

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Cuantificación de urea en orina humana para la implementación de una celda ureolítica en una unidad generadora de energía

Trabajo de investigación presentado por:

Sofía Pallais Beteta para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2016








**Cuantificación de urea en orina humana para la implementación de una celda ureolítica en una unidad generadora de energía**



Vo.Bo.:

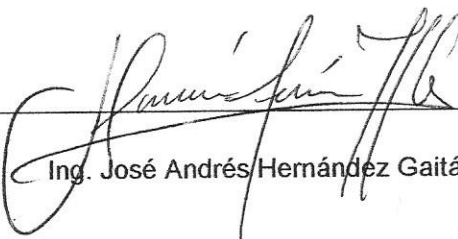
(f) 

B.Sc. Krisztina Fulop de Ríos-González Ph.D

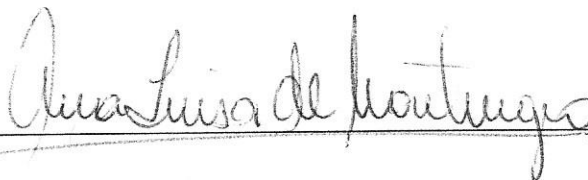
Tribunal Examinador:

(f) 

B.Sc. Krisztina Fulop de Ríos-González Ph.D

(f) 

Ing. José Andrés Hernández Gaitán, M.Sc.

(f) 

Lic. Ana Luisa Mendizabal de Montenegro

Fecha de aprobación del examen: Guatemala, 23 de junio 2016



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Cuantificación de urea en orina humana para la implementación de una celda ureolítica en una unidad generadora de energía

Trabajo de investigación presentado por:

Sofía Pallais Beteta para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2016



## PREFACIO

Quiero agradecer profundamente a mis padres, María de la Cruz y Mario Enrique, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, sin el cual no habría llegado hasta donde estoy.

También quiero agradecer a: el Licenciado André Chocó por su invaluable consejo y guía en el análisis estadístico de este trabajo; A la Licenciada Ana Luisa Mendizábal de Montenegro por sus preciosos consejos y guía en el trabajo de laboratorio; Al Dr. Alan Reyes por su valiosa asesoría matemática; Al Ingeniero José Andrés Hernández Gaitán y a la Dra. Krisztina Fulop de Ríos-González por su valiosa asesoría en el diseño experimental; Y a la Licenciada Lucía Nitsch por sus siempre valiosos consejos y apoyo.



## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| Tabla de imágenes.....   | xiii |
| Índice de tablas.....  | xv   |
| Resumen.....   | xix  |
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| II. OBJETIVOS .....  | 5    |
| A. Objetivo general.....   | 5    |
| B. Objetivos específicos y sub-específicos .....   | 5    |
| III. JUSTIFICACIÓN.....  | 7    |
| A. Justificación del trabajo de graduación.....  | 9    |
| B. Justificación del método de cuantificación de urea .....                              | 9    |
| IV. MARCO TEÓRICO.....   | 11   |
| A. Definiciones .....  | 11   |
| 1. Ureasa.....   | 11   |
| 2. Métodos para la cuantificación de urea .....  | 12   |
| B. Antecedentes .....  | 12   |
| 1. Generación de energía a partir de orina .....   | 12   |
| 2. Las bacterias ureasa positivo son ubicuas.....  | 15   |
| 3. Cambios observados en la orina almacenada y factores determinantes en la tasa de .... | 15   |
| descomposición de la urea.....   | 15   |
| 4. Experimentos sobre descomposición de urea .....                                       | 17   |
| V. METODOLOGÍA .....   | 19   |
| A. Materiales y equipo .....   | 19   |
| B. Reactivos.....  | 19   |
| C. Procedimientos.....   | 20   |
| 1. Aspectos éticos.....  | 20   |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.   | Solicitud de la muestra .....  | 20 |
| 3.   | Determinación del promedio de concentración de urea en orina .....                                 | 20 |
| 4.   | Exploración de la tendencia de la curva de la descomposición de urea en mezclas de orina .....     | 21 |
|      | almacenada.....  | 21 |
| 5.   | Efecto del KCl en los valores de concentración de urea en orina .....                              | 22 |
| 6.   | Controles.....   | 23 |
| 7.   | Limpieza de la cristalería y del equipo .....  | 24 |
| VI.  | RESULTADOS.....  | 25 |
| A.   | Determinación del promedio de concentración de urea en orina .....                                 | 25 |
| 1.   | Curvas de calibración de urea (amonio total) .....   | 25 |
| 2.   | Pruebas estadísticas .....   | 25 |
| B.   | Exploración de la tendencia de la curva de la descomposición de urea en mezclas de orina .....     | 29 |
| 1.   | Curvas de calibración de cloruro de amonio.....  | 29 |
| 2.   | Cambios observados en la orina almacenada en botellas PET.....                                     | 29 |
| 3.   | Análisis estadístico y matemático.....   | 31 |
| C.   | Efecto del KCl en los valores de concentración de urea en orina .....                              | 43 |
| D.   | Controles.....   | 45 |
| 1.   | Pruebas de referencia para la evaluación del funcionamiento del espectrofotómetro UV- Visible..... | 45 |
| 2.   | Precisión del pipeteo .....  | 46 |
| 3.   | Evaluación de la estabilidad de la reacción al momento de la lectura espectrofotométrica .....     | 47 |
| 4.   | Análisis gráfico de los patrones de urea y cloruro de amonio.....                                  | 48 |
| VII. | DISCUSIÓN .....  | 51 |
| A.   | Cálculo de la media de concentración de urea en orina .....  | 51 |
| B.   | Determinación del modelo matemático de predicción de urea en orina en función del tiempo .....     | 53 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| C.    | Efecto del KCl en los valores de concentración de urea en orina ..... | 60 |
| D.    | Controles .....   | 62 |
| VIII. | CONCLUSIONES .....  | 65 |
| IX.   | RECOMENDACIONES .....   | 67 |
| X.    | LITERATURA CITADA .....   | 71 |
| XI.   | ANEXOS .....  | 75 |



