lcm.go.cr/acerca-de/nuestra_historia/
- [12] A. Urbas and P. Trask, “Traceability in Molecular Spectrophotometry,” Nov 2009. [Online]. Available: <https://www.nist.gov/programs-projects/traceability-molecular-spectrophotometry>
- [13] BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, and OIML. (2012) Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>.
- [14] IUPAC. (1997) Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”). <https://goldbook.iupac.org/terms/view/S05848>.
- [15] B. Kafilé, *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*. Elsevier Science, 2019.

- [16] CENAM, *Métodos y pruebas para la caracterización del espectrofotómetro del CENAM*, ser. Publicación Técnica: CNM-MFO-PT-001. El Marqués: CENAM, 1996.
- [17] J. Chacón Solano and S. M. Rodríguez Zúñiga, “Caracterización de un espectrofotómetro Ultravioleta Visible para ser utilizado en la certificación de materiales de referencia.” <https://www.lcm.go.cr/documentosweb/quimica/2011/Publicaciones/sandra.pdf>, 2002.
- [18] INM, “Guía de calibración de espectrofotómetros UV/Vis INM/GTM-FR-E/01,” Apr. 2021. [Online]. Available: <https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2021/11/M-06-F-01-Guia-de-calibracion-espectrofotometros-ISBN.pdf>
- [19] R. Mavrodineau, M. V. Smith, J. C. Travis, R. Burke, J. Baldwin, J. Messman, and J. Colbert, “Standard Reference Materials: Glass Filters as a Standard Reference Material for Spectrophotometry - Selection, Preparation, Certification, and Use of SRM 930 and SRM 1930,” National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, Tech. Rep. NIST SP 260-116, 1994. [Online]. Available: <https://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/Legacy/SP/nistspecialpublication260-116.pdf>
- [20] PelkinElmer, “Technical Specifications for the LAMBDA 950 UV/Vis/NIR and LAMBDA 850 UV/Vis Spectrophotometers,” PelkinElmer, 710 Bridgeport Avenue, Tech. Rep., 2004. [Online]. Available: <https://cmdis.rpi.edu/sites/default/files/UVVis-PerkinElmer-Lambda950-Specifications.pdf>
- [21] T. Owen and A. Technologies, *Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer*. Agilent Technologies, 2000.
- [22] S. Upstone, “Technical Note UV/Vis Spectroscopy - Validating UV/Visible Spectrophotometers,” https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TCH_Validating_UV_Visible.pdf, 2012.
- [23] ASTM, “E387 - 2004 - Standard Test Method for Estimating Stray Radiant Power Ratio of Dispersive Spectrophotometers by the Opaque Filter Method,” 2004.
- [24] B. Magnusson and U. Örnemark, *Guía Eurachem: La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos - Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*, 2nd ed., 2014. [Online]. Available: <http://www.eurachem.org>
- [25] OAA, “GUI-LE-03: GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO,” Mar. 2021. [Online]. Available: <https://oaa.org.ar/>
- [26] ISO/IEC, “INTERNATIONAL STANDARD - ISO/IEC 17025 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories,” 2017.
- [27] JCGM, “Evaluación de datos de medición - Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida,” 2008.
- [28] CENAM, “Guía Técnica de Trazabilidad e Incertidumbre en los Servicios de Calibración de Espectrofotómetros UV-Vis México,” Apr. 2014. [Online]. Available: https://www.ema.org.mx/descargas_portalV2/guias_tecnicas/Guias_Tecnicas_CALIBRACION/CALIBRACION_Espectrofotometros_UV.pdf
- [29] A. Z. Chonón Núñez, “CALIBRACION DE ESPECTROFOTOMETROS DE ABSORCION MOLECULAR EN EL RANGO ULTRA VIOLETA Y VISIBLE,” Callao, Perú, Aug. 2013.
- [30] ISO, “ISO 5725-2:2019 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement

method,” 2019. [Online]. Available: <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/94/69419.html>

- [31] R. E. Walpole, *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. PEARSON, 2012.
- [32] B. C. Jimenez, G. Sarmanho, K. E. Murphy, A. R. M. Bustos, and J. R. V. Baudrit, “NanoUV-VIS: An Interactive Visualization Tool for Monitoring the Evolution of Optical Properties of Nanoparticles Throughout Synthesis Reactions,” *NIST*, vol. 122, Sep. 2017. [Online]. Available: <https://www.nist.gov/publications/nanouv-vis-interactive-visualization-tool-monitoring-evolution-optical-properties>
- [33] D. Skoog, D. West, F. Holler, and S. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning, 2013.
- [34] E. Hecht, *Optics*, ser. Always learning. Pearson, 2016.