

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

Departamento de Química

## TRABAJO DE DIPLOMA

Cuantificación de nitrógeno, fósforo y potasio  
totales en muestras del bioproducto CBQ-AgroG

Autor: María Isabel Sánchez Paz

Tutor: MSc. Juan Alberto Ribalta Quesada

Santa Clara , septiembre, 2020  
Copyright©UCLV

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

Department of Chemistry

## **BACHELOR THESIS**

Quantification of total nitrogen, phosphorous and potassium in samples of the bioproduct CBQ-AgroG

Author: María Isabel Sánchez Paz

Supervisor: MSc. Juan Alberto Ribalta Quesada

Santa Clara, september, 2020  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubián” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830  
Teléfonos.: +53 42 28 15 03-14 19

*El único camino que has elegido tú mismo, es la verdad de tu universo.*

*Kamina*

*Dedicatoria:*

*A mis padres y hermana quienes de forma incondicional hicieron posible este sueño.*

*A la memoria de mis abuelos, a ellos también dedico este logro.*

*Agradecimientos:*

*A mi familia, que ha sido el pilar fundamental de mi vida, mi mayor apoyo a lo largo de estos 5 años y los verdaderos merecedores de mi título, especialmente a mis padres María Emilia y Orestes, a mi familia santaclareña, Ani, gracias por acogerme como a una hija más.*

*A mi tutor y profesor Msc. Juan Alberto Ribalta Quesada, por su esfuerzo, entrega y comprensión en su labor como educador, a él agradezco sus palabras de aliento cuando las cosas fueron difíciles para mí, su paciencia, apoyo incondicional y confianza fueron motores que impulsaron la culminación de este proyecto.*

*A mi mejor amiga Melissa, gracias por estar allí, y ser mi cómplice siempre....*

*A Yoel, con quien he compartido risas y llantos desde el colegio, gracias por estar ahí siempre.*

*A mis compañeros de aula con los cuales he compartido momentos buenos y malos a lo largo de estos años y que siempre llevaré en el corazón, en especial.*

*A todas las personas que de una forma u otra fueron el sostén para seguir avanzando en este difícil camino, así como las que trataron de amedrentarme lo cual me sirvió de estímulo a lo largo de esta etapa de mi vida.*

*A todos Muchas Gracias.*

## **Resumen**

En el presente trabajo se abordaron los principales tipos de fertilizantes, biofertilizantes y bioproductos para la agricultura, teniendo en cuenta sus características, composiciones y campos de aplicación más comunes.

Además, se recopilaron los principales métodos de cuantificación de tres de los componentes más representativos de los fertilizantes a nivel mundial (nitrógeno, fósforo y potasio), destacando su aplicabilidad y características generales.

Se determinaron algunos parámetros para la verificación de la cuantificación de fósforo total por el método del ácido ascórbico empleando espectrofotometría ultravioleta-visible, estos parámetros fueron linealidad, repetibilidad y precisión intermedia. Como resultado de este estudio se obtuvo que el método resultó ser lineal, repetible y preciso bajo las condiciones experimentales consideradas durante el análisis.

## **Abstract**

In the present work the main types of fertilizers, biofertilizers and bioproducts for agriculture were addressed, taking into account their characteristics, compositions and most common fields of application.

In addition, the main quantification methods of three of the most representative components of fertilizers worldwide (nitrogen, phosphorus and potassium) were collected, highlighting their applicability and general characteristics.

Some parameters were determined for the verification of the total phosphorus quantification by the ascorbic acid method using visible-ultraviolet spectrophotometry, these parameters were linearity, repeatability and intermediate precision. As a result of this study, it was obtained that the method turned out to be linear, repeatable and precise under the experimental conditions considered during the analysis.

# Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	7
1.1 Fertilizantes.....	7
1.2 Biofertilizantes .....	8
1.3 Bioproductos para el mejoramiento de los suelos .....	9
1.4 Nutrientes del suelo .....	11
1.5 Caracterización química de biofertilizantes .....	15
1.5.1 Determinación de nitrógeno total.....	15
1.5.2 Determinación de fósforo total.....	18
1.5.3 Digestión con persulfato para la determinación de nitrógeno y fósforo totales .....	20
1.5.4 Determinación de potasio .....	22
1.6 Verificación de métodos analíticos .....	26
1.6.1 Parámetros implementados en la verificación de los métodos.....	26
1.6.2 Sesgo proporcional y sesgo constante.....	28
1.6.3 Bondad de ajuste.....	30
1.7 Estudio de exactitud.....	37
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
2.1 Equipos, reactivos y preparación de las disoluciones .....	40
2.2 Evaluación de la linealidad, la repetibilidad y la precisión intermedia .....	41
CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	45
3.1 Linealidad.....	45
3.1.2 Bondad de ajuste.....	48
3.2 Análisis de la repetibilidad y la precisión intermedia para la cuantificación de los contenidos de fosfato .....	50
3.2.2 Repetibilidad .....	50
3.2.3 Precisión intermedia.....	51
CONCLUSIONES.....	53
RECOMENDACIONES .....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS .....	58

## INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por el cambio climático y, en menor medida, por el agotamiento de los combustibles fósiles, han dirigido el foco del debate público hacia los impactos y la disponibilidad de los recursos energéticos. Sin embargo, los problemas de escasez a los que tendrán que hacer frente las sociedades industriales en las próximas décadas afectan a muchos ámbitos distintos. Uno de los que destaca por su gravedad, y que sigue estando relativamente desatendido en el debate público, es el de la producción de alimentos. El modelo de agricultura actual depende de enormes aportes externos de energía, pero también de otros insumos que se han vuelto igual de imprescindibles: los fertilizantes químicos. La historia de la agricultura moderna es, en gran medida, la historia de esta dependencia. Una de las claves de su innegable éxito es, también, una de las principales causas de su ruina (Escalante, 2020).

En el desarrollo de un país se debe considerar, entre otros aspectos, el avance científico, tecnológico, económico y social, lo que implica evaluar también la transformación de los residuos que se generan y utilizarlos para obtener productos útiles que contribuyan a disminuir el impacto que ellos ejercen sobre el medioambiente.

El suelo es una fina capa formada por la acumulación e interacción de partículas minerales, materia orgánica y seres vivos, el cual permite el crecimiento de los vegetales. Si bien tarda cientos o miles de años en formarse, sus nutrientes pueden agotarse muy rápidamente y la necesidad de reponerlos ha sido una preocupación constante, consciente o no, desde el surgimiento de la agricultura. Antes de que la moderna química del suelo explicara con detalle su funcionamiento, ya tenían lugar por todo el mundo prácticas que reducían o compensaban la pérdida de nutrientes: barbecho, rotación de cultivos y, especialmente, la vinculación entre ganadería y agricultura, que garantizaba la reposición de parte de estos elementos mediante el estiércol.

El desarrollo capitalista en el siglo XIX, con sus enormes necesidades de abastecimiento de alimentos hacia las ciudades y la industria, aceleró el consumo y la dispersión de estos nutrientes del suelo más allá de su capacidad de renovación. Marx señaló este fenómeno, indicando que la producción capitalista, y la concentración urbana generada por ella, “perturban el metabolismo entre el hombre y la tierra; es decir, el retorno a la tierra de los elementos de esta consumidos por el hombre en forma de alimento y de vestido, que constituye la condición natural eterna sobre la que descansa la fecundidad permanente del suelo” (Escalante, 2020).

Estas observaciones venían tras el estudio de la obra del químico alemán Justus von Liebig, quien expuso el carácter fundamental de tres elementos químicos para el desarrollo de las plantas: nitrógeno, fósforo y potasio, los cuales constituyen la base de los modernos fertilizantes químicos (la conocida fórmula NPK). El nitrógeno es un nutriente esencial que todas las plantas requieren para un crecimiento adecuado. Es un constituyente importante de la molécula de clorofila, ácidos nucleicos y proteínas, el mismo es usado por las plantas para producir hojas y mantener un buen color verde. El fósforo es un nutriente primordial para el crecimiento de organismos, por lo que la utilización en la agricultura puede estimular el crecimiento de macro y microorganismos fotosintéticos en proporciones normales o nocivas. Es importante señalar que los seres vivos obtienen fósforo de los alimentos y a través de disolución del suelo. El potasio es un nutriente que es requerido en grandes cantidades por las plantas para el crecimiento y la reproducción de las mismas, influyendo en la forma, tamaño, color y sabor de las plantas y a otras medidas atribuidas a la calidad del producto (Villasanti y Román, 2013).

La degradación de los suelos es un problema creciente en el mundo actual, en gran medida vinculado a las actividades agropecuarias, aunque también hay otras actividades humanas que pueden causarla, las mismas afectan una parte importante de las tierras cultivables de la tierra, la

disminución de la riqueza y el desarrollo económico de las naciones. La degradación del suelo anula ganancias adelantadas por la mejora de rendimiento de los cultivos y la reducción del crecimiento de la población.

Cuba es un país en el cual la agricultura ha sido durante muchos años una de las principales actividades económicas, la cual se ha orientado hacia la exportación y consumo interno constituyendo una fuente importante de ingreso y ahorro de divisas. En Cuba, como en muchos países el proceso de degradación de los suelos se manifiesta en un alto porcentaje por el inadecuado manejo y explotación de estos, además las condiciones topográficas y edafológicas existentes han dado lugar a la erosión de los mismos afectando alrededor de 2,9 millones de hectáreas. Otros factores que afectan a los suelos de nuestro país, son la salinidad, la cual afecta más de 1 millón de hectáreas, la compactación, la pérdida de materia orgánica y de fertilidad (Olivera Vicedo, 2012).

El uso de desechos industriales como sustrato para la producción de biocompuestos es una alternativa válida para multiplicar, por vía fermentativa, la población de microorganismos capaces de producir biomasa rica en productos biológicos con amplia demanda en la industria y la agricultura. La mezcla de microorganismos, todos benéficos, ha constituido la base de lo que es hoy la tecnología de los productos de fermentación (Higa y Parr, 1994). Esta tecnología ha sido desarrollada como alternativa para obtener biofertilizantes y otros agroquímicos de alta calidad y no muy costosos, con componentes orgánicos y biológicos que no afectan el medioambiente.

El Centro de Bioactivos Químicos en conjunto con el Instituto Investigación de Biotecnología de las Plantas (IBP), ambos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, trabajan en la producción y desarrollo de un biopreparado, CBQ-AgroG, el cual presenta marcada acción biológica, evidenciada por resultados de su uso práctico.

Este producto es una novedosa formulación obtenida mediante la fermentación heteroláctica de dos materias primas (melaza y suero de leche) y en su conjunto tienen un eficaz efecto sobre el suelo, mejorando los procesos químicos, físicos y biológicos, además proporciona nutrientes que ayudan en el desarrollo de las plantas. El CBQ-AgroG permite reducir plagas y enfermedades, mejorar la fertilidad y ayuda a aumentar los rendimientos de las cosechas (Centro de Bioactivos Químicos).

Sin embargo, a consideración de la autora de este trabajo, a pesar de las aplicaciones de esta tecnología en diversos campos, pocos reportes han sido realizados sobre el estudio de la composición química del bioproducto CBQ-AgroG, por lo que se considera importante, teniendo en cuenta la materia prima a través de la cual se obtiene este producto, llevar a cabo la caracterización de algunos de sus componentes a través de técnicas analíticas que permitan cuantificar su concentración real, siendo de utilidad como parte de la caracterización del mismo, dando una posible explicación de los beneficios prácticos reportados en algunos estudios (Castillo et al., 2007).

Por todo lo anteriormente expresado se definen los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Determinar los contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio totales en muestras del bioproducto CBQ-AgroG para la evaluación de su potencial efecto fertilizante.

Objetivos específicos:

- Proponer, a partir de una revisión de la bibliografía, los métodos más adecuados para cuantificar los contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio totales en muestras del bioproducto CBQ-AgroG.

- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la determinación de los contenidos de fósforo total mediante el método espectrofotométrico del molibdovanadofosfato, empleando el ácido ascórbico como agente reductor.

