

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**“EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE BRAY- KURTZ Y OLSEN PARA LA
DETERMINACIÓN DE FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELOS AGRÍCOLAS DEL
DEPARTAMENTO DE LA PAZ.”**

ELIZABETH YUJRA TICONA

La Paz - Bolivia

2018

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE BRAY- KURTZ Y OLSEN PARA LA
DETERMINACIÓN DE FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELOS AGRÍCOLAS DEL
DEPARTAMENTO DE LA PAZ.”

*Tesis de Grado presentado como requisito
para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

ELIZABETH YUJRA TICONA

Tutor:

Ing. Ph. D. Roberto Miranda Casas

Lic. Heidi Ruth Mamani Tola

Ing. Miguel Ángel López

Tribunal examinador:

Ing. Ph. D. Vladimir Orsag Céspedes

Ing. Ph. D. Eduardo Chilón Camacho

Ing. Freddy Carlos Mena Herrera

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

La Paz – Bolivia

2018

DEDICATORIA

Dedicatoria con todo mi amor y respeto a mis padres: Alejandro Yujra Pocomá y Francisca Ticona Ticona, por su esfuerzo, confianza y apoyo para llegar a concluir una de mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Dios por la darme las fuerzas, por darme salud, y sobre todo poder estar al lado de las personas que más aprecio. Agradecer mis papás, Alejandro Yujra Pocoma, Francisca Ticona Ticona, a mis hermanos: Elsa, Jaime, Javier y Beatriz, por apoyarme en los peores momentos, por darme el ánimo para seguir adelante, por brindarme su apoyo incondicional.

Agradecer al Laboratorio LAFASA por darme la oportunidad de crecer como profesional, por confiar en mí para realizar el trabajo de investigación, agradezco a mi Asesor Ing.Ph. D. Roberto Miranda Casas por la oportunidad que me brindó, por su paciencia, por su ejemplo, por su tiempo. A mis amigos Mauricio, Ericka, Esmeralda por todo el apoyo. Finalmente al equipo LAFASA Miguel Ángel, Marco Antonio, Alejandro, Sandra.

CONTENIDO GENERAL

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Justificación	2
1.2. Objetivos	2
1.3. Objetivo general	2
1.4. Objetivos específicos.....	3
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Suelo	4
2.2. El fósforo en el suelo	5
2.2.1. Origen	5
2.2.2. Dinámica del fosforo en el suelo	5
2.2.3. Formas de fósforo en el suelo	7
2.2.4. Factores que afectan la disponibilidad del fosforo en el suelo	8
2.2.4.1. Textura.....	8
2.2.4.2. El pH	8
2.2.4.3. Materia orgánica	8
2.2.4.4. Humedad	9
2.2.5. Análisis de suelo.....	9
2.2.6. Fundamentos de espectrofotometría	10
2.2.6.1. Espectrofotómetro Cole-Parmer	10
2.2.6.2. Principio de funcionamiento.....	11
2.3. Métodos para el análisis de fosforo en el suelo.....	12
2.3.1. Bray II (suelos ácidos).....	13
2.3.2. Olsen 1954 (suelos básicos)	14
2.4. Norma Internacional NB-ISO/IEC 17025:2017	15
2.4.1. Requisitos de la norma NB-ISO/IEC 17025:2017 aplicables al objeto del trabajo.....	15
2.5. Validación de métodos en laboratorio	16
2.6. Material de Referencia Certificado (MRC).....	17
2.7. Parámetros de Validación	18

2.7.1.	Intervalo de trabajo	19
2.7.2.	Linealidad	19
2.7.3.	Límite de cuantificación (LC)	20
2.7.4.	Límite de detección (LD).....	20
2.7.5.	Precisión.....	21
2.7.6.	Exactitud.....	22
2.7.7.	Incertidumbre	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Localización	25
3.2.	Materiales.....	25
3.2.1.	Materiales de Laboratorio.....	25
3.2.2.	Material de gabinete.....	26
3.3.	Metodología.....	26
3.3.1.	Condiciones de trabajo.....	26
3.3.2.	Elección de la longitud de onda óptima	27
3.3.3.	Modificación de la metodología original	27
3.3.4.	Validación de la metodología	28
3.3.4.1.	Preparación del MRC y MRI	29
3.3.4.3.	Procedimiento analítico Bray-Kurtz II (suelos ácidos).....	30
3.3.4.4.	Procedimiento analítico Olsen (suelos básicos)	31
3.3.4.5.	Determinación de la linealidad del sistema	33
3.3.4.6.	Linealidad del método	35
3.3.4.7.	Límite de detección y límite de cuantificación	35
3.3.4.8.	Precisión	36
3.3.4.9.	Exactitud	37
3.3.4.10.	Incertidumbre.....	38
3.3.5.1.	Determinación de pH.....	42
3.3.5.2.	Determinación de textura método del Densímetro.....	42
3.3.5.3.	Selección de muestras 20 municipios del Departamento de La Paz	43
3.3.6.	Análisis de costos.....	45
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46

4.1. Condiciones óptimas de las metodologías	46
4.1.1. Elección de la longitud de onda óptima	46
4.1.2. Reducción de la metodología original	48
4.2. Validación de los métodos Bray-Kurtz y Olsen.....	50
4.2.1. Linealidad del sistema.....	50
4.2.2. Linealidad del método	53
4.2.3. Límite de detección y límite de cuantificación.....	56
4.2.4. Precisión.....	58
4.2.4.1. Repetibilidad	59
4.2.4.2. Reproducibilidad intermedia.....	60
4.2.4.3. Relación entre la concentración de fósforo de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia	61
4.2.5. Exactitud.....	63
4.2.5.1. Sesgo.....	63
4.2.5.2. Recuperación (%).....	64
4.2.6. Incertidumbre	67
4.3. Análisis de las muestras de suelo.....	68
4.4. Costos	72
5. CONCLUSIONES.....	75
6. RECOMENDACIONES	77
7. BIBLIOGRAFÍA.....	78
8. ANEXOS.....	82

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Dinámica del fósforo en el suelo.....	6
Figura 2. Interacción de la radiación con la materia.....	10
Figura 3. Espectros de absorción (barrido) en la región de 180 a 400 nm de un analito en disolución a diferentes concentraciones	12
Figura 4. Linealidad	20
Figura 5. Zona de detección y cuantificación	21
Figura 6. Diagrama de flujo para la determinación de la precisión	22

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Principales formas de fosfato inorgánico	7
Tabla 2. Propiedades de los materiales de referencia certificado	18
Tabla 3. Materiales de laboratorio.....	25
Tabla 4. Variables de reducción del método Bray-Kurtz	28
Tabla 5. Variables de reducción del método Olsen	28
Tabla 6. Condiciones de variación para determinar reproducibilidad intermedia	36
Tabla 7. Muestras utilizadas para el método Bray-Kurtz.....	43
Tabla 8. Muestras utilizadas para el método Olsen	44
Tabla 9. Barrido espectral 880-890nm	47
Tabla 10. Reducción Método A (50ml) – Método B (10ml).....	48
Tabla 11. Análisis de varianza (Bray-Kurtz)	49
Tabla 12. Análisis de varianza (Olsen).....	49
Tabla 13. Valores experimentales evaluados.....	51
Tabla 14. Resumen de los resultados estadísticos para la linealidad.....	53
Tabla 15. Linealidad del método Bray-Kurtz y Olsen	54
Tabla 16. Resumen de los resultados estadísticos para la linealidad.....	55
Tabla 17. Repetibilidad para el método Bray-Kurtz	60
Tabla 18. Repetibilidad para el método Olsen	60
Tabla 19. Reproducibilidad intermedia Método Bray-Kurtz	61
Tabla 20. Reproducibilidad intermedia Método Olsen	61
Tabla 21. Relación de concentración S_r , S_w para el método Bray-Kurtz.....	61
Tabla 22. Relación de concentración S_r , S_w para el método Olsen	62
Tabla 23. Datos obtenidos para el Sesgo método Bray-Kurtz	64
Tabla 24. Datos obtenidos para el Sesgo método Olsen	64
Tabla 25. Valores obtenidos en % Recuperación para ambos métodos.....	65
Tabla 26. Análisis de muestras de suelos empleando métodos validado Bray- Kurtz	70
Tabla 27. Análisis de muestras de suelos empleando métodos validado Olsen	71

Tabla 28. Comparación de las dos metodologías para diferentes pH.....	71
Tabla 29. Costo de reactivos método Bray-Kurtz (50ml).....	72
Tabla 30. Costo de reactivos método Bray-Kurtz (10ml).....	73
Tabla 31. Costo de reactivos método Olsen (50ml).....	73
Tabla 32. Costo de reactivos método Olsen (10ml).....	74

CONTENIDO DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Espectro de máxima absorción de fósforo	46
Gráfico 2. Espectro de máxima absorbancia Bray-Kurtz	48
Gráfico 3. Evaluación de los datos para el método Bray-Kurtz	50
Gráfico 4. Evaluación de los datos a para el método Olsen	51
Gráfico 5. Linealidad del sistema método Bray-Kurtz	52
Gráfico 6. Linealidad del sistema método Olsen	52
Gráfico 7. Linealidad del método Bray-Kurt	54
Gráfico 8. Linealidad del método Olsen	55
Gráfico 9. Límites del método Bray-Kutz	57
Gráfico 10. Límites del método Olsen	57
Gráfico 11. Datos evaluados para el método Bray-Kurtz	58
Gráfico 12. Datos evaluados para el método Olsen	59
Gráfico 13. Relación de concentración S_r , S_w para el método Bray-Kurtz....	62
Gráfico 14. Relación de concentración S_r , S_w para el método Olsen.....	63
Gráfico 15. % Recuperación método Bray-Kurtz	66
Gráfico 16. % Recuperación método Olsen	66
Gráfico 17. Incertidumbre relativa para el método Bray-Kurtz y Olsen.....	68

CONTENIDO DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de Temperatura y Humedad.....	82
Anexo 2. Barrido espectral 400-990 nm.....	83
Anexo 3. Datos experimentales (Bray-Kurtz y Olsen) para linealidad.....	84
Anexo 4. Datos para el Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	85
Anexo 5. Análisis de datos para la precisión (Bray-Kurtz y Olsen).....	85
Anexo 6. Valores tabulados de t a un 95,46 % y 99,73 % de probabilidad.....	86
Anexo 7 Valores tabulados de “F”	87
Anexo 8. Valores tabulados de “G”	88
Anexo 9. Valores de t a un 95,46 % y 99,73% de probabilidad.....	89
Anexo 10. Fotografías.....	90

RESÚMEN

El Laboratorio de análisis de suelos y aguas (LAFASA), de la Facultad de Agronomía busca demostrar que los análisis de suelos realizados en este caso de P disponible, utilizando las metodologías espectrofotométricas (Bray-Kurtz y Olsen) generen resultados reproducibles, exactos, confiables y adecuados para la finalidad que se requiere, al mismo tiempo se quiere dar cumplimiento a los Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración en base a la Norma Boliviana ISO-IEC 17025:2017 de los puntos 5.4.5 validando métodos no normalizados y modificados por el laboratorio y el punto 5.4.6 estimando la incertidumbre asociada al método de ensayo. Cumpliendo de esta manera con uno de los requisitos para una futura acreditación del laboratorio.

En este trabajo se encontró la longitud de onda óptima para las condiciones ambientales del laboratorio, la reducción del método original, se realizó la validación de las metodologías (Bray-Kurtz y Olsen) evaluando los siguientes parámetros linealidad del sistema, linealidad del método, límites de detección, límites de cuantificación, determinación de la exactitud encontrando la repetibilidad, precisión intermedia, sesgo y la estimación de la incertidumbre, encontrado así rangos de lectura en los cuales los valores obtenidos y las condiciones en las cuales la determinación de P es confiable, Además de documentar todos los resultados obtenidos para realizar un control en laboratorio.

Con las metodologías ya validadas se realizó el análisis de P en diferentes muestras suelos ácidos y básicos pertenecientes a algunos de los municipios de la ciudad de La Paz, además se realizó un análisis de costos para ambas metodologías.

ABSTRACT

The soil and water analysis laboratory (LAFASA) of the Faculty of Agronomy seeks to demonstrate that soil analyzes carried out in this case of P available in the soil with the use of spectrophotometric methodologies (Bray-Kurtz and Olsen) generate reproducible, exact, reliable and adequate results for the purpose that is required, at the same time we want to comply with the General requirements for the competence of the testing and calibration laboratories based on the Bolivian Standard ISO-IEC 17025: 2017 of the points 5.4.5 validating non-standardized methods modified by the laboratory and point 5.4.6 estimating the uncertainty associated with the test method. Fulfilling this way with one of the requirements for future accreditation of the laboratory.

This work was found the optimal wavelength for the environmental conditions of the laboratory, the reduction of the original method, the validation of the methodologies was carried out (Bray-Kurtz and Olsen) evaluating the following parameters linearity of the system, linearity of the method, limits of detection, limits of quantification, determination of the accuracy finding the repeatability, intermediate precision, bias and the estimation of the uncertainty, found reading ranges in which the values obtained and the conditions in which the determination of P is reliable, to document all the results obtained to perform a laboratory control. With the methodologies already validated, the analysis of P in different acid and basic soil samples belonging to some of the municipalities of the city of La Paz was carried out, and a cost analysis was carried out for both methodologies.

1. INTRODUCCION

El P se considera en la agricultura mundial como el elemento nutriente al cual solo sobrepasa en importancia el nitrógeno, e influye en el desarrollo de los vegetales ya que es el responsable del desarrollo normal de sistema radicular, pronta madurez de los cultivos, formación de semillas, incrementa la resistencia de las plantas a las enfermedades. Una deficiencia de dicho elemento provoca una marcada reducción del crecimiento de la planta y por consiguiente, un bajo rendimiento.

El análisis químico de suelos está orientado hacia el diagnóstico de la fertilidad, es por eso que existen metodologías específicas de extracción para cada nutriente las cuales varían dependiendo de las propiedades químicas de los mismos (pH, mineral arcilloso dominante, contenidos de materia orgánica); razón por la cual es necesario realizar evaluaciones de metodologías de extracción de elementos en diferentes suelos. Para lo cual es necesario contar con métodos de análisis que permitan obtener la concentración correcta en el suelo, por esto los métodos deben ser evaluados por medio de la validación.

De acuerdo a la norma NB-ISO/IEC 17025:2018 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración) validación es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para la utilización específica prevista. Si esta definición la llevamos al campo de los laboratorios de análisis químicos, validar un método de ensayo consiste en demostrar, mediante una serie de experimentos, que el método es idóneo para el uso que se pretende hacer del mismo, manteniendo su eficacia a lo largo del tiempo y cumpliendo unos requisitos de calidad previamente establecidos.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar.

En este trabajo se evaluó las metodologías Bray-Kurtz y Olsen a partir de la validación para la determinación de P disponible en el suelo, en las instalaciones del Laboratorio de la Facultad de Agronomía de Suelos y Aguas (LAFASA).

1.1. Justificación

Los análisis químicos de suelos son la metodología más empleada como herramienta para recomendar la fertilización.

El laboratorio de análisis de suelos y aguas (LAFASA), de la Facultad de Agronomía busca demostrar que los análisis de P disponible en el suelo con el uso de las metodologías espectrofotométricas (Bray-Kurtz y Olsen) generan resultados reproducibles, exactos, confiables y adecuados para su finalidad que se requiere, ya que con base en estos se toman decisiones. Así mismo el laboratorio (LAFASA) está cumpliendo con los requisitos generales para la competencia de los laboratorio y el sistema de gestión de calidad basado en la NB-ISO/IEC 17025:2017 cuyo objetivo es dar lineamientos de calidad a laboratorios de ensayo, que posteriormente ayudarán a la acreditación del laboratorio.

1.2. Objetivos

1.3. Objetivo general

Evaluar los métodos de Bray-Kurtz y Olsen para la determinación de fósforo disponible en suelos agrícolas del departamento de La Paz.

1.4. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto desempeño del método.
- Validar los métodos de Bray-Kurtz y Olsen, a través de la estimación de los parámetros de calidad en base a los lineamientos de la norma NB-ISO/IEC 17025:20017 en los numerales 5.4.5 y 5.4.6 de la mencionada Norma.
- Cuantificar el P disponible con las metodologías validadas para la aplicación en algunos suelos agrícolas pertenecientes a municipios del Departamento de La Paz.
- Realizar un análisis de costos del análisis de Fósforo en laboratorio.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Suelo

Según el IFA (2002), el suelo es un material extraordinario, es la capa superficial de la tierra, la que ha sido transformada muy despacio por la descomposición a través de la acción meteorológica, la acción de la vegetación y del ser humano. El material original del cual un suelo se forma puede ser la roca subyacente o los depósitos de los ríos y de los mares (suelos aluvionales) y del viento (suelos eólicos, tales como el loess) o suelos de cenizas volcánicas.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2005), menciona que el suelo es un recurso natural básico es un sistema dinámico, compuesto de materiales orgánicos y minerales; sus propiedades se deben al efecto integrado del clima y los organismos vivos que actúan sobre el material parental, en determinado periodo de tiempo. Sirve de soporte para el crecimiento de las plantas, microorganismos edáficos y micro fauna; regula el destino del agua en el ciclo hidrológico y es un sistema reciclador de nutrimentos y residuos orgánicos.

Miranda (2004), define al suelo como un complejo orgánico mineral con características dinámicas, es el lugar donde se desarrolla una gran cantidad biológica. Los suelos se constituyen como una parte de un sistema y en el cual existen gran interrelación entre los diferentes componentes.

Por otro lado desde el punto de vista agronómico Orsag (2010), menciona que el recurso suelo idealmente debería estar conformado de manera proporcional. Una parte sólida 50% (minerales y materia orgánica); una parte aérea: aproximadamente de 50% que responde a la fase líquida (solución del suelo) y otra gaseosa (O_2 , CO_2 , N_2 , NH_4 , etc.).

Benier (2003), menciona que el suelo es un medio natural de donde las plantas obtienen todos los elementos minerales (elementos esenciales) que requieren para su nutrición.

2.2. El fósforo en el suelo

2.2.1. Origen

Bornemiza (1960), citado por Santos (2003), menciona que el fósforo del suelo proviene mayormente de la meteorización de la apatita, un mineral que contiene fósforo (P) y calcio (Ca), así como otros elementos como flúor y cloro. El fósforo elemental es químicamente muy reactivo y por esta razón no está presente en un estado puro en la naturaleza. Se encuentran solamente en combinaciones químicas con otros elementos. A medida que las apatitas se descomponen y libera fósforo, se forman varios compuestos de este elemento en el suelo y se liberan los dos iones ortofosfato que son absorbidos por las plantas.

Por otro lado Sanzano (s.f.), menciona que la fuente original de fósforo es el material madre, constituido por rocas fosfatadas, tales como apatita, fluorapatita, vivianita, etc. Constituye aproximadamente el 0,12 % de la corteza terrestre.

2.2.2. Dinámica del fosforo en el suelo

Por su importancia biológica y la complejidad de su ciclo en el suelo, el fósforo es uno de los macronutrientes más estudiados en el mundo. Son varios los mecanismos de naturaleza físico-química y biológica que rigen la dinámica del fósforo edáfico, estudios han demostrado que el contenido de fósforo disponible de los suelos está en función, en gran medida, de su estado evolutivo, así como de su mineralogía y granulometría. (Avellaneda, 1980).

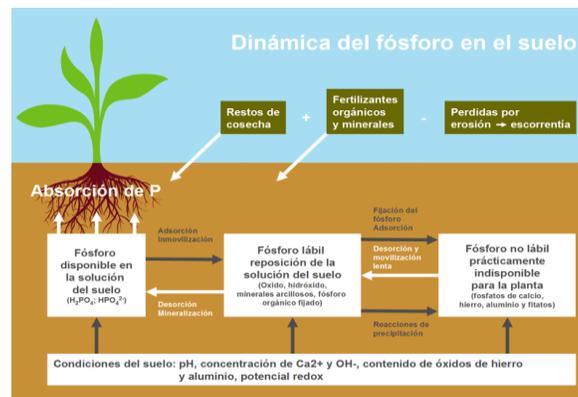
El Instituto de la Potasa y el Fosforo (1996) citado por Santos (2003), menciona que el fósforo se mueve muy poco en la mayoría de los suelos. Generalmente se mantiene en el lugar que ha sido colocado por la meteorización de los minerales o

por la fertilización; Muy poco se pierde por lixiviación, aunque cuando se mueve más libremente en suelos arenosos que en arcillosos. La erosión y la remoción por el cultivo son las dos únicas formas significativas de pérdida de fósforo del suelo. Casi todo el fósforo se mueve en el suelo por difusión, un proceso lento de poco alcance depende de la humedad del suelo. Las condiciones secas reducen notablemente la difusión.

Picone y Zamuer (2002), señalan que el fósforo en el suelo es un sistema dinámico y complejo que involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas. El fósforo en el suelo puede ser particionado en compartimentos que varían en su disponibilidad para las plantas y microorganismos. Una fracción pequeña se encuentra en forma soluble, la cual está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el fósforo orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales. La mayor parte está en formas insolubles o fijadas, principalmente como minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de *Ca, Fe* y *Al*, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados.

La Figura 1. muestra los componentes del sistema fósforo en el suelo son el (P) en solución, (inmediatamente disponible para las plantas), el (P) lábil, que se encuentra adsorbido en la superficie de las arcillas y el (P) no lábil, disponible para las plantas (Tisdale, 1993) citado por (Bonomelli 2003).

Figura 1. Dinámica del fósforo en el suelo



Fuente: (UNER, 2012)

2.2.3. Formas de fósforo en el suelo

Agronayade (2011), señala que el fósforo presente en el suelo agrícola se encuentra como:

- Fósforo orgánico
- Fósforo inorgánico

El fósforo orgánico, cuyo porcentaje varía entre 20 y 70 %. La fracción orgánica se encuentra en el humus y otros materiales orgánicos que pueden o no estar asociados con él. La principal fuente está constituida por los residuos vegetales y animales que se adicionan al suelo.

Las formas de fósforo inorgánico presentes en un suelo dependen de su etapa de meteorización química. Los fosfatos de calcio son más solubles que los fosfatos de aluminio, estos a su vez más solubles que los de hierro (Sanzano, s.f.). (Tabla 1).