## TABLA DE IMÁGENES

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Imagen #1:  | Sistema generador de energía acoplado a una bomba de agua.....  | 6   |
| Imagen #2:  | Unidad generadora de electricidad a partir de electrólisis de urea desarrollada por estudiantes africanas.....                          | 12  |
| Imagen #3:  | Relación entre el pH y los días de almacenamiento de orina con heces a distintas concentraciones.....                                   | 14  |
| Imagen #4:  | Producción de amonio en pipas en dos tipos de reactores.....  | 15  |
| Imagen #5:  | Disminución de la concentración de urea en un cultivo bacteriano.....   | 16  |
| Imagen #6:  | Gráfica Q-Q para los 15 promedios de concentración de urea en orina.....  | 25  |
| Imagen #7:  | Diagrama de caja-bigotes de los 15 datos de concentración de urea en orina.....   | 26  |
| Imagen #8:  | Cambios observados durante el almacenamiento de la orina.....   | 28  |
| Imagen #9:  | Modelos de bondad y ajuste simples para describir la disminución de la concentración de urea en orina humana en función del tiempo..... | 35  |
| Imagen #10: | Modelos de bondad y ajuste para describir el aumento de la concentración de amonio en orina humana en función del tiempo.....           | 36  |
| Imagen #11: | Distribución de los datos de amonio total.....  | 38  |
| Imagen #12: | Predicción de la concentración de urea con modelos matemáticos compuestos.....  | 40  |
| Imagen #13: | Comportamiento de la absorbancia al momento de realizar la lectura espectrofotométrica.....   | 45  |
| Imagen #14: | Distribución de los valores del patrón de urea en el tiempo.....  | 46  |
| Imagen #15: | Distribución de los valores del patrón de $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....  | 47  |
| Imagen #16: | Curvas de calibración para el cálculo de la concentración de urea en orina...   | 73  |
| Imagen #17: | Curvas de calibración para el cálculo de la concentración de amonio en orina.....   | 80  |
| Imagen #18: | Diagrama de caja-bigotes de los residuales del modelo 14.....   | 93  |
| Imagen #19: | Comparación de la varianza de los dos tipos de mezcla.....  | 97  |
| Imagen #20: | Comparación de las medias e intervalos de confianza de los dos tipos de mezcla.....   | 98  |
| Imagen #21: | Prueba de estabilidad.....  | 107 |
| Imagen #22: | Prueba del espectro de corriente oscura.....  | 108 |
| Imagen #23: | Pruebas del ruido, la estabilidad fotométricos y monotonía de la línea base..   | 109 |
| Imagen #24: | Prueba del espectro de intensidad.....  | 110 |
| Imagen #25: | Prueba del espectro del patrón de óxido de olmio.....   | 111 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabla #1:  | Ventajas y desventajas del método de <i>Berthelot</i> .....  | 8  |
| Tabla #2:  | Características de las curvas de calibración de urea.....  | 23 |
| Tabla #3:  | Estadística descriptiva de los datos de concentración de urea en orina.....  | 24 |
| Tabla #4:  | Pruebas de hipótesis para verificar normalidad.....  | 24 |
| Tabla #5:  | Valores Z modificados de la ecuación de Iglewicz y Hoaglin (1993).....   | 26 |
| Tabla #6:  | Características de las curvas de calibración de NH <sub>4</sub> Cl.....  | 27 |
| Tabla #7:  | Regresión lineal para la disminución de la concentración de urea.....  | 29 |
| Tabla #8:  | Regresión logarítmica de la disminución de la concentración de urea.....   | 30 |
| Tabla #9:  | Regresión exponencial de la disminución de la concentración de urea.....   | 31 |
| Tabla #10: | Regresión lineal del aumento de la concentración de amonio.....  | 32 |
| Tabla #11: | Regresión logarítmica del aumento de la concentración de amonio.....   | 33 |
| Tabla #12: | Características matemáticas y estadísticas de los modelos seleccionados.....   | 34 |
| Tabla #13: | Prueba t para muestras independientes y la constante de amonio total.....  | 37 |
| Tabla #14: | Concentración de urea en orina antes y después de neutralizar.....   | 41 |
| Tabla #15: | Volumen de HCl calculado y agregado.....   | 42 |
| Tabla #16: | pH antes y después de la neutralización.....   | 42 |
| Tabla #17: | Pruebas de referencia del espectrofotómetro UV-Visible.....  | 43 |
| Tabla #18: | Media y desviación estándar del pipeteo de 1000, 20 y 10 $\mu$ L de agua.....  | 44 |
| Tabla #19: | Especificaciones de la cristalería volumétrica.....  | 70 |
| Tabla #20: | Especificaciones del equipo.....   | 71 |
| Tabla #21: | Especificaciones de los reactivos.....   | 71 |
| Tabla #22: | Concentraciones reales y absorbancias de los estándares de urea.....   | 72 |
| Tabla #23: | Algoritmo en R: curvas de calibración de urea.....   | 74 |
| Tabla #24: | Media de urea y coeficiente de variación (C.V.) del triplicado.....  | 77 |
| Tabla #25: | Algoritmo en R: pruebas de normalidad para objetivo 1.....   | 78 |
| Tabla #26: | Ecuación de Iglewicz y Hoaglin (1993).....   | 78 |
| Tabla #27: | Concentraciones reales y absorbancias de los estándares de NH <sub>4</sub> Cl.....   | 79 |
| Tabla #28: | Algoritmo en R: curvas de calibración de NH <sub>4</sub> Cl.....   | 81 |
| Tabla #29: | Concentración de amonio total y amonio en aumento.....   | 82 |
| Tabla #30: | Concentración de urea experimental.....  | 83 |
| Tabla #31: | Algoritmo en R: modelos de regresión lineal, exponencial y logarítmico de la disminución en la concentración de urea experimental..... | 84 |
| Tabla #32: | Amonio en aumento transformado con la función $\ln ( )$ .....  | 87 |
| Tabla #33: | Algoritmo en R: modelos y gráficas de regresión lineal y logarítmica del amonio en aumento.....  | 88 |
| Tabla #34: | Algoritmo en R: evaluación de supuestos de las regresiones lineales, exponenciales y logarítmicas.....                                 | 91 |
| Tabla #35: | Indicadores de la distribución de los residuales del modelo 14.....  | 93 |
| Tabla #36: | Estadísticos y valores p de las prueba de hipótesis para la evaluación de los supuestos de los residuos del modelo 14.....             | 93 |
| Tabla #37: | Amonio total (base de datos para prueba t).....  | 94 |