# CAPÍTULO I

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

# CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Fertilizantes

Un fertilizante es una sustancia o mezcla química, natural o sintética, utilizada para enriquecer el suelo y favorecer el crecimiento vegetal. Los fertilizantes contienen nutrientes en sus formas químicas solubles y asimilables por las raíces de las plantas, para mantener o incrementar el contenido de estos elementos en el suelo, se trata, por tanto, de una reposición o aporte artificial de nutrientes (Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes, 2002). Los fertilizantes se dividen en dos grupos, los fertilizantes simples y los compuestos. En el primer grupo se pueden encontrar los fertilizantes nitrogenados, los fertilizantes fosfatados y los fertilizantes potásicos, entre otros, y en el caso de los compuestos se encuentran los fertilizantes NPK, los cuales son la combinación entre los elementos nitrógeno, fósforo y potasio respectivamente, los fertilizantes NP, los fertilizantes NK, y los fertilizantes PK. Los fertilizantes varían en su composición química en dependencia de los elementos que los componen, una muestra representativa de las composiciones de algunos de estos fertilizantes es la siguiente: los fertilizantes NPK generalmente contienen de un 5 a un 26 % de N, de un 5 a un 35 % de  $P_2O_5$  y de un 5 a un 26 % de  $K_2O$ ; los fertilizantes NP poseen de un 16 a un 18 % de N y de un 46 a un 48 % de  $P_2O_5$ , los fosfatos amónicos poseen de un 16 a un 18 % N y de un 46 a un 48 %  $P_2O_5$ , los nitrofosfatos se componen en su mayoría de un 20 a un 26 % N y de un 6 a un 34 %  $P_2O_5$ ; los fertilizantes PK se componen de un 6 a un 30 % de  $P_2O_5$  y de un 6 a un 30 % de  $K_2O$  (Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes, 2002). Antes de hacer un plan de fertilización se debe contar con un análisis de suelo con el fin de determinar las necesidades de elementos nutricionales y así hacer los ajustes necesarios que garanticen una adecuada nutrición del cultivo de acuerdo a los requerimientos nutricionales de este (González y Pomares 2008). Existen varios métodos para la aplicación de

los fertilizantes según el resultado que se desee obtener en el cultivo o la planta, tales como el esparcimiento a voleo (es decir aplicándolo superficialmente en el terreno); aplicación localizada del fertilizante (dosificar el fertilizante sólo en lugares seleccionados en el campo); en cobertera (esparciendo el fertilizante a voleo sobre un cultivo en pie) y la aplicación foliar, el cual es el método más eficiente de suministro de micronutrientes (Villasanti y Román, 2013).

## **1.2 Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son productos constituidos por microorganismos vivos y/o los metabolitos que ellos producen, los cuales son capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre las plantas. Los biofertilizantes pueden definirse como preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas eficientes fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo o potenciadoras de diversos nutrientes, que se utilizan para aplicar a las semillas o al suelo, con el objetivo de incrementar el número de estos microorganismos en el medio y acelerar los procesos microbianos, de tal forma que se aumenten las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas o se hagan más rápidos los procesos fisiológicos que influyen sobre el desarrollo y el rendimiento de los cultivos (Castillo et al., 2007). Existen distintos tipos de biofertilizantes: los abonos, el compost y aquellos que contienen inoculantes microbianos. Los abonos son enmiendas para suelos agrícolas que buscan mejorar sus propiedades químicas y proveer a los cultivos los elementos minerales para su nutrición.

Un compost es el resultado de un proceso controlado de descomposición de residuos orgánicos de origen vegetal y animal; el compost se caracteriza por su riqueza química y biológica, lo cual permite su aplicación para el mejoramiento de los componentes de los suelos agrícolas (Silva Rubio et al., 2014).

Los biofertilizantes que incluyen inoculantes microbianos cumplen funciones de descomposición, solubilización de nutrientes y estimulación del crecimiento de las raíces. Entre los principales componentes de estos biofertilizantes se encuentran las bacterias *micorrizas* y rizobacterias principalmente los géneros *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.*, *Frankia sp.*, *Beijerinckia sp.* las cuales promueven el crecimiento vegetal, las actinobacterias también forman parte de la composición de disímiles biofertilizantes, siendo estas últimas una clase de bacterias Gram positivas, las cuales se encuentran principalmente en la tierra, e incluyen algunas de las más típicas formas de vida terrestre, jugando un importante rol en la descomposición de materia orgánica. Estas bacterias renuevan las reservas de nutrientes en la tierra y son fundamentales en la formación de humus. Las algas y los hongos también son empleados en la producción de biofertilizantes algunos de estos hongos son el *Glomus*, la *Entrophospora* y la *Acaulospora* (Silva Rubio et al., 2014).

Los fertilizantes y biofertilizantes poseen métodos similares de aplicación (Silva Rubio et al., 2014). Los mismos pueden aplicarse en suelos degradados donde la presencia de microorganismos ha sido afectada negativamente por el uso inapropiado de técnicas agrícolas (exceso de agroquímicos, talas, quemas, entre otras), que han propiciado la degradación del suelo y han reducido su diversidad y efectividad.

### **1.3 Bioproductos para el mejoramiento de los suelos**

Un bioproducto surge por la aplicación de la biotecnología dentro del ámbito industrial, donde, mediante procesos biológicos, bioquímicos, físicos y térmicos de fermentación, esterificación, transesterificación, digestión, hidrólisis con incorporación de enzimas, microorganismos, bacterias, hongos, residuos de origen animal y vegetal, se transforma la biomasa, dando lugar a la obtención

de bioproductos los cuales pueden emplearse en diversas esferas. Muestra de ello, es la existencia de productos de origen biológico (bioproductos) dedicados al desarrollo agrícola, tales como los bioestimulantes, los biopesticidas y los biofertilizantes (Almazán et al., 2007).

Los bioestimulantes se definen como formulaciones a base de varios compuestos químicos incluyendo hormonas, aminoácidos, vitaminas, enzimas y elementos minerales, siendo estos los más conocidos y de uso común en la agricultura. Otros autores como Castillo et al (2007), amplían la definición al considerar que los bioestimulantes son productos constituidos por microorganismos vivos y/o los metabolitos que ellos producen, los cuales son capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre las plantas, mediante la producción de sustancias fisiológicamente activas (auxinas, giberelinas, citoquininas, aminoácidos, péptidos y vitaminas) que al interactuar con la planta promueven o desencadenan diferentes eventos metabólicos en función de estimular el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de cultivos.

El término biopesticida se suele emplear para los productos utilizados en el control de plagas, hongos y enfermedades provocadas por bacterias de origen patógeno que afectan a los cultivos.

En nuestro país son varios los productos que se estudian y desarrollan con el fin de ser empleados en la agricultura para lograr un balance entre la producción agrícola y la sostenibilidad ambiental. Este es el caso del bioproducto CBQ-AgroG, el cual es el resultado del proceso de fermentación entre dos subproductos de la industria láctea y cañera (Cáceres, 2012, Rivera et al., 2014).

El suero de leche y la melaza son subproductos abundantes de ambas industrias, son los residuos obtenidos de la fabricación del queso y de la azúcar (Amrane y Prigent, 1998). Estos subproductos son de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no los hacen aptos para su comercialización directa como suero líquido y melaza. Debido a esto, el lactosuero y la melaza se tratan mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como: lactosa

(3,3 - 6,0 %) y proteínas (0,32 - 0,7 %), los cuales constituyen fuentes potenciales para la alimentación animal. Sin embargo, sólo una parte del suero se utiliza para estos fines, ya que la mayor parte del lactosuero se convierte en un efluente altamente contaminante cuando se vierte a los cuerpos de agua, debido a la gran demanda biológica y química de oxígeno (Pavel, 1979, Navas, 2012).

El desarrollo y aplicación de bioproductos (biopesticidas, biofertilizantes y bioestimulantes) en la agricultura está siendo objeto de gran atención, por científicos y productores, como una alternativa para la reducción del empleo de pesticidas y fertilizantes químicos, con el fin de disminuir la contaminación ambiental producida por los mismos, promover incrementos en los rendimientos y calidad de las cosechas, eliminar patógenos de plantas e incrementar la calidad de los suelos.

#### **1.4 Nutrientes del suelo**

Dieciséis elementos son esenciales para el crecimiento de una gran mayoría de plantas y éstos provienen del aire y del suelo circundante. En el suelo, el medio de transporte es la solución del suelo (Nicholls y Altieri, 2008). Los elementos adquiridos por la planta provienen de distintas fuentes, del aire el carbono es obtenido mediante la absorción del dióxido de carbono, el hidrógeno y el oxígeno lo obtienen del agua y del suelo, los fertilizantes y el abono animal son fuentes de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno y cloro. Excepto el carbono, elemento esencial para la fotosíntesis, la planta obtiene todos los nutrientes de la solución del suelo, los cuales se dividen en dos categorías (clasificación cuantitativa) (Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes, 2002).

Macronutrientes: se necesitan en grandes cantidades y grandes cantidades tienen que ser aplicadas si el suelo es deficiente en uno o más de ellos. Se encuentran divididos en nutrientes

primarios y secundarios; los nutrientes primarios son el nitrógeno, el fósforo y el potasio, y entre los secundarios se encuentran el magnesio, el calcio y el azufre.

Micronutrientes: entre estos se encuentran el hierro, el manganeso, el zinc, el cobre, el molibdeno, el cloro y el boro. Ellos son parte de sustancias claves en el crecimiento de las plantas, siendo comparables con las vitaminas en la nutrición humana. Son absorbidos en pequeñas cantidades su rango de provisión óptima es muy pequeño y su disponibilidad en las plantas depende principalmente de la disposición de los mismos en el suelo.

Dentro del grupo de nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas en grandes cantidades, destacan el nitrógeno, el fósforo y el potasio.

El nitrógeno es el motor del crecimiento de las plantas. Constituye del uno al cuatro por ciento del extracto seco de la planta y del nitrógeno total presente en el suelo del 90 al 95 % se encuentra en forma orgánica, de modo que no es directamente asimilable por las plantas hasta después del proceso de mineralización, donde es absorbido en forma de iones nitrato o iones amonio. En la planta, se combinan con componentes producidos por el metabolismo de los carbohidratos para formar aminoácidos y proteínas siendo el constituyente esencial de las proteínas, y estando involucrados en todos los procesos principales de desarrollo de las plantas (Nicholls y Altieri, 2008).

El fósforo constituye del 0,1 al 0,4 % del extracto seco de la planta, juega un papel importante en la transferencia de energía, por lo cual es esencial para la fotosíntesis y para otros procesos químico-fisiológicos. Es posible encontrarlo en los suelos formando parte de diferentes minerales como fosforita y apatita, también se puede encontrar como parte de compuestos orgánicos, en formas iónicas libres en la solución del suelo y fijadas al complejo arcillo-húmico. Este elemento es indispensable para la diferenciación de las células y para el desarrollo de los tejidos, que forman

los puntos de crecimiento de la planta, favorece el desarrollo radicular agilizándolo y mejorando el amarre de las raíces a la tierra lo cual beneficia la absorción de otros macro y micronutrientes que ayudan al correcto desarrollo de las plantas. En los frutos, las semillas y las flores, el fósforo propicia un alto nivel de maduración y evita el proceso conocido como “aborto”, referido a la pérdida prematura de flores y frutos de las plantas. El fósforo es deficiente en la mayoría de los suelos naturales o agrícolas o donde la fijación limita su disponibilidad (Silva Rubio et al., 2014).

El potasio constituye del 1 al 4 % del extracto seco de la planta. El potasio se encuentra en los suelos en cuatro formas:

- potasio no disponible: este se encuentra como componente estructural de minerales primarios como micas y feldspatos, este potasio solo se encuentra disponible tras la descomposición de los minerales.
- potasio fijo o disponible: este se encuentra temporalmente atrapado entre las capas de arcilla expandibles como la illita y la montmorillonita.
- potasio intercambiable: este se encuentra retenido electrostáticamente por los coloides del suelo cargados negativamente y puede ser desplazado y extraído por tratamiento con sales neutrales como el acetato de amonio.
- el potasio soluble que se encuentra en pequeñas porciones en la solución del suelo.

El potasio activa más de 60 enzimas, por ello juega un papel vital en la síntesis de carbohidratos y proteínas, mejorando el régimen hídrico de la planta y aumentando su tolerancia a la sequía, heladas y a la salinidad. Las plantas bien provistas de potasio sufren menos de enfermedades (Silva Rubio et al., 2014, Villasanti y Román, 2013, Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes, 2002).

El contenido de estos elementos en bioproductos y fertilizantes debe ser vigilada porque pueden alterar los índices de nitrógeno, fósforo y potasio en el suelo y este exceso de nutrientes podría en lugar de ser beneficioso, ser una fuente de contaminación ambiental y pérdida de la calidad de los cultivos (Castillo et al., 2007) .

Si los niveles de nitrógeno en el suelo son altos (mayores que el 0,30 %) se puede llegar a producir un desbalance entre el área foliar y la radicular. Si esto ocurre, el área foliar provoca un incremento de la transpiración que no es correspondido con un aumento en la absorción de agua, por lo tanto, la planta puede entrar en estrés hídrico, aunque tenga buena disponibilidad de agua y puede aparecer podredumbre apical de frutos. En las aguas un exceso de nitrógeno causa el crecimiento excesivo de algas, es decir, su afloramiento a lo largo de extensos cuerpos de agua, lo que provoca un fuerte impacto en el medio ambiente, la salud humana y la economía, debido a que los afloramientos de algas consumen una gran cantidad de oxígeno, lo que priva a los peces, moluscos, y otros organismos acuáticos del oxígeno necesario para sobrevivir (De Borba et al., 2014).

Los niveles de fósforo deben ser controlados en las zonas de producción a fin de garantizar el mantenimiento de sus niveles. Los cultivos con deficiencias de fósforo muestran un crecimiento retrasado, las hojas se tornan oscuras, azuladas y en ocasiones moradas, los frutos aparecen deformes y los granos vacíos, aunque alcanzar un exceso de fósforo en los suelos es complicado, ya que no es un elemento que no se retiene en el suelo con facilidad y que es fácilmente lavable. Un exceso del mismo puede provocar en la planta problemas para la absorción de nutrientes como el zinc, el cobre y el calcio. En las aguas el exceso de fósforo provoca un efecto similar al ocasionado por niveles alterados de nitrógeno en las aguas.