Tabla 1. Principales formas de fosfato inorgánico

Forma del fósforo	Denominación
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita
	Oxiapatita
	Fluorapatita
	Carbonatoapatita
	Fosfato tricálcico
	Fosfato bicalcico
Fosfatos de hierro	Fosfato monocalcico
	Vivianita
	Estrenguita
Fosfatos de aluminio	Variscita

Fuente: Rosetto (1992)

2.2.4. Factores que afectan la disponibilidad del fósforo en el suelo

2.2.4.1. Textura

Núñez Vázquez y Salas (1986), señalan que, a medida que la textura se hace más gruesa, el nivel de fósforo disponible disminuye.

2.2.4.2. El pH

Por otro lado las diversas formas de fósforo varían en relación al pH; Karim y Khan (1965) verificaron que las formas $P - Al$ y $P - Fe$ predominan con pH 5 a 6, disminuyendo por encima de ese valor. Trabajos de muestran que las concentraciones de P-Ca aumentan substancialmente conforme aumenta el pH de la solución de suelo, en tanto decrece la solubilidad del P-Fe. De la misma manera, Núñez Vázquez y Salas (1986) demostraron que en los suelos salinos alcalinos el valor de P extractable es menor

Del valor de pH depende la existencia de diferentes fosfatos y para su fijación en el suelo se realiza por bases cálcicas, óxidos de hierro y aluminio o por minerales arcillosos .Por otro lado Velez (2012), menciona que el pH del suelo es posiblemente el determinante individual más importante en la disponibilidad del P en el suelo. La solubilidad de muchos compuestos de P disminuye a medida que el pH sube del levemente ácido (6,5) a neutro (7,0) y llega a el rango de la alcalinidad. En la mayoría de los suelos la disponibilidad del fósforo es máxima en un orden de pH que oscila de 5.5 a 7.0, disminuyendo cuando el pH cae por debajo de 5.5 y disminuyendo también cuando este valor sube por encima de 7.0.

2.2.4.3. Materia orgánica

De acuerdo a Biabati (s.f.), los suelos con alto contenido de materia orgánica contienen fósforo orgánico mineralizado (similar al nitrógeno).

La aplicación de materia orgánica (estiércol, residuos de plantas, estiércol verde de cultivos) a suelos con valores de pH altos:

- Suministra fósforo.
- Durante su descomposición produce compuestos ácidos los cuales aumentan la disponibilidad de las formas minerales de fósforo.
- Actúa como agente quelatante y se combina con hierro previniendo la formación de fosfatos de hierro insolubles.

2.2.4.4. Humedad

El movimiento de fósforo aumenta con el contenido de agua del suelo. Por otra parte la absorción del fósforo por las plantas aumenta cuando la succión matriz del suelo disminuye, lo que concuerda con el concepto de que la transferencia de nutrientes a las raíces se efectúa por medio del agua. El incrementar la humedad del suelo a niveles óptimos hace que el fósforo sea más disponible para la planta. Sin embargo el exceso de humedad reduce el oxígeno lo que limita el crecimiento de la raíz y hace lenta la absorción de fósforo, (Instituto de la Potasa y el Fosforo 1996), citado por (Santos, 2003).

Vélez (2012), señala que la humedad del suelo es otro factor de importancia en la disponibilidad del fósforo. Tanto los suelos que sufren de sequía como los frecuentemente anegados tienen niveles reducidos de fosfato disponible.

2.2.5. Análisis de suelo

Ramos (2003), menciona que el análisis de suelo consiste en extraer los nutrientes del suelo mediante la utilización de soluciones extractoras, dando como resultado valores numéricos que pueden reflejar o no la disponibilidad de un nutriente para las plantas.

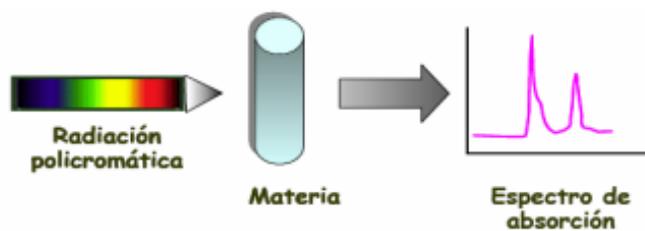
Por otro lado Molina y Bornemisza (2006), mencionan que el análisis de suelo es una herramienta que permite diagnosticar el estado nutricional del suelo y establecer recomendaciones de fertilización en caso de que se diagnostiquen problemas nutricionales.

2.2.6. Fundamentos de espectrofotometría

La espectroscopia es una ciencia que estudia las interacciones que suceden entre la radiación y la materia. Los métodos espectroscópicos de análisis miden la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies atómicas o moleculares que se analizan.

Según Verde, López Cruz y Malpica (2013), la espectrofotometría ultravioleta-visible es una técnica de medición de concentración de masa de elementos y compuestos (especies) químicos (análisis cuantitativo), cuyo principio es la interacción entre la energía electromagnética con la materia. En forma más específica la espectrofotometría ultravioleta – visible se fundamenta en medir la radiación monocromática absorbida por un elemento o molécula causante de desplazamientos electrónicos a capas superiores, estas transiciones determinan la región del espectro en la que tiene lugar la absorción.

Figura 2. Interacción de la radiación con la materia



Fuente: (Quintero, 2003)

2.2.6.1. Espectrofotómetro Cole-Parmer 83057-0.1 V O.2

Es un equipo de propósito general diseñado para cumplir las necesidades del laboratorio convencional, son ideales para diversas aplicaciones, tales como: Bioquímica, Petroquímica, Protección del Medio Ambiente, Laboratorios de Alimentos y Bebidas, Agua y Laboratorios de aguas residuales y otros campos de control de calidad e investigación.

El espectrofotómetro tiene una pantalla digital, fácil operación y rango de longitud de onda de 325 nm a 1000 nm para visible y 200 a 1000 nm. Es ideal para mediciones en la región de longitud de onda visible del espectro electromagnético y modelo UV en ultravioleta y región visible de la longitud de onda.

2.2.6.2. Principio de funcionamiento

El espectrofotómetro consta de cinco partes:

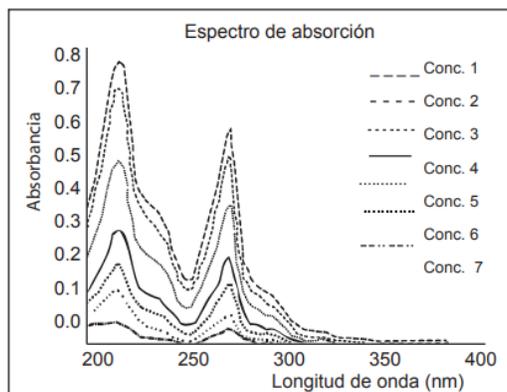
- Lámpara halógena y deuterio (solo modelo UV) para suministrar la luz
- Un monocromador para aislar la longitud de onda de interés y eliminar la radiación de segundo orden no deseada
- Un compartimento de muestra para acomodar la muestra solución
- Un detector para recibir la luz transmitida y convertirla en una señal eléctrica
- Una pantalla digital para indicar la absorbancia o la transmitancia.

En su espectrofotómetro, la luz de la lámpara se enfoca en la rendija de entrada del monocromador donde el espejo de colimación dirige el haz sobre la rejilla. La rejilla dispersa el haz de luz para producir el espectro, una parte del cual se enfoca en la rendija de salida del monocromador por un espejo de colimación. Desde aquí el haz pasa a una muestra compartimento a través de uno de los filtros, lo que ayuda a eliminar el segundo orden no deseado radiación de la red de difracción. Al salir del compartimento de muestra, el rayo espaciado al detector de fotodiodos de silicio y hace que el detector produzca una señal crítica que se muestra en la pantalla digital.

Verde, López Cruz, y Malpica (2013), mencionan que el análisis espectrofotométrico, normalmente se escoge la longitud de onda de máxima absorbancia del analito (λ_{max}) debido, entre otras razones, a que la sensibilidad del análisis es máxima a esta , es decir, se consigue la máxima respuesta para una concentración dada de analito. La λ_{max} se obtiene mediante un espectro de absorción que es una gráfica que muestra como varía la absorbancia (A) o la

absortividad molar (ϵ) al variar la longitud de onda y se obtiene efectuando mediciones de absorbancia del analito en un intervalo amplio de longitudes de onda, por ejemplo de 380 a 780 nm en la región del visible (Figura 3).

Figura 3. Espectros de absorción (barrido) en la región de 180 a 400 nm de un analito en disolución a diferentes concentraciones



Fuente: Verde, López Cruz, y Malpica (2013)

Las celdas o depósitos transparentes que contienen la muestra (analito en disolución) o el blanco pueden ser de cuarzo, vidrio óptico o plástico y generalmente tienen 1 cm de longitud de paso óptico. Las de cuarzo se usan para medidas espectrofotométricas en el UV-Visible, las de vidrio óptico, como absorben radiación ultravioleta, sólo son apropiadas para mediciones en la región del visible, y las de plástico sólo se utilizan para disoluciones acuosas y las hay para mediciones en el visible, y recientemente, en el ultravioleta.

2.3. Métodos para el análisis de fósforo en el suelo

Para extraer el fósforo en suelos ácidos, se utilizan soluciones ácidas, y en los suelos básicos, soluciones alcalina. Es importante tener en cuenta que los extractantes químicos utilizados en las diversas técnicas para dosar el fósforo extractable informa sobre el factor intensidad (P-solución) y parcialmente sobre el factor cantidad (P-matriz), cuya solubilización será directamente proporcional a la energía del extractor utilizado (Bahía, 197) citado por (Bachmeier, 1994). Esta

energía depende de la composición del extractante, la que, a su vez, determina su pH y el tipo de interacción extractante-matriz de suelo.

2.3.1. Bray-Kurtz II (suelos ácidos)

El método Bray y Kurtz , para determinación de fósforo disponible fue desarrollado por Roger H. Bray y Lester T. Kurtz en la Estación Experimental Agrícola de Illinois en 1945 y ahora es ampliamente utilizado en todo el mundo. El fósforo extraído por el método Bray y Kurtz se ha demostrado estar bien correlacionado con la respuesta de rendimiento de los cultivos en la mayoría de los suelos ácidos y neutros.

- Principio del método

Para los suelos ácidos, el fluoruro presente en el extracto Bray y Kurtz , mejora la liberación de P de los fosfatos de aluminio por la disminución de la actividad de Al en la solución del suelo a través de la formación de varios complejos $Al - F$. El fluoruro es también eficaz en la supresión de la re-absorción de fósforo solubilizado en los coloides del suelo.

La naturaleza ácida del extractante (pH 2,6) también contribuye a la disolución del P disponible del *Al, Ca y Fe*, formas enlazadas en la mayoría de los suelos.

Por otro lado la solución Bray II (HCl 0.1M y NH_4F 0.03 M) disuelve algunos fosfatos fácilmente solubles en ácido como los fosfatos de Calcio y una parte de los fosfatos de Hierro y Aluminio. El proceso automatizado para la determinación de Fósforo se basa en la siguiente reacción: El Molibdato de Amonio catalizado con Tartrato de Antimonio y Potasio reacciona en medio ácido, con el fosfato para formar un complejo fosfomolibdico el cual es reducido mediante ácido Ascórbico para producir un complejo de color azul (Universidad de Magdalena, 2013).

El ensayo comprende 2 etapas:

- Extracción

- Determinación espectrofotométrica

El HCl disuelve principalmente los fosfatos de Ca y algunos de Al y Fe .

El ión F^- promueve la desorción de los fosfatos ligados al Fe y Al .

El ión F^- al disminuir la actividad del Al^{3+} y la del Ca^{2+} y Fe^{3+} por la formación de complejos, evita la adsorción de los fosfatos solubilizados (Soil and Plant Analysis Council, 1992) citado por (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER, 2012).

2.3.2. Olsen 1954 (suelos básicos)

El método de Olsen con bicarbonato de sodio fue desarrollado por Sterling R. Olsen y sus colaboradores en 1954. Se utiliza como método predilecto en suelos básicos, particularmente aquellos con menos más del 2% de carbonato de calcio.

Para Olsen un valor de 10 mg/kg se considera generalmente óptimo para el crecimiento vegetal.

- Principio del método

El Fósforo se extrae con una solución de Bicarbonato de Sodio ($NaHCO_3$ 0.5 M) a un pH 8.50. En los suelos calcáreos o alcalinos los iones bicarbonato causan la precipitación del Calcio como $CaCO_3$ por lo tanto la actividad del Calcio en la solución disminuye; esto facilita la extracción de los fosfatos de Calcio por lo que aumenta la solubilidad del fósforo mejorando su absorción disponible en la solución. El proceso automatizado para la determinación de Fósforo se basa en la siguiente reacción: El molibdato de Amonio catalizado con tartrato de Antimonio y Potasio reacciona en medio ácido, con el fosfato para formar un complejo ácido Fosfomolibdico, el cual es reducido mediante ácido Ascórbico para producir un complejo de color azul (Universidad de Magdalena, 2013).

2.4. Norma Internacional NB-ISO/IEC 17025:2017

Requisitos generales de acuerdo con los cuales un laboratorio puede demostrar que opera, si se va a reconocer como competente para realizar ensayos o calibraciones específicos usando esta norma en laboratorios de calibración y ensayo en el desarrollo e implementación de sus sistemas de calidad.

En Bolivia se han emitido normas, guías y reglamentos para normalizar las condiciones del desarrollo de métodos analíticos para disminuir la variabilidad de los resultados en los laboratorios que trabajan bajo las mismas condiciones, método, personal, entre otros. Dentro de estas normas se encuentra la norma Boliviana homóloga a la norma internacional ISO/IEC 17025:2017, que establece los requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.

2.4.1. Requisitos de la norma NB-ISO/IEC 17025:2017 aplicables al objeto del trabajo

El numeral 5.4.5 *Validación de los métodos*, de la norma ISO/IEC/17025:2017 menciona que: El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.

El numeral 5.4.6 *Estimación de la incertidumbre de la medición*, de la norma ISO/IEC/17025:2017 señala que “Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. En algunos casos la naturaleza del método de ensayo puede excluir un cálculo riguroso, metrológicamente y estadísticamente válido, de la incertidumbre de medición”. En

estos casos el laboratorio debe, por lo menos, tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, y debe asegurarse de que la forma de informar el resultado no dé una impresión equivocada de la incertidumbre. Una estimación razonable se debe basar en un conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia adquirida y de los datos de validación anteriores (NB-ISO, 2017).

2.5. Validación de métodos en laboratorio

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos. Se debe resaltar el hecho que se valida con un uso específico determinado de antemano. Esta noción amplia de lo que implica la validación equivale al concepto de adecuación a la finalidad o propósito perseguido. La validación sería pues el proceso de verificar que un método es adecuado para su finalidad, es decir, adecuado para resolver un problema analítico particular (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

La validación constituye un requisito imprescindible para las buenas prácticas de laboratorio, conforme lo establecen diferentes agencias reguladoras y la determinación de la incertidumbre debe formar parte de este proceso de validación y es esencial para un control continuo de la calidad. A partir del criterio que no existe un modelo único para validación y que los parámetros a evaluar cambian de acuerdo con los requisitos legales de diferentes organizaciones y de los requerimientos analíticos particulares; solo es recomendable el seguimiento de una guía general para la validación de métodos analíticos, en conformidad con pautas aceptadas internacionalmente (Cañez, 2015).

Duffauet (2010), señala que es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación. A partir del concepto de la validación como la confirmación, surgen cuatro motivos por lo que es necesaria la validación.

- Cumplir la normativa (NB – ISO – IEC 17025).
- Optimizar los procesos.
- Asegurar la calidad/mejorar la productividad.
- Reducir costos

Está implícito que los estudios para determinar los parámetros de rendimiento se llevan a cabo mediante equipos que cumplen con las especificaciones, funcionan correctamente y están adecuadamente calibrados. Igualmente, el operador que realiza los estudios debe ser competente en el campo de trabajo en estudio y debe contar con suficientes conocimientos respecto al trabajo como para poder tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones realizadas a medida que el estudio progresa.

2.6. Material de Referencia Certificado (MRC)

Desde un punto de vista práctico, los materiales de referencia (MR) y los materiales de referencia certificados (MRC) hacen posible la transferencia de los valores de las magnitudes asignadas o medidas (física, química, biológica o técnica), entre un lugar y otro. Son ampliamente usados para la calibración de los instrumentos de medición, para la evaluación o verificación de los métodos de ensayo o análisis, para el aseguramiento de la calidad de las mediciones, etc. Todas las clases de MR y MRC juegan un papel importante y creciente en las actividades de la normalización nacional e internacional, en los ensayos de aptitud, validación y en la acreditación de laboratorios y deben cumplir con diferentes propiedades como lo indica la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de los materiales de referencia certificado

Propiedades	Descripción
Homogeneidad	El material debe ser estable durante las condiciones de envío, y el usuario debe conocer durante cuánto tiempo permanece estable el MRC desde su recepción y desde que se abre el recipiente. La estabilidad tiene que referirse tanto a las propiedades certificadas como a la matriz.
Similitud con las muestras reales	El MRC ha de ser lo más parecido posible, tanto en la composición de la matriz como en el valor de la propiedad a determinar, a las muestras reales que serán posteriormente analizadas con nuestro método analítico.
Incertidumbre	Los valores certificados de la propiedad deseada en el MRC deben ir acompañados por sus valores de incertidumbre. El nivel de incertidumbre asociado también informa de la calidad de un MRC en concreto.

Fuente: Elaboración propia

2.7. Parámetros de Validación

Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad.

Según Salazar (s.f), el laboratorio decide cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse con el fin de validar el método. La caracterización de desempeño del método es un proceso costoso pero puede restringirse por consideraciones de tiempo y costo. Al empezar con una especificación analítica considerada cuidadosamente, se tiene una buena base sobre la cual planear al proceso de validación. Algunos de los parámetros pudieron haber sido determinados aproximadamente durante la etapa de desarrollo del método. Los parámetros estudiados para un mejor desempeño del método son los siguientes: intervalos de trabajo, límite de cuantificación y detección, intervalo de trabajo, exactitud, precisión y otros.

2.7.1. Intervalo de trabajo

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de trabajo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse como se observa en la Figura 4. Esto se refiere al intervalo de concentraciones o a los valores de la propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

Figura 4. Intervalo de Trabajo



Fuente: (Instituto de Salud Pública, 2010)

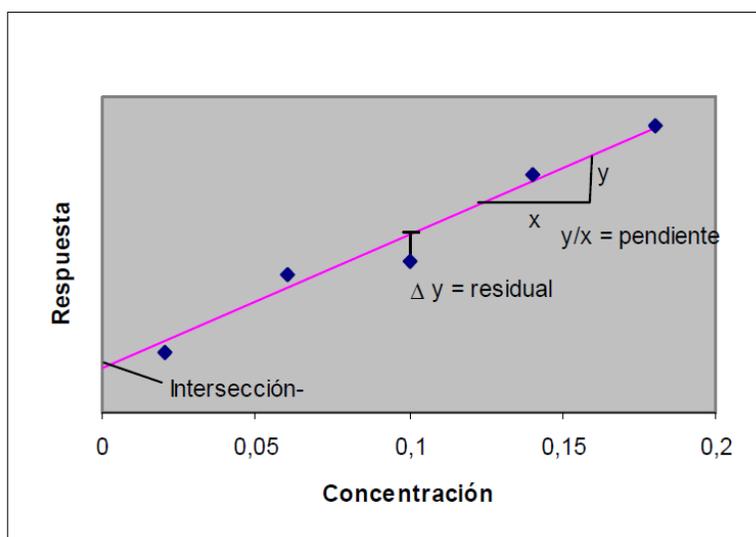
2.7.2. Linealidad

Según la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2010), este parámetro permite expresar la capacidad del método analítico para dar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra encontrada mediante espectrofotometría UV-Vis.

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante

un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo Araujo (2009). (Figura 5).

Figura 4. Linealidad



Fuente: Validación de métodos analíticos (2002)

2.7.3. Límite de cuantificación (LC)

Según el Centro Nacional de Metrología (2005), corresponde a la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud. Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, es importante saber cuál es la concentración más baja del analítico o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método.

2.7.4. Límite de detección (LD)

Este parámetro permite encontrar la concentración mínima cantidad presente en la muestra que se puede detectar aunque no cuantificar bajo las condiciones

experimentales descritas para dicho método. El límite de detección considera la amplitud de la señal y el ruido de la línea de fondo, además la concentración más baja que se puede distinguir claramente a partir del cero (EURACHEM, 2005).

El límite de cuantificación es por lo tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es solo cuantitativo como se observa en la figura 6, encontrándose en ambos términos un rango de concentraciones en el que si bien no se puede cuantificar el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.

Figura 5. Zona de detección y cuantificación



Fuente: Validación de métodos analíticos (2012)

Dónde: Y_B = lectura del blanco L_d = límite de detección L_c = límite de cuantificación

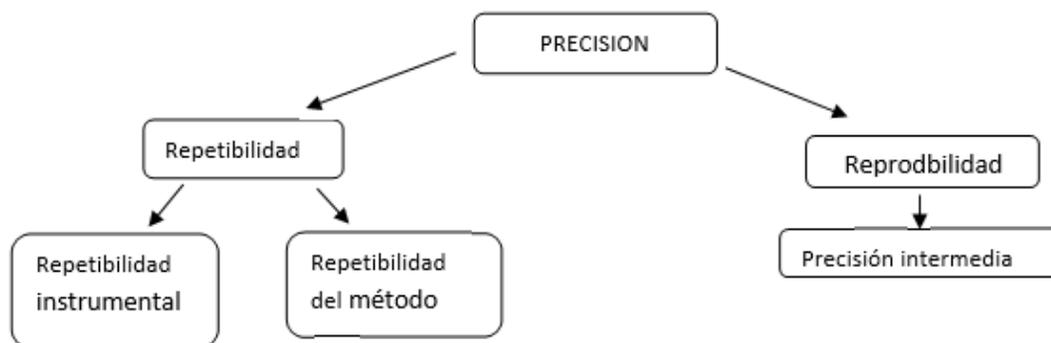
2.7.5. Precisión

La precisión mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, 2010),

Según Eurachem (2005), las fuentes de variación se pueden dividir en: instrumentales y técnicos, humanas y ambientales, las medidas de precisión más comunes son la "repetibilidad" y la "reproducibilidad". Estas representan las dos medidas extremas de precisión que puede obtenerse.