|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Tabla #38: | Algoritmo en R: prueba t de muestras independientes para la comparación de los dos tipos de mezcla.....   | 95  |
| Tabla #39: | Prueba t para comprobar la igualdad de medias de los dos tipos de mezcla....  | 95  |
| Tabla #40: | Algoritmo en R: evaluación de supuestos de la prueba t de muestras independientes para la comparación de los dos tipos de mezcla.....                           | 96  |
| Tabla #41: | Procedimiento para calcular el poder estadístico de la prueba t para la comparar los dos tipos de mezcla .....  | 99  |
| Tabla #42: | Procedimiento para graficar la distribución y la media de los valores de amonio total.....  | 100 |
| Tabla #43: | Concentración de urea antes y después de la neutralización (base de datos).....   | 101 |
| Tabla #44: | Algoritmo en R: comparar la concentración de urea antes y después de la neutralización.....   | 102 |
| Tabla #45: | Procedimiento para calcular el poder estadístico de la prueba t para la comparar la concentración de urea antes y después de la neutralización.....             | 103 |
| Tabla #46: | Volúmenes y concentraciones de KOH en solución.....   | 104 |
| Tabla #47: | HCl calculado y agregado (base de datos).....   | 104 |
| Tabla #48: | Algoritmo en R: comparar HCl calculado y agregado.....  | 105 |
| Tabla #49: | Prueba de Shapiro-Wilk para HCl calculado y HCl agregado.....   | 105 |
| Tabla #50: | Prueba de Levene entre HCl calculado y HCl agregado.....  | 106 |
| Tabla #51: | Temperatura durante la medición del pH.....   | 106 |
| Tabla #52: | Temperatura registrada y densidad del agua durante las mediciones de la precisión del pipeteo.....  | 112 |
| Tabla #53: | Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Eppendorf de 1000 $\mu\text{L}$ .....   | 113 |
| Tabla #54: | Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Eppendorf para medir 10 $\mu\text{L}$ .....   | 114 |
| Tabla #55: | Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Transferpette para medir 20 $\mu\text{L}$ .....   | 115 |
| Tabla #56: | Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Transferpette para medir 10 $\mu\text{L}$ .....   | 116 |
| Tabla #57: | Datos originales para la evaluación del comportamiento de la absorbancia después de cumplirse los 20 minutos de la reacción para la cuantificación de urea..... | 117 |
| Tabla #58: | Algoritmo en R: graficar el comportamiento de la absorbancia después de haberse cumplido los 20 minutos de la reacción para la cuantificación de urea.....      | 118 |
| Tabla #59: | Datos originales de la concentración del patrón de urea.....  | 119 |
| Tabla #60: | Algoritmo en R: graficar el comportamiento del patrón de urea en función del tiempo.....  | 121 |
| Tabla #61: | Datos originales de la concentración del patrón de cloruro de amonio.....   | 122 |
| Tabla #62: | Algoritmo en R: graficar el comportamiento del patrón de cloruro de amonio en función del tiempo.....   | 123 |



## RESUMEN

Este trabajo buscó responder las interrogantes relacionadas con la concentración de urea en orina humana para diseñar un prototipo de una máquina generadora de energía a partir de orina humana, la cual hace funcionar una bomba de agua. Se determinó la media poblacional de urea en orina ( $1779.2079 \pm 430.9402$  mg/dL), para lo cual se precisó definir si la distribución de probabilidad de la urea en orina correspondía a la de la población normal, aplicando análisis estadístico inferencial. También se calculó un modelo exponencial mediante regresión lineal múltiple para predecir la disminución de la concentración de urea en un intervalo de 12 días en mezclas de orina almacenadas bajo condiciones específicas, respondiendo a las necesidades de repetibilidad requeridas para el funcionamiento a futuro de la máquina. Se concluyó que se requiere una solución de urea a una concentración igual a la media poblacional de urea en orina para estudiar el funcionamiento, la rentabilidad y el rendimiento de la máquina. También se concluyó que las dimensiones del tanque de almacenamiento de mezclas de orina de 4 y 8 muestras pueden calcularse utilizando el modelo exponencial calculado, cuya precisión de predicción puede mejorarse al incluir en el modelo otras posibles variables regresoras y al aumentar el número de las réplicas. Esta investigación es de tipo exploratoria, por lo que los resultados obtenidos pretenden ser el inicio de varios estudios de seguimiento. Este estudio contribuirá en los primeros pasos en el diseño del primer prototipo de la máquina.