Cuando el potasio se encuentra en niveles adecuados, se recomienda mantener el nivel del nutriente en el suelo aplicando solamente lo que es extraído por el cultivo. Los cultivos con deficiencia de potasio muestran un crecimiento reducido o enanismo, los bordes exteriores de las hojas son oscuros (necrosis); las hojas marchitas y los frutos obtenidos son pequeños (Villasanti y Román, 2013). Autores como Novoa et al (2018), refieren que un exceso de potasio en el suelo provoca en las plantas deficiencias de calcio y magnesio, así como una clorosis de lámina foliar acompañada de puntos necróticos.

### **1.5 Caracterización química de biofertilizantes**

En los análisis físico-químicos de los biofertilizantes se determinan varios parámetros los cuales dan una medida de la aplicabilidad de los mismos en distintos sectores agrícolas. El análisis de fertilizantes y afines es uno de los retos técnicos más importantes para un laboratorio agrícola, ya que estas muestras en ocasiones presentan una marcada complejidad y pueden estar sujetas a muchas interferencias y variantes. Algunos de los parámetros que se determinan en estos análisis son pH, índice de acidez, índice de basicidad, conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos, sólidos insolubles, azúcares reductores, ácidos libres, sustancias inorgánicas, grado equivalente (porcentaje en peso de los nutrientes, generalmente N, P, K, Ca, Mg, S), entre otros, lo que unido a la composición de las materias primas de origen y biotransformadas brinda la posibilidad de aplicarlos como biofertilizantes. (Silva Rubio et al., 2014, González y Pomares 2008).

#### **1.5.1 Determinación de nitrógeno total**

Cuando se realiza la caracterización química de un fertilizante o productos afines es necesario cuantificar nutrientes como el nitrógeno. Este se encuentra en la naturaleza en varias formas siendo las mismas, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, nitrógeno ureico, nitrógeno insoluble en agua y nitrato. Todas estas formas de nitrógeno, así como el nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>), son bioquímicamente

interconvertibles y son a la vez componentes del ciclo de nitrógeno (Baird et al., 2017). Para la determinación de las distintas formas de nitrógeno existen diversos métodos, entre los que se encuentran básicamente las siguientes variantes: los métodos espectrofotométricos, los métodos potenciométricos, los métodos cromatográficos y los métodos de valoración.

En la cuantificación de nitrógeno total se utilizan modalidades analíticas basadas principalmente en métodos como el método de combustión, en el cual el nitrógeno es liberado de la muestra a través de un proceso de combustión en presencia de oxígeno (con un alto nivel de pureza). Este método es aplicable en la determinación de hasta el 67 % del nitrógeno total presente en muestras de fertilizantes tanto líquidas como sólidas. El método del nitrógeno absoluto y el método del nitrógeno absoluto modificado son aplicables a todo tipo de fertilizantes. El método del polvo de Raney es otra variante que puede ser empleada en el estudio de muchos fertilizantes, con la excepción de aquellos fertilizantes basados en fosfatos y nitratos y que además contengan en su composición azufre que no sea en forma de sulfatos (AOAC International, 2000). Sin embargo, los métodos más estudiados y desarrollados para el análisis de nitrógeno total son el método de Dumas y el método de Kjeldahl, siendo este último el más difundido.

El método de Dumas tiene su principio en la pirolisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno de los gases de combustión. El nitrógeno puede ser medido con manómetro después de absorber el dióxido de carbono en una solución alcalina o por conductividad térmica en métodos automatizados. Mediante este método es posible determinar del 1 al 67 % de nitrógeno total contenido en fertilizantes líquidos y sólidos. Estudios realizados muestran equivalencias satisfactorias al compararlo con el método de Kjeldahl en análisis de forrajes y alimentos.

El método de Kjeldahl es uno de los métodos más difundidos para el análisis de nitrógeno total, se caracteriza por el uso de ebullición, empleando el ácido sulfúrico concentrado en la descomposición

de la materia orgánica presente en la muestra mediante la oxidación y en la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco. El hidrogenosulfato de amonio obtenido al final del procedimiento puede ser determinado in situ o por destilación alcalina y valoración. Entre las dificultades químicas y prácticas de este método se encuentran la digestión prolongada de la muestra, la conversión cuantitativa de nitrógeno a amoníaco, la espumosis excesiva, la interferencia de compuestos nitrogenados no proteicos, la acción corrosiva del ácido sulfúrico sobre el sistema de extracción de humos y las consideraciones ambientales derivadas de la descarga de humos tóxicos y la contaminación de aguas con catalizadores metálicos como el selenio y sales de cobre o titanio. Entre las ventajas de este método se encuentra la aplicabilidad en varios tipos de productos y la alta fiabilidad, por lo que es empleado como método de referencia (Paneque-Pérez et al., 2010, Baird et al., 2017).

Cuando se realizan análisis químicos vinculados al sector agrícola la forma más común de cuantificar el nitrógeno es en forma de nitrato, ya que este es un constituyente presente en fertilizantes y abonos a nivel mundial.

Entre los métodos comunes de análisis se encuentran, el método de Robertson, el cual es aplicable en presencia de cianamida de calcio y urea, el método de Jones, el cual es una modificación del método de Robertson y es aplicable cuando no es necesario determinar el nitrógeno soluble en agua y el método de electrodo selectivo a nitrato (AOAC International, 2000). Otros métodos empleados en la cuantificación de nitratos son el método de oxidación de compuestos orgánicos como la brucina y la difenilamina en presencia de nitrato y el método de nitración de compuestos fenólicos como el ácido fenoldisulfónico, el ácido cromotrópico, el 2,4-xilenol, el 2,6-xilenol y el ácido salicílico los cuales emplean detección colorimétrica en la cuantificación. Otros métodos instrumentales empleados en la cuantificación de nitrato son el método del test rápido nitrógeno – nitrato en el cual el desarrollo de color implica la reducción de nitrato a nitrito; los métodos

potenciométricos y la cromatografía, dentro de esta última la cromatografía gaseosa (CG) y la cromatografía líquida de alta eficacia son las más empleadas (Sah, 1994).

La mayoría de estos procedimientos están sujetos al menos una de las siguientes limitaciones: baja tolerancia a interferencias (por ejemplo, materia orgánica soluble), rango analítico limitado, necesidad de automatizado o equipo especializado, o requieren un manejo especial de muestras que alarga el tiempo de análisis (Baird et al., 2017). Autores como Cataldo et al (1975), refieren que el método de nitración del ácido salicílico está relativamente libre de las limitaciones anteriores por lo que resulta adecuado para la cuantificación de nitrógeno total en forma de nitrato. En este método el complejo se forma en condiciones fuertemente ácidas y presenta máxima absorción a una longitud de onda de 410 nm en soluciones básicas ( $\text{pH} > 12$ ). La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de  $\text{N-NO}_3^-$  presente en la muestra y los iones  $\text{NH}_4^+$ ;  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{Cl}^-$  no interfieren en la cuantificación, por lo cual resulta ser un método rápido y sensible con un rango lineal de aplicación de 0,5-50 mg de  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  (Cataldo et al., 1975).

### **1.5.2 Determinación de fósforo total**

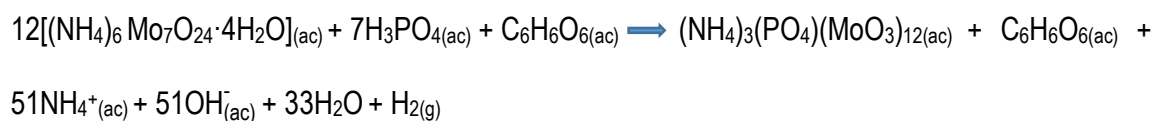
La forma común de encontrar el fósforo en fertilizantes y productos afines es en forma de fosfatos tanto orgánicos como inorgánicos, de allí la necesidad de analizar diferentes tipos de fósforo presentes en los mismos, los cuales son: el fósforo total, el fósforo hidrosoluble (dihidrogenofosfato de calcio)  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , el fósforo insoluble en agua formado por el fosfato de calcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , el fósforo insoluble en citrato y fósforo asimilable formados por los fosfatos  $\text{Ca}(\text{HPO}_4)$  y  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ . Los análisis de los diferentes tipos de fósforo implican la realización de una etapa de extracción y otra de determinación. La primera requiere el uso de reactivos específicos para extraer las formas

de fósforo que se desean determinar y una vez obtenidos los extractos se puede cuantificar este elemento utilizando métodos clásicos e instrumentales de análisis (Paneque-Pérez et al., 2010).

El fósforo total se determina en muestras sin filtrar porque en ellas están presentes todas las formas de fósforo y debido a que el mismo puede estar presente en combinación con materia orgánica e inorgánica. Para esto es necesario preparar la muestra mediante un método de digestión capaz de oxidar la materia para liberar el fósforo como ortofosfato, para su posterior determinación por el método seleccionado. Dentro de los procesos de digestión recomendados se encuentran la digestión con ácido perclórico, la digestión ácido sulfúrico – ácido nítrico y la digestión oxidativa con persulfato, la cual es considerada como la técnica de digestión más simple (Baird et al., 2017). Algunos de los métodos empleados en la cuantificación de fósforo total en fertilizantes son el método espectrofotométrico del molibdatovanadatofosfato, el método gravimétrico del molibdofosfato de quinolinio y el método alcalimétrico del molibdofosfato de quinolinio  $\{(C_9H_7N)_3H_3[PO_4 \cdot 12MoO_3]\}$ .

En el marco de este trabajo se emplea una técnica espectrofotométrica para la cuantificación de fósforo total en fertilizantes, ya que al ser comparada con los métodos alcalimétricos y volumétricos de análisis, resulta ser más fiable, más rápida y de manera general emplea menor cantidad de reactivos en el análisis.

Las técnicas espectrofotométricas empleadas en la cuantificación de fósforo total poseen el mismo principio, el cual está fundamentado en lo siguiente: cuando el ácido fosfórico se pone en contacto con el ácido molibdico y un agente reductor como el cloruro de estaño(II), el ácido ascórbico, y el ácido vanadomolibdofosfórico se forma un heteropoliácido con una determinada coloración, la cual dentro de ciertos límites es proporcional a las concentraciones de fósforo en la muestra (Paneque-Pérez et al., 2010). Estos métodos se rigen por la siguiente reacción química:



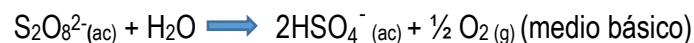
En el método del ácido vanadomolibdofosfórico la coloración del complejo es amarilla y se adapta al análisis de soluciones que contienen entre 1 y 20 mg de fósforo por litro, este método no es aplicable a materiales que produzcan soluciones coloreadas o que puedan formar complejos con el ion molibdovanadato, mientras que los métodos basados en el desarrollo del color azul (a base de cloruro de estaño(II) o de ácido ascórbico) son más adecuados para soluciones con concentraciones bajas de fósforo de 0,01 a 6 mg de fósforo por litro, como las presentes en suelos y aguas. Autores como Baird et al. (2017), refieren que estos dos últimos métodos poseen mayor sensibilidad que el método del ácido vanadomolibdofosfórico. Sin embargo, estudios como los realizados por De Katsner, (1959) demuestran que cuando se emplea al cloruro de estaño(II) como agente reductor se presenta una aparente desviación de la ley de Lambert Beer (De Katsner, 1959). Al comparar los métodos que emplean al ácido ascórbico y al cloruro de estaño(II) como agentes reductores autores como García y Ballesteros (2006), sostienen que el método más sensible y con los mejores límites de detección y cuantificación para la determinación de fósforo total es el que emplea como agente reductor al ácido ascórbico; en este método los valores tanto de los coeficientes de variación, como el de las desviaciones estándar resultan ser menores que los valores obtenidos para el método del cloruro de estaño(II) (García y Ballesteros, 2006). Por lo anteriormente expresado se selecciona, en el marco de este trabajo, el método del ácido ascórbico para la cuantificación de fósforo total.

### 1.5.3 Digestión con persulfato para la determinación de nitrógeno y fósforo totales

La digestión con persulfato es un método ampliamente recomendado para la determinación simultánea de nitrógeno y fósforo totales (Studt et al., 2020, Dayton et al., 2017, Patton y Kryskalla,

2003, Baird et al., 2017). Los autores de estos estudios refieren que este método resulta ser más confiable, sensible, preciso y seguro para el medioambiente cuando es comparado con el método de Kjeldahl, ya que también incluye en el proceso de digestión a todas las formas en las que se encuentra al nitrógeno, siendo esta última una limitación presente en el método de digestión de Kjeldahl (Miles M. Smartt et al., 1981, Patton y Kryskalla, 2003).

El método de digestión con persulfato cubre un rango amplio de pH que permite la oxidación de ambos compuestos. En este método hay tres procesos que ocurren de forma simultánea: la descomposición térmica del persulfato, la remoción del persulfato por la reacción con el material orgánico y la remoción del material orgánico hasta que es oxidado a sus componentes inorgánicos. Este método emplea concentraciones equimolares de iones hidroxilo y persulfato (1:2), por lo que en la fase inicial de la digestión el medio es alcalino (pH > 12), en esta etapa ocurre la oxidación de todas las formas de nitrógeno a nitrato. A medida que se realiza la digestión a altas temperaturas (120 °C), los iones hidrogenosulfato se neutralizan a partir de la descomposición térmica del persulfato y luego acidifican la mezcla reactiva mediante la siguiente reacción química:



En la fase final de la digestión el hidróxido de sodio se consume y el pH desciende hasta acidificar el medio (pH = 2) y, bajo estas condiciones, el fósforo disuelto se hidroliza a ortofosfato, concluyendo así el proceso de digestión. Los contenidos de nitrógeno y fósforo totales presentes en la muestra digestada se cuantifican empleando los métodos mencionados en los epígrafes anteriores.