- Llamamos repetibilidad a la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición sobre una misma muestra se obtienen con el mismo método, con el mismo analista, utilizando el mismo instrumento de medida y mismos reactivos, y durante un corto intervalo de tiempo. Se puede cuantificar la repetibilidad debida únicamente al instrumento midiendo repetidamente la señal analítica proporcionada por una misma muestra.
- Precisión intermedia de la precisión, por ejemplo la precisión medida entre diferentes ensayistas, en periodos de tiempo prolongados dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”, pero las condiciones exactas deberán ser especificadas.
- Tanto la reproducibilidad como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito. En la figura 7, se observa los él diagrama para evaluar la precisión.

Figura 6. Diagrama de flujo para la determinación de la precisión



Fuente: Elaboración propia

2.7.6. Exactitud

Expresa el grado de aproximación de los resultados obtenidos, por el método con los verdaderos valores, este parámetro permite cuantificar los errores sistemáticos de las lecturas realizadas, se expresa como porcentaje de recuperación o como

diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero (Instituto de Salud Pública, 2010).

La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos (Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito, 2010).

2.7.7. Incertidumbre

Un requisito fundamental del proceso de validación es establecer la incertidumbre de medida del método de ensayo. Esta incertidumbre de medida viene definida en el Vocabulario Internacional de Metrología, como “la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad, el valor verdadero de la magnitud de medida”, la incertidumbre debe contemplarse como un requisito técnico indispensable por varios motivos como forma de búsqueda de posibles fuentes de error; es indispensable para aquellos laboratorios que pretenden acreditarse según la NB-ISO/IEC 2017.

(Instituto de Salud Pública, 2010), define la incertidumbre de una medición como el parámetro asociado al resultado de la misma, que caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente a la magnitud que se mide por lo que es importante que para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- Efectos de las mediciones, variaciones en las observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralaje
- Condiciones de medición: debido al certificado de calibración, en el que se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor K determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico

- Condiciones de medición: temperatura humedad, etc.
- Otras: el método, uso de tablas, pesada, alícuota, efectos computacionales, etc.
- muestra: tipo de matriz
- Sesgos instrumentales: debido a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas como la deriva resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura
- Pureza de reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.
- Analista: debido a la serie de Generalmente para el análisis de las fuentes de incertidumbre se utiliza el diagrama de espina de pescado u otro tipo de diseño esquemático que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

Este estudio se realizó en el Laboratorio de la Carrera de Agronomía de Suelos y Agua (LAFASA) dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés. El ambiente presenta una Temperatura promedio de 16,8 °C y Humedad promedio de 29,34 %. Como se observa en (Anexo 1).

3.2. Materiales

3.2.1. Materiales de Laboratorio

Los materiales utilizados se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Materiales de laboratorio

Equipos	Reactivos
- Espectrofotómetro UV-visible Cole-Parmer 83057-0,1 V 2.0	- Fluoruro de amonio: NH_4F
- Agitador magnético	- Ácido clorhídrico: HCl
- Agitador de mesa	- Molibdato de amonio: $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$
- Destiladora de agua	- Ácido sulfúrico: H_2SO_4
- Balanza analítica OHAUS	- Tartrato de antimonio y potasio $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 1/2 H_2O$
- pH-metro OAKTON	- L-ácido ascórbico: $(C_6H_8O_6)$
- Micro pipeta de: 10 ml-5 ml-1 ml	- Fosfato dihidrógeno de potasio: (KH_2PO_4)
- Hidrómetro de Bouyoucos	- Bicarbonato de sodio: $NaCO_3$
	- Hexametáfosfato de sodio
	- Ácido clorhídrico HCl

Vidriería	Otros
<ul style="list-style-type: none"> - Matraz aforado de: 10 ml-25 ml-50 ml-1000 ml - Vasos precipitados de: 100ml-250ml-1000ml. - Probetas graduadas de: 50 ml-100ml-1000 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tamiz :de 1mm-2mm - Termómetro - Papel filtro cuantitativo - Piceta - Mortero - Viales - Tips 200µl, 1ml , 5ml

Fuente: Elaboración propia

3.2.2. Material de gabinete

- Computador personal
- Material de escritorio
- Imágenes satelitales, Google Earth
- Software (ArcGIS)

3.3. Metodología

3.3.1. Condiciones de trabajo

- **Preparación del material**

Antes de realizar los ensayos todos los materiales fueron lavados con detergente líquido libre de fosfatos para evitar posible contaminación, se enjuagó con agua destilada además se utilizó *HCl* al 10 % para eliminar adherencias de residuos a los materiales utilizados.

3.3.2. Elección de la longitud de onda óptima

Para la elección de la longitud de onda adecuada a las condiciones ambientales del laboratorio, se obtuvo la Máxima absorbancia (λ) mediante el espectro de absorción la cual relaciona la absorbancia de la solución y las longitudes de onda, efectuando mediciones del analito, para esto se realizó un barrido espectral utilizando soluciones de patrón a partir del estándar de Fosfato dihidrógeno de potasio: (KH_2PO_4), a concentración 0.2 y 0,4 ppm, (Bray-Kurtz y Olsen respectivamente) esta solución fue enrazada a un mismo volumen para ambos métodos (50 ml) ,se realizó las lecturas en un intervalo amplio de longitudes de onda 400 a 990 (nm) en la región del visible.

3.3.3. Modificación de la metodología original

Cuando se plantea un problema analítico lo primero es seleccionar el método de análisis que nos proporcione la información requerida, en este caso los métodos de análisis seleccionados (Bray-Kurtz y Olsen) están basados en el Manual de Procedimientos Analíticos para suelos y Plantas de la Universidad Autónoma Chapingo, México 2011.

Para fines estratégicos y económicos del laboratorio se realizó algunas modificaciones, estos cambios se realizaron de acuerdo a la relación; suelos-Extractante; Solución filtrada-Aforo, Solución Stock-aforo y la longitud de onda como se muestra en la Tabla 4,5.

Para el análisis estadístico se realizó el cálculo de los cuadrados medios y el nivel de significancia respecto a la prueba F con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 4. Variables de reducción del método Bray-Kurtz

Variación	Método original	Método modificado
Peso de la muestra (g)	2.5	1,5
Solución extractante (ml)	25	15
Solución Stock (ml)	5	1
Aforo (ml)	50	10
Longitud de onda (nm)	882	889

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5. Variables de reducción del método Olsen

Variación	Método Original	Método Modificado
Peso de la muestra (g)	2.5	1.5
Solución extractante (ml)	100	30
Solución Stock (ml)	5	1
Aforo (ml)	50	10
Longitud de onda (nm)	882	889

Fuente: Elaboración propia

3.3.4. Validación de la metodología

Se realizó la validación de las metodologías en base a la evaluación de los siguientes parámetros: linealidad del sistema, linealidad del método, intervalo de trabajo, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre, todos estos parámetros fueron evaluados en base a criterios de aceptación, descrito de acuerdo a lo que establece el INSTITUTO BOLIVIANO DE METROLOGIA, Guía de Validación de Métodos analíticos del Instituto de Salud Pública de Chile y la Guía Eurachem de México debido a que se adecuan al método desarrollado que además tienen como lineamientos la NB-ISO/IEC 17025:2017.

3.3.4.1. Preparación del MRC y MRI

Para los ensayos de validación se utilizaron MRC (Material de Referencia Certificado, que fue obtenido del equipo de absorción atómica) que es el estándar, como también se utilizó MRI (Material de Referencia Interno) de suelo, seguidamente se describe la preparación de las soluciones y del material para los ensayos.

A partir de una solución certificada de (Fosfato dihidrógeno de potasio KH_2PO_4) de 1000 ppm se preparó un estándar intermedio de 250 ppm, para lo cual se midió 12,5 ml de Fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) esta cantidad se aforo en 50 ml con agua destilada. Esta solución se guardó en un frasco de plástico o de vidrio blando, para evitar la contaminación con arsénico. Finalmente, la solución se mantuvo refrigerada.

Para el MRI se escogió dos tipos de suelos ácido y básico que representasen los suelos que existen en los diferentes municipios de la ciudad de La Paz.

3.3.4.2. Muestreo de suelos

Las muestras de suelo se tomaron de la capa arable a una profundidad de 20 a 30 cm, cada muestra pesó de 1,5 a 2 kg, se retiró las piedras y los terrones grandes y se procedió al embolsado e identificación de las muestras (Chilón, 1996).

3.3.4.3. Preparación de la muestra de suelo en laboratorio

Para el manejo de las muestras de suelo en laboratorio se siguió con los siguientes pasos: desecación, molienda, tamizado, mezcla, partición, pesada y conservación (Chilón, 1996).

Las muestras de suelo fueron secadas a temperatura ambiente posteriormente se las colocó en una capa delgada de plástico en un área donde esté protegido de

contaminación por materias extrañas esto hasta que se equilibre con la humedad atmosférica, una vez secas las muestras se procedió a pasarla a través de un tamiz de 1mm de diámetro para la determinación de parámetros químicos y 2mm para la determinación de parámetros físicos, luego se procedió a mezclar para lograr la mayor uniformidad posible, una vez mezcladas las muestras se realizó la partición de la muestra a través del “cuarteo”, estas muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas de polietileno de alta densidad respectivamente codificadas y libres de humedad, para su respectivo análisis.

3.3.4.4. Procedimiento analítico Bray-Kurtz (suelos neutro - ácidos)

- **Fluoruro de amonio 0.03 N en ácido clorhídrico 0.025 N (Solución extractante)**

Se pesó en una balanza analítica 1.11 g de NH_4F se diluyó en 900 ml de agua destilada y se adicionaron 2 ml de HCl concentrado ($\rho = 1.19$ y pureza de 37.23%). Se transvasó a un matraz y se aforó a 1 l.

- **Ácido sulfúrico 14 N**

Con la ayuda de una probeta se midió 196 ml de H_2SO_4 concentrado ($\rho = 1.84g/m^3$ y pureza de 95%), se procedió a mezclar lentamente en agua destilada y se enrazó a 500 ml.

- **Tartrato doble de amonio y potasio al 0.5%.**

Se pesó 0.5 g de tartrato doble de amonio y potasio [$K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 1/2 H_2O$] y se procedió a mezclar en 100 ml de agua destilada.

- **Solución “stock” de molibdato de amonio.**

Se pesó 20 g de molibdato de amonio, [$(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$] y se procedió a diluir aproximadamente en 300 ml de agua destilada. Se agregó lentamente 450 ml de H_2SO_4 al 14 N bajo constante agitación y 100 ml de tartrato doble de amonio

y potasio al 0.5%, posteriormente se procedió a diluir y trasvasar a un matraz de 1000 ml, se debe guardar en frasco oscuro para protegerlo de la luz.

- **Reactivo mezclado**

Se pesó 1.5 g de L-ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) se procedió a diluir en 100 ml de la solución stock. Este reactivo debe prepararse fresco cada 24 horas ya que sufre descomposición.

- **Procedimiento**

Se pesó 1.5 g de suelo y se colocó en un vaso de precipitado de 100 ml. Se adicionó 15 ml de la solución extractante (cubrir la película de plástico para evitar contaminación). Se agitó por 5 minutos en agitador a 250 revoluciones. Se procedió a filtrar en papel cuantitativo. Simultáneamente se corrió blancos de reactivos. Se tomó una alícuota de 1 a 5 ml del extracto, dependiendo de la concentración de P y se colocó en un matraz aforado de 10 ml. Se adicionó agua hasta completar aproximadamente 5 ml. Se agregó 1 ml del reactivo mezclado, se agitó y completó a volumen. Se esperó 30 minutos y se procedió a leer en el espectrofotómetro a 889 nm de acuerdo al resultado obtenido en la elección de longitud óptima para el laboratorio.

3.3.4.5. Procedimiento analítico Olsen (suelos básicos)

- **Solución extractora, bicarbonato de sodio 0.5 M.**

Con la ayuda de una balanza analítica se pesó 42 g de $NaHCO_3$, en un vaso de precipitado se procedió a disolver en aproximadamente 900 ml de agua destilada. Antes de usar la solución extractora se debe ajustar su pH a 8.5 con $NaOH$ 10 N se enrasa a 1 l. Se debe controlar el pH de la solución antes de utilizarla. El contacto de esta solución con el aire tiende a cambiar el pH, por lo que debe controlarse antes de utilizarse y realizar el ajuste si es preciso.

- **Ácido sulfúrico 14 N.**

Con la ayuda de una probeta de 100 ml se midió 196 ml de H_2SO_4 concentrado ($\rho = 1.84 \text{ g/m}^3$ y pureza de 95%), se procedió a trasvasar lentamente en agua destilada y se enrasó a 500 ml.

- **Tartrato de antimonio y potasio a 0.5%.**

Se pesó 0.5 g de $[K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 1/2 H_2O]$, se disolvió en 100 ml de agua. Molibdato de amonio. Se disuelven 20 g de $[(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ en aproximadamente 300 ml de agua destilada, posteriormente se agregó lentamente, y bajo constante agitación, 450 ml de H_2SO_4 al 14 N. Se agregó 100 ml de tartrato de antimonio y potasio a 0.5%. Se diluyó las mezclas a 1 l con agua destilada. Esta solución se debe guardar en frasco oscuro para protegerlo de la luz.

- **Solución reductora, ácido ascórbico**

Se disolvió 0.50 g de $(C_6H_8O_6)$ con solución de molibdato de amonio y se aforó con la misma solución a 100 ml. Esta solución se preparó minutos antes y cada vez que se vaya a realizar la colorimetría.

- **Procedimiento**

Se pesó 1,25 g de suelo y se colocó en un vaso de precipitado de 100 ml, se adicionó 25 ml de solución extractora (cubrir los tapones con la película de plástico para evitar contaminación) y se agitó por 30 minutos a 250 revoluciones. Se filtró inmediatamente a través de papel filtro cuantitativo. Si los suelos son ricos en materia orgánica, se adiciona aproximadamente 1 g de carbón activado al papel filtro. Este carbón activado debe estar libre de P. Simultáneamente se corrió blancos de reactivos.

Para la determinación de P se toma una alícuota de 1 ml del filtrado (ó 5 ml si la concentración de P es muy baja) y se colocó en un matraz aforado de 10 ml, se

adicionó agua y 1 ml de solución reductora y se aforó. Después de la adición de cada reactivo hay que agitar. Se hizo la lectura de absorbancia después de 30 minutos, pero antes de una hora a 889 nm.

3.3.4.6. Determinación de la linealidad del sistema

Para el análisis de linealidad del sistema se realizó ensayos de curva de calibración para el espectrofotómetro, se prepararon disoluciones a partir del estándar (de 250 ppm). Para el método Bray- Kurtz, se utilizó concentraciones crecientes de fósforo en el rango 0-0,2-0,4-0,6-0,8-1 ppm. Para el método Olsen se midió niveles de concentraciones crecientes de 0-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6 ppm estas diluciones fueron enrazadas a 50 ml por cada método se realizó 12 ensayos con una réplica y en diferentes días, obteniendo lecturas a una longitud de onda de 889 nm.

Una vez realizada las lecturas se descartó los datos anómalos, esto para evaluar que los resultados pertenecen a la misma población. Esta evaluación consiste en calcular un estadístico y compararlo con un valor tabulado esto para un 95% de confianza como lo indica (Instituto de Boliviano de Metrología, 2018), para esto se utilizó las siguientes expresiones:

Test de Grubbs (Evalúa la precisión de los valores)

$$G_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}}{s_{ij}} \quad Ec.1$$

Donde : G_{ij} es la G de Grubbs; \bar{y}_{ij} es el promedio de las mediciones; \bar{y} es el promedio total de las mediciones; s_{ij} es la desviación estándar de las mediciones.

A partir de los datos obtenidos en los ensayos se realizó un análisis estadístico en base determinando las siguientes especificaciones : ecuación de la recta de regresión, representación gráfica de la recta de regresión (respuesta del instrumento y; y la concentración del patrón x), coeficiente de correlación de

Pearson (r), coeficiente de determinación, determinación de la pendiente, ordenada al origen, covarianza, y análisis de varianza para la regresión lineal (Instituto de Salud Pública,2010), utilizando las siguientes ecuaciones:

Ecuación de la recta:

$$Y_j = a + by_i \quad Ec. 2$$

Donde: a es la intersección; b es la pendiente; y_i son los datos obtenidos de cada lectura (absorbancias).

Se calculó el valor de la pendiente (b):

$$b = \frac{\sum_i^n \{(x_i - \bar{x}) - (y_i - \bar{y})\}}{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2} \quad Ec. 3$$

Donde: x_i son las medidas de concentraciones; y_i son las medidas de absorbancia.

La ordenada en el origen (a):

$$a = \bar{y} - \bar{bx} \quad Ec. 4$$

El coeficiente de correlación (r):

$$r = \frac{\sum_i^n \{(x_i - \bar{x}) - (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2] * [\sum_i^n (y_i - \bar{y})^2]}} \quad Ec. 5$$

Donde: $x_i - \bar{x}$ son cada par de puntos concentración y respuesta; $y_i - \bar{y}$ son los valores promedio de las concentraciones y respuestas.

Correlación lineal significativa:

$$t_r = \frac{r * \sqrt{(q - 2)}}{\sqrt{(1 - r^2)}} \quad Ec. 6$$

Donde: $t_{critico}$ es el valor del estimador t Student crítico, para $\alpha = 0.05$ y $n-2$; t_{cal} es el valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación; $|r|$ es el valor absoluto del coeficiente de correlación.

Para la evaluación de la linealidad se realizó una prueba estadística de F (Fisher), se comparó el valor de F_{cal} con el valor de F_{crit} con un grado de significancia del 95%.

3.3.4.7. Linealidad del método

Se utilizó 5 muestras de suelos ácidos y 5 muestras de suelos básicos de diferentes niveles de concentración de fosforo (bajo, medio y alto), de cada una de las muestras se realizó 3 réplicas. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico determinando la ecuación de la recta de regresión, representación gráfica de la recta de regresión, coeficiente de correlación de Pearson, varianza residual y análisis de varianza de la regresión, utilizando las ecuaciones ya descritas.

3.3.4.8. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección y límite de cuantificación se determinó realizando lecturas de 10 blancos para cada método, además de calcular el valor crítico (LC), (Eurachem, 2005). El primer paso para determinar el límite de detección es calcular el valor crítico, el cual se determina con un nivel de confianza del 95%, con grado de libertad infinito, el cual es de 1.645, para el análisis se realizó el cálculo de ambos parámetros con las siguientes ecuaciones:

$$LC = \bar{y}(B) + 1,645 * S_B \quad Ec. 7$$

$$LOD = \bar{y}(B) + 3.29 * S_B \quad Ec. 8$$

$$LOQ = \bar{y}(B) + 10 * S_B \quad Ec. 9$$

Dónde: LC es el límite crítico; LOD es el límite de detección; LOQ es el límite de cuantificación; Y_i es el valor promedio de las lecturas del blanco; S_B es la desviación del blanco.

3.3.4.9. Precisión

La precisión fue determinado a partir de dos medidas: repetibilidad y reproducibilidad intermedia para esto se realizó diluciones a partir del estándar de 250 ppm a diferentes concentraciones definido por el método de análisis (Instituto de Salud Pública, 2010): para el método Bray-Kurtz II 0,2-0,4-0,6-0,8-1 ppm y para el método Olsen a concentraciones de 0,2-0,3-0,4-0,5-0,6 ppm. Estos análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones de variación (variaciones intermedias) como se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de variación para determinar reproducibilidad intermedia

Variables	Repetibilidad	Precisión intermedia
Analista	Mismo	Diferente
Laboratorio	Mismo	Mismo
Día del ensayo	Mismo	Diferente
Condiciones ambientales de T° y %H	Diferente	Diferente
Método	Mismo	Mismo
Equipo (Espectrofotómetro)	Mismo	Mismo

Fuente: Elaboración propia

El segundo analista (A-M), realizó los mismos ensayos pero en diferentes condiciones ambientales y diferentes días.

Con los datos se le realizó la verificación de datos anómalos y si estos valores pertenecen a la misma población estadística en base a la evaluación de test de Grubbs (G).

Para el análisis estadístico se realizó el análisis de Horwitz, para cada una de las concentraciones ya establecidas. El criterio de aceptación se fijó como $\%CV \leq 2$

según lo establecido para métodos espectrofotométricos para la repetibilidad y para la reproducibilidad el valor de aceptación se determinó por medio del factor de HorRat (CODEX ,2009) para lo cual se utilizaron las siguientes expresiones:

$$\% CV_{Horwitz} = 2^{(1-0,5)\log C} \quad Ec. 10$$

$$HorRat = \frac{CV}{CV_{Horwitz}} \quad Ec. 11$$

Dónde: $\% CV_{Horwitz}$ es el Coeficiente de variación de Horwitz; CV=Coeficiente de variación de las mediciones realizadas; C es la Concentración del analito expresada en decimales.

3.3.4.10. Exactitud

Para la evaluación de la exactitud de los métodos se realizó evaluando el sesgo y el %R. (Eurachem, 2005). Para el sesgo se realizó ensayos empleando el estándar del cual se preparó diluciones concentración conocida, este valor teórico se le restó el resultado hallado empleando los métodos en estudio, utilizando las siguientes especificaciones:

$$\delta = x - x_{MRC} \quad Ec. 12$$

Donde: δ es el sesgo; x es el valor obtenido en cada corrida; x_{MRC} es el valor teórico del material de referencia.

Para su análisis estadístico se utilizó la siguiente expresión:

$$t_{cal.} = \frac{|x - x_{MRC}|}{S\sqrt{n}} \quad Ec. 12$$

Dónde: x_{MRC} es el valor medio asignado al material de referencia; x es el valor medio de todas las lecturas realizadas; S es la desviación estándar de las lecturas obtenidas n es el número de lecturas o valores observados.

Para él % R se trabajó con MRI (Material de Referencia Interno) a los que se les añadió estándares de P, para esto se consideró elegir niveles de concentración que se encuentren en el rango lineal de manera que permitan evaluar mejor la capacidad de recuperación del método (Eurachen, 2005).

Se realizó 6 mediciones de cada concentración a 3 niveles críticos (bajo, medio y alto) para el método Bray-Kurtz 0,2- 0,4 y 0,6 ppm y para el método Olsen 0,2-0,3 y 0,4 ppm, El % de R se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \quad \text{Ec. 14}$$

Dónde: %R es el porcentaje de recuperación; C_e es la concentración de analito de la muestra enriquecida C_o = Es la concentración del analito medido en la muestra sin adicionar, C_a = Es la concentración del analito adicionado a la muestra enriquecido.