## I. INTRODUCCIÓN

La presente investigación se enfocó en responder a dos interrogantes relacionadas a la concentración de urea en orina humana, las cuales fueron: (1) calcular la media poblacional de la concentración de urea en orina humana, cuyo resultado se esperó encontrar entre 930 mg/dL y 2330 mg/dL (Putnam, 1971) y (2) calcular un modelo matemático para predecir la concentración de urea en orina almacenada bajo condiciones específicas en función del tiempo. Para calcular el modelo, se esperó obtener una parábola cóncava que corta ambos ejes ( $x$ ,  $y$ ) en el primer cuadrante de un plano cartesiano (Jiang y Bakken, 1999). Por consiguiente, se esperó poder predecir la concentración de urea mediante un modelo exponencial.

La presente investigación está dirigida a responder las interrogantes relacionadas con la concentración de urea en orina humana para construir una plataforma de información que permita diseñar un prototipo de una máquina generadora de energía a partir de orina humana, un proyecto desarrollado por un grupo de estudiantes de la Universidad del Valle de Guatemala, con el fin de auxiliar a comunidades con problemas en el acceso al agua. Esta investigación es de tipo exploratoria, por lo que los resultados obtenidos pretenden ser el inicio de varios estudios de seguimiento.

Como resultado de los desastres naturales en Guatemala, la comunidad de *Panimaché* debió ser trasladada hacia diferentes regiones. La más actual es *Panimaché Quinto*, localizada entre los departamentos de Sololá y Quiché, en donde las mujeres y niños requieren invertir alrededor de 35 horas semanales en el transporte del agua para la comunidad.

Para resolver el problema del agua en la comunidad, el equipo de la UVG desarrolló un prototipo inicial de una unidad que provee energía a una bomba de agua, a partir de la electrólisis de urea. En un futuro se espera construir un prototipo funcional e implementarlo en la comunidad. El sistema se compone esencialmente de un tanque de almacenamiento de orina de tereftalato de polietileno (PET) conectado a una celda electrolítica, la cual genera el  $H_2$ . La celda está conectada también a una batería, la cual al descargarse completamente permite la producción máxima de hidrógeno. La batería, a su vez, es recargada por un panel solar. La celda provee el  $H_2$  a un motor modificado para la combustión de hidrógeno; el motor está conectado a una bomba de agua para proveerle la energía necesaria para funcionar. La cantidad de agua por hora que puede bombear son

3500 L/h, asumiendo un 100% de eficiencia. La eficiencia del prototipo actual es de 14.5%, lo cual permite bombear 507.5 L/h.

Para la cuantificación de urea se utilizó el método enzimático que emplea la reacción de *Berthelot*, utilizando un kit comercial de uso rutinario en laboratorios clínicos, adaptándolo a las necesidades del proyecto. Para responder la primera interrogante, se obtuvieron muestras de orina de 15 voluntarios aleatorios dentro del campus UVG y se obtuvo la media de concentración de urea poblacional mediante el análisis previo de la normalidad de la distribución de los datos. La media se requirió para estudiar el funcionamiento y el rendimiento de la celda ureolítica.

Para responder la segunda interrogante, se prepararon dos tipos de mezcla de orina. La primera contenía cuatro muestras de cuatro individuos voluntarios y la segunda contenía ocho muestras, de las cuales cuatro eran idénticas a la primera mezcla. Las mezclas se almacenaron en botellas de tereftalato de polietileno (PET), con la intención de replicar las condiciones de almacenamiento de la máquina generadora de energía. Con base en estas mezclas se calculó el modelo matemático para predecir la concentración de urea en orina en el tiempo, el cual se requería para calcular las dimensiones óptimas del tanque de almacenamiento de orina de la máquina, utilizando regresión lineal múltiple.

Adicionalmente, se estudió el efecto de la formación de KCl *in situ* a partir de KOH y HCl en la orina sobre los valores de concentración de urea con el fin de determinar si era posible utilizar el método enzimático para estudiar la cinética de la reacción de ureolisis en la celda electrolítica. Asimismo, se estudió la diferencia entre la cantidad calculada y agregada de HCl para neutralizar la cantidad correspondiente de KOH para determinar si era posible utilizar KCl puro en lugar de la neutralización *in situ*.

Con respecto a la primera interrogante, se encontró que la concentración de urea en orina es una variable que puede que se distribuya normalmente, con una media de  $1779.21 \pm 430.94$  mg/dL; por lo que se recomendó que la solución de urea, requerida para estudiar el funcionamiento y el rendimiento de la celda, se encontrase en este rango.

Con respecto a la segunda interrogante, se calculó un modelo matemático de tipo exponencial para predecir la concentración de urea en el tiempo en un rango de 12 días, cuya variable dependiente está en función del tiempo y el tipo de mezcla de orina. El modelo calculado describe una parábola convexa que corta ambos ejes (x, y) en el primer cuadrante de un plano cartesiano. Según este modelo, el cálculo de la dimensión del tanque de almacenamiento deberá

contemplar la cantidad de muestras de orina que conforman la mezcla; sin embargo, existe la posibilidad de que el tipo de mezcla no sea una variable regresora significativa.

Con respecto al experimento adicional, se determinó que podría no existir efecto alguno sobre los valores de concentración de urea debido a la adición de KOH y HCl a la orina, en cuyo caso podría utilizarse el método enzimático para estudiar la cinética de la reacción de ureolisis en la celda electrolítica. También se determinó que podría no existir diferencia entre el HCl calculado y agregado para neutralizar el KOH, en cuyo caso podría utilizarse KCl en lugar de la neutralización *in situ*.



## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Generar las bases de información sobre la concentración de urea en orina para construir una máquina generadora de energía a partir de orina humana.

### B. Objetivos específicos y sub-específicos

1. Calcular la media poblacional de la concentración de urea en orina humana utilizando un método espectrofotométrico estandarizado.
  - a. Analizar la normalidad de una muestra de tamaño representativo de la población “concentración de urea en orina humana”.
  - b. A partir de una muestra distribuida normalmente, calcular el promedio de la “concentración de urea en orina humana”.
  