#### **1.5.4 Determinación de potasio**

Los portadores o fuentes de potasio utilizados en la producción de fertilizantes, por lo general, son sales solubles en agua ( $KCl$ ,  $K_2SO_4$ ,  $KNO_3$ ) y en el proceso de análisis solo se requiere disolver la muestra en agua y hacer la determinación de potasio (Paneque-Pérez et al., 2010).

Entre los métodos comunes de análisis de potasio en fertilizantes se encuentran el método de Lindo - Gladding, cuyo principio está basado en la obtención del hexacloruroplatino (IV) de potasio  $K_2[PtCl_6]$  el cual es insoluble en alcohol. Este método es aplicado generalmente en la determinación de pequeñas cantidades de potasio en muestras de origen biológico. Métodos como el del recobrado de platino, el método del tetrafenilborato de sodio y el método de digestión húmeda también son empleados cuando se necesita cuantificar potasio en fertilizantes y sus derivados (AOAC International, 2000).

Sin embargo, el método más actual y difundido para la cuantificación de potasio es la espectrometría de absorción atómica ya que resulta ser una técnica más sensible, reproducible, simple y económica para la cuantificación de potasio.

#### **Fundamentos de la espectrofotometría ultravioleta – visible.**

La espectrofotometría, en especial en la región visible del espectro electromagnético, tal vez sea uno de los métodos de análisis más usados en la determinación de sustancias que pueden convertirse en derivados coloreados en forma selectiva (Christian, 2009). La espectrofotometría utiliza las interacciones de la radiación electromagnética con la materia para obtener información sobre una muestra. En las regiones ultravioleta y visibles del espectro electromagnético, la muestra se estimula aplicándole energía en la forma de radiación electromagnética. Antes de aplicar el estímulo, el analito está predominantemente en su estado energético más bajo, es decir, en el

estado basal. Entonces, el estímulo hace que algunas de las especies del analito transiten hacia un estado energético superior o estado excitado (Skoog et al., 2008).

La radiación monocromática, ya sea emitida por un LED (diodo emisor de luz, siglas en inglés) o una lámpara y un filtro óptico, pasa a través de una cubeta, con un camino óptico ( $d$ ) fijo, conteniendo la muestra. El logaritmo de la relación de las intensidades de radiación electromagnética ( $P$ ) antes y después de pasar a través de la solución es llamada absorbancia ( $A$ ) y se encuentra en una proporción directa a la concentración ( $c$ ) del componente absorbente de acuerdo con la Ley de Lambert – Beer. A la constante  $\epsilon$  se le llama absorptividad molar, la cual depende de la naturaleza del material absorbente y de la probabilidad de transición.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon \cdot c \cdot d \text{ (Ecuación 1)}$$

Es posible hacer cálculos cuantitativos cuando dos o más especies absorbentes en solución tienen espectros que se superponen. De acuerdo con la Ley de Lambert- Beer, la absorbancia total  $A$ , a determinada longitud de onda, es igual a la suma de las absorbancias totales de todas las especies absorbentes. Cuando hay dos especies absorbentes, dicho comportamiento se describe en la siguiente ecuación

$$A = A_1 + A_2 = \epsilon_1 c_1 d + \epsilon_2 c_2 d \text{ (Ecuación 1.1)}$$

Como muchas leyes físicas, la Ley de Lambert - Beer es una formulación idealizada de un proceso natural. De hecho, la relación entre la absorbancia y la concentración solamente es lineal hasta un valor cercano de 1.0 a 1.5 unidades de absorbancia (dependiendo del compuesto químico). Una absorbancia de 1.5 indica que solamente el 3 % de la luz incidente pasa a través de la cubeta (Hansen y Koroleff, 1999). Esta ley concierne a solo una fracción de la luz absorbida y es válida teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

- La luz empleada debe ser monocromática.
- La concentración debe ser baja.
- La solución no debe ser ni fluorescente, ni heterogénea.
- El soluto no debe someterse a transformaciones fotoquímicas.
- El soluto no debe establecer interacciones variables con el soluto.

Las transiciones que ocurren en la región ultravioleta visible son de tipo electrónicas entre orbitales  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ;  $n \rightarrow \sigma^*$ ;  $\pi \rightarrow \pi^*$ ;  $n \rightarrow \pi^*$ , transferencia de cargas y, por último, campos de ligandos. Estas transiciones se deben a la absorción de radiación electromagnética por tipos específicos de grupos cromóforos, enlaces y grupos funcionales de la especie química. La longitud de onda de absorción, y su intensidad, depende de la naturaleza de la especie química.

La longitud de onda de absorción es una medida de la energía ( $h\nu$ ) que se requiere en la transición. A los grupos covalentes insaturados que absorben radiación electromagnética en una especie química se les llama cromóforos. Por lo general un grupo cromóforo es un fragmento de entidad química la cual es responsable de originar las transiciones electrónicas, ejemplos de cromóforos son los grupos vinilo, carbonilo, fenilo y nitro y a la entidad química que contiene un cromóforo se le llama cromógeno.

El equipo utilizado para la técnica de espectrofotometría ultravioleta-visible es un espectrofotómetro, el cual descompone la radiación policromática en distintas longitudes de onda. Todos los espectrofotómetros están constituidos por una fuente de radiación continua en las longitudes de onda que interesan, un monocromador para seleccionar una banda estrecha de longitudes de onda del espectro de la fuente, una celda para la muestra, un detector o transductor, para convertir la energía radiante en energía eléctrica y un sistema de lectura para interpretar la

respuesta del detector. La muestra puede estar antes o después del monocromador. Entre los tipos de espectrofotómetros, se encuentra el espectrofotómetro de doble haz (Figura 1), el cual tiene dos haces de radiación uno para la muestra y otro para la referencia. (Christian, 2009).

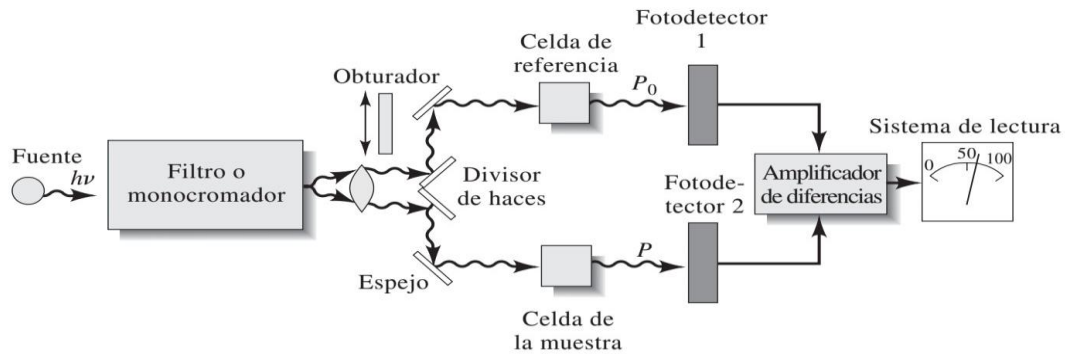


Figura 1. Diseño instrumental para un espectrofotómetro de doble haz para la región UV-VIS.

La radiación proveniente del filtro o monocromador se divide en dos haces que atraviesan de manera simultánea las celdas de referencia y de la muestra antes de chocar con los fotodetectores que se han hecho corresponder con el amplificador de diferencias (Skoog et al., 2008).

Cuando se realiza el análisis para un componente, en la práctica, el primer paso es la construcción de una curva de la calibración de las soluciones de concentración conocida del compuesto a ser medido, el cual es sometido al mismo tratamiento de la muestra. Esta curva es a menudo una línea recta cuando se emplean soluciones diluidas.

Cuando se realiza el análisis de multicomponentes y se tiene una mezcla de compuestos cuyos espectros de absorción son conocidos, es posible determinar la composición de la mezcla. El método empleado con este fin se basa en la medición de la absorción de los componentes puros de manera individual y calibrando mezclas de composición bien definida. Según la ley de aditividad (ecuación 1.1), el espectro de la mezcla a ser medido corresponde a la suma ponderada de los espectros de cada uno de los constituyentes. Existen varios métodos de cálculo para el análisis de

muestras multicomponentes, entre los que se encuentran el método algebraico básico, el análisis de regresión lineal a múltiple longitud de onda, entre otros, aunque en la actualidad la realización de estos cálculos se efectúa empleando software especializados (Rouessac y Rouessac, 2007).

## **1.6 Verificación de métodos analíticos**

La utilización de métodos experimentales ha sido una de las principales vías mediante la cual se contribuye a los actuales conocimientos científicos. Las mejoras o verificaciones de estos procedimientos permiten disminuir la incidencia de errores en los ensayos aplicados. Se puede definir verificación como la "confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados", es decir, el laboratorio debe confirmar su capacidad para aplicar el método (Morillas y al., 2016). Existen características que definen la aptitud de un método analítico para el uso al que se destina, esto implica que debe realizarse algún trabajo experimental para demostrar que el método funciona adecuadamente en el laboratorio. Los parámetros a evaluar en la verificación de un método de análisis químico son los siguientes: exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación y especificidad siempre que proceda (AOAC International., 2007). En el marco de este trabajo solo se describirán los parámetros que se emplearán para la adecuada verificación de los métodos de análisis empleados.

### **1.6.1 Parámetros implementados en la verificación de los métodos**

#### **Determinación de errores burdos**

Para caracterizar las variaciones al azar que inevitablemente ocurren durante estudios cuantitativos usualmente es necesario hacer mediciones replicadas. También se conoce que cuando tales replicados se realizan, es común encontrar que uno o más de los resultados difieren del resto. El tratamiento adecuado de tales valores sospechosos es un área de gran importancia en el desarrollo de estos estudios (Araujo, 2009). Un error burdo se puede definir como una observación en un

conjunto de datos que parece ser inconsistente dentro del conjunto. Una de las estrategias para minimizar el efecto de los errores burdos es tratar de identificarlos y distinguirlos de cualquier variación casual, permitiendo al analista inspeccionar los datos sospechosos y, si es necesario, corregir o remover los valores erróneos en el análisis. Existen varias pruebas para comprobar la presencia o no de errores burdos, siendo las más comúnmente empleadas la prueba de Dixon, la de Grubbs y la de Cochran (Ellison et al., 2009). Tres pruebas para detectar errores burdos en una distribución normal fueron desarrolladas y extendidas por F. E. Grubbs, todas usan estadísticas basadas en las desviaciones estándar. La primera de estas es una prueba para un solo valor errático. La segunda prueba es para un par de valores erróneos a extremos opuestos del conjunto de datos y la tercera busca valores erráticos sobre el mismo extremo de conjunto de datos (Walsh et al., 2016 , Analytical Methods Committee AMCTB No. 69, 2015).

En este trabajo se emplea la primera prueba de Grubbs. Para esta se calculan dos estadígrafos:  $G'_{\min}$  y  $G'_{\max}$ .

$$G'_{\min} = \frac{X_{\text{prom}} - X_1}{s}$$

$$G'_{\max} = \frac{X_n - X_{\text{prom}}}{s}$$

Donde,  $X_{\text{prom}}$  es el valor promedio de los valores replicados,  $X_1$  es el valor mínimo de los valores replicados,  $X_n$  es el valor máximo de los valores replicados y  $S$  es la desviación estándar de los valores replicados.

Si  $G_{\text{mín}}$  y/o  $G_{\text{máx}}$  exceden el valor crítico para un determinado nivel de confianza (usualmente 95 %) los valores probados se consideran errores burdos (Analytical Methods Committee AMCTB No. 69, 2015).

### 1.6.2 Sesgo proporcional y sesgo constante

Un método comúnmente empleado en los análisis químicos es la calibración externa, el cual simplifica considerablemente el protocolo a seguir, ya que los estándares de calibración se preparan como disoluciones simples del analito. Lo anterior puede traer consecuencias erráticas en el análisis, por lo que los posibles efectos matrices que provienen de la muestra deben ser analizados. Una herramienta muy útil para comprobar la posible presencia de sesgo constante y de sesgo proporcional debidos al efecto matriz es el método de adición de estándar (SAM, siglas en inglés) (González y Herrador, 2007) y el método de Youden (Maroto et al., 2003, Ellison et al., 2009). Estos procedimientos asumen que la matriz de la muestra no contribuye a la señal como un agente interferente y que no existe interacción entre el analito y la matriz. Se puede definir sesgo como la diferencia entre el promedio calculado de los resultados de medición y un valor de referencia aceptado, o bien como el error sistemático total, pudiendo existir uno o más componentes de error sistemático que contribuyen al sesgo.

Dos herramientas muy útiles para probar la presencia del sesgo proporcional (recobrado,  $R$ , significativamente diferente de 1) y sesgo constante (desplazamiento de la señal analítica,  $\delta_c$ , significativamente diferente de 0), debido a los efectos de la matriz, son el método de adición de estándar y el método de Youden respectivamente (González et al., 2005).