3.3.4.11. Incertidumbre

Para esta determinación se identificó las principales fuentes de incertidumbre, luego se evaluó las incertidumbres que provienen de cada fuente individual y finalmente se determinó directamente la incertidumbre combinada. Para cada fuente de incertidumbre se utilizaron las siguientes formulas:

- Incertidumbre de la linealidad del sistema:

La incertidumbre estándar de la linealidad del sistema se la estimó mediante la respuesta del instrumento (espectrofotómetro UV- Visible) se calculó con la ecuación 18:

$$u_{Y_L} = \frac{S}{b_1} \sqrt{\frac{1}{\rho} + \frac{1}{n} + \frac{(Y_p - \bar{Y}_{MR})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Ec. 15}$$

Donde: u_{Y_p} =Incertidumbre del (P) obtenida por la linealidad; S = desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal; b_1 = pendiente calculada; ρ es el

número de réplicas de la muestra en estudio; n es el número de disoluciones, $\bar{\gamma}_{MR}$ es el promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones empleadas en la linealidad del sistema de linealidad; S_{xx} es Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas.

La suma de cuadrados de los residuales se calculó con la siguiente ecuación:

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (\gamma_p - \bar{\gamma}_{MR})^2 \quad \text{Ec. 16}$$

La desviación estándar residual de la regresión lineal se calculó con la siguiente ecuación:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b_0 + b_i \gamma_p)]^2}{n-2}} \quad \text{Ec. 17}$$

Se asumió que la concentración de la muestra γ_p , es de 0,40 ppm que corresponde a uno de los puntos del rango trabajo, para efectos prácticos de cálculo.

- Incertidumbre de la pureza del (KH_2PO_4)

Según el certificado del MRC la pureza del (KH_2PO_4) que se utilizó fue de 99.9 ± 0.5 %. Esto es químicamente equivalente a la pureza del P_2O_5 y del P. No se consideró otra fuente de incertidumbre ya que el procedimiento fue realizado adecuadamente, para lo cual se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$u_{P \text{ KH}_2\text{PO}_4} = \frac{u}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. 18}$$

$$u_{rP \text{ KH}_2\text{PO}_4} = \frac{u_{P \text{ KH}_2\text{PO}_4}}{P \text{ KH}_2\text{PO}_4} \quad \text{Ec. 19}$$

- Incertidumbre de la masa molar del (KH_2PO_4)

La incertidumbre de la masa molar del compuesto se determinó mediante la combinación de la incertidumbre de los pesos atómicos de sus elementos constitutivos (Westgard, 2003). Para calcular la incertidumbre estándar (ux)

correspondiente a cada elemento se dividió la incertidumbre reportada (u) entre $\sqrt{3}$, (CENAM, 2008). Para la incertidumbre estándar combinada del KH_2PO_4 se utilizó las siguientes ecuaciones:

$$u_{MKH_2PO_4} = \sqrt{u_{K^2} + u_{H^2} + u_{P^2} + u_{O^2}} \quad \text{Ec. 20}$$

$$u_{rM KH_2PO_4} = \frac{u_{M KH_2PO_4}}{M KH_2PO_4} \quad \text{Ec. 21}$$

- Incertidumbre del volumen del material volumétrico

Este parámetro se evaluó utilizando el método gravimétrico (Ruiz-Morer, 2006), empleando 10 repeticiones por duplicado en cada caso (matraz aforado de 10ml, 25ml, 50 ml y micropipetas de 200ul, 1ml, 5ml). En los que se identificaron tres principales fuentes de incertidumbre que afectan esta medición: tolerancia del material volumétrico, repetibilidad del volumen medido por el analista (Rep) y efecto de la variación de la temperatura con respecto a la temperatura de calibración del material volumétrico, que se estima a partir del factor de expansión del agua (ΔT).

- Tolerancia

Se tomó de la especificación del material volumétrico (Tolerancia) correspondiente que proporciona el proveedor y para convertir a incertidumbre estándar se asumió una distribución rectangular dividiendo entre $\sqrt{6}$ (EURACHEM, 2005), se utilizó la siguiente ecuación:

$$u_T = \frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{6}} \quad \text{Ec. 22}$$

- Repetibilidad

Esta fuente de incertidumbre se estimó realizando 20 mediciones ($n = 20$) de la masa de agua (g) contenida en el volumen asignando del material volumétrico. La

repetibilidad se estimó a través del cálculo de la desviación estándar (s) de las mediciones de la masa del volumen asignado, utilizando la siguiente ecuación:

$$u_T = \frac{Sij}{\sqrt{n}} \quad Ec. 23$$

- Incertidumbre del factor de dilución

A partir del (KH_2PO_4) de 1000 ppm se preparó una disolución a 250ppm y de ahí se preparó el estándar del punto medio (2.0 mgL⁻¹) de la curva de calibración. Aquí se utilizó la incertidumbre del volumen del matraz volumétrico de 50 ml y la incertidumbre correspondiente al volumen de la micropipeta volumétrica de 200ul, con los cuales se prepararon las diluciones, la incertidumbre estándar del factor de dilución se obtiene con la siguiente ecuación:

$$u_{rfdn} = \sqrt{\sum_1^n \left(\frac{u_{fdn}}{fdn}\right)^2} \quad Ec. 24$$

- Combinación de las fuentes de incertidumbre

La incertidumbre estándar relativa y la combinada son las incertidumbres obtenidas a partir de las incertidumbres estándares individuales asociadas a las magnitudes de entrada del modelo de medición (EURACHEM, 2005). Para la combinación se utilizó la ecuación 25. Todas las fuentes de incertidumbres halladas anteriormente.

$$u_{rcp} = \sqrt{\left(\frac{u_{yp}}{yp}\right)^2 + \left(\frac{u_{P KH_2PO_4}}{P KH_2PO_4}\right)^2 + \left(\frac{u_{M KH_2PO_4}}{M KH_2PO_4}\right)^2 + \left(\frac{u_{fdn}}{fdn}\right)^2} \quad Ec. 25$$

- Estimación de la incertidumbre expandida

Para hallar la incertidumbre expandida (U) se obtuvo multiplicando la incertidumbre estándar combinada (por el factor de cobertura $k = 2$, con un nivel de confianza de aproximadamente 95%).

$$U = urcp * K \quad Ec. 26$$

3.3.5. Cuantificación el fósforo disponible en suelos agrícolas de diferentes municipios del Departamento de La Paz.

Para este objetivo se siguió el siguiente procedimiento:

3.3.5.1. Determinación de pH

Se determinó según (Miranda y Caballero, 2015).

- Se pesó 10 g de suelo seco tamizado (1 mm.) en un vaso de precipitado de 100 ml y se añadió 50 ml e agua destilada.
- Agitó la muestra por espacio de 30 min. En una mesa agitadora.
- Se dejó en reposo un mínimo de 2 horas, se procedió a las lecturas.

3.3.5.2. Determinación de textura método del Densímetro

Se determinó según (Miranda y Caballero, 2015).

- Se pesó 50 g de muestra tamizado a 2mm.
- La muestra se colocó en un vaso de dispersión de 200 ml. Se procedió a agregarle 100 ml de agua destilada y se agitó hasta formar una suspensión.
- Se agregó 5 g de hexametáfosfato de sodio.
- Se agitó a 200 revoluciones durante 10 min.
- Se transfirió la suspensión a una probeta y se añadió agua destilada hasta llegar a la señal de 1000 ml.
- Posteriormente se agitó la solución manualmente durante 1 min. hasta que las partículas queden suspendida.
- Se efectuó la primera lectura con el hidrómetro, después de 2 horas se realizó la segunda lectura.

3.3.5.3. Selección de muestras de 20 municipios del Departamento de La Paz

Los suelos fueron seleccionados bajo ciertas condiciones de naturaleza física y química para el método Bray-Kurtz, los suelos de pH ácidos- neutros y para el método Olsen de pH básicos, para homogenizar las muestras en cuanto a textura se eligieron suelos que contengan arcilla $\geq 20\%$, cada determinación de fósforo disponible en el suelo se la realizó por triplicado y de cada municipio se escogió tres muestras de suelo, se evaluó el desvío estándar y el %CV.

La preparación de la muestra y el procedimiento se realizó en base a lo descrito en el los puntos 3.3.4.2, 3.3.4.3 y 3.3.4.4.

Las Tablas 7 y 8, muestran los Municipios y códigos de los suelos utilizados para cada método.

Tabla 7. Muestras utilizadas para el método Bray-Kurtz

Método	Municipio	Código
Bray-Kurtz	Inquisivi	MP-25
Bray-Kurtz	Cairoma	MP-369
Bray-Kurtz	Cairoma	MP-371
Bray-Kurtz	Cairoma	MP-373
Bray-Kurtz	Ichoca	MP-152
Bray-Kurtz	Ichoca	MP-153
Bray-Kurtz	Ichoca	MP-159
Bray-Kurtz	Carabuco	MP-211
Bray-Kurtz	Carabuco	MP-217
Bray-Kurtz	Yaco	MP-235
Bray-Kurtz	Yaco	MP-249
Bray-Kurtz	Malla	MP-252
Bray-Kurtz	Malla	MP-253
Bray-Kurtz	Malla	MP-255
Bray-Kurtz	Colquiri	MP-259
Bray-Kurtz	Colquiri	MP-266
Bray-Kurtz	Colquiri	MP-283
Bray-Kurtz	Mecapaca	MP-330
Bray-Kurtz	Chuma	MP-360
Bray-Kurtz	Chuma	MP-361
Bray-Kurtz	Chuma	MP-363

Bray-Kurtz	Achacachi	MP-388
Bray-Kurtz	Achacachi	MP-394
Bray-Kurtz	Achacachi	MP-398
Bray-Kurtz	Sorata	MP-423
Bray-Kurtz	Sorata	MP-449
Bray-Kurtz	Sorata	MP-459
Bray-Kurtz	Quime	MP-477
Bray-Kurtz	Quime	MP-487
Bray-Kurtz	Quime	MP-496
Bray-Kurtz	Combaya	MP-507
Bray-Kurtz	Combaya	MP-510
Bray-Kurtz	Combaya	MP-523
Bray-Kurtz	Ancoraimes	MP-563

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Muestras utilizadas para el método Olsen

Método	Municipio	Código
Olsen	Inquisivi	MP-24
Olsen	Inquisivi	MP-26
Olsen	Palca	MP-41
Olsen	Escoma	MP-165
Olsen	Escoma	MP-186
Olsen	Carabuco	MP-201
Olsen	Escoma	MP-218
Olsen	Yaco	MP-238
Olsen	Luribay	MP-296
Olsen	Luribay	MP-298
Olsen	Luribay	MP-314
Olsen	Mecapaca	MP-318
Olsen	Mecapaca	MP-319
Olsen	Sapahaqui	MP-544
Olsen	Sapahaqui	MP-557
Olsen	Sapahaqui	MP-558
Olsen	Ancoraimes	MP-564
Olsen	Ancoraimes	MP-567

3.3.6. Análisis de costos

Se realizó la determinación de costos tomando en cuenta, el costo de los reactivos y comparando el método original con el método modificado. Los parámetros evaluados fueron: el costo de los reactivos y no se tomó en cuenta el personal, los ambientes, mantenimiento del equipo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

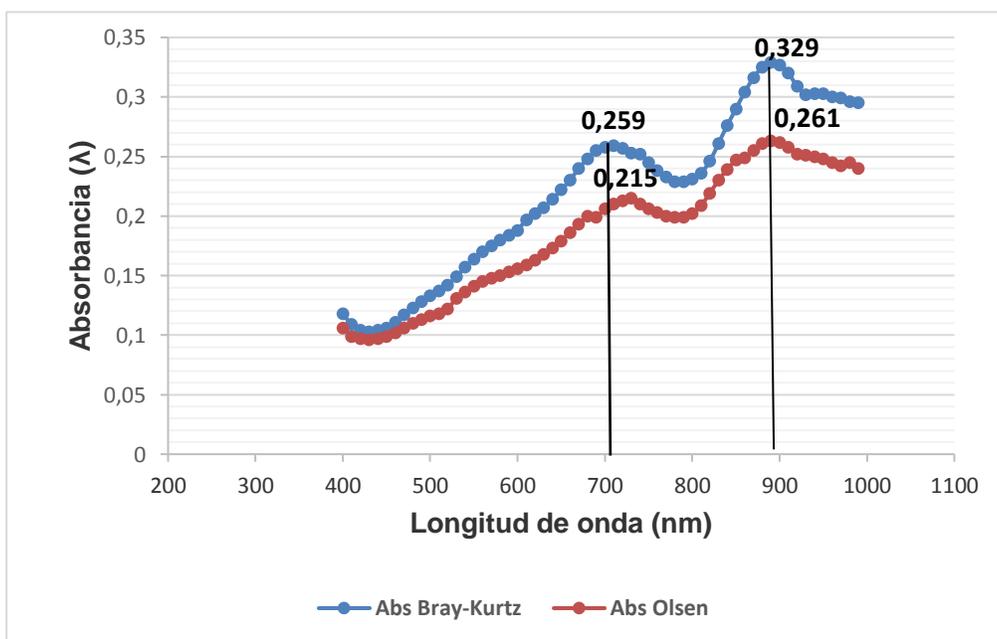
4.1. Condiciones óptimas de las metodologías

4.1.1. Elección de la longitud de onda óptima

En el Anexo 2, se muestra los resultados obtenidos del barrido espectral de 400 a 990 nm, con una concentración de 0,2 ppm para el método Bray-Kurtz y 0,4 ppm para el método Olsen, datos obtenidos con el espectrofotómetro UV-visible Cole-Parmer Modelo 83057-0.1 V-2.0. Las condiciones ambientales en el laboratorio no fueron parámetros críticos para la calibración, durante el periodo que duro los ensayos de este trabajo ya que la Temperatura y Humedad estuvieron dentro de los siguientes intervalos: 50 ± 20 % HR y 25 ± 10 °C, como lo estable (Hernández, 2013).

En el Grafico 1, podemos observar claramente que el espectro de máxima absorbancia (λ) se encuentra a dos longitudes de onda de máxima absorción las cuales se dan a 710 y otro a 900 nm para ambos métodos.

Gráfico 1. Espectro de máxima absorción de fósforo



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9, se muestran los datos obtenidos para ambos métodos de un barrido espectral entre 880 a 890 nm. Para identificar la longitud de onda en un número exacto.

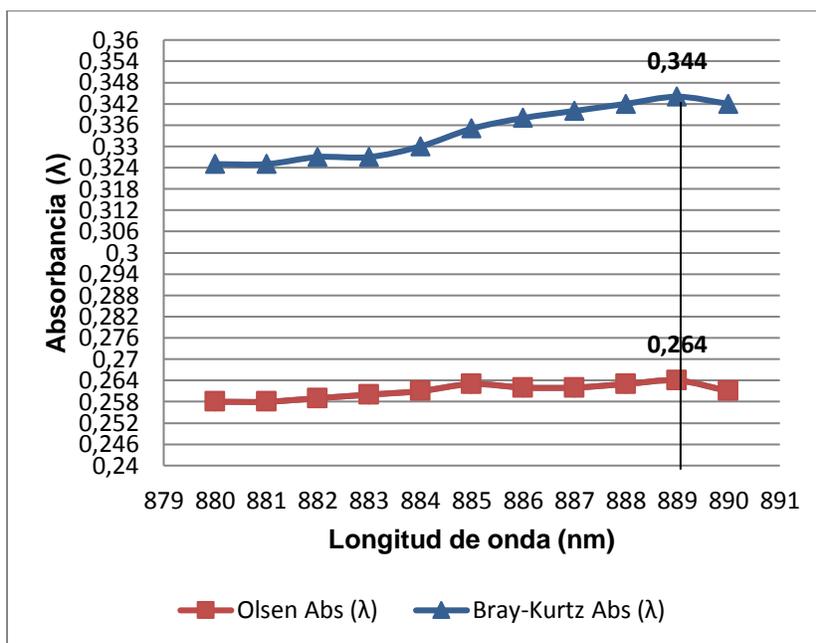
Tabla 9. Barrido espectral 880-890nm

Longitud de onda (nm)	Bray-Kurtz Abs. (λ)	Olsen Abs. (λ)
880	0,325	0,258
881	0,325	0,258
882	0,327	0,259
883	0,327	0,26
884	0,33	0,261
885	0,335	0,263
886	0,338	0,262
887	0,34	0,262
888	0,342	0,263
889	0,344	0,264
890	0,342	0,261

Fuente: Elaboración propia

El Gráficos 2, se muestra los espectros de máxima absorbancia. Para el método Bray-Kurtz a una concentración de 0,4 ppm la máxima absorbancia es 0,344 (λ) y para el método Olsen a una concentración 0,2 ppm su máxima absorbancia es de 0,264 (λ) estos valores se encuentra a una longitud de onda de 889 nm , cumpliendo así con lo que menciona (Verde y Vega, 2008), que en el análisis espectrofotométrico, normalmente se escoge la longitud de onda de máxima absorbancia del analito, entonces podemos decir que a 889 nm se encuentra la longitud óptima para realizar las lecturas de muestras de suelo, además que comparando ambos espectros obtenidos son similares con los reportados por (García y Ballesteros, 2006) de 890 nm.

Gráfico 2. Espectro de máxima absorbancia Bray-Kurtz



Fuente: Elaboración propia

4.1.2. Reducción de la metodología original

La Tabla 10, muestra los datos obtenidos en la modificación de la metodología original esto para ambos métodos, podemos observar que se obtiene valores similares.

Tabla 10. Reducción Método A (50ml) – Método B (10ml)

Código	Método				
	Bray-Kurtz		Código	Olsen	
	Método A 50ml ppm de P	Método B 10 ml ppm de P		Método A 50ml ppm de P	Método B 10 ml ppm de P
MRI-1	19,2	20,2	MRI-1B	63,4	64,4
MRI-1	19,5	20,1	MRI-1B	63,8	64,8
MRI-1	20,3	20,7	MRI-1B	63,8	64,4
MRI-1	20,1	20,2	MRI-1B	64	63,8
MRI-1	19,9	19,8	MRI-1B	65,2	64,8
MRI-1	19,4	20,2	MRI-1B	64,4	65,4
MRI-1	20	19,8	MRI-1B	64	64,2
MRI-1	20,2	20,2	MRI-1B	64,8	64,4
MRI-1	19,3	18,7	MRI-1B	63,4	64,8
Yi	19,767	19,989	Yi	64,089	64,556
Si	0,418	0,551	Si	0,609	0,456

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 11 y 12, se muestra el resumen del análisis ANOVA, en el que se compara las medias entre sí para ambos métodos, mostrando resultados satisfactorios y similares, el nivel de significancia respecto a la prueba F con un nivel de confianza del 95%, para el método Bray-Kurtz se alcanzó un F crítico igual a 4,414 que es mayor al F experimental 0,928 que manifiesta que no existen diferencias significativas entre ambos métodos, para el método Olsen se obtuvo F crítico igual a 4,414 que es mayor al F experimental 3,692 manifestando así que no existen diferencias entre ambos métodos.

De acuerdo a los datos obtenidos podemos mencionar que al realizar los análisis con el método modificado (10ml) se obtendrán valores que no son significativamente diferentes del método original (50ml).

Tabla 11. Análisis de varianza (Bray-Kurtz)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0,2	1	0,200	0,928	4,414
Dentro de los grupos	3,878	18	0,215		
Total	4,078	19			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 12. Análisis de varianza (Olsen)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0,968	1	0,968	3,692	4,414
Dentro de los grupos	4,72	18	0,262		
Total	5,688	19			

Fuente: Elaboración propia

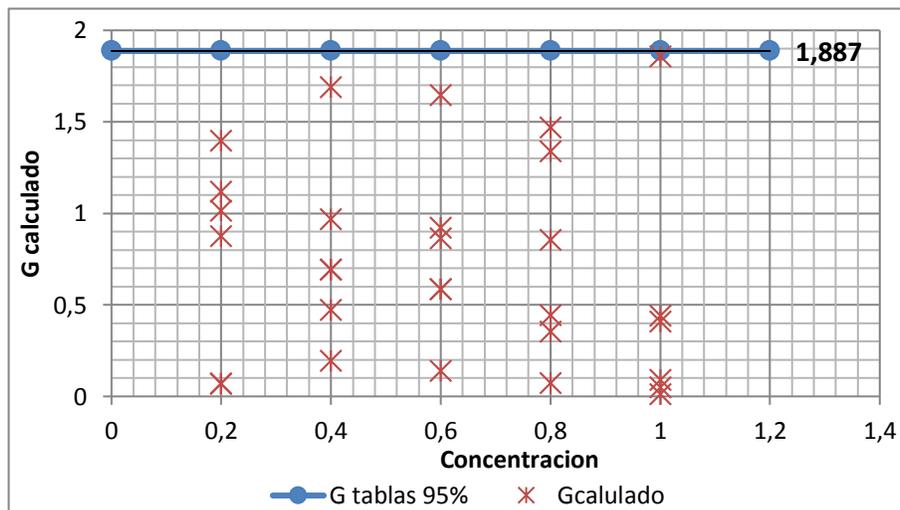
4.2. Validación de los métodos Bray-Kurtz y Olsen

A continuación se presenta el tratamiento de datos en base a los resultados obtenidos experimentalmente en los ensayos realizados para cada método.

4.2.1. Linealidad del sistema

Con los datos obtenidos (Anexo 2) se realizó el descarte de datos anómalos por medio del tests de Grubbs a un 95% de probabilidad, de acuerdo al Gráfico 3, podemos observar que los valores de G_{cal} para las concentraciones (0,2-0,4-0,6-0,8 y 1) no sobrepasa el valor de G_{tab} que es de 1,887, en base a esta evaluación estadística se acepta los valores experimentales, por lo que ningún valor fue descartado cumpliendo así con lo establecido por el (Instituto Boliviano de Metrología, 2018).