2. Explorar la tendencia de la curva de la descomposición de urea en mezclas de orina bajo condiciones de almacenamiento específicas en función del tiempo.
  - a. Observar la descomposición de urea en dos tipos de mezcla de orina almacenadas en botellas de PET en un intervalo determinado experimentalmente.
  - b. Explorar la tendencia de la curva de la descomposición de urea en mezclas de orina por medio del análisis estadístico de los datos obtenidos.



### III. JUSTIFICACIÓN

La implementación de un sistema generador de energía a partir del hidrógeno obtenido de la ureolisis permitiría disminuir los efectos nocivos del exceso de urea en el ambiente. Según los datos recopilados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) (1994), la exposición de los ecosistemas a cantidades excesivas de urea (la producción anual supera las 100 millones de toneladas métricas) ha causado la eutrofización de los mismos, además de acidificación de los suelos, contaminación de las aguas subterráneas y aumento de la concentración de amonio en el aire (Francis *et al.* 2002).

El hidrógeno generado con esta tecnología tiene una amplia gama de aplicaciones, entre las cuales se encuentran la integración de pilas de combustión de hidrógeno en teléfonos celulares, lap-tops, máquinas dispensadoras, casas, oficinas, negocios, fábricas y vehículos de todo tipo (Dunn, 2002). En el mundo ya existen 1093 pilas de combustible estacionarias (Gelman, 2012). Además, se utiliza para la propulsión de cohetes y generación de electricidad y agua dentro de las naves espaciales (Dunn, 2002).

Por otro lado, comunidades de personas de escasos recursos sin acceso a electricidad podrían beneficiarse del invento. Por ejemplo, Guatemala es un país marcado por la pobreza y que alberga a más de 20 etnias distintas. La historia de la población indígena está grabada por la violencia, la muerte y despojos de sus tierras hacia lugares en donde las tierras no son tan fértiles. Uno de estos pueblos es el de *Panimaché Quinto*, localizado entre los departamentos de Sololá y Quiché (dos de los departamentos más afectados por la guerra y los desastres naturales) y conformado por 44 familias mayoritariamente de la cultura K'iche. Esta comunidad se dividió en 5 grupos (I, II, III, IV y V) debido al desplazamiento de la comunidad a causa de las condiciones inhabitables. *Panimaché V* es la más reciente y se formó a raíz de la Tormenta Agata 2010, la cual obligó a la comunidad a comprar un terreno, el cual dividieron para asentarse. Las familias contactaron a TECHO (una organización dedicada a buscar e implementar soluciones a la situación de pobreza en países de Latinoamérica y El Caribe a través del voluntariado) cuatro años después de la movilización, solicitando el programa de vivienda. Los problemas de esta comunidad giran alrededor de la desigualdad de género y el acceso al agua. Las mujeres y los niños invierten 35 horas semanales en transportar agua desde el pozo más próximo hasta sus casas (TECHO Guatemala, 2015).



## A. Justificación del trabajo de graduación

Este trabajo es de tipo exploratorio y busca responder a las interrogantes planteadas sobre la concentración de urea en orina para construir un prototipo de máquina generadora de energía a partir de orina humana (sección roja de la Imagen #5).

El primer objetivo es calcular la media de la concentración de urea en orina humana utilizando una muestra de tamaño representativo. La importancia de este estudio radica en la necesidad de calcular la rentabilidad de la máquina, así como de preparar soluciones de urea a la misma concentración de la orina para probar el funcionamiento de la celda electrolítica que produce el hidrógeno a partir de la electrólisis de la urea.

El segundo objetivo se enfocará en observar la descomposición de urea en dos tipos de mezcla de orina almacenadas en botellas PET en un intervalo de tiempo determinado experimentalmente, atendiendo a las necesidades de repetibilidad requeridas para obtener datos confiables. El intervalo de tiempo se establecerá al inicio del experimento, con una solución pura de urea almacenada bajo las mismas condiciones que las mezclas de orina. La importancia de este estudio radica en la necesidad de calcular un modelo matemático que pueda utilizarse en la planificación de las dimensiones del tanque de almacenamiento de orina. Mientras menor sea el tiempo de duración de la urea, menor tiempo podrá almacenarse la orina, lo cual requerirá un tanque más pequeño.

## B. Justificación del método de cuantificación de urea

El método que se empleará será el enzimático que utiliza la reacción de *Berthelot*. Otros métodos utilizan equipos y reactivos costosos, son laboriosos o no hay leyes que regulen los desechos producidos (en el caso de la espectrometría de masas con dilución isotópica (IDMS) que utiliza un isótopo no radioactivo de la urea). El método de *Berthelot* se utiliza rutinariamente en los laboratorios clínicos (hay kits con los reactivos necesarios para la reacción y con el método estandarizado y validado) y es de relativamente bajo costo (aproximadamente Q2.50 por prueba), en comparación con el otro kit que se vende en Guatemala (método de la glutamato deshidrogenasa (GLDH)), cuyo precio es de aproximadamente Q5.00 por prueba. En el cuadro 1 se presentan las ventajas y desventajas del método.