Cuando el método de adición de estándar es aplicado a porciones representativas de una muestra real se obtienen las siguientes ecuaciones (González y Herrador, 2007):

$$\hat{Y} = a_{\text{SAM}} + b_{\text{SAM}} \cdot C_{\text{añadida}}$$

donde:

$\hat{Y}$ : valor de la respuesta analítica para las muestras a partir del método de adición de estándar

$a_{SAM}$ : es el intercepto de la línea recta obtenida a partir del método de adición de estándar

$b_{SAM}$ : es la pendiente de la línea recta obtenida a partir del método de adición de estándar

$C_{añadida}$ : es la concentración del analito adicionado

$$R = \frac{b_{SAM}}{b}$$

donde:

R, es el recobrado de consenso y b es la pendiente de la línea recta de calibración de los estándares de calibración. La ausencia de sesgo proporcional corresponde a  $b_{SAM} = b$ , o, en términos del recobrado,  $R = 1$ . Esto debe ser chequeado para la significación estadística:

$t = \frac{|R-1|}{u(R)}$ , el valor de la t de Student se compara con el valor tabulado para 2 colas y n-1 grados de

libertad y un determinado nivel de confianza, usualmente 95% (Ellison et al., 2009). Si  $t \leq t_{tab}$  el recobrado de consenso no es significativamente diferente de 1, es decir, no hay sesgo proporcional (González y Herrador, 2007).

El método de Youden consiste en analizar dos o más cantidades diferentes (masas o volúmenes) de una muestra que es representativa de las muestras de rutina. Para el caso más simple de este método solo se analizan dos cantidades diferentes de una muestra rutinaria. En este caso, el sesgo

constante se puede estimar a partir de la siguiente expresión matemática  $\delta_{ct} = \frac{W_m \cdot \bar{X}_n - W_n \cdot \bar{X}_m}{W_m - W_n}$ , donde

$\bar{X}_n$  y  $\bar{X}_m$  son los promedios de los resultados analíticos obtenidos cuando se analizan las cantidades de muestras  $W_m$  y  $W_n$ , respectivamente y  $\delta_{ct}$  es el sesgo constante. La ausencia de sesgo constante en el procedimiento analítico debe ser comprobado para la significación estadística

empleando el siguiente estadígrafo:  $t = \frac{|\delta_{ct}|}{u(\delta_{ct})}$  donde  $u(\delta_{ct})$  es la incertidumbre debido a la estimación del sesgo constante. Si  $t \leq t_{\alpha/2, n_{ef}}$  el sesgo constante no es significativo estadísticamente, siendo  $\alpha$  el nivel de significación (usualmente 0,05),  $n_{ef}$  los grados efectivos de libertad y  $t_{\alpha/2, n_{ef}}$  es la  $t$  de Student de dos colas tabulada. Si el sesgo constante es significativo el procedimiento debe ser revisado (Maroto et al., 2001). Sin embargo, se pueden encontrar autores que señalan que si durante el estudio del efecto matriz, existen sesgo proporcional y sesgo constante, entonces el valor de la concentración estimada corregida para el analito será:  $Z = \frac{Z_{hallada} \cdot \delta_{ct}}{R}$ , donde  $Z_{hallada}$  es la concentración no corregida del analito (González y Herrador, 2007).

### 1.6.3 Bondad de ajuste

#### Análisis de la regresión

La función respuesta curva de calibración de un método analítico es una relación monotónica entre la señal analítica (respuesta) y la concentración del analito. La función respuesta puede ser lineal, pero modelos no – lineales son también observados. La función respuesta se obtiene usando estándares de calibración preparados en ausencia de la muestra matriz y relacionando la respuesta con la concentración (González y Herrador, 2007).

Existen varias definiciones en relación con la linealidad. Sin embargo, la definición de linealidad se puede resumir como la capacidad del método para obtener resultados de ensayos que son directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango dado (Sanagi et al., 2010). Dentro de los modelos de estudio, el más simple es el lineal, muy a menudo hallado en la metodología analítica, conduciendo a predicciones de las respuestas de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_i$$

Donde:

$Y_i$ : es el valor observado de la respuesta

$X_i$ : es la concentración del analito

$\beta_0$  y  $\beta_1$ : son el intercepto y la pendiente respectivamente

Para hallar los mejores valores estimados de los parámetros de regresión  $\beta_0$  y  $\beta_1$  se emplea el método de los mínimos cuadrados, en el cual se considera la siguiente expresión matemática:

$Q = \sum_{i=1}^n (Y_i - \beta_0 - \beta_1 \cdot X_i)^2$ . De acuerdo con este método los estimadores de  $\beta_0$  y  $\beta_1$  son aquellos valores que minimizan el criterio Q para las observaciones dadas (Kutner et al., 2005). El método de los mínimos cuadrados asume que las observaciones Y para cada X son independientes, están normalmente distribuidos y que las distribuciones de Y tienen la misma varianza ( $\sigma^2$ ) (Miller y Miller, 2010).

### **Significación estadística de la regresión**

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan a una línea recta es necesario calcular los coeficientes de correlación producto – momento, comúnmente conocido como coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Las expresiones matemáticas para calcular estos coeficientes se pueden encontrar en diversas bibliografías (Miller y Miller, 2010, Kutner et al., 2005, Ellison et al., 2009).

El coeficiente de correlación refleja el grado de relación entre las variables "x" e "y"; si r es cercano a cero, el ajuste es pobre y la correlación es débil o no existe; si r es cercano a la unidad, el ajuste es bueno y esto es indicativo de una fuerte correlación entre "x" e "y". El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es otro parámetro que reafirma la correlación existente entre las variables "x" e "y", su valor debe ser mayor o igual que 0.98.

A menudo es necesario emplear una prueba estadística para comprobar si el coeficiente de correlación es significativo, considerando el número de puntos empleados en el cálculo. El método más simple es calcular un valor de la t de Student usando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

donde:

t: es la t de Student

n: es el número de puntos empleados para calcular el coeficiente de correlación

El valor calculado de la t de Student es comparado con el valor tabulado al nivel de confianza deseado (usualmente 95 %), usando una prueba de dos colas para n-2 grados de libertad (Miller y Miller, 2010).

Para el análisis del intercepto y la pendiente usualmente se emplea una tabla ANOVA, la cual forma parte de los resultados obtenidos en el análisis de la regresión implementado en diversos softwares estadísticos. A partir de esta tabla se pueden utilizar los valores de los estadígrafos t de Student y el valor  $p$  relacionado para comparar si la pendiente y el intercepto son significativamente distintos de cero.

En un experimento de calibración la pendiente debe ser diferente de cero ya que es esencial que los valores de las respuestas y la concentración estén altamente correlacionados. Para un 95 % de confianza, el valor  $p$  debe ser muy pequeño ( $\alpha < 0,05$ ) y el valor de la t de Student experimental debe ser mucho mayor que el valor crítico. Si el intercepto no es significativamente diferente de cero, el valor de la t Student experimental debe ser menor que el valor crítico y el valor  $p$  será mucho mayor que el valor de significación esperado (usualmente  $\alpha = 0,05$ ). Además, la significación estadística del intercepto se puede determinar inspeccionando el intervalo de

confianza del intercepto. Si este contiene el 0 entonces el intercepto no es significativamente diferente de cero (Ellison et al., 2009).

Los intervalos de confianza para los estimados de la pendiente y el intercepto se calculan a través de las siguientes ecuaciones matemáticas (Ellison et al., 2009, Miller y Miller, 2010).

$$b \pm t \cdot S_b$$

$$a \pm t \cdot S_a$$

donde:

a y b: son el intercepto y la pendiente respectivamente

$S_a$  y  $S_b$ : son las desviaciones estándar para los estimados del intercepto y la pendiente respectivamente y t es el valor de la t de Student de dos colas al nivel de significación requerido (generalmente  $\alpha = 0,05$ ) y con n-2 grados de libertad, siendo n el número de observaciones.

Para verificar la linealidad generalmente se emplean varios métodos, entre los cuales se encuentra la prueba de Falta de Ajuste (LOF por sus siglas en inglés) (Kutner et al., 2005).

La prueba de Falta de Ajuste se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales empleadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello tener más de una réplica de algunas de las parejas de datos. Para llevar a cabo la prueba de falta de ajuste, la variabilidad total de las respuestas se descompone en la suma de cuadrados debido a la regresión y la suma de cuadrados de los residuales. La suma de cuadrados de los residuales se divide en la falta de ajuste (desviación de la linealidad) y la suma de cuadrados del error puro (a partir de los puntos repetidos) (Kutner et al., 2005, González y Herrador, 2007). La suma de cuadrados total de las desviaciones de  $y_{ij}$  del promedio se denomina  $SS_{total}$  y se descompone en tres sumas de cuadrados:

debido a la regresión (SSreg), debido la falta de ajuste (SSlof, por sus siglas en inglés) y debido al error puro (SSpe, por sus siglas en inglés):

$$SS_{total} = SS_{reg} + SS_{res}$$

donde,

$$SS_{res} = SS_{lof} + SS_{pe}$$

así, finalmente,

$$SS_{total} = SS_{reg} + SS_{res} + SS_{pe}$$

El estadígrafo para comprobar la falta de ajuste se calcula como  $F^* = \frac{\frac{SS_{lof}}{c-2}}{\frac{SS_{pe}}{n-c}} = \frac{MSS_{lof}}{MSS_{pe}}$

donde:

MSS<sub>lof</sub>: cuadrado medio de la falta de ajuste (siglas en inglés)

MSS<sub>pe</sub>: cuadrado medio del error puro (siglas en inglés)

n: es el número total de observaciones

c: es el número de niveles de concentraciones

El estadígrafo  $F^*$  se compara con el valor crítico  $F_{crit}(1 - \alpha; c - 2, n - c)$ . Si  $F^* \leq F_{crit}$  se concluye entonces que la regresión es lineal (Kutner et al., 2005). A este tipo de linealidad se denomina linealidad "in-line" (Rodríguez et al., 1996, González y Herrador, 2007).

Dentro del reino de los modelos lineales algunos autores consideran dos características: la linealidad "in-line" y la linealidad "on-line" (Rodríguez et al., 1996). La linealidad "in-line" se refiere a la linealidad del modelo evaluado por la falta de ajuste (presencia de curvatura) y la linealidad "on-line" se refiere a la dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración y se basa en la desviación estándar relativa de la pendiente:

$$RSD_b = \frac{S_b}{b}$$

donde:

$RSD_b$ : es la desviación estándar relativa de la pendiente (siglas en inglés)

$S_b$ : es la desviación estándar de la pendiente

$b$ : es el valor de la pendiente obtenida por el método de los mínimos cuadrados. Este valor se toma como otro parámetro característico de desempeño y depende del valor máximo aceptado para  $RSD_b$  tal que un umbral típico puede ser  $RSD_b \leq 5\%$  (González y Herrador, 2007, Kutner et al., 2005).

### **Sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación**

La sensibilidad es el cambio en la respuesta analítica dividido por el correspondiente cambio en la concentración del analito (González y Herrador, 2007, Ellison et al., 2009), es decir, a un valor dado de la concentración del analito  $Z_0$ , la sensibilidad será determinada por la siguiente ecuación:

$$\text{sensibilidad} = \left( \frac{dY}{dZ} \right)$$

Si la calibración es lineal, la sensibilidad es justamente la pendiente (González y Herrador, 2007, Prichard y Barwick, 2007).

La sensibilidad analítica corresponde a la linealidad on - line de la pendiente de la recta de calibración, es decir, a la señal o respuesta por unidad de concentración. Este parámetro indica la menor variación de concentración que el método analítico es capaz de detectar siendo característico del método de calibración instrumental e independiente del equipo empleado y de la transformación matemática llevadas a cabo para leer las mediciones, pudiendo ser empleado como un criterio de comparación (Rodríguez et al., 1993). Su valor numérico es determinado por la siguiente ecuación:

$$\text{sensibilidad}_{\text{calibrado}} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Donde  $b$  es el valor de la pendiente y  $S_{y/x}$  la desviación estándar de los residuales.

El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede ser detectada y confiablemente distinguida de cero (o del nivel del ruido del sistema), pero no necesariamente cuantificado. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito que puede ser determinada cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión (Eurachem, 2005, Shrivastava y Gupta, 2011).

El límite de detección en unidades de señal analítica se estima comúnmente usando la siguiente expresión:

$$Y_{LOD} = Y_{\text{blanco}} + 3s_{\text{blanco}}$$

donde:

$Y_{LOD}$ : es el valor de la señal analítica correspondiente al límite de detección (siglas en inglés)

$Y_{\text{blanco}}$ : es el valor de la señal analítica correspondiente a los blancos de muestra

$S_{\text{blanco}}$ : desviación estándar de las muestras de los blancos de muestra

El procedimiento para expresar el límite de cuantificación en unidades de la señal analítica es equivalente al del límite de detección, pero usando un factor de 10 en lugar de 3. Estos límites se pueden expresar en unidades de la señal analítica en cuestión, pero expresado de esta manera son difíciles de manipular. Los límites de cuantificación y de detección se expresan de mejor manera en términos de la concentración del analito empleando la función de calibración (González y Herrador, 2007, Shrivastava y Gupta, 2011)

$$Z_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - a}{b}$$

donde:

$Z_{LOD}$ : es la concentración del analito correspondiente al límite de detección (siglas en inglés) a y b son el intercepto y la pendiente de la línea recta obtenidos por el método de los mínimos cuadrados. Entonces, el valor del límite de detección, considerando intercepto cero, es:

$$Z_{LOD} = \frac{3S_{\text{blanco}}}{b}$$

Para expresar el límite de cuantificación en unidades de concentración se utiliza una expresión matemática equivalente a la del límite de detección, pero usando un factor de 10 en lugar de 3 (Shrivastava y Gupta, 2011).