Gráfico 3. Evaluación de los datos para el método Bray-Kurtz

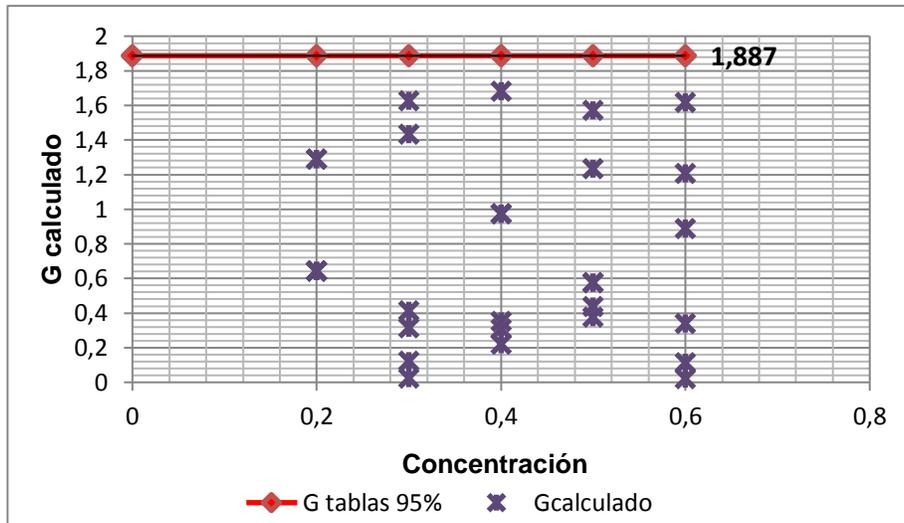


Fuente: Elaboración propia

Con los datos de obtenidos (Anexo 2) se realizó el descarte de datos anómalos por medio del tests de Grubbs a un 95% de probabilidad, el Grafico 4, podemos observar que los valores de G_{cal} para las concentraciones (0,2-0,3-0,4-0,4 y 0,5) no sobrepasa el valor de G_{tab} que es de 1,887, en base a esta evaluación estadística se acepta los valores experimentales por lo que ningún valor fue

descartado cumpliendo así con lo establecido por el (Instituto Boliviano de Metrología, 2018).

Gráfico 4. Evaluación de los datos a para el método Olsen



Fuente: Elaboración propia

La Tabla 13, se muestran los valores experimentales promedios obtenidos de la evaluación del test de Grubbs de la absorbancia de cada concentración para cada método, con estos datos se realizó las gráficas de linealidad, cabe destacar que para la obtención de estos resultados se realizó varias ensayos previos.

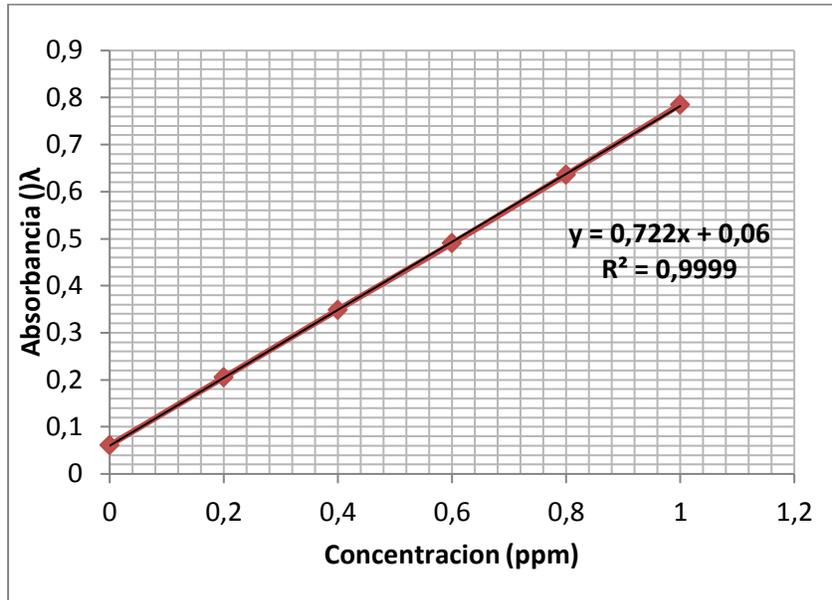
Tabla 13. Valores experimentales evaluados

Niveles	METODOS			
	Bray-Kurtz		Olsen	
	Conc.	Abs. (λ) Yi	Conc.	Abs. (λ) Yi
1	0	0,061	0	0,06
2	0,2	0,205	0,2	0,2
3	0,4	0,349	0,3	0,272
4	0,6	0,49	0,4	0,336
5	0,8	0,636	0,5	0,412
6	1	0,785	0,6	0,478

Fuente: Elaboración propia

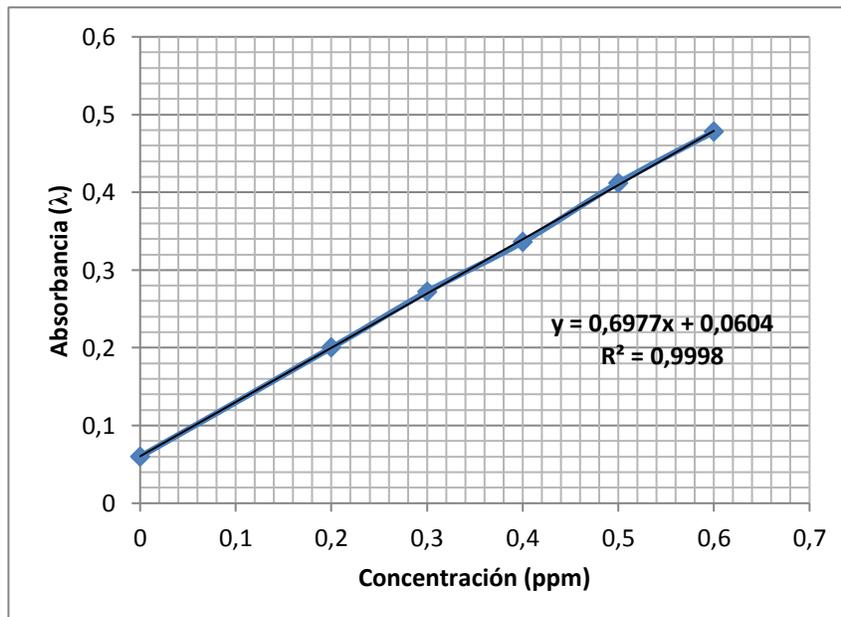
En la Gráfica 5 y 6, observamos la linealidad del sistema para el método Bray-Kurtz II y el método Olsen.

Gráfico 5. Linealidad del sistema método Bray-Kurtz



Fuente: Elaboración propia

Gráfico 6. Linealidad del sistema método Olsen



Fuente: Elaboración propia

La Tabla 14, muestra los resultados estadísticos del estudio de la linealidad para el método Bray-Kurtz y Olsen.

Tabla 14. Resumen de los resultados estadísticos para la linealidad

Parámetros	Resultados método Bray-kurtz	Resultados método Olsen	Criterios de aceptación
Coeficiente de correlación (r)	0.9999	0.9998	$r \geq 0.9993$
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9999	0.9997	$r^2 \geq 0.9998$
Intercepto(a)	0.0602	0.0605	$a \neq 0$
Pendiente(b)	0.7217	0.6973	b cercano a 1
t_{exp}	239.03	124.99	$t_{exp} > t_{tab}$
t_{tab}	2.776	2.776	

Fuente: Elaboración propia

Por los resultados mostrados en la Tabla 14, podemos mencionar que existe un alto grado de correlación entre la absorbancia (λ) y la concentración (ppm), cumpliendo así la condición de proporcionalidad indicada por la Ley de Lamber Beer, además que los indicadores de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación establecido por la guía de validación (Eurachem, 2005), de esta manera indicamos que los métodos de Bray-Kurtz y Olsen dan resultados lineales para la determinación de P en el intervalo de 0 a 1 ppm para el método Bray-Kurtz y de 0 a 0.6 ppm para el método Olsen. Además se establece estas concentraciones para realizar la curva de calibración que se realizará en el espectrofotómetro antes de leer las muestras de suelo.

4.2.2. Linealidad del método

En la Tabla 15, observamos los datos promedio de absorbancias obtenidos en el análisis empleando las metodologías modificadas y realizando las lecturas a 889 nm. para cada uno de los suelos utilizados para este ensayo.

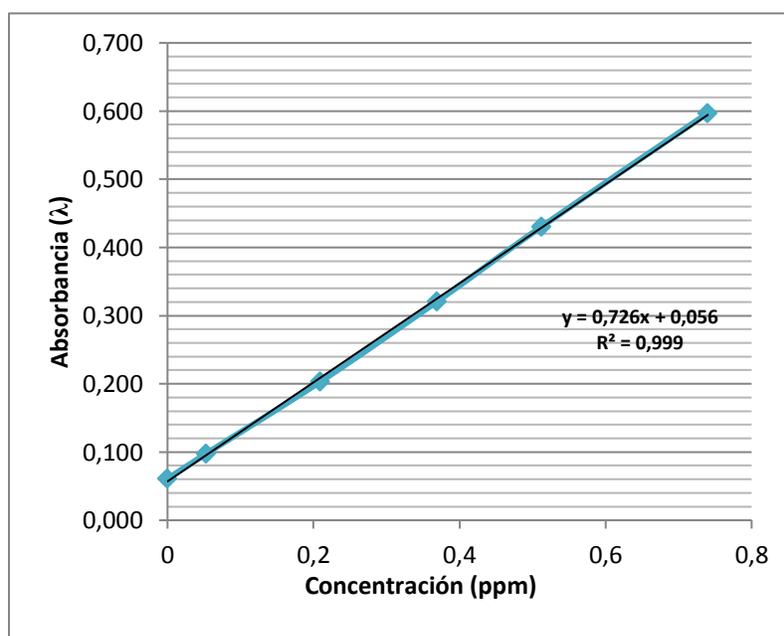
Tabla 15. Linealidad del método Bray-Kurtz y Olsen

Municipio	METODO						
	Bray-Kurtz		Olsen				
Código	Conc.	Abs. Yi (λ)	Municipio	Código	Conc.	Abs. Yi (λ)	
Blanco	BLK	0	0,061	Blanco	BLK	0	0,059
Combaya	MP-259	0,053	0,098	Yaco	MP-238	0,2	0,207
Combaya	MP-523	0,209	0,203	Ancoraimes	MP-567	0,332	0,306
Ichoca	MP-152	0,369	0,321	Mecapaca	MP-319	0,416	0,366
Chuma	MP-360	0,512	0,43	Ancoraimes	MP-564	0,51	0,434
Malla	MP-252	0,74	0,597	Luribay	MP-314	0,611	0,508

Fuente: Elaboración propia

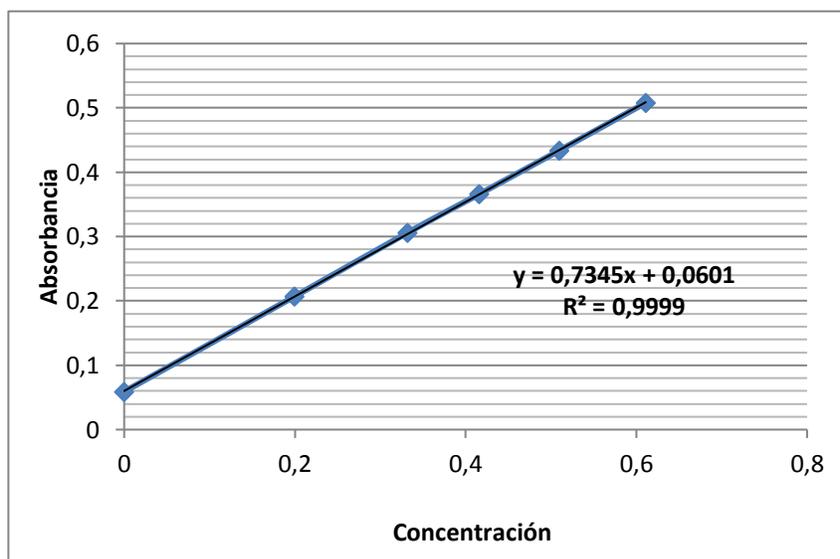
Los Gráficos 7 y 8, muestran la linealidad del método utilizando muestras de suelos de diferentes municipios.

Gráfico 7. Linealidad del método Bray-Kurt



Fuente: Elaboración propia

Grafico 8. Linealidad del método Olsen



Fuente: Elaboración propia

La Tabla 16, muestra los resultados estadísticos del estudio de la linealidad del método Bray-Kurtz y Olsen.

Tabla 16. Resumen de los resultados estadísticos para la linealidad

Parámetros	Resultados método Bray-Kurtz	Resultados método Olsen	Criterios de aceptación
Coefficiente de correlación (r)	0.9998	0.9993	$r \geq 0.9993$
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9999	0.9991	$r^2 \geq 0.9998$
Intercepto(a)	0.075	0.057	$a \neq 0$
Pendiente(b)	0.702	0.726	b cercano a 1
t_{exp}	58,842	103.45	$t_{exp} > t_{tab}$
t_{tab}	2.776	2.776	

Fuente: Elaboración propia

Por los resultados mostrados en la Tabla 16, de esta manera podemos mencionar que el método da resultados linealmente proporcionales entre la absorbancia (λ) y

concentración (ppm), cumpliendo así la condición de proporcionalidad indicada por la Ley de Lambert Beer, además que los indicadores de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación establecido por la guía de validación (Eurachem, 2005), lo que indicamos que los métodos para la determinación de fósforo en muestras de suelo son lineales y se encuentran dentro de los intervalos de 0 a 1 ppm para el método Bray-Kurtz y de 0 a 0.6 ppm para el método Olsen establecidos en la linealidad del sistema.

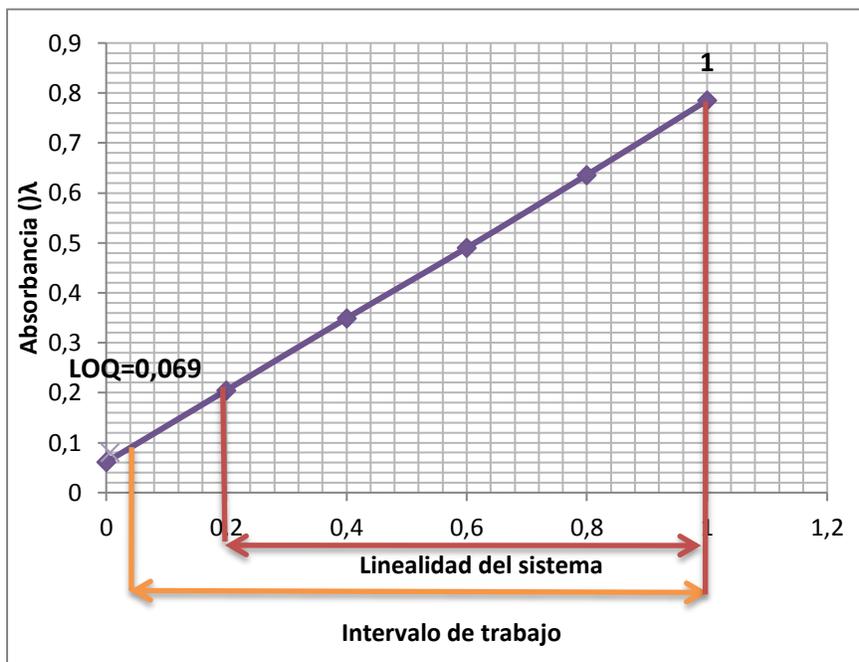
4.2.3. Límite de detección y límite de cuantificación

El Anexo 3, muestra los valores obtenidos de acuerdo al procedimiento realizado para cada método. El límite de detección para el método Bray-Kurtz es 0,066 (λ) para el método Olsen 0,062 (λ) siendo estas las cantidades mínimas de analito en la muestra de suelo que pueden ser detectables pero no cuantificables.

En el Grafico 9 y 10, podemos observar que el *LOQ* (Límite de cuantificación) para el método Bray-Kurtz es de 0,073 (λ) y para el método Olsen es de 0,069 (λ), determinando así que estos métodos son capaces de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas de fósforo en el suelo que tengan absorbancias (λ) iguales o mayores a los ya mencionados si hubieran casos en los que las absorbancias fueran menores a los límites de cuantificación se procederá a realizar el análisis con mayor cantidad de la solución filtrada (mayor alícuota), de igual forma si una muestra obtiene absorbancias mayores se procederá a disminuir la alícuota de la solución filtrada, para así realizar el analizar las muestras de suelo dentro del intervalo de trabajo establecido.

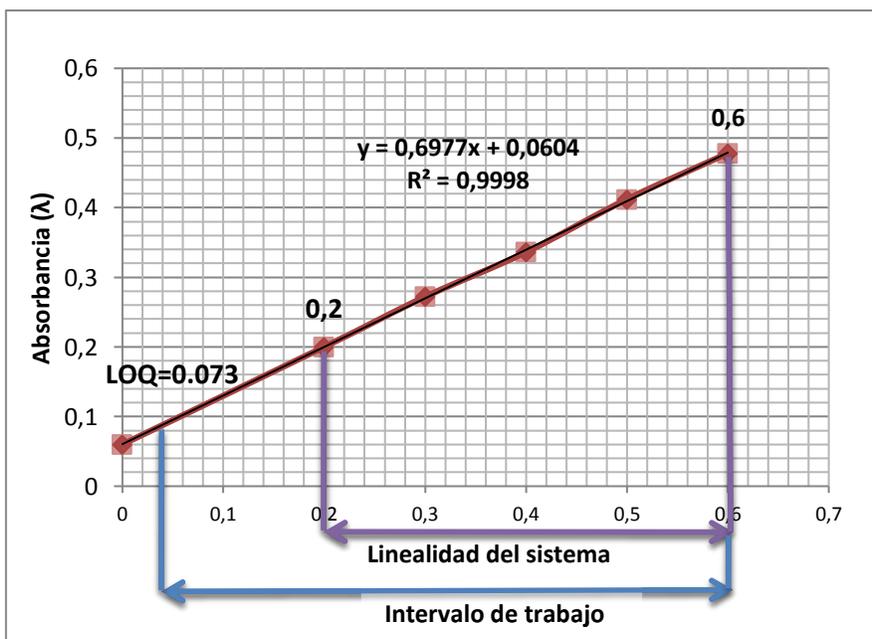
El criterio de aceptación para los Límites de Detección y el Límite de Cuantificación es que sean menores al límite crítico (0.065) definido por el (Instituto de Salud Pública, 2010), ($LC < LOD \ll LOQ$), siendo los valores para el método Bray-Kurtz ($0.065 < 0.066 \ll 0.073$), para el método Olsen ($0.061 < 0.062 \ll 0.069$), cumpliendo así con el criterio de aceptación.

Grafico 9. Límites del método Bray-Kutz II



Fuente: Elaboración propia

Grafico 10. Límites del método Olsen



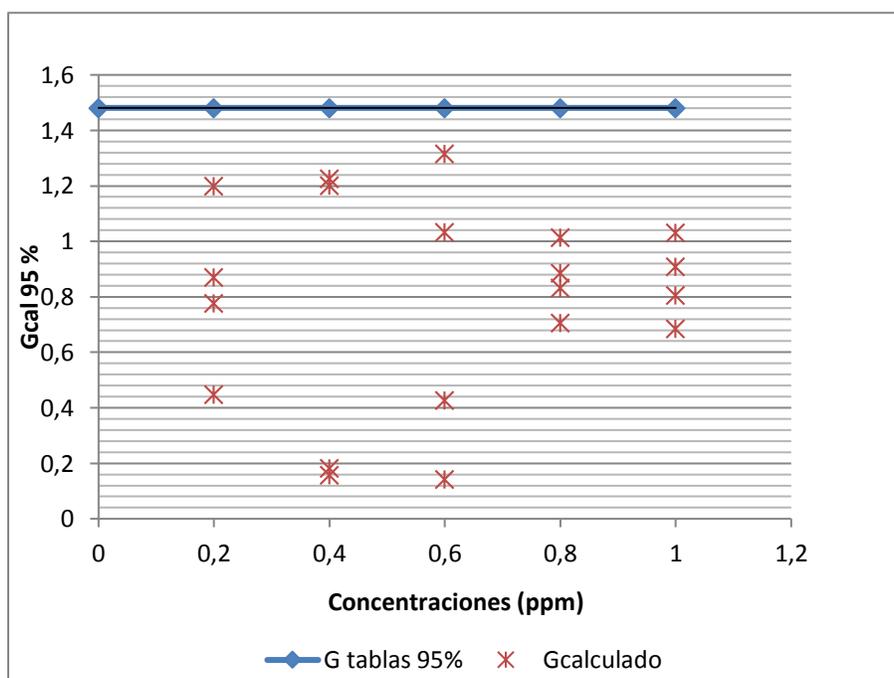
Fuente: Elaboración propia

4.2.4. Precisión

La precisión de los métodos se los evaluó en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

En el Anexos 4, se muestra los datos obtenidos mediante la evaluación de los ensayos realizados para la precisión del método Bray-Kurtz, en el Grafico 11, podemos observar que ningún valor del G_{cal} sobrepasa el límite establecido por el G_{tab} un 95%de confianza, en base a esta evaluación estadísticas se aceptan los valores experimentales por lo que ningún valor fue descartado, cumpliendo de esta manera con lo establecido por el (Instituto Boliviano de Metrología, 2018).