Tabla #1: Ventajas y desventajas del método de *Berthelot*

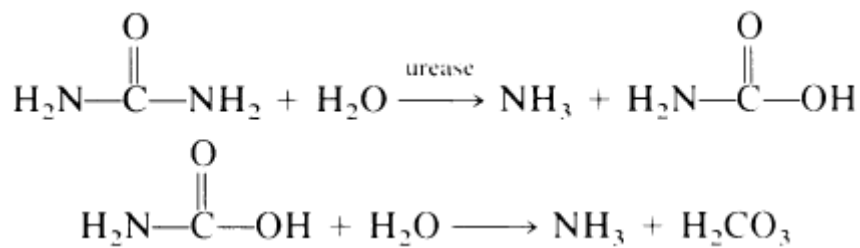
| Ventajas  | Desventajas  |
|---|--|
| Los reactivos pueden costearse en kit, el cual es de bajo costo y trae incluida la información metrológica.   | Hay interferencia por ion $\text{NH}_4^+$ endógeno, aminoácidos, aminos y amidas. La orina debe refrigerarse y analizarse antes que se cumplan las 24 horas para que la concentración de $\text{NH}_4^+$ endógeno sea despreciable (Burtis y Bruns, 2014). |
| Es una reacción de punto final, por lo que no requiere de un autoanalizador para medir tiempos específicos, a diferencia de la reacción con glutamato deshidrogenasa (GLDH) (Sampson <i>et al.</i> 1980). |  |

## IV. MARCO TEÓRICO

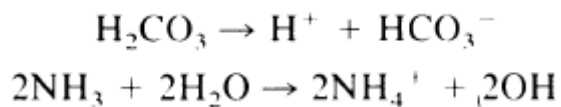
### A. Definiciones

1. Ureasa. La ureasa (urea amidohidrolasa: EC 3.5.1.5) se encuentra en el citoplasma de bacterias y hongos, aunque también puede encontrarse ureasa libre proveniente, probablemente, de plantas y microorganismos (Mobley y Hausinger, 1989); (Lv *et al.* 2011).

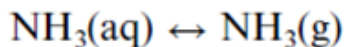
Esta enzima posee el níquel como cofactor (Riedel *et al.* 2015) y cataliza la conversión de una molécula de urea en una de amoníaco y otra de ácido carbámico, la cual se descompone espontáneamente para formar ácido carbónico y otra molécula de amoníaco (Mobley y Hausinger, 1989); (Carter *et al.* 2009):



A pH fisiológico, el ácido carbónico y el ion amonio se equilibran con el medio acuoso, lo cual resulta en un aumento neto del pH (Mobley y Hausinger, 1989), considerando que el pKa para el equilibrio del amonio es 9.3 a 25°C (Hellström *et al.* 1999); (UN Industrial Development Organization, 1998):



El amoníaco disuelto está en equilibrio con el amoníaco gaseoso (Hellström *et al.* 1999):



La descomposición de la urea implica el aumento en la concentración de amonio en el medio con el consecuente aumento del pH, lo cual aumenta el riesgo de la pérdida de nitrógeno por volatilización. La presión parcial del amoníaco que se encuentra encima de la interfase líquida determina la cantidad de amoníaco que puede volatilizarse. El nitrógeno puede conservarse durante

el almacenamiento al impedir la ventilación de la orina, ya que se reduce la tasa de intercambio gaseoso (Hellström *et al.* 1999). A pH fisiológico de la orina, el 99% del amoníaco se encuentra en forma de ion amonio (Edin-Liljergen *et al.* 1992). El pH normal de la orina se encuentra entre 4.5 y 8.0, pero un pH ligeramente ácido de 6.0 es lo común (Jones, 2010); (McClatchey, 2002)

2. Métodos para la cuantificación de urea. Los métodos para la cuantificación de urea pueden clasificarse en 4 tipos: misceláneos, enzimáticos, directos y electroquímicos. Ejemplos son: IDMS (*Isotopic Dilution Mass Spectrometry*) y espectroscopía infrarroja (IR), GLDH (glutamato deshidrogenasa), la reacción de Fearon, conductimétricos, respectivamente (entre otros) (Burtis y Bruns, 2014); (Francis *et al.* 2002). También pueden clasificarse en directos e indirectos. En los métodos directos, la reacción con la molécula de urea ocurre sin previa transformación, mientras que en los indirectos, la reacción ocurre en dos etapas. La primera etapa consiste en la ruptura de los enlaces de nitrógeno de la molécula de urea por la acción de la ureasa y la segunda etapa consiste en la cuantificación del amonio liberado mediante diversos métodos. El más utilizado es el que emplea la reacción de *Berthelot* (Valdés Diez *et al.* 1997). La reacción se inicia con la hidrólisis de urea por la adición de una cantidad conocida de ureasa estabilizada con tampón de fosfatos. Para la reacción de *Berthelot*, inicialmente, el amonio producido se hacía reaccionar con fenol para producir indofenol azul, cuya absorbancia se mide entre 580 y 630 nm (espectrofotometría visible). Debido a la alta toxicidad del fenol, se ha sustituido por salicilato de sodio (Burtis y Bruns, 2014); (Kempers y Kok, 1989). Como fuente de cloro se utiliza hipoclorito de sodio, el cual funciona como iniciador de la reacción. La reacción es catalizada en medio alcalino con nitroprusiato sódico (Karge y Weitkamp, 2007); (Kempers y Kok, 1989).