### 1.7 Estudio de exactitud

La exactitud es una entidad con dos componentes (veracidad y precisión) pero considerada como una entidad global (Morillas y al., 2016, González y Herrador, 2007). Un estudio de exactitud involucra la determinación de la veracidad, la precisión y la robustez, así como la estimación de la incertidumbre de la medición y de los perfiles de exactitud.

Se puede evaluar la precisión a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La repetibilidad expresa la precisión evaluada bajo las mismas condiciones experimentales sobre un corto periodo de tiempo. La precisión intermedia se aplica a variaciones dentro de un mismo laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipamientos entre otros aspectos. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios como en los estudios colaborativos.

La precisión intermedia puede ser determinada según González y Herrador (2007) como:

$$S^2_R = S^2_r + S^2_B$$

donde:

$S^2_R$ : es la varianza de la precisión intermedia

$S^2_r$ : es la varianza de la repetibilidad

$S^2_B$ : es la varianza entre condiciones (analistas)

A partir de estos datos, se calculan las correspondientes desviaciones estándar relativas ( $RSD_r$  y  $RSD_R$ ).

En el año 1982 Horwitz diseñó una expresión para predecir el valor esperado de las desviaciones estándar relativas para la reproducibilidad interlaboratorio:

$\% PRSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$  en esta ecuación,  $c$ , corresponde al valor de la concentración del analito en fracciones decimales.

Sin embargo, un modelo más contemporáneo ha demostrado que la relación anterior se representa mejor si 3 ecuaciones se usan para cubrir desde las altas a las bajas concentraciones (Prichard y Barwick, 2007):

Si  $c < 1,2 \cdot 10^{-7}$  el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,22c$$

Si  $1,2 \cdot 10^{-7} \leq c \leq 0,138$  el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,02c^{0,8495}$$

Si  $c > 0,1387$  el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,01c^{0,5}$$

Para análisis repetidos llevados a cabo por un solo operador en un solo laboratorio en validaciones/verificaciones intralaboratorio  $\% RSD_r = 0,2$  a  $0,3$  veces  $\% PRSD_R$  mientras que para la precisión intermedia  $\% RSD_R = 0,2$  a  $1$  veces  $\% PRSD_R$  (Prichard y Barwick, 2007, González y Herrador, 2007).

# CAPÍTULO II

## MATERIALES Y MÉTODOS

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe la etapa experimental de la investigación desarrollada, se especifican los reactivos, materiales, equipos y las condiciones a las cuales se efectúan los análisis.

### 2.1 Equipos, reactivos y preparación de las disoluciones

Para la determinación de fósforo total mediante espectrofotometría UV – Visible se empleó un espectrofotómetro UV-VIS L6S con celdas de 1 cm de camino óptico. Todo el material volumétrico utilizado estaba certificado por la Oficina Territorial de Normalización.

Para la cuantificación de fosforo total por el método del ácido ascórbico los reactivos empleados fueron heptamolibdato de amonio tetrahidratado  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ , ácido ascórbico anhidro ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) p.a, Merck, dihidrogenofosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a, Merck, tartrato de antimonio y potasio trihidratado  $\text{K}_2\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  p.a, Merck y ácido sulfúrico de Uni-Chem.

Para la preparación de la solución de heptamolibdato de amonio tetrahidratado se pesaron 4 g de este y fueron trasvasados a un matraz volumétrico de 50 mL y llevado hasta el aforo empleando agua destilada. Para la solución de ácido ascórbico se pesaron 1.76 g de este compuesto, los cuales fueron llevados a un matraz volumétrico de 50 mL, el cual fue enrazado empleando agua destilada. Para la preparación de la solución madre de dihidrogenofosfato de potasio se pesaron 0,11 g de este y se llevaron a un matraz volumétrico de 500 mL el cual fue enrazado con el fin de obtener una disolución de concentración igual a 50.0 mg/L de  $\text{PO}_4^{3-}$  (fosfato). La solución de tartrato de antimonio y potasio trihidratado fue preparada pesando 0.2743 g de este, y fueron trasvasados a un matraz volumétrico de 50 mL y llevados al aforo empleando agua destilada. La solución de ácido sulfúrico de concentración 2,5 mol/L se preparó tomando un volumen de 14 mL de este, el cual fue trasvasado a un matraz volumétrico de 50 mL y se enrazó con agua destilada. Para el

desarrollo del color en el método fue necesaria la preparación de un reactivo combinado (estable durante cuatro horas) con las siguientes proporciones para un volumen final de 50 mL:

- 25 mL de ácido sulfúrico (2,5 mol/L)
- 2,5 mL de la solución de tartrato de antimonio y potasio
- 7,5 mL de la solución de heptamolibdato de amonio
- 15 mL de la solución de ácido ascórbico

Para el proceso de digestión se empleó una solución combinada de hidróxido de sodio y persulfato de potasio. Para la preparación de este reactivo se tomaron 80 mL de agua desionizada en un matraz aforado de 100 mL a este se le agregaron 10 mL de solución madre de NaOH (1,5 mol/L) y 4 g de persulfato de potasio, luego esta solución se agitó durante 10 minutos, se enrazó el matraz y se mezcló completamente mediante inversión manual.

## **2.2 Evaluación de la linealidad, la repetibilidad y la precisión intermedia**

Para preparar las disoluciones de la curva de calibración se tomaron 5 matraces aforados de 25 mL a los cuales se añadieron 0,150; 0,250; 0,350; 0,450 y 0,600 mL de la solución de concentración 50 mg/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y fueron enrazados con agua destilada, estos volúmenes se correspondieron a concentraciones finales de 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 y 1,1 mg/L de  $\text{PO}_4^{3-}$  respectivamente. Seguidamente se vertieron 2 mL de cada estándar a matraces volumétricos de 10 mL a los cuales se agregaron 0,32 mL del reactivo combinado y se llevaron hasta el aforo. A continuación, se esperó a que desarrollara el color durante 10 minutos y luego el contenido se trasvasó a una cubeta de vidrio con paso óptico de 10 mm para la detección colorimétrica. Empleando un espectrofotómetro UV-VIS L6S se registró la señal analítica en el intervalo de tiempo establecido de 10 a 30 min, a una longitud de onda de 880 nm, a cada concentración se le realizaron 6 réplicas, obteniendo así la curva de calibración.

Para el proceso de digestión con persulfato en medio alcalino se tomó una relación 2:1 (v/v) de las soluciones acuosas de hidróxido de sodio y persulfato de potasio con la cual se formó el reactivo empleado en el proceso de digestión. De este reactivo 2 mL fueron añadidos a 4 mL de muestra en un vial de vidrio, el cual fue tapado y colocado en una plancha eléctrica de calentamiento a 120 °C durante 60 min. Una vez finalizada la digestión, se dejó que el tubo se enfriara hasta llegar a temperatura ambiente y luego se procedió con el análisis de estas de manera similar al tratamiento dado a los patrones.

Para determinar el comportamiento de la repetibilidad del método se realizó la lectura de las soluciones patrón de fosfato a los niveles de concentración mínimo (0,3 mg/L), medio (0,7 mg/L) y máximo (1,1 mg/L), todos comprendidos dentro del rango de estudio, para lo cual se realizaron diez réplicas en un mismo día, empleando el mismo equipo y analista en todos los casos. Como criterio para evaluar la repetibilidad se empleó el coeficiente de variación de las concentraciones.

El estudio de la precisión intermedia se realizó a los mismos niveles de concentración utilizados en la repetibilidad, pero considerando como el único factor de variabilidad los días de la realización de los análisis.

Para la comprobación estadística del procedimiento se realizó el análisis de la regresión y de la precisión, en cuanto a repetibilidad y precisión intermedia, realizando previamente la comprobación de la posible presencia de errores burdos mediante la primera prueba de Grubbs.

Para comprobar la linealidad de los datos primeramente se realizó un análisis estadístico que incluyó varias pruebas de proporcionalidad como son determinación del intervalo de confianza de la pendiente y del intercepto, así como la significación estadística de los mismos y se analizó, además, la significación estadística de la correlación. Para la evaluación de la linealidad se utilizó la prueba de falta de ajuste.

Los criterios de aceptación definidos para evaluar la linealidad del método analítico fueron:

- Coeficiente de correlación  $r > 0,990$
- Coeficiente de determinación  $R^2 > 0.98$
- El cumplimiento de la condición de proporcionalidad, que considera la inclusión del cero en el intervalo de confianza del intercepto (a)
- El valor del estadígrafo  $F_{exp} > F_{crítico}$
- El valor coeficiente de variación de los factores respuesta (no debe exceder el 5 %)
- Significación estadística de la varianza de la pendiente "b" de la recta de regresión
- La desviación estándar relativa de la pendiente " $S_{b (rel.)} (%)$ ", se utilizó como expresión matemática de la linealidad.
- Homocedasticidad

# CAPÍTULO III

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el marco de este capítulo se presentan y analizan los principales resultados obtenidos en el análisis de algunos parámetros de verificación implementados al método espectrofotométrico del ácido ascórbico empleado para la cuantificación de fósforo total en muestras del bioproducto CBQ-AgroG. Para ello se tienen en cuenta criterios como linealidad y precisión.

#### 3.1 Linealidad

En la tabla 1 se presentan los valores de absorbancia obtenidos durante el análisis de la linealidad, a los cuales se les realizó la determinación de errores burdos, donde se plantearon las siguientes hipótesis:

H<sub>0</sub>: No existen errores burdos

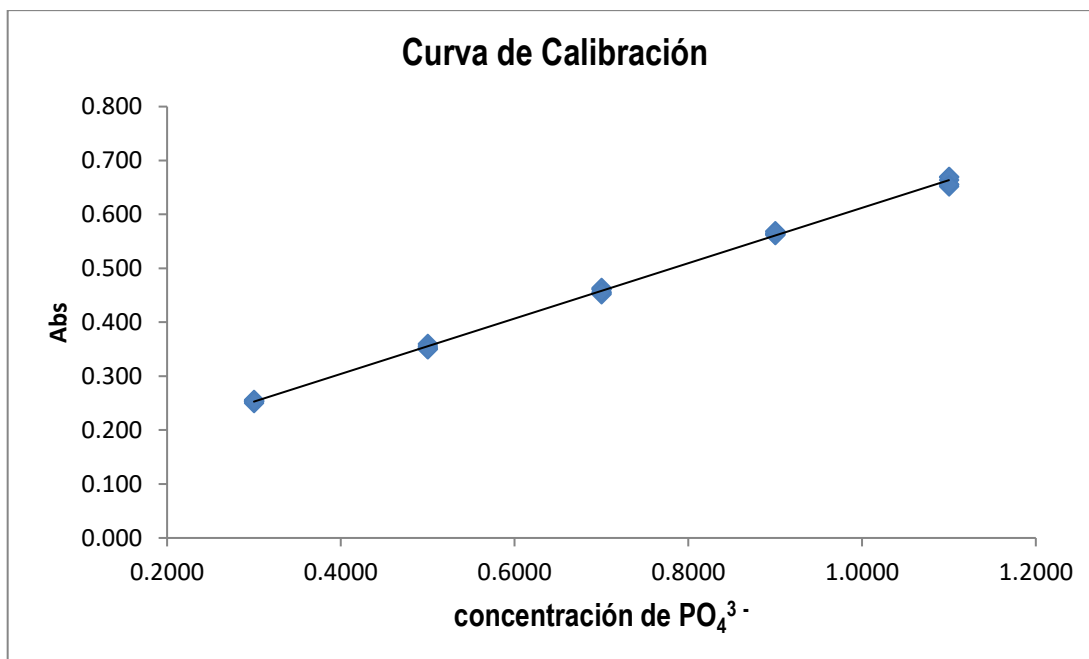
H<sub>1</sub>: Existen errores burdos

**Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos durante el desarrollo del método.**

Concentración en (mg/L)	Abs1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs 6	$\bar{X}$	S
0,3	0,256	0,254	0,255	0,250	0,253	0,253	0,254	0,002
0,5	0,351	0,352	0,351	0,360	0,356	0,350	0,353	0,004
0,7	0,461	0,462	0,464	0,454	0,452	0,456	0,458	0,005
0,9	0,564	0,562	0,563	0,569	0,565	0,568	0,565	0,003
1,1	0,652	0,656	0,664	0,670	0,655	0,669	0,661	0,008

En el análisis se obtuvo que en todos los casos y para un 95 % de confianza los valores de  $G_{exp}$  son menores que  $G_{crítico}$  (1.887), por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula y se concluyó que no existen errores burdos (Anexo 1).