Gráfico 11. Datos evaluados para el método Bray-Kurtz

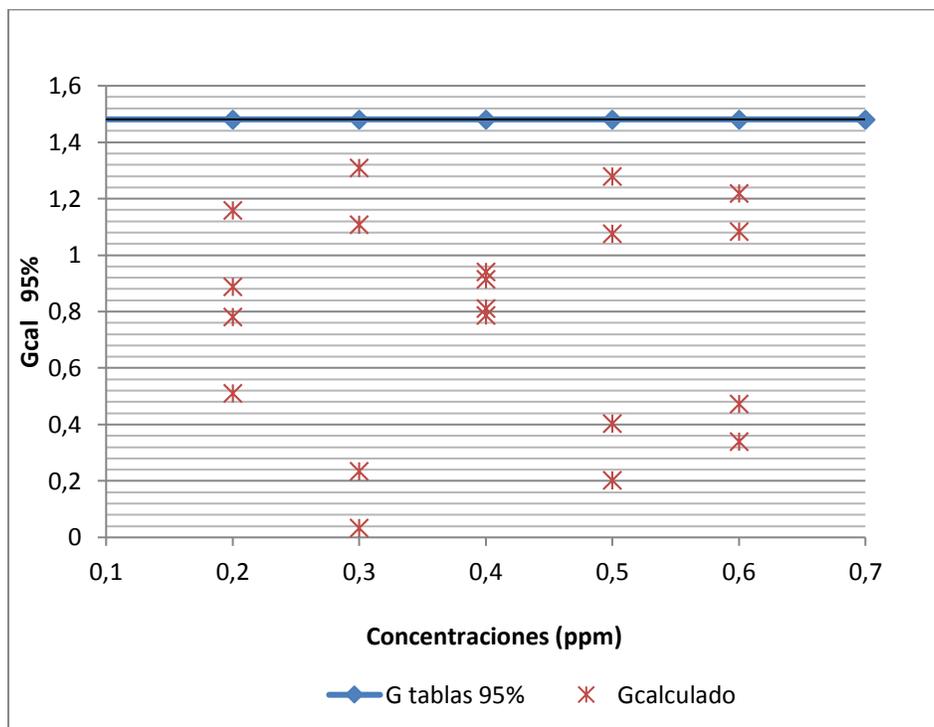


Fuente: Elaboración propia

En el Anexos 5, se muestra los datos obtenidos mediante la evaluación de los ensayos realizados para la precisión del método Olsen, en el Gráfico 12,

podemos observar que ningún valor del G_{cal} sobrepasa el límite establecido por el G_{tab} un 95% de confianza, en base a estas evaluaciones estadísticas se aceptan los valores experimentales cumpliendo con lo establecido por el (Instituto Boliviano de Metrología, 2018).

Gráfico 12. Datos evaluados para el método Olsen



Fuente: Elaboración propia

4.2.4.1. Repetibilidad

En la Tabla 17 y 18, se observa valor más alto de $\%CV= 1,369$ para Bray-Kurtz y $\%CV= 1,167$ para Olsen, presentando así la mayor dispersión entre sus datos, pero aun así no se encuentran por fuera de los criterios de aceptación.

Por lo tanto podemos decir que los métodos son repetibles, ya que las medidas realizadas por un mismo analista, mismo equipo (espectrofotómetro), mismos reactivos, se encuentran en óptimas condiciones y que las variaciones en las condiciones ambientales del laboratorio no influyen en los resultados, entonces los métodos son repetibles cumpliendo así con el criterio de aceptación $\%CV \leq 2$

consideradas aceptables para los métodos espectrofotométricos según lo establecido por (CODEX, 2009).

Tabla 17. Repetibilidad para el método Bray-Kurtz

Parámetro	Concentración (P)	Resultado % CVr	Criterio de aceptación
Repetibilidad	0,2	0,493	≤ 2%
	0,4	1,923	
	0,6	1,329	
	0,8	1,796	
	1	0,278	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 18. Repetibilidad para el método Olsen

Parámetro	Concentración (P)	Resultado % CVr	Criterio de aceptación
Repetibilidad	0,2	1,167	≤ 2%
	0,3	1,37	
	0,4	0,822	
	0,5	0,583	
	0,6	0,606	

Fuente: Elaboración propia

4.2.4.2. Reproducibilidad intermedia

Los resultados obtenidos para el segundo analista se muestran en las Tabla 19 y 20, para este parámetro se determinó su aceptación por medio del coeficiente de variación de *Horwitz* y luego se determinó el índice de *HorRat*, el cual de acuerdo al (Instituto de Salud Pública, 2010), establece que el valor de *HorRat* para 1 ppm (rango de trabajo) no debe ser mayor de 2%, por lo tanto ese será el valor de aceptación que los valores calculados. Como se observa el valor más alto de Factor *HorRat* = 0,177 para método Bray-Kurtz y para el método Olsen el Factor *HorRat* = 0,116 estos valores representan la mayor dispersión entre sus datos, pero aun así no se encuentran por fuera de los criterios de aceptación. Lo que demuestra que la técnica es totalmente reproducible.

Tabla 19. Reproducibilidad intermedia Método Bray-Kurtz

Parámetro	Concentración (P)	resultado % CV _H	Facto HorRat	Criterio de aceptación
Reproducibilidad intermedia	0,2	16	0,177	≤ 2%
	0,4	16	0,113	
	0,6	16	0,165	
	0,8	16	0,18	
	1	16	0,022	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 20. Reproducibilidad intermedia Método Olsen

Parámetro	Concentración (P)	resultado % CV _H	Facto HorRat	Criterio de aceptación
Reproducibilidad intermedia	0,2	16	0,074	≤ 2%
	0,3	16	0,116	
	0,4	16	0,062	
	0,5	16	0,049	
	0,6	16	0,047	

Fuente: Elaboración propia

4.2.4.3. Relación entre la concentración de fósforo de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia

En la Tabla 21, se muestran los datos obtenidos para la relación de la concentración entre la repetibilidad (Sr) y la reproducibilidad intermedia (Sw).

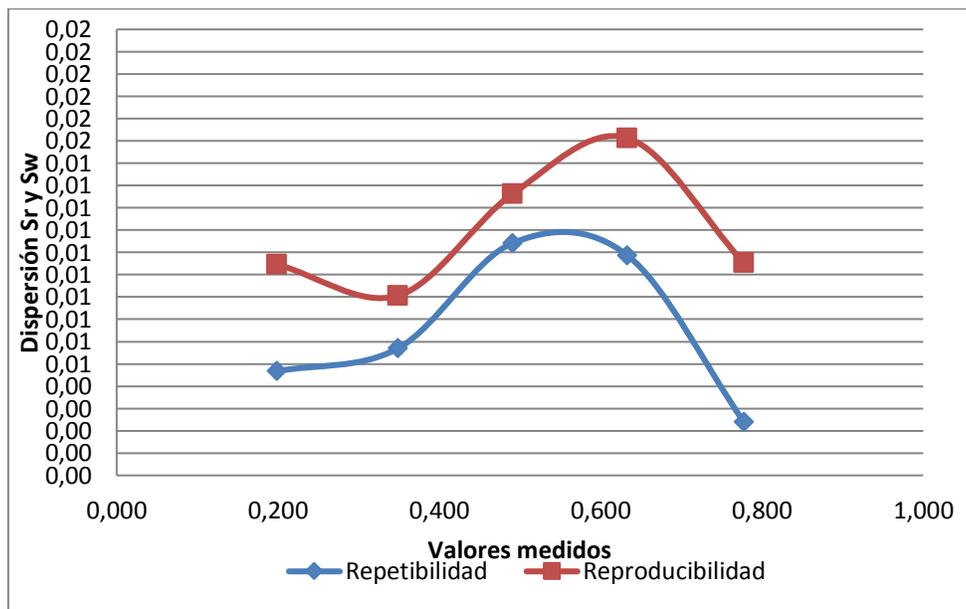
Tabla 21. Relación de concentración Sr, Sw para el método Bray-Kurtz

Nivel	P	Sr2	SL2	SR2	m ^{^j}	Sr	Sw
Nivel 0,2	4	0,000022	1,25E-04	0,000	0,199	0,005	0,009
Nivel 0,4	4	0,0000325	3,25E-05	0,000	0,349	0,006	0,008
Nivel 0,6	4	0,0001085	5,08E-05	0,000	0,491	0,010	0,013
Nivel 0,8	4	0,0000975	1,32E-04	0,000	0,633	0,010	0,015
Nivel 1	4	0,000006	0,000085	0,000	0,778	0,002	0,010

Fuente: Elaboración propia

En el Gráfico 13, se puede observar que la precisión intermedia es mayor a la repetibilidad, significa que la dispersión máxima en condiciones de reproducibilidad intermedia es mayor que la repetibilidad ya que se produjo variaciones (analista, día, condiciones ambientales). Esto significa que la dispersión máxima en condiciones de repetibilidad está entre los valores de 0,5 y 0.6 ppm.

Gráfico 13. Relación de concentración Sr, Sw para el método Bray-Kurtz



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 22, se muestran los datos obtenidos para la relación de la concentración entre la repetibilidad (Sr) y la reproducibilidad intermedia (Sw).

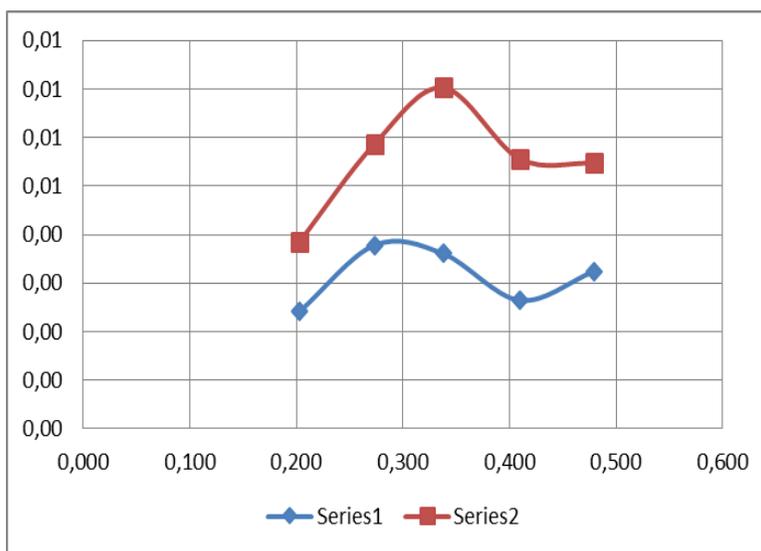
Tabla 22. Relación de concentración Sr, Sw para el método Olsen

Nivel	P	Sr2	SL2	SR2	m^j	Srj	SRj
Nivel 0,2	4	0,000006	8,98E-06	0,000	0,203	0,002	0,004
Nivel 0,3	4	0,0000143	2,02E-05	0,000	0,274	0,004	0,006
Nivel 0,4	4	0,000013	3,63E-05	0,000	0,338	0,004	0,007
Nivel 0,5	4	0,000007	2,39E-05	0,000	0,409	0,003	0,006
Nivel 0,6	1	0,000011	0,000019	0,000	0,479	0,003	0,005

Fuente: Elaboración propia

En la Gráfica 14, se puede observar que la precisión intermedia es mayor a la repetibilidad, significa que la dispersión máxima en condiciones de reproducibilidad intermedia es mayor que la repetibilidad ya que se produjo variaciones (analista, día, condiciones ambientales). Esto significa que la dispersión máxima en condiciones de repetibilidad está entre los valores de 0,3 y 0,4 ppm.

Gráfico 14. Relación de concentración Sr, Sw para el método Olsen



Fuente: Elaboración propia

4.2.5. Exactitud

4.2.5.1. Sesgo

En la Tabla 23 y tabla 24, se muestran los resultados de los ensayos para la determinación del sesgo entre el valor de referencia (MRC) y valor obtenido empleando las respectivas metodologías.

Para la evaluación del sesgo, se realizó la prueba t , en la cual el t_{calc} es menor al t_{crit} para un nivel de confianza de 95%, por lo que podemos decir que las metodologías empleadas reportan resultados exactos.

Tabla 23. Datos obtenidos para el Sesgo método Bray-Kurtz

Nivel	Muestra pp P	Sesgo	tcal	ttab $\alpha = 005$
1	0,2	0,0011	0,159	
2	0,4	0,0019	0,140	
3	0,6	0,0033	0,252	2,262
4	0,8	0,0027	0,273	
5	1	0,0018	0,279	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 24. Datos obtenidos para el Sesgo método Olsen

Nivel	Muestra ppm (P)	Sesgo	tcal	ttab $\alpha = 005$
1	0,2	0,0001	0,088	
2	0,3	0,004	0,274	
3	0,4	0,006	0,630	2,262
4	0,5	0,003	0,197	
5	0,6	0,04	0,382	

Fuente: Elaboración propia

4.2.5.2. Recuperación (%)

Respecto a la recuperación del analito de interés (suelo), se observaron valores satisfactorios como se muestran en la Tabla 25. En promedio, la recuperación más alta de las muestras naturales fortificadas para el método Bray-Kurtz fue 101,1%, 102,4%, 99,3% y para el método Olsen de 101,1%, 102,4%, 99,3% para los niveles bajo, medio y alto respectivamente, como se observa en los Gráficos 15 y 16, estos valores cumplen con lo establecido por la ecuación de Horwitz (Instituto de Salud Pública, 2010), que menciona que el % de recuperación esperado debe encontrarse entre 80% y 120%, cumpliendo de esta manera el criterio de aceptación.

Por lo tanto podemos decir que el método Bray-Kurtz y el método Olsen son método exactos en cuanto a la extracción de la cantidad de analito existente en la muestra,

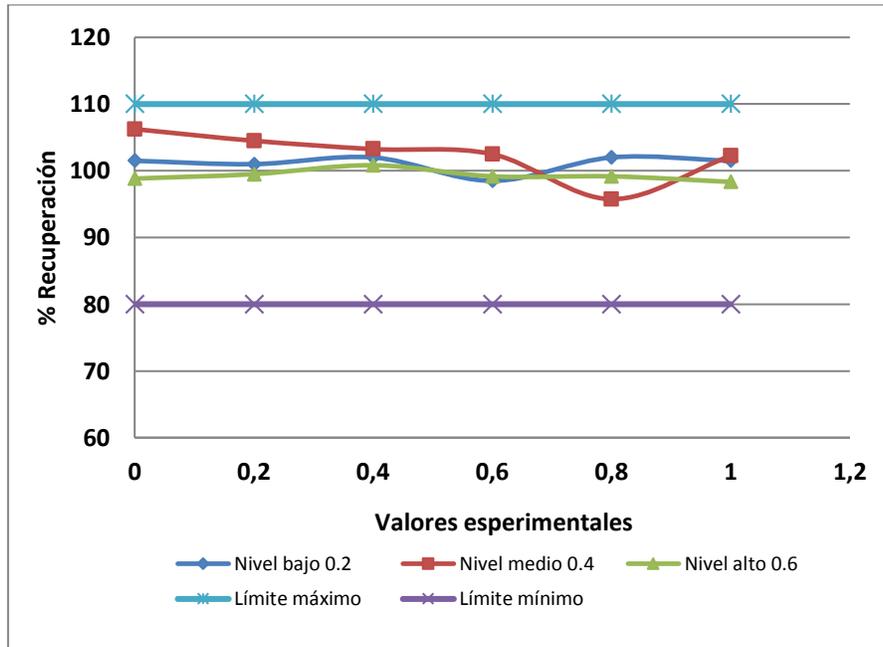
Tabla 25. Valores obtenidos en % Recuperación para ambos métodos

Nº	Código	% R Bray-Kurtz			% R Olsen		
		Nivel bajo 0,2	Nivel medio 0,4	Nivel alto 0,6	Nivel bajo 0,2	Nivel medio 0,3	Nivel alto 0,4
1	MRI-1	101,5	106,25	98,83	86	81,3	91
2	MRI-2	101	104,5	99,5	91	87	85
3	MRI-3	102	103,25	100,83	89,5	87,7	86,3
4	MRI-4	98,5	102,5	99,17	86	84,3	86,5
5	MRI-5	102	95,753	99,17	95,5	86,3	89,5
6	MRI-6	101,5	102,25	98,33	99,5	90,7	90,8
	Yi	101,1	102,4	99,3	91,25	86,22	88,18

Fuente: Elaboración propia

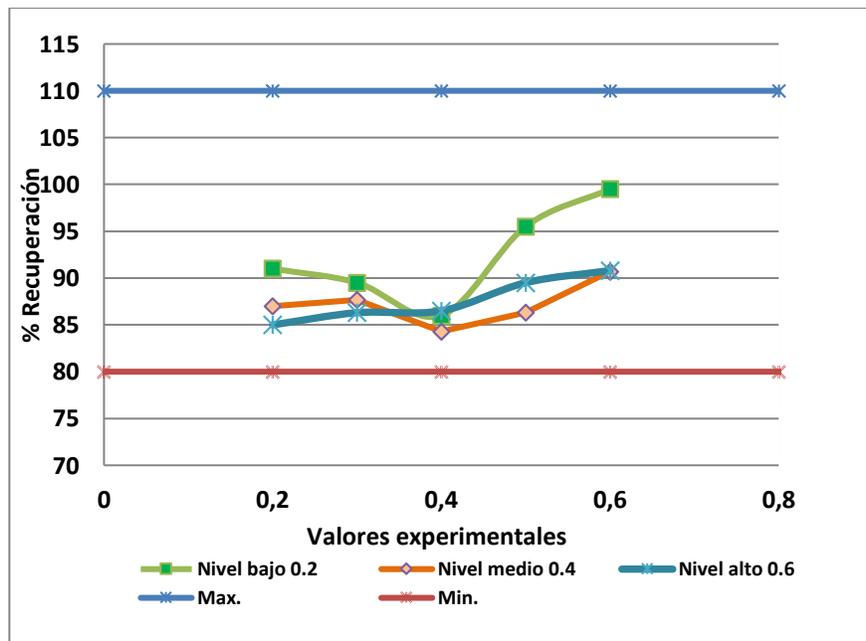
Con los datos obtenidos en la Tabla 22, se realizó el gráfico control de recuperación donde se observa que los valores obtenidos de los tres niveles de % R se encuentra dentro de los niveles máximos y mínimos como se muestra en los Gráfico 15 y 16, para cada método, por lo cual podemos mencionar que el rendimiento de ambos métodos analíticos son aceptables en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra de suelo.

Gráfico 15. % Recuperación método Bray-Kurtz



Fuente: Elaboración propia

Gráfico 16. % Recuperación método Olsen

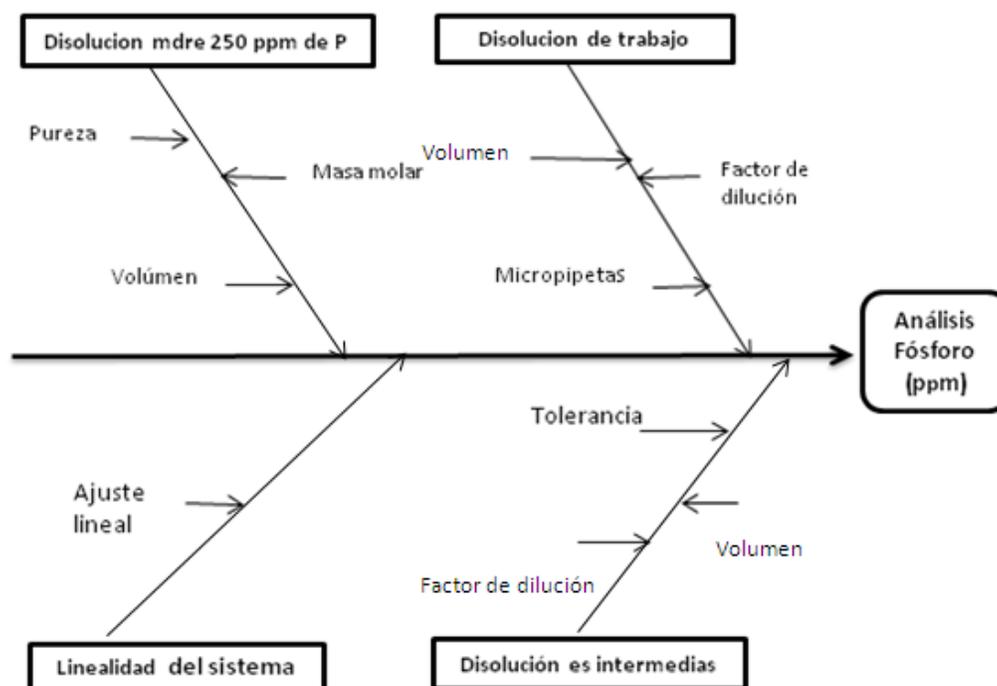


Fuente: Elaboración propia

4.2.6. Incertidumbre

En la Figura 7, se puede observar el diagrama de espina de pescado donde se muestra la identificación de las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico para ambas metodologías.

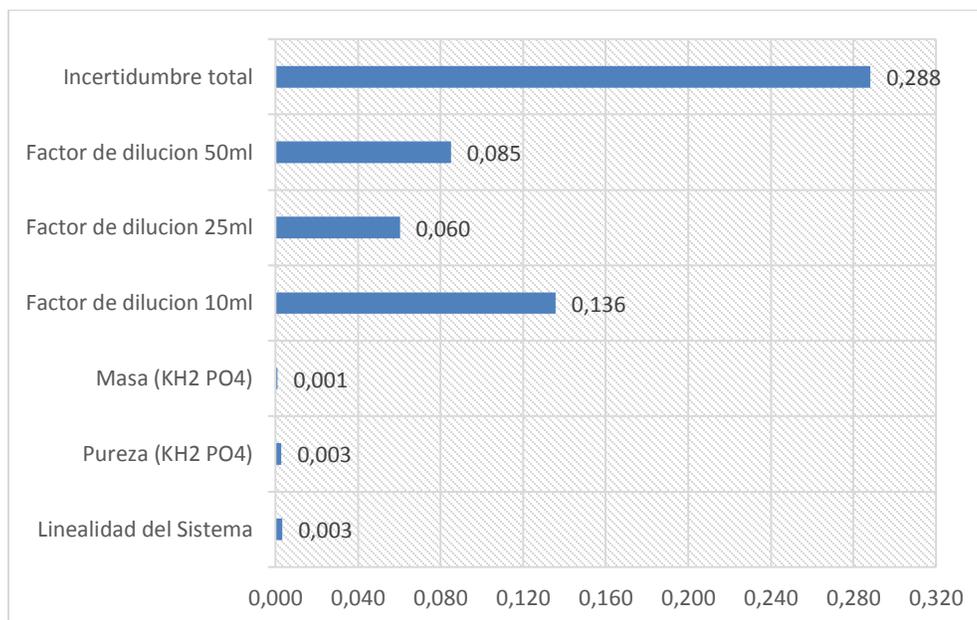
Figura 7. Diagrama de espina de pescado (Incertidumbre)



Fuente: Elaboración propia

En el Gráfico 17, podemos observar la contribución de las fuentes de incertidumbre estimadas, en la Figura 8, se puede apreciar que la mayor contribución corresponde a la determinación de la concentración de fósforo obtenido del factor de disolución de 10 ml lo que se demuestra que ésta es la operación que es necesario mejorar para aumentar la calidad de los resultados de este ensayo. La masa molar prácticamente no contribuye con incertidumbre, en tanto que la pureza del (KH_2PO_4), la masa del (KH_2PO_4). Nuestra incertidumbre estándar nos da un valor de $\pm 0,576$, por lo tanto este es valor que va acompañado al resultado del análisis de P.