## B. Antecedentes

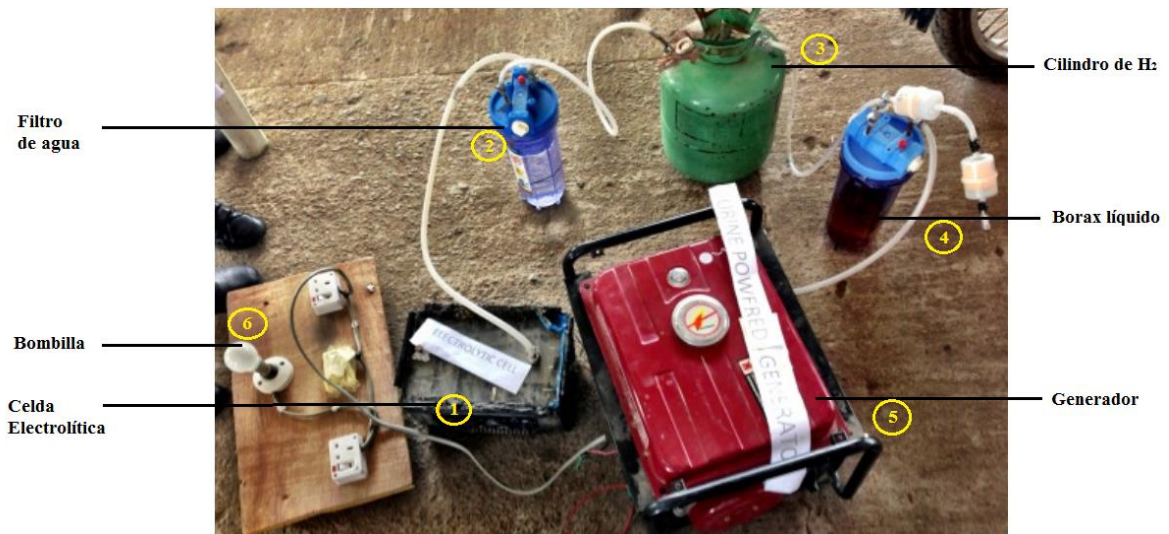
1. Generación de energía a partir de orina. En 1979 la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) publicó un documento titulado “Composition And Concentrative Properties of Human Urine” con todas las propiedades físicas y químicas de la orina típica humana, junto con datos experimentales de pretratamientos químicos y electrolíticos para la extracción de agua potable a partir de la orina. Los autores indican que a la orina se le puede hacer pasar suficiente corriente de modo que todos los compuestos orgánicos se conviertan en H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Las sales

inorgánicas residuales pueden removerse por electroósmosis para obtener el agua potable (Putnam, 1979).

En enero de 2011, la revista *Current Science* publicó un artículo acerca del proyecto *Liquid Gold*, encabezado por Gerardine Botte, ingeniera química de la Universidad de Ohio (Piddock, 2011). Este proyecto consistió en generar hidrógeno puro a partir de urea en orina humana, el cual puede ser utilizado como generador de electricidad al aplicar la reacción inversa de la electrólisis (la separación de  $H_2O$  en  $H_2$  y  $O_2$ ), la cual es exotérmica (Georgia State University, 2005). La conversión de urea a hidrógeno se realizó mediante la electrólisis de la urea (ureólisis) en una celda electrolítica alcalina, utilizando KOH como electrolito y  $H_2O$  como solvente, con electrodos de níquel (Boggs *et al.* 2009). Las reacciones ocurren a temperatura ambiente y presión atmosférica. El voltaje teórico es de 0.37V, que es más económico que otras tecnologías que producen hidrógeno como la electrólisis del  $H_2O$ , que requiere un voltaje de 1.23V (Ohio University, 2015).

Según el *blog* de “Maker Faire Africa” (2012), en el año 2012, las adolescentes de 14 años, Duro-Aina Adebola, Akindele Abiola, Faleke Oluwatoyin y Bello Eniola, originarias de Lagos, Nigeria, desarrollaron un sistema que enciende una bombilla utilizando la tecnología patentada de ureólisis de Botte (Botte, 2009), cuya unidad se ilustra en la Imagen #2. Esta unidad tiene capacidad para generar luz de una bombilla por 6 horas a partir de 1 L de orina.

Imagen #2: Unidad generadora de electricidad a partir de electrólisis de urea desarrollada por estudiantes africanas



(Adaptado de A Urine Powered Generator: Maker Faire Africa, 2012)

Funcionamiento de la unidad que se observa en la Imagen #1:

1. La orina ingresa en una celda electrolítica que produce H<sub>2</sub>
2. El H<sub>2</sub> pasa a un filtro de agua
3. El H<sub>2</sub> purificado se almacena en un cilindro de gas
4. Desde el cilindro de gas, el H<sub>2</sub> ingresa en un cilindro con bórax líquido para remover la humedad del gas
5. El H<sub>2</sub> ingresa en un generador, el cual está conectado a una bombilla
6. Se produce electricidad y la bombilla enciende

El fundamento del funcionamiento de este sistema es la obtención de energía eléctrica a partir de un generador acoplado a una fuente de H<sub>2</sub> producido con la celda electrolítica, tal y como lo describió Gerardine Botte -- *“What these kids are doing is taking urea electrolysis and making hydrogen and then using that hydrogen to make electricity”*.

[“Lo que estas niñas están haciendo es tomando la electrólisis de la urea y produciendo hidrógeno y luego usando ese hidrógeno para producir electricidad”.] (Walia, 2013).

2. Las bacterias ureasa positivo son ubicuas. Las bacterias ureasa positivo son ubicuas; pueden encontrarse en suelos, ambientes acuáticos, en los intestinos humanos y en el tracto urinario de forma patogénica causando así enfermedades asociadas a cálculos renales (Udert *et al.* 2003). En el suelo, puede encontrarse entre un 17% y 30% de población bacteriana cultivable ureasa positiva, aunque la enzima también puede encontrarse en forma libre, la cual probablemente proviene de bacterias y células vegetales (Mobley y Hausinger, 1989). La disminución de la urea en orina almacenada se debe a la presencia de bacterias productoras de ureasa y de ureasa libre, tal y como lo demostró Udert *et al.* (2003).