La linealidad del método se evaluó mediante el análisis de la curva de calibración. Con los valores de las absorbancias medidas a los 5 niveles de concentración previamente establecidos en el intervalo de 0,3 a 1,1 mg/L de  $PO_4^{3-}$  se obtuvo la gráfica de absorbancia contra concentración (Figura 2).



**Figura 2. Curva de calibración**

Para comprobar si la regresión es lineal se procedió a un análisis estadístico apoyado en la construcción de la curva de regresión, el análisis de los residuos, la comprobación de la significación estadística de la correlación, del intercepto y de la pendiente y la prueba de falta de ajuste.

**Tabla 2. Parámetros estadísticos para el análisis de la linealidad**

Parámetro	Criterio de aceptación	Valor experimental
Número de datos (n)	-	30
Rango concentración (mg/L)	-	0,3-1,1
Ecuación de la recta	$y = bx + a$	$y = 0,513x + 0,098$
Intercepto	-	$0,513 \pm 0,006$
Pendiente	-	$0,098 \pm 0,005$
Coefficiente de correlación lineal (r)	$r > 0,990$	0,9994
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	$R^2 > 0,98$	0,9988
Intervalo de confianza de a (95 % de confianza)	que contenga al 0	0,094 - 0,104
Desviación estándar relativa a la pendiente ( $RSD_b$ )	$RSD_b \leq 5 \%$	0,3 %
Significación estadística de la correlación	$t_{exp} > t_{critica}$	$155,8427 > 2,0484$

Con el objetivo de verificar la significación estadística de la pendiente se plantearon las siguientes pruebas de hipótesis:

$$H_0: bx = 0$$

$$H_1: bx \neq 0$$

Como  $t_{exp} = 155,843 > t_{tab} = 2,068$  para un 95 % de confianza y 23 grados de libertad, se rechaza

la hipótesis nula; la pendiente es significativamente diferente de 0. Lo anterior se corrobora a partir

del p-valor menor que 0,05 (tabla anexo I), es decir existe una relación de proporcionalidad entre los valores de absorbancia y concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$ , por lo que este valor se incluye en el modelo.

Para el análisis del intercepto se propuso la siguiente hipótesis:

$H_0: a = 0$

$H_1: a \neq 0$

Como  $t_{\text{exp}} = 39,739 > t_{\text{tab}} = 2,068$  para un 95 % de confianza y 23 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula; el intercepto es significativamente diferente de 0. Lo anterior se corrobora a partir del p-valor (menor que 0,05), lo cual es suficiente evidencia estadística para plantear que este parámetro es significativamente distinto de 0 y se incluye en el modelo.

### 3.1.2 Bondad de ajuste

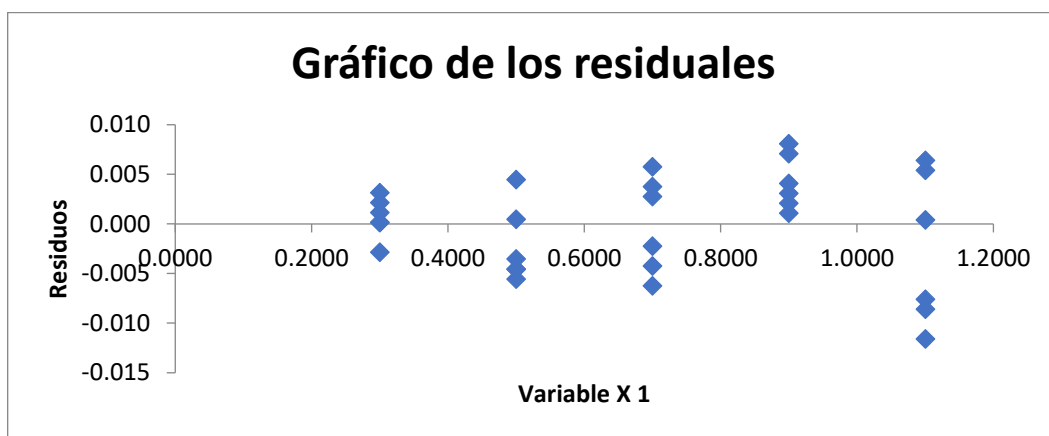
Para comprobar si existió correlación entre los valores de absorbancia y concentración se formuló la siguiente hipótesis:

$H_0 =$  no existe correlación entre la  $c(\text{PO}_4^{3-})$  y la absorbancia.

$H_1 =$  existe correlación entre la  $c(\text{PO}_4^{3-})$  y la absorbancia.

Como  $t_{\text{exp}} = 155,8427 > t_{\text{tab}} = 2,048$  para un 95 % de confianza y 23 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula; por lo que existe una correlación significativa entre la  $c(\text{PO}_4^{3-})$  y la absorbancia. Los resultados muestran un buen ajuste de la curva de calibración a los datos experimentales, debido a que el coeficiente de correlación tiene valor muy próximo a 1, lo que significa que existe correlación con una probabilidad elevada. El valor estadístico de R-cuadrado indica que el modelo de regresión lineal simple explica el 99,88 % de la variabilidad en la absorbancia mientras que el 0,12 % de la variabilidad queda explicado por otros factores.

Para comprobar la homogeneidad de varianza de las absorbancias (homocedasticidad) se presenta en la figura 3 un gráfico de los residuales obtenidos. Como se observa al graficar los residuales contra las concentraciones se obtienen los puntos distribuidos al azar alrededor del eje x, lo que indica que existe homocedasticidad.



**Figura 3. Gráfico de residuales de la curva de calibración.**

Para comprobar si los resultados experimentales se ajustan a un modelo lineal se formularon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \text{Abs} = bx + a \cdot c(\text{PO}_4^{3-})$$

$$H_1: \text{Abs} \neq bx + a \cdot c(\text{PO}_4^{3-})$$

Como  $F_{\text{exp}} = 0,06 < F_{\text{tab}} = 2,76$  para un 95 % de confianza y (4 y 25) grados de libertad entonces se acepta la hipótesis nula, por lo cual los resultados experimentales se ajustan a un modelo lineal (linealidad in-line, ausencia de curvatura). La linealidad on-line es igual a 99,36 % indicando que existe poca dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración.

Por todo lo anterior se puede afirmar que los resultados experimentales obtenidos por el método espectrofotométrico ultravioleta visible del ácido ascórbico para la determinación de la concentración de fosfato se ajustan a una línea recta.

### 3.2 Análisis de la repetibilidad y la precisión intermedia para la cuantificación de los contenidos de fosfato

Al realizar los replicados para el análisis de la precisión se tuvo en cuenta la repetibilidad y precisión intermedia. Se realizaron 10 determinaciones en tres niveles de concentración: mínimo (0,3 mg/L), medio (0,7 mg/L) y máximo (1,1 mg/L) de fosfato.

#### 3.2.2 Repetibilidad

Como parte del análisis de la repetibilidad del método se realizó la comprobación de errores burdos a los datos experimentales obtenidos, donde para uno de los valores correspondientes al nivel de concentración mínimo no se cumplió  $G_{exp} < G_{critico}$  para un 95 % de confianza, por lo que este valor fue excluido del análisis. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la repetibilidad al determinar el contenido de  $PO_4^{3-}$ .

**Tabla 3. Resultados de la repetibilidad del método.**

Concentración (mg/L)	Desviación estándar	Concentración Media	CV(%)
0,3	0,0068	0,3227	2,09
0,7	0,0095	0,7129	1,33
1,1	0,0205	1,0969	1,87

Como parte del análisis de repetibilidad correspondiente a la determinación de  $PO_4^{3-}$  se comprobó que en los tres niveles de concentración se cumplió que los coeficientes de variación experimentales son menores que los coeficientes de variación críticos (expresados ambos en porcentaje) (ver tabla 4), por lo cual se puede afirmar que la cuantificación es adecuadamente repetible bajo las condiciones de los ensayos realizados.

**Tabla 4. Coeficientes de Horwitz para el análisis de repetibilidad**

Coeficiente de Horwitz			
Concentración(mg/L)	CV (%)	0,20*RSD <sub>H</sub>	CV <sub>exp</sub> (%)
0,3	19,18	3,84	2,09
0,7	16,88	3,38	1,33
1,1	15,77	3,15	1,87

### 3.2.3 Precisión intermedia

Como parte del análisis de precisión intermedia del método se realizó la comprobación de errores burdos a los datos experimentales obtenidos, donde para todos los valores obtenidos se cumplió  $G_{exp} < G_{critico}$  para un 95 % de confianza, por lo que no hay presencia de errores burdos en este análisis.

**Tabla 5. Resultados de la precisión intermedia**

Concentración (mg/L)	Desviación estándar	Concentración media	CV(%)
0,3	0,011	0,3136	3,55
0,7	0,008	0,7076	1,24
1,1	0,018	1,0943	1,64

De los análisis de precisión intermedia de las determinaciones llevadas a cabo por el mismo analista en diferentes días, se comprobó que para el factor evaluado y en los tres niveles de concentración se cumplió que los coeficientes de variación experimentales son menores que los coeficientes de variación críticos (expresados ambos en porciento) (ver tabla 6), por lo cual se puede afirmar que la cuantificación es precisa bajo las condiciones de los ensayos realizados.

**Tabla 6. Coeficientes de Horwitz para el análisis de precisión intermedia**

<b>Coeficiente de Horwitz</b>			
<b>Concentración(mg/L)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>0,30*RSD<sub>H</sub></b>	<b>CV<sub>exp</sub> (%)</b>
<b>0,3</b>	19,18	5,75	3,55
<b>0,7</b>	16,88	5,06	1,24
<b>1,1</b>	15,77	4,73	1,64

## CONCLUSIONES

- A partir de la revisión de la bibliografía disponible se propone, bajo las condiciones experimentales previstas, para la determinación, en muestras del bioproducto CBQ-AgroG, de los contenidos de nitrógeno y fósforo totales el de la transnitración del ácido salicílico (para nitrógeno total) y el del molibdovanadofosfato empleando el ácido ascórbico como agente reductor (para fósforo total), en ambos casos combinado con espectrofotometría UV – Vis. Para la cuantificación de potasio total se propone el empleo de la espectrofotometría de absorción atómica.
- Bajos las condiciones experimentales empleadas, la técnica de determinación espectrofotométrica UV – Vis de los contenidos de fósforo total mediante el método del molibdovanadofosfato empleando el ácido ascórbico como agente reductor resultó ser lineal, repetible y precisa.

## RECOMENDACIONES

- Completar la verificación del método de determinación espectrofotométrica de los contenidos de fósforo total en muestras del bioproducto CBQ-AgroG mediante el método del molibdovanadofosfato empleando el ácido ascórbico como agente reductor.
- Realizar la verificación del método espectrofotométrico UV – Vis de transnitración del ácido salicílico para la cuantificación de nitrógeno total y del método por espectrofotometría de absorción atómica para la cuantificación de potasio total, en ambos casos en muestras del bioproducto CBQ-AgroG.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almazán, O. d.-O., Gómez, E. S., Álvarez, R. M. F., Ortega, G. M. A.-C., Delgado, G. A., Villar, J. D. y Díaz, M. E. V. 2007. Los bioproductos. Una alternativa en la agricultura, Parte III. *Los bioproductos. Una alternativa en la agricultura*. ICIDCA.
2. Amrane, A., y Prigent, Y. 1998. Influence of an initial addition of lactic acid on growth, acid production and their coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Bioprocess Engineering*, no.19, pp.307-312.
3. Analytical Methods Committee AMCTB No. 69 2015. Using the Grubbs and Cochran tests to identify outliers. *Analytical Methods*, vol.7, pp.7948-7950.
4. AOAC International (ed.) 2000. *Official Methods of Analysis of the association of official Analytical Chemists. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs ,vol I*, Virginia,USA: Association of official Analytical Chemists.
5. AOAC International. 2007. How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification.
6. Araujo, P. 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of chromatography B*, vol.877, pp.2224-2234.
7. Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes (ed.) 2002. *Los Fertilizantes y su uso*, París: Food & Agriculture Org.
8. Baird, R. B., Eaton, A. D. y Rice, E. W. (eds.) 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* Washington: American Public Health Association.
9. Cáceres, M. 2012. Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la industria láctea. *Mundo pecuario*, no.8, pp.16-32.
10. Castillo, G., Gregori, B. S., Michelena, G., de Villegas, M. E. D., Delgado, G., Montano, R., Cejas, G. y Gálvez, L. O. 2007. Bioproductos para la agricultura: surgimiento y desarrollo en el ICIDCA. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, no.41, pp.42-51.
11. Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., y Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in soil science and plant analysis*, no.6, pp.71-80.
12. Christian, G. D. (ed.) 2009. *Química Analítica. Sexta edición* México, D.F: McGraw-Hill/ Interamericana Editores, S.A. de C.V. .
13. Dayton, A. E., Whitacre, S. y Holloman, C. 2017. Comparison of three persulfate digestion methods for total phosphorus analysis and estimation of suspended sediments. *Applied Geochemistry* no.78, pp.357-362.
14. De Borba, B. M., Jack, R. F., Rohrer, J. S., Wirt, J. y Wang, D. 2014. Simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in environmental waters using alkaline persulfate digestion and ion chromatography. *Journal of Chromatography* no.1369, pp.131-137.
15. De Katsner, M. R. Q. 1959. Secreción de fósforo durante la absorción de azúcares (I). Métodos de determinación del fósforo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol.57, pp.112-130.
16. Ellison, S. L. R., Barwick, V. y Farrant, T. J. 2009. *Practical Statistics for the Analytical Scientist. A Bench Guide, 2nd Edition*, Cambridge (UK):, The Royal Society of Chemistry.
17. Eurachem 2005. CNM-MRD-PT-030 *Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*.