Gráfico 17. Incertidumbre relativa para el método Bray-Kurtz y Olsen



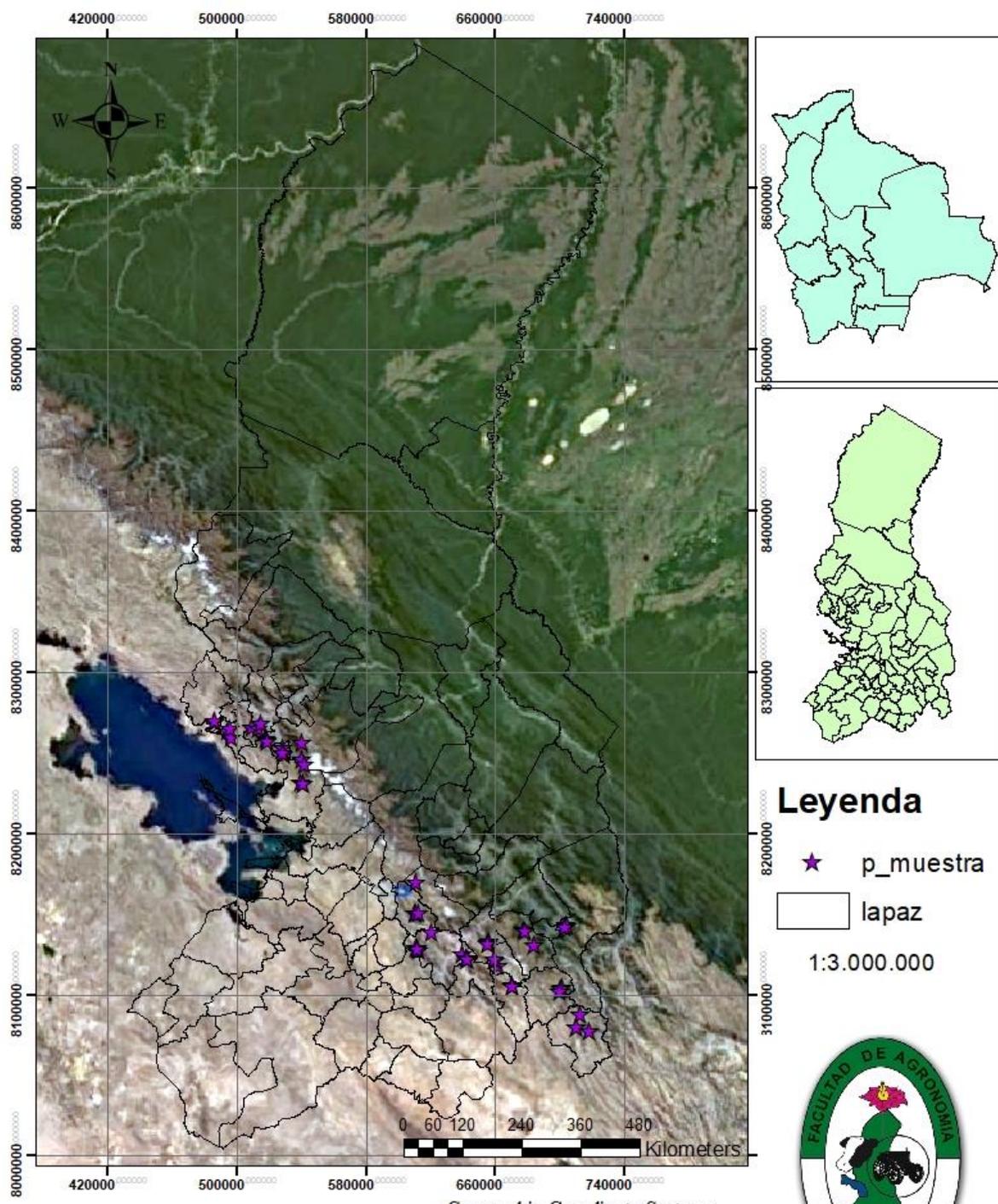
Fuente: Elaboración propia

4.3. Análisis de las muestras de suelo

En la Ilustración 1, se observa la localización de los puntos de muestreo en los diferentes municipios del departamento de La Paz.

En las Tablas 26 y 27, se observan los datos obtenidos en el análisis de P empleando los métodos ya validados (Bray-Kurtz y Olsen,) en muestras de suelo, los resultados van acompañados con su incertidumbre ($\pm 0,576$), de esta manera aplicamos los métodos para el análisis de P en los suelos ácidos y básicos.

Ilustración 1. Localización de los puntos de muestreos



Puntos de Muestreo
Departamento de La Paz - Bolivia

Tesista: Elizabeth Yujra Ticona

Geographic Coordinate System:
GCS_WGS_1984
Datum: D_WGS_1984
Prime Meridian: Greenwich
Angular Unit: Degree

Leyenda

★ p_muestra

□ lapaz

1:3.000.000



Tabla 26. Análisis de muestras de suelos empleando métodos validado Bray-Kurtz

Municipio	Código	A	L	Y	Clase textural	pH 1:5	ppm de (P)	S	%CV
Inquisivi	MP-25	39	36	26	franco	6,69	3,84 ± 0,576	0,05	1,32
Ichoca	MP-152	35	43	22	franco	5,51	36,9 ± 0,576	0,61	1,65
Ichoca	MP-159	36	41	23	franco	5,52	9,71 ± 0,576	0,05	0,51
Carabuco	MP-211	42	35	23	franco	7,33	9,31 ± 0,576	0,11	1,15
Carabuco	MP217	34	41	24	franco	7,38	272 ± 0,576	3,12	1,15
Yaco	MP235	47	31	21	franco	6,75	6,47 ± 0,576	0,21	3,22
Yaco	MP249	42	35	22	franco	6,65	20,8 ± 0,576	0,36	1,27
Malla	MP-252	38	40	21	franco	7,31	73,97 ± 0,576	0,74	0,1
Malla	MP-253	30	45	24	franco	7,02	28,4 ± 0,576	0,36	1,27
Malla	MP-255	36	39	24	franco	7,22	52,43 ± 0,576	0,49	0,94
Colquiri	MP-259	28	48	24	franco	5,93	1,33 ± 0,576	0,01	1,08
Colquiri	MP-266	37	42	22	franco	5,78	10,92 ± 0,576	0,1	0,95
Colquiri	MP-283	38	37	24	franco	5,9	7,18 ± 0,576	0,32	5,22
Mecapaca	MP-330	48	30	22	franco	7,03	25,97 ± 0,576	0,31	1,18
Chuma	MP-360	42	38	20	franco	6,68	51,233 ± 0,576	1,16	1,13
Chuma	MP-361	40	39	21	franco	6,53	66,400 ± 0,576	1,2	0,54
Chuma	MP-363	48	32	20	franco	6,08	51,6 ± 0,576	0,27	0,51
Cairoma	MP-369	45	29	26	franco	5,74	86,6 ± 0,576	1,44	1,67
Cairoma	MP-371	43	32	26	franco	5,01	71,5 ± 0,576	0,53	0,74
Cairoma	MP-373	40	34	26	franco	5,52	52,756 ± 0,576	0,46	0,29
Achacachi	MP-388	41	32	27	franco	5,87	15,98 ± 0,576	0,33	2,08
Achacachi	MP-394	42	34	25	franco	5,52	21,23 ± 0,576	0,67	3,14
Achacachi	MP-398	45	29	26	franco	5,85	20,97 ± 0,576	1,29	6,13
Sorata	MP-423	31	48	21	franco	5,34	41,43 ± 0,576	0,25	0,61
Sorata	MP-449	42	35	23	franco	5,4	43,933 ± 0,576	1,102	2,51
Sorata	MP-459	27	48	24	franco	5,28	81,267 ± 0,576	0,01	1,08
Quime	MP-477	47	33	21	franco	5,75	59,73 ± 0,576	2,46	1,12
Quime	MP-487	45	34	22	franco	5,25	49,27 ± 0,576	0,83	1,69
Quime	MP-496	46	32	22	franco	5,54	11,99 ± 0,576	0,12	0,98
Combaya	MP-507	47	31	23	franco	5,99	61,13 ± 0,576	2,05	3,35
Combaya	MP-510	51	29	21	franco	5,73	33,82 ± 0,576	2,33	2,89
Combaya	MP-523	44	33	23	franco	6,8	10,45 ± 0,576	0,27	2,53
Ancoraimes	MP-563	43	33	24	franco	7,03	58,5842 ± 0,576	0,11	3,33
Palca	MP-44	32	45	23	franco	7,16	58,7294 ± 0,576	1,44	0,61
Palca	MP-54	37	39	24	franco	7,64	58,8747 ± 0,576	0,12	0,6

Fuente: Elaboración propia

Tabla 27. Análisis de muestras de suelos empleando métodos validado Olsen

Municipio	Código	A	L	Y	Clase textural	pH 1:5	P (ppm)	S	%CV
Inquisivi	MP-24	44	28	28	franco arcilloso	7,99	12,35 ± 0,576	0,09	0,7
Inquisivi	MP-26	34	43	24	Franco	7,56	5,72 ± 0,576	0,03	0,51
Palca	MP-41	37	37	25	Franco	7,56	14,6 ± 0,576	0,35	2,37
Escoma	MP-165	28	47	25	Franco	7,58	13,67 ± 0,576	0,46	0,462
Escoma	MP-186	41	34	25	Franco	7,64	13,67 ± 0,576	0,46	0,058
Carabuco	MP-201	38	38	24	Franco	7,4	6,62 ± 0,576	0,33	3,97
Escoma	MP-218	40	34	26	Franco	7,77	51,6 ± 0,576	1,22	2,36
Yaco	MP-238	39	39	23	Franco	7,35	39,33 ± 0,576	0,757	1,9
Luribay	MP-296	38	41	20	Franco	8,64	87,6 ± 0,576	0,72	0,82
Luribay	MP-298	43	36	21	Franco	8,88	53,47 ± 0,576	1,3	2,43
Luribay	MP-314	34	41	24	Franco	8,79	81,467 ± 0,576	0,6	0,49
Mecapaca	MP-318	46	33	21	Franco	7,4	9,23 ± 0,576	0,115	0,139
Mecapaca	MP-319	40	38	22	Franco	7,6	83,267 ± 0,576	0,23	1,84
Sapahaqui	MP-544	44	33	23	Franco	7,81	11,04 ± 0,576	0,204	1,84
Sapahaqui	MP-557	50	29	21	Franco	7,78	57,8 ± 0,576	0,346	0,6
Sapahaqui	MP-558	37	42	21	Franco	7,96	60,889 ± 0,576	0,658	1,08
Ancoraimes	MP-564	36	42	22	Franco	7,43	67,956 ± 0,576	0,601	0,88
Ancoraimes	MP-567	29	47	24	Franco	7,73	66,400 ± 0,576	1,039	1,57

Fuente: Elaboración propia

Tabla 28. Comparación de las dos metodologías para diferentes pH

	pH	Bray-Kurtz II (ppm)	Olsen (ppm)	Diferencia
MP-507	5,99	61,13	57,98	3,15
MP-330	7,03	25,97	24,89	1,08
MP-255	7,22	52,43	49,5	2,93
MP-26	7,56	7,9	5,72	2,18
MP-544	7,81	13,87	11,04	2,83

Fuente: Elaboración propia

Los resultados del análisis de P disponible en las muestras de suelo mostraron diferencias, en las concentraciones de P disponible extraído por las soluciones de Bray-Kurtz y Olsen. En la Tabla 28. Se observa que el extractante Bray-Kurtz extrajo mayor cantidad de P en comparación con Olsen, posiblemente, estos resultados se pueden atribuir a que la solución ácida de Bray-Kurtz promueve la

disolución parcial de los coloides inorgánicos, y las formas extraídas de P unido al calcio (Ca-P), hierro (Fe-P) y aluminio (Al-P). Mientras que los valores obtenidos por el método de Olsen se deben a la posible disolución del fósforo orgánico debido al alto pH (8,50) de la solución extractante, ya que en suelos ácidos se inhibe la formación de carbonatos, lo que no permite la liberación del P proveniente de las formas inorgánicas antes mencionadas. En tal sentido, al analizar las diferencias podemos ver que a pH cercanos a neutro existe una menor diferencia para ambos métodos.

4.4. Costos

En las Tabla 29 y 30, se muestra los costos de los materiales para el método Bray-Kurtz para la metodología original (50ml), por cada 100 muestras se tiene un costo de 686 Bs. Para la metodología modificada (10ml) por cada 100 muestras se tiene un costo de 416 Bs, ahorrándole al laboratorio 270 Bs. Por los datos obtenidos podemos decir que no es factible realizar el análisis para una sola muestra por la poca cantidad de reactivos que se usa, y el resto sería desechado determinando así que mínimamente se debe realizar 20 muestras.

Tabla 29. Costo de reactivos método Bray-Kurtz (50ml)

Ítem	Reactivo/materiales	Unidades	Cantidad de Reactivo	Precio de Reactivo(Bs)	Cantidad/100muestra	Valor en Bs. /100muestras
1	Ácido Ascórbico	g	500	1020	7,5	15,3
2	Ácido Sulfúrico	ml	1000	580	98	56,84
3	Molibdato de amonio	g	100	2800	10	280
4	Tartrato de Potasio	g	250	1600	0,25	1,6
5	Ácido Clorhídrico	ml	1000	420	2	0,84
6	Fluoruro de amonio	g	100	1000	1,11	11,1
7	Carbón Activo	g	1000	800	50	40
8	Papel filtro cuantitativo	Caja	100	280	100	280
Costo de reactivo por 100 muestras (Bs) en 50 ml						686
Tiempo de análisis						45 min

Fuente: Elaboración propia

Tabla 30. Costo de reactivos método Bray-Kurtz (10ml)

Ítem	Reactivo/materiales	Unidades	Cantidad de Reactivo	Precio de Reactivo(Bs)	Cantidad/100muestra	Valor en Bs. /100muestras
1	Ácido Ascórbico	g	500	1020	2,5	5,1
2	Ácido Sulfúrico	ml	1000	580	19,6	11,368
3	Molibdato de amonio	g	100	2800	2	56
4	Tartrato de Potasio	g	250	1600	0,25	1,6
5	Ácido Clorhídrico	ml	1000	420	2	0,84
6	Fluoruro de amonio	g	100	1000	1,11	11,1
7	Carbón Activo	g	1000	800	50	40
8	Papel filtro cuantitativo	Caja	100	280	100	280
Costo de reactivo por 100 muestras (Bs) en 50 ml						406
Tiempo de análisis						30min

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 31 y 32, se muestra los costos de los materiales para el Olsen para la metodología original (50ml), por cada 100 muestras se tiene un costo de 822 Bs. Para la metodología modificada (10ml) por cada 100 muestras se tiene un costo de 548 Bs, ahorrándole al laboratorio 274 Bs. Por los datos obtenidos podemos decir que no es factible realizar el análisis para una sola muestra por la poca cantidad de reactivos que se usarían, determinando así que mínimamente se debe realizar 20 muestras.

Tabla 31. Costo de reactivos método Olsen (50ml)

Ítem	Reactivo/materiales	Unidades	Cantidad de Reactivo	Precio de Reactivo(Bs)	Cantidad/100muestra	Valor en Bs. /100muestras
1	Ácido Ascórbico	g	500	1020	2,5	5,1
2	Ácido Sulfúrico	ml	1000	580	98	56,84
3	Molibdato de amonio	g	100	2800	10	280
4	Tartrato de Potasio	g	250	1600	0,25	1,6
6	Bicarbonato de Sodio	g	500	740	105	155,4
7	Carbón Activo	g	1000	800	50	40
8	Papel filtro cuantitativo	Caja	100	280	100	280
9	Hidróxido se Sodio	g	500	700	2,5	3,5
Costo de reactivo por 100 muestras (Bs) en 50 ml						822
Tiempo de análisis						50

Fuente: Elaboración propia

Tabla 32. Costo de reactivos método Olsen (10ml)

Item	Reactivo/materiales	Unidades	Cantidad de Reactivo	Precio de Reactivo(Bs)	Cantidad/100muestra	Valor en Bs. /100muestras
1	Ácido Ascorbico	g	500	1020	0,5	1,02
2	Ácido Sulfurico	ml	1000	580	19,6	11,37
3	Molibdato de amonio	g	100	2800	2	56
4	Tartrato de Potasio	g	250	1600	0,05	0,32
6	Bicarbonato de Sodio	g	500	740	105	155,4
7	Carbon Activo		1000	800	50	40
8	Papel filtro cuantitativo	Caja	100	280	100	280
9	Hidroxido se Sodio	g	500	700	2,5	3,5
Costo de reactivo por 100 muestras (Bs) en 10 ml						548
Tiempo de análisis						35

Fuente: Elaboración propia

5. CONCLUSIONES

- Las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto desempeño se determinó una longitud de 889 nm para los métodos espectrofotométricos Bray-Kurtz y Olsen, este valor fue determinado para las condiciones ambientales de temperatura y humedad del laboratorio.
- En cuanto a la modificación de la metodología original en relación: suelos-Extractante; Solución filtrada-Aforo, Solución Stock-aforo demuestran que el método modificado (10 ml) se obtiene valores que no son significativamente diferentes del método original (50ml).
- Se comprobó el cumplimiento de la linealidad del sistema y la linealidad del método en el intervalo de concentraciones que se estudiaron por su elevado valor del coeficiente de correlación alcanzado que es 0,9999 para ambos métodos.
- A partir de los ensayos realizados se determinó el límite de cuantificación para los métodos Bray-Kurtz y Olsen fue 0,073 y 0,069 de absorbancia (λ), estos valores corresponde a la más baja cantidad de fósforo que puede determinarse cuantitativamente con los métodos ya mencionados.
- La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y los criterios de aceptación (%R= 80-120), concluyendo que los resultados de la prueba obtenida mediante el procedimiento establecido bajo condiciones descritas demostrando así que el método es exacto.
- El método analítico para la cuantificación de P en el suelo es preciso dentro del ensayo al ser efectuado cualquier día, diferente analista y cualquier muestra a diferentes concentraciones. Es un procedimiento analítico preciso ya que posee un grado de concordancia entre los resultados de las

pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente en el laboratorio. Los resultados en la precisión mostraron que los coeficientes de variación fueron $\leq 2\%$, lo que demuestra la buena repetibilidad de los métodos de cuantificación. No se observaron diferencias significativas entre las medias de ambos analistas y ambos días por lo tanto los métodos analítico fue reproducible por ambos analistas.

- Los resultados de ambos métodos (Bray-Kurtz y Olsen), permite concluir que estos métodos analíticos para la cuantificación de P en suelos ácidos y básicos, presentan resultados de linealidad del sistema, linealidad del método, precisión y exactitud son satisfactorios que permiten obtener resultados seguros y confiables en la detección y cuantificación de P, además de contar con el dato de incertidumbre que debe ir acompañado al resultado cumpliendo así el proceso de validación para ambos métodos bajo los lineamientos de la NB-ISO/IEC 17025:2017, en los numerales 5.4.5 y 5.4.6.
- El análisis de costos nos permite concluir que al emplear los métodos Bray-Kurtz y Olsen, el valor de los reactivos por cada 100 es de 324 Bs. y 398 Bs. respectivamente, estos valores nos indican que es rentable para el laboratorio realizar servicios de análisis de muestras en suelo.

6. RECOMENDACIONES

- Para evitar la presencia de interferencia en los análisis de P, se recomienda lavar los el material volumétrico (tips, pipeta, matraces aforados, etc.), con detergente líquido y dejarlos en *HCL* al 10 %.
- Se recomienda realizar la curva de calibrado cada vez que se vaya a realizar las lecturas de las muestras de suelo, y verificar que este tenga un coeficiente de correlación de 0,999 para tener datos proporcionales entre la absorbancia (λ) y concentración.
- Una vez culminado el proceso de validación el laboratorio se recomienda utilizar los datos obtenidos para realizar un monitoreo periódico al método. Normalmente se debe establecer parámetros para su control, en este caso los parámetros que se recomienda utilizar son: Precisión, exactitud e incertidumbre.

7. Bibliografía

- Avellaneda, M.O., 1980. Fósforo disponible en el suelo: su evaluación. IX Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo. Actas: 123-159.p.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas. En UNDOC.
- Benier, R. (2003). Tecnicas de muestreo de Suelo para el Analisis de la Fertilidad. osorno.
- Biabati, G. (s.f.). El Fósforo en la planta y el suelo.
- Bonomelli, C. (2003). Disponibilidad de Fósforo en un andisol, con distintas fuentes de dosis de fosforo, en condiciones controladas. Ciencia e investigacion agraria , 3.
- Cañez. (2015). Validación de un Método Analítico para la Determinación de Fósforo por Espectrofotometría. Revista de Ciencias Biológicas y de Salud. Vol. XVII (1) , 32-39 p.
- Conti. (1998). Principios de Edafología. Fauba.
- CODEX. (2009). Directrices sobre la terminología analítica (CAC/GL 72-2009).
- CHILON, E. 1996. Manual de Edafología, practica de campo y laboratorio. La Paz – Bolivia. Editado en la facultad de Agronomía UMSA. 65 – 66 p.
- Duffauet. (2010). Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. En Aspectos generales de la Validación. Chile.
- EURACHEM/CITAC. (2005). Guide Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement. This

Guide was in part supported under contract with the UK Department of Trade and Industry as part of the National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM) Program.

- Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER. (2012). Determinación de P extraíble en suelos por el método Bray y Kurtz. En L. E. Boschetti.
- Fernández, L. C. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos*. Mexico,D.F.
- INSTITUTO BOLIVIANO DE METROLOGIA. (2018). Curso de validación.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). En Validación de métodos y Determinacion de la incertidumbre de la medicion : "Aspectos Generales sobre Validacion de metodos". Santiago de Chile.
- INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS. (2005). Práctica para la conservación del suelo y agua en zonas áridas y semiaridas. San Luis Potosi: Lored Osti.
- Miranda, R. 2004. Introducción a la Geología Agrícola. Facultad de Agronomía. UMSA. La Paz. Bolivia. 15 p.
- Miranda, R.; Caballero, A. 2015.Métodos y análisis del suelo. La Paz. Bolivia. UDIC. UMSA.84 p.
- Muñoz Benito M. (2001). Procedimiento para la validación de métodos de ensayo físico-químicos. Primer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad de Laboratorios, IBEROLAB I.
- Núñez Vázquez, F. y H.P. Salas, 1986. Evaluación de niveles de disponibilidad de fósforo en la región central de Córdoba. Rev. Agro. Manir. 34-39 p.

- Orsag, V. (2010). El recurso suelo Principios para su manejo y conservación. La Paz: Zeus.
- Picone, L y Zamuer, e. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* ,
- Porras, L. S. (2015). Calibración de dos métodos de diagnóstico de la fertilidad del suelos cultivados con yuca (manihot sculenta) en el tropico humedo de costa rica. Titulo para obter como Licenciado en Ingenieria en Agronomia INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA ,15 p.
- Santos, N. A. (2003). Evaluacion del fosforo extraido con dos soluciones extractoras en 19 suelos del altiplano de Guatemala. Tesis de Grado.Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. 16 p.
- Sanzano, A. (s.f.). Quimica del Suelo-El fosforo.
- Universidad de Magdalena. (2013). Manual de procedimiento Analíticos. Santa Marta: San Pedro Alejandrino.
- Universidad de Magdalena. (2008). Manual de Procedimientos Analiticos de Suelos. Santa Marta.
- Velez, G. A. (2012). Dinamica del Fósforo en el suelo. En el Fósforo elemento indispensable para la vida vegetal . Pereira.31 p.
- Westgard, O.J. (2003). Basic Method Validation. 2nd. Edition. 29-30, 87-99, 111-122p
- "http://www.bioquimica.ucv.cl/paginas/central/bioquimica%20clinica/apuntes%20de%20espectrofotometria.pdf"
<http://www.bioquimica.ucv.cl/paginas/central/bioquimica%20clinica/apuntes%20de%20espectrofotometria.pdf>

- Fósforo extractable en un suelo Haplustoléntico del área semiárida central de Córdoba, Argentina. Comparación de dos métodos de evaluación AGRISCIENTIA1994,VOL.XI:23:///C:/Users/CLIENTE/Desktop/bibliografia/articulos%20fosforo/2435-7597-1-SM.pdf

ANEXOS

Anexo 1. Datos de Temperatura y Humedad

Hora	T°	%H
10:15	17,5	32
10:18	17,4	32
10:00	17,3	29
10:15	17,8	30
11:00	17	31
12:24	16,2	31
9:00	17,8	32
11:00	17,3	29
10:10	18,8	28
8:45	16,4	27
14:00	18,5	26
11:00	16,5	33
11:25	17,4	35
14:30	18,5	26
10:30	17,3	27
10:15	17,8	32
14:45	18,6	28
14:30	18,8	26
14:00	14,1	29
9:30	13,3	29
11:15	13	29
11:00	12,5	30
Promedio	16,81	29,59

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2. Barrido espectral 400-990 nm

Longitud de onda (nm)	Bray-Kurtz Abs (λ)	Olsen Abs(λ)	Longitud de onda (nm)	Bray-Kurtz Abs(λ)	Olsen Abs(λ)	Longitud de onda (nm)	Bray-Kurtz Abs(λ)	Olsen Abs(λ)
400	0,118	0,106	600	0,188	0,156	800	0,231	0,231
410	0,109	0,099	610	0,197	0,159	810	0,236	0,236
420	0,104	0,097	620	0,202	0,163	820	0,246	0,246
430	0,103	0,096	630	0,207	0,168	830	0,261	0,261
440	0,104	0,097	640	0,214	0,173	840	0,276	0,276
450	0,106	0,099	650	0,222	0,179	850	0,29	0,29
460	0,111	0,102	660	0,23	0,186	860	0,304	0,304
470	0,117	0,106	670	0,24	0,193	870	0,316	0,316
480	0,123	0,11	680	0,248	0,2	880	0,325	0,325
490	0,128	0,113	690	0,255	0,199	890	0,329	0,329
500	0,133	0,116	700	0,258	0,206	900	0,327	0,327
510	0,137	0,118	710	0,259	0,21	910	0,32	0,32
520	0,142	0,122	720	0,257	0,213	920	0,309	0,309
530	0,149	0,131	730	0,253	0,215	930	0,302	0,302
540	0,157	0,136	740	0,252	0,21	940	0,303	0,303
550	0,164	0,141	750	0,245	0,206	950	0,323	0,323
560	0,17	0,145	760	0,238	0,203	960	0,36	0,36
570	0,175	0,148	770	0,233	0,2	970	0,358	0,358
580	0,18	0,15	780	0,229	0,199	980	0,343	0,343
590	0,184	0,153	790	0,229	0,199	990	0,318	0,318

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3. Datos experimentales (Bray-Kurtz y Olsen) para linealidad

Conc. P	G calculado	G tablas 95%	G tab>Gcal	Conc. P	G tablas 95%	G tab>Gcal	G tab>Gcal
0,2	0,070	0,070	Cumple	0,2	1,291	1,887	Cumple
0,2	0,873	0,873	Cumple	0,2	1,291	1,887	Cumple
0,2	0,070	0,070	Cumple	0,2	0,645	1,887	Cumple
0,2	1,013	1,013	Cumple	0,2	0,645	1,887	Cumple
0,2	1,118	1,118	Cumple	0,2	0,645	1,887	Cumple
0,2	1,397	1,397	Cumple	0,2	0,645	1,887	Cumple
0,4	0,968	0,968	Cumple	0,3	0,316	1,887	Cumple
0,4	0,470	0,470	Cumple	0,3	0,024	1,887	Cumple
0,4	0,194	0,194	Cumple	0,3	1,435	1,887	Cumple
0,4	0,692	0,692	Cumple	0,3	1,629	1,887	Cumple
0,4	0,692	0,692	Cumple	0,3	0,122	1,887	Cumple
0,4	1,687	1,687	Cumple	0,3	0,413	1,887	Cumple
0,6	0,585	0,585	Cumple	0,4	0,31	1,887	Cumple
0,6	0,585	0,585	Cumple	0,4	0,354	1,887	Cumple
0,6	0,139	0,139	Cumple	0,4	1,683	1,887	Cumple
0,6	0,864	0,864	Cumple	0,4	0,974	1,887	Cumple
0,6	0,920	0,920	Cumple	0,4	0,221	1,887	Cumple
0,6	1,644	1,644	Cumple	0,4	0,974	1,887	Cumple
0,8	0,070	0,070	Cumple	0,5	0,577	1,887	Cumple
0,8	0,442	0,442	Cumple	0,5	0,378	1,887	Cumple
0,8	0,352	0,352	Cumple	0,5	1,573	1,887	Cumple
0,8	0,855	0,855	Cumple	0,5	1,234	1,887	Cumple
0,8	1,338	1,338	Cumple	0,5	0,577	1,887	Cumple
0,8	1,468	1,468	Cumple	0,5	0,438	1,887	Cumple
1	0,408	0,408	Cumple	0,6	0,023	1,887	Cumple
1	0,088	0,088	Cumple	0,6	0,342	1,887	Cumple
1	0,010	0,010	Cumple	0,6	1,618	1,887	Cumple
1	0,050	0,050	Cumple	0,6	1,208	1,887	Cumple
1	0,439	0,439	Cumple	0,6	0,889	1,887	Cumple
1	1,856	1,856	Cumple	0,6	0,114	1,887	Cumple

Fuente: Elaboración propia

Anexo 4. Datos para el Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Nº de muestra	Bray-Kurtz Abs (λ)	Olsen Abs (λ)
1	0,064	0,058
2	0,063	0,059
3	0,064	0,06
4	0,062	0,059
5	0,063	0,061
6	0,062	0,06
7	0,063	0,058
8	0,063	0,061
9	0,064	0,058
10	0,065	0,059
Yi	0,063	0,059
Si	0,001	0,001
LC	0,065	0,061
LOD	0,066	0,062
LOQ	0,073	0,069

Fuente: Elaboración propia

Anexo 5. Análisis de datos para la precisión (Bray-Kurtz y Olsen)

Conc.P	Analista	G		Conc.P	Analista	G		G tab > Gcal
		Gcalculado	tablas 95%			Gcalculado	tablas 95%	
0,2	A-M	0,447	1,481	0,2	A-M	0,781	1,481	Cumple
0,2	A-E	0,776	1,481	0,2	A-E	0,511	1,481	Cumple
0,2	A-M	1,2	1,481	0,2	A-M	0,888	1,481	Cumple
0,2	A-E	0,87	1,481	0,2	A-E	1,158	1,481	Cumple
0,4	A-M	0,182	1,481	0,3	A-M	0,034	1,481	Cumple
0,4	A-E	0,158	1,481	0,3	A-E	1,108	1,481	Cumple
0,4	A-M	1,201	1,481	0,3	A-M	1,31	1,481	Cumple
0,4	A-E	1,225	1,481	0,3	A-E	0,235	1,481	Cumple
0,6	A-M	1,316	1,481	0,4	A-M	0,786	1,481	Cumple
0,6	A-E	0,427	1,481	0,4	A-E	0,812	1,481	Cumple
0,6	A-M	0,142	1,481	0,4	A-M	0,941	1,481	Cumple
0,6	A-E	1,032	1,481	0,4	A-E	0,915	1,481	Cumple
0,8	A-M	1,013	1,481	0,5	A-M	0,404	1,481	Cumple
0,8	A-E	0,705	1,481	0,5	A-E	1,279	1,481	Cumple
0,8	A-M	0,885	1,481	0,5	A-M	1,077	1,481	Cumple
0,8	A-E	0,833	1,481	0,5	A-E	0,202	1,481	Cumple
1	A-M	1,03	1,481	0,6	A-M	1,219	1,481	Cumple
1	A-E	0,805	1,481	0,6	A-E	1,084	1,481	Cumple

1	A-M	0,684	1,481	0,6	A-M	0,339	1,481	Cumple
1	A-E	0,908	1,481	0,6	A-E	0,474	1,481	Cumple

Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. Valores tabulados de t a un 95,46 % y 99,73 % de probabilidad

Grados de libertad	95,46%		99,73%		Grados de libertad	95,46%		99,73%	
	Una Cola	Dos Colas	Una Cola	Dos Colas		Una Cola	Dos Colas	Una Cola	Dos Colas
1	6,964	13,999	117,890	235,784	26	1,756	2,102	3,035	3,316
2	3,088	4,532	13,553	19,206	27	1,754	2,098	3,025	3,303
3	2,461	3,310	7,256	9,219	28	1,752	2,094	3,016	3,291
4	2,218	2,871	5,480	6,620	29	1,749	2,091	3,007	3,280
5	2,091	2,650	4,687	5,507	30	1,747	2,088	2,999	3,270
6	2,013	2,518	4,247	4,904	31	1,746	2,085	2,992	3,261
7	1,960	2,430	3,969	4,530	32	1,744	2,082	2,985	3,252
8	1,922	2,368	3,778	4,277	33	1,742	2,080	2,978	3,244
9	1,894	2,321	3,640	4,094	34	1,741	2,077	2,972	3,236
10	1,871	2,285	3,535	3,957	35	1,739	2,075	2,966	3,229
11	1,854	2,256	3,453	3,850	36	1,738	2,073	2,961	3,222
12	1,839	2,233	3,387	3,764	37	1,736	2,071	2,956	3,216
13	1,827	2,213	3,332	3,694	38	1,735	2,069	2,951	3,210
14	1,816	2,196	3,287	3,636	39	1,734	2,067	2,946	3,204
15	1,807	2,182	3,248	3,586	40	1,733	2,065	2,942	3,199
16	1,800	2,170	3,215	3,544	41	1,732	2,064	2,938	3,194
17	1,793	2,159	3,187	3,507	42	1,731	2,062	2,934	3,189
18	1,787	2,150	3,162	3,475	43	1,730	2,061	2,930	3,184
19	1,782	2,142	3,139	3,447	44	1,729	2,059	2,927	3,180
20	1,777	2,134	3,120	3,422	45	1,728	2,058	2,924	3,175
21	1,773	2,127	3,102	3,400	46	1,727	2,057	2,920	3,171
22	1,769	2,121	3,086	3,380	47	1,727	2,056	2,917	3,168
23	1,765	2,116	3,071	3,361	48	1,726	2,054	2,914	3,164
24	1,762	2,111	3,058	3,345	49	1,725	2,053	2,912	3,160
25	1,759	2,106	3,046	3,330	50	1,724	2,052	2,909	3,157

Anexo 7 Valores tabulados de “F”

VALORES TABULADOS DE “F” F DE SNEDECOR A 95,46% DE PROBABILIDAD

f_1/f_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	195,963	242,082	261,728	272,488	279,251	283,887	287,260	289,823	291,836	293,459
2	20,538	21,026	21,191	21,274	21,323	21,356	21,380	21,398	21,412	21,423
3	10,955	10,287	9,974	9,794	9,678	9,596	9,536	9,490	9,453	9,423
4	8,246	7,386	6,996	6,772	6,627	6,526	6,450	6,392	6,346	6,309
5	7,025	6,112	5,700	5,463	5,309	5,201	5,120	5,058	5,008	4,968
6	6,341	5,409	4,989	4,747	4,589	4,478	4,394	4,330	4,279	4,237
7	5,906	4,968	4,544	4,300	4,140	4,026	3,942	3,876	3,824	3,781
8	5,607	4,666	4,241	3,995	3,834	3,719	3,634	3,567	3,514	3,470
9	5,388	4,446	4,021	3,775	3,613	3,498	3,411	3,344	3,290	3,246
10	5,221	4,280	3,855	3,608	3,446	3,330	3,243	3,175	3,120	3,076
11	5,090	4,150	3,725	3,478	3,315	3,199	3,111	3,043	2,988	2,943
12	4,984	4,046	3,621	3,374	3,211	3,094	3,006	2,937	2,882	2,836
13	4,897	3,960	3,535	3,288	3,125	3,008	2,919	2,850	2,795	2,749
14	4,824	3,888	3,464	3,217	3,053	2,936	2,847	2,778	2,722	2,676
15	4,763	3,827	3,404	3,156	2,992	2,875	2,786	2,716	2,660	2,614
16	4,709	3,775	3,352	3,104	2,940	2,822	2,733	2,663	2,607	2,560
17	4,663	3,730	3,307	3,059	2,895	2,777	2,688	2,618	2,561	2,514
18	4,622	3,690	3,267	3,020	2,856	2,737	2,648	2,578	2,521	2,474
19	4,586	3,655	3,233	2,985	2,821	2,702	2,613	2,542	2,485	2,438
20	4,554	3,624	3,202	2,954	2,790	2,671	2,581	2,511	2,454	2,406

Anexo 8. Valores tabulados de “G”

VALORES TABULADOS DE “G” PARA EL TEST DE GRUBB’S A 1% Y 5% DE PROBABILIDAD

p	Prueba simple de un solo valor alejado		Prueba doble de dos valores alejados	
	Arriba de 1%	Arriba de 5%	Bajo 1%	Bajo 5%
3	1,155	1,154	---	---
4	1,496	1,481	0,0000	0,0002
5	1,764	1,715	0,0018	0,0090
6	1,973	1,887	0,0116	0,0349
7	2,139	2,020	0,0308	0,0708
8	2,274	2,127	0,0563	0,1101
9	2,387	2,215	0,0851	0,1492
10	2,482	2,290	0,1150	0,1864
11	2,564	2,355	0,1448	0,2213
12	2,636	2,412	0,1738	0,2537
13	2,699	2,462	0,2016	0,2836
14	2,755	2,507	0,2280	0,3112
15	2,806	2,548	0,2530	0,3367
16	2,852	2,586	0,2767	0,3603
17	2,894	2,620	0,2990	0,3822
18	2,932	2,652	0,3200	0,4025
19	2,968	2,681	0,3398	0,4214
20	3,001	2,708	0,3585	0,4391
21	3,031	2,734	0,3761	0,4556
22	3,060	2,758	0,3927	0,4711
23	3,087	2,780	0,4019	0,4857
24	3,112	2,802	0,4234	0,4994
25	3,135	2,822	0,4376	0,5123
26	3,158	2,841	0,4510	0,5245
27	3,179	2,859	0,4638	0,5360
28	3,199	2,876	0,4759	0,5470
29	3,218	2,893	0,4875	0,5574
30	3,236	2,908	0,4985	0,5672
31	3,253	2,924	0,5091	0,5766
32	3,270	2,938	0,5192	0,5856
33	3,286	2,952	0,5288	0,5941
34	3,301	2,965	0,5381	0,6023
35	3,316	2,978	0,5469	0,6101
36	3,330	2,991	0,5554	0,6175
37	3,343	3,003	0,5636	0,6247
38	3,356	3,014	0,5714	0,6316
39	3,369	3,025	0,5789	0,6382
40	3,381	3,036	0,5862	0,6445

Anexo 9. Valores de t a un 95,46 % y 99,73% de probabilidad

Grados de libertad	95,46%		99,73%		Grados de libertad	95,46%		99,73%	
	Una Cola	Dos Colas	Una Cola	Dos Colas		Una Cola	Dos Colas	Una Cola	Dos Colas
1	6,964	13,999	117,890	235,784	26	1,756	2,102	3,035	3,316
2	3,088	4,532	13,553	19,206	27	1,754	2,098	3,025	3,303
3	2,461	3,310	7,256	9,219	28	1,752	2,094	3,016	3,291
4	2,218	2,871	5,480	6,620	29	1,749	2,091	3,007	3,280
5	2,091	2,650	4,687	5,507	30	1,747	2,088	2,999	3,270
6	2,013	2,518	4,247	4,904	31	1,746	2,085	2,992	3,261
7	1,960	2,430	3,969	4,530	32	1,744	2,082	2,985	3,252
8	1,922	2,368	3,778	4,277	33	1,742	2,080	2,978	3,244
9	1,894	2,321	3,640	4,094	34	1,741	2,077	2,972	3,236
10	1,871	2,285	3,535	3,957	35	1,739	2,075	2,966	3,229
11	1,854	2,256	3,453	3,850	36	1,738	2,073	2,961	3,222
12	1,839	2,233	3,387	3,764	37	1,736	2,071	2,956	3,216
13	1,827	2,213	3,332	3,694	38	1,735	2,069	2,951	3,210
14	1,816	2,196	3,287	3,636	39	1,734	2,067	2,946	3,204
15	1,807	2,182	3,248	3,586	40	1,733	2,065	2,942	3,199
16	1,800	2,170	3,215	3,544	41	1,732	2,064	2,938	3,194
17	1,793	2,159	3,187	3,507	42	1,731	2,062	2,934	3,189
18	1,787	2,150	3,162	3,475	43	1,730	2,061	2,930	3,184
19	1,782	2,142	3,139	3,447	44	1,729	2,059	2,927	3,180
20	1,777	2,134	3,120	3,422	45	1,728	2,058	2,924	3,175
21	1,773	2,127	3,102	3,400	46	1,727	2,057	2,920	3,171
22	1,769	2,121	3,086	3,380	47	1,727	2,056	2,917	3,168
23	1,765	2,116	3,071	3,361	48	1,726	2,054	2,914	3,164
24	1,762	2,111	3,058	3,345	49	1,725	2,053	2,912	3,160
25	1,759	2,106	3,046	3,330	50	1,724	2,052	2,909	3,157

Anexo 10. Fotografías

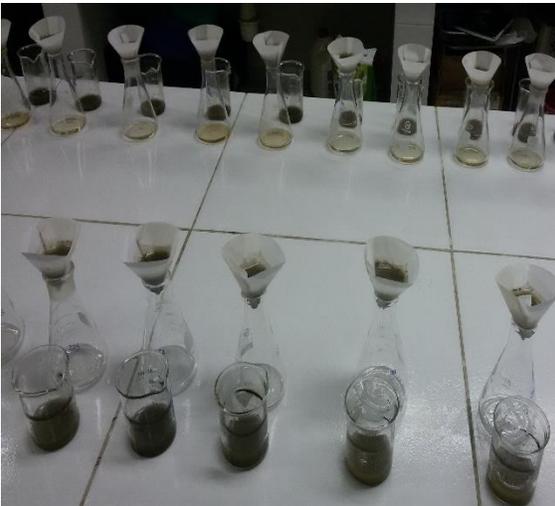
Determinación de textura



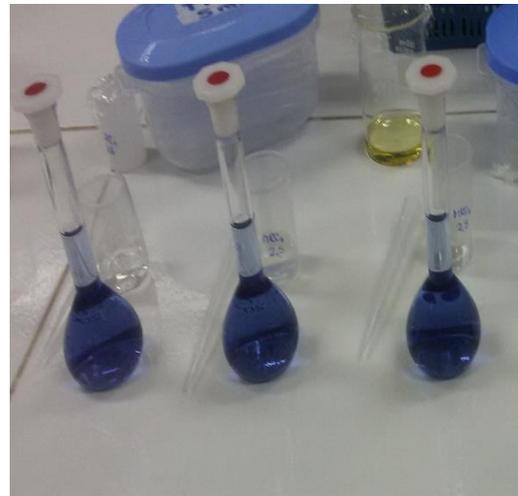
Determinación de pH



Determinación de Fósforo



Filtrado de las muestras



Coloración

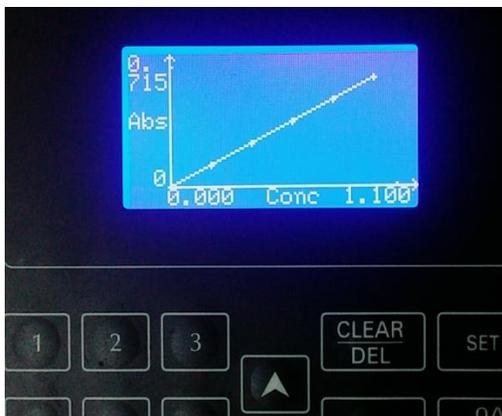


Preparado de las muestras

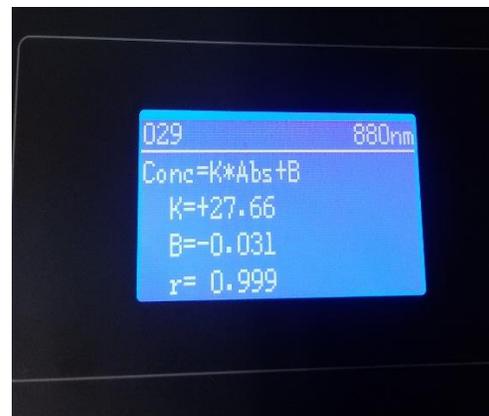


Lectura de las muestras

Calibración del Espectrofotómetro



Linealidad



Coefficiente de correlación