3. Cambios observados en la orina almacenada y factores determinantes en la tasa de descomposición de la urea. En la orina sin preservar se observan cambios físicos, químicos y microbiológicos. Los cambios físicos se observan como el cambio de color debido a oxidación o reducción de solutos (urobilinógeno y bilirrubina), la disminución de la claridad debido a la formación de precipitados y proliferación bacteriana y el aumento en el olor característico del amoníaco debido a la hidrólisis de la urea causada por la ureasa bacteriana o libre. Los cambios químicos se observan como un aumento del pH debido a la producción de amonio, la disminución de glucosa, utilizada como fuente de energía por las bacterias, y la conversión de nitratos a nitritos. El tipo y la magnitud del cambio es imposible de predecir (Brunzel, 2013); (Mundt y Shanahan, 2010).

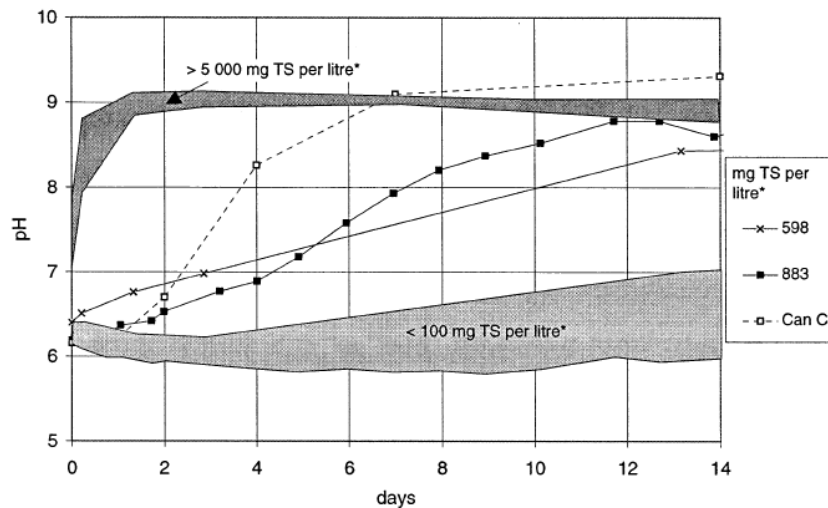
En sistemas de recolección de orina diluida proveniente de baños se ha observado la formación de precipitados inorgánicos, la cual está catalizada por el aumento del pH causado por la hidrólisis de la urea. Se identificaron estruvita ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), hidroxiapatita (HAP,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) y calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) (Udert *et al.* 2003). La precipitación de MAP (fosfato de magnesio y amonio) y fosfato de calcio se produce a pH 7.0 y 6.8, respectivamente, en orina sintética (Edin-Liljergen *et al.* 1992). En el estudio de Udert *et al.* (2003) se encontró que las concentraciones libres de calcio, magnesio y fosfato en los recolectores de orina disminuyeron en un 70%, 99% y 44%, respectivamente, antes de cumplirse las 24 horas.

La cristalización de la orina depende del tiempo de almacenamiento de la orina. Para que ocurra cristalización, la circulación de la orina debe retrasarse lo suficiente para que la acción de la ureasa bacteriana cause el incremento de pH necesario. El tiempo requerido por la ureasa para aumentar el pH también depende de la actividad enzimática del organismo (Edin-Liljergen *et al.* 1992). Considerando que el aumento del pH se debe a la formación de  $\text{NH}_4^+$  proveniente de la

descomposición de la urea, la frecuencia de circulación de la orina y la actividad enzimática de la ureasa contaminante son factores determinantes en la velocidad de descomposición de la urea.

Imagen #3: Relación entre el pH y los días de almacenamiento de orina con heces a distintas concentraciones

La concentración de heces se expresa como mg de TS por litro de orina sin diluir. Las botellas se almacenaron entre 20-23°C. Can C contiene 0.4 L de agua residual, 2.5L de orina y 7.5L de agua destilada.

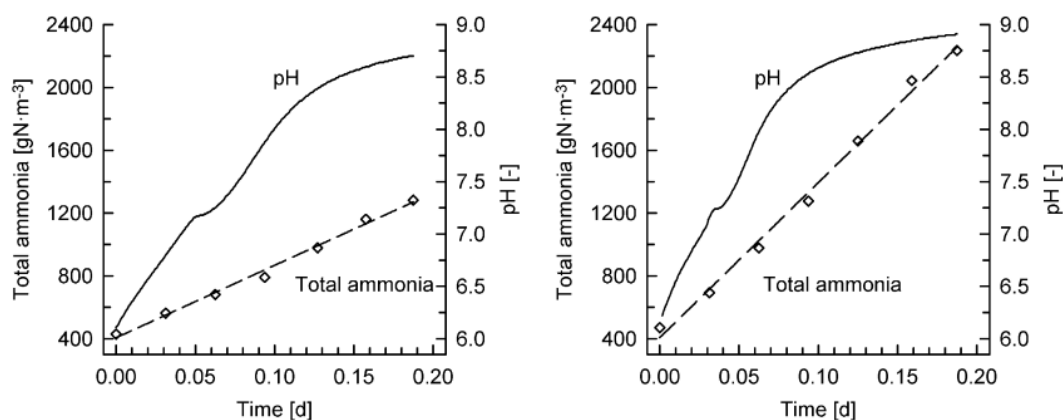


(Hellström *et al.* 1999)

En la Imagen #3 del estudio de Hellström *et al.* (1999) se observa los resultados de un experimento para determinar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de heces (proporcional a la carga microbológica) a un volumen fijo de orina sobre la tasa de descomposición de la urea. La concentración de heces menor a 100 mg de sólidos totales por litro (TS/L) de orina sin diluir tuvo poco impacto en la velocidad de descomposición de la urea. En cambio, a concentraciones entre 500 y 1000 mg TS por litro de orina sin diluir, la adición de heces aumentó la tasa de descomposición de la urea (Hellström *et al.* 1999), lo cual refleja que la velocidad de descomposición también depende de la carga bacteriana inicial.

#### 4. Experimentos sobre descomposición de urea