18. García, R. G. y Ballesteros, M. I. 2006. Evaluación de parámetros de calidad para la determinación de fósforo disponible en suelos. *Revista colombiana de Química*, vol.35, pp.81-89.
19. González, A. G. y Herrador, M. Á. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 227-238.
20. González, A. G., Herrador, M. Á. y Asuero, A. G. 2005. Practical digest for evaluating the uncertainty of analytical assays from validation data according to the LGC/VAM protocol. *Talanta*, no.65, pp.1022-1030.
21. González, V. y Pomares, F. 2008. La fertilización y el balance de nutrientes en sistemas agroecológicos. Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE), p.24.
22. Hansen, H. P. y Koroleff, F. 1999. Determination of nutrients. In: GRASSHOFF, K., KREMLING, K., Y EHRHARDT, M (ed.) *Methods of seawater analysis. Third, completely revised and extended edition*. Weinheim: Wiley-VCH. .
23. Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J. y Li, W. 2005. *Applied Linear Statistical Models*, New York, McGraw-Hill/Irwin.
24. Maroto, A., Boqué, R., Riu, J. y Rius, F. X. 2001. Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Analytica chimica acta*, no.440, pp.171-184.
25. Maroto, A., Boqué, R., Riu, J. y Rius, F. X. 2003. Effect of non-significant proportional bias in the final measurement uncertainty. *Analyst*, no.128, pp.373-378.
26. Miles M. Smartt, Frederic A. Reid y Jones, J. R. 1981. A comparison of a persulfate digestion and the Kjeldahl procedure for determination of total nitrogen in freshwater samples. *Water Research*, vol.15, pp.919-921.
27. Miller, C. E. y Miller, J. C. 2010. *Chemometrics in process analytical chemistry, 6th edn*, England, Pearson Education Limited.
28. Morillas, P. P. y al., e. (eds.) 2016. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*: Eurolab España.
29. Navas, J. S. R. 2012. Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, no.6, pp.69-83.
30. Nicholls, C. I. y Altieri, M. A. 2008. Suelos saludables, plantas saludables: la evidencia agroecológica. *LEISA revista de Agroecología*, no.24, pp.6-8.
31. Paneque-Pérez, V. M., Calaña Naranjo, J. M., Calderón Valdés, M., Borges Benítez, Y. y Caruncho Contreras, M. 2010. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA.
32. Patton, J. C. y Kryskalla, R. J. 2003. Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Evaluation of Alkaline Persulfate Digestion as an Alternative to Kjeldahl Digestion for Determination of Total and Dissolved Nitrogen and Phosphorus in Water. *Water Resources Investigations*, pp.1-44.
33. Pavel, J. 1979. Industrial whey processing technology: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no.27, pp.658-661.
34. Prichard, E. y Barwick, V. 2007. *Quality assurance in analytical chemistry*, LGC, Teddington, UK, John Wiley & Sons.

35. Rivera, N. A., Mendoza, G. G., Martínez, J. F. y Servin, C. C. 2014. Análisis del ciclo de vida de residuos de la industria azucarera y alternativas de uso sostenible. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
36. Rodríguez, L. C., Campaña, A. G. y Sendra, J. B. 1996. Statistical estimation of linear calibration range. *Analytical letters*, no.29, pp.1231-1239.
37. Rodríguez, L. C., Campaña, A. M. G., Linares, C. J. y Ceba, M. R. 1993. Estimation of Performance Characteristics of an Analytical Method Using the Data Set Of The Calibration Experiment. *Analytical Letters*, 26, 1243-1258.
38. Rouessac, F. y Rouessac, A. 2007. Modern Instrumentation Methods and Techniques. *Chichester, England*.
39. Sah, R. N. 1994. Nitrate-nitrogen determination—a critical review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol.25, pp.2841-2869.
40. Sanagi, M. M., Nasir, Z., Ling, S. L., Hermawan, D., Ibrahim, W. A. W. y Naim, A. A. 2010. A practical approach for linearity assessment of calibration curves under the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) guidelines for an in-house validation of method of analysis. *Journal of AOAC International*, no.93, pp.1322-1330.
41. Shrivastava, A. y Gupta, V. B. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of young scientists*, no.2, pp.21–25.
42. Silva Rubio, L. A., Almarino Mayor, F., Mojica, P., Cuellar, S., Medina, C. y Tamayo, A. 2014. Tecnologías Relacionadas con Biofertilizantes. Bogotá: Banco de patentes sic p.132. Disponible en: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)
43. Skoog, D. A., Holler, F. J. y Nieman, T. A. (eds.) 2008. *Principios de análisis instrumental*, Madrid: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U.
44. Studt, L. J., Campbell, R. E., Westrick, D., Kinnunen-Skidmore, T., Marceau, H. A. y Campbell, H. W. 2020. Non-toxic total nitrogen determination using a low alkaline persulfate digestion. *Elsevier, MethodsX*, no.100791, pp.1-6.
45. Villasanti, C. y Román, P. (eds.) 2013. *El Manejo del Suelo en la Producción de Hortalizas con Buenas Prácticas Agrícolas*, Paraguay: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
46. Walsh, S. J., Macsik, Z., Wegrzynek, D., Krieger, T. y Boulyga, S. 2016. Model diagnostics for detecting and identifying method repeatability outliers in precision studies: application to a homogeneity study under a two-stage nested ANOVA. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, no.31, pp.686-699.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### Resumen estadístico de la regresión

Conc (mg/L)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs 6
0,3000	0,256	0,254	0,255	0,250	0,253	0,253
0,5000	0,351	0,352	0,351	0,360	0,356	0,350
0,7000	0,461	0,462	0,464	0,454	0,452	0,456
0,9000	0,564	0,562	0,563	0,569	0,565	0,568
1,1000	0,652	0,656	0,664	0,670	0,669	0,655

Prueba de Grubbs				
Media	Desv. Est	Gmáx	Gmín	Gcrítico (95)
0,254	0,002	1,206	1,688	1,887
0,353	0,004	1,718	0,859	
0,458	0,005	1,207	1,276	
0,565	0,003	1,375	1,136	
0,661	0,008	1,170	1,170	

Coeficientes							
Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	sig.	Intervalo de confianza para B	
	B	Error estándar	Beta			Límite inferior	Límite superior
Constante	0,098	0,002		39,739	0,00	0,094	0,104
Concentración	0,513	0,003	0,999	155,843	0,00	0,570	0,520

**Análisis de la Repetibilidad.**

Lack-of-Fit							
X	Y	Ymedia	Y estimada	Yij- Yestimada	Yij- Ymedia	Ymedia- Yestimada	SSPE
0,3000	0,256	0,304	0,25	0,00	-0,05	0,05	1,86E+00
0,3000	0,254	0,304	0,25	0,00	-0,05	0,05	<b>n-c</b>
0,3000	0,255	0,304	0,25	0,00	-0,05	0,05	25
0,3000	0,250	0,304	0,25	0,00	-0,05	0,05	<b>MSPE</b>
0,3000	0,253	0,304	0,25	0,00	-0,05	0,05	7,42E-02
0,3000	0,253	0,304	0,25	0,10	0,05	0,05	
0,5000	0,351	0,353	0,35	0,00	0,00	0,00	<b>SSLF</b>
0,5000	0,352	0,353	0,35	0,00	0,00	0,00	1,66E-02
0,5000	0,351	0,353	0,35	0,01	0,01	0,00	<b>c-2</b>
0,5000	0,360	0,353	0,35	0,00	0,00	0,00	4
0,5000	0,356	0,353	0,35	0,11	0,11	0,00	<b>MSLF</b>
0,5000	0,350	0,353	0,35	0,11	0,11	0,00	4,15E-03
0,7000	0,461	0,458	0,46	0,01	0,01	0,00	
0,7000	0,462	0,458	0,46	0,00	0,00	0,00	<b>α</b>
0,7000	0,464	0,458	0,46	-0,01	-0,01	0,00	0,05
0,7000	0,454	0,458	0,46	0,11	0,11	0,00	
0,7000	0,452	0,458	0,46	0,10	0,10	0,00	<b>Fexp LOF</b>
0,7000	0,456	0,458	0,46	0,11	0,10	0,00	0,06
0,9000	0,564	0,565	0,56	0,01	0,00	0,01	
0,9000	0,562	0,565	0,56	0,01	0,00	0,01	<b>Ftabulada</b>
0,9000	0,563	0,565	0,56	0,09	0,09	0,01	2,76
0,9000	0,569	0,565	0,56	0,10	0,09	0,01	
0,9000	0,565	0,565	0,56	0,10	0,10	0,01	<b>P-Value</b>
0,9000	0,568	0,565	0,56	0,11	0,10	0,01	0,99
1,1000	0,652	0,661	0,66	0,01	0,01	0,00	
1,1000	0,656	0,661	0,66	-0,01	-0,01	0,00	
1,1000	0,664	0,661	0,66	-0,66	-0,66	0,00	
1,1000	0,670	0,661	0,66	-0,66	-0,66	0,00	
1,1000	0,669	0,661	0,66	-0,66	-0,66	0,00	
1,1000	0,655	0,661	0,66	-0,66	-0,66	0,00	

Conc (mg/L)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
0,3	0,262	0,268	0,261	0,265	0,247*	0,259	0,265	0,263	0,269	0,260
0,7	0,465	0,461	0,465	0,462	0,464	0,472	0,464	0,454	0,461	0,469
1,1	0,656	0,664	0,641	0,654	0,668	0,660	0,670	0,675	0,650	0,669

\*Valor atípico

Prueba de grubbs			
Gmáx	Gmín	Gcritico	Amedia
1,570	1,314	2,215	0,2636
1,710	1,998	2,290	0,4637
1,361	1,874	2,290	0,6607

#### Análisis de la precisión intermedia

Concentración (mg/L)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
0,3000	0,262	0,268	0,261	0,265	0,259	0,256	0,254	0,255	0,250	0,253
0,7000	0,465	0,461	0,465	0,462	0,464	0,461	0,462	0,464	0,454	0,452
1,1000	0,656	0,664	0,641	0,654	0,668	0,652	0,656	0,664	0,670	0,669

Prueba de Grubbs				
Desviación Estándar	Gmáx	Gmín	Gcritico	Amedia
0,006	1,595	1,557	2,215	0,2589
0,004	0,889	2,001	2,290	0,461
0,009	1,149	1,994	2,290	0,6594

## **Anexo II. Medidas generales de seguridad en el trabajo en el laboratorio**

### **Hábitos personales:**

- No comer, beber, fumar, ni aplicar cosméticos en los laboratorios.
- Mantener el puesto de trabajo siempre limpio y en orden.
- Revisar de forma periódica, en grupo, los hábitos de trabajo para detectar posibles actuaciones que pueden generar riesgos.
- Utilizar gafas de seguridad y evitar el uso de lentes de contacto.
- Utilizar si es necesario, equipos de protección individual.

### **Manipulación de productos:**

- Antes de manipular un producto químico deben conocerse sus posibles riesgos y los procedimientos seguros para su manipulación.
- Si se manejan productos cancerígenos, mutágenos, tóxicos para la reproducción, radioisótopos y/o material biológico adoptar las precauciones que, en cada caso, deben tenerse en cuenta para su manipulación.

### **Etiquetado de envases:**

Comprobar que todos los productos adquiridos estén etiquetados correctamente.

- Mantener las etiquetas en buen estado.
- Etiquetar todo envase que contenga productos químicos o disoluciones generados en el laboratorio.
- No superponer etiquetas, ni escribir o rotular sobre la original.

### **Almacenamiento:**

- Disponer de un almacén separado del laboratorio o, en su defecto, de un armario de seguridad y de neveras para inflamables en el propio laboratorio.

- Separar siempre los productos en función de sus incompatibilidades químicas. No almacenarlos. Por ejemplo, por orden alfabético.
- Guardar por separado los productos de características especiales.

#### **Residuos y vertidos:**

- Disponer de un programa de recogida selectiva según las características de los residuos generados.
- No acumular residuos en el laboratorio. Almacenarlos en un lugar específico y gestionarlos según las disposiciones legales vigentes.
- Tratar los derrames con los productos adecuados según sus características y recogerlo como residuos.
- Recoger el material de vidrio en contenedores especiales.
- Minimizar los residuos, optimizando la gestión de compras, los procedimientos de trabajo, valorando su recuperación y su neutralización.

#### **Emergencias:**

- Disponer de un plan de emergencia con toda la información necesaria (teléfonos, vías de evacuación, equipos de protección, etc.)
- Señalizar la ubicación de las instalaciones y aparatos o materiales existentes para la actuación en casos de emergencias.
- Disponer de protocolos escritos de actuación para situaciones específicas, como derrames, salpicaduras, conatos de incendio, etc.
- Adiestrar a los trabajadores sobre la actuación correcta en casos de emergencias y accidentes.
- Promover la práctica periódica de simulacros de accidentes y emergencias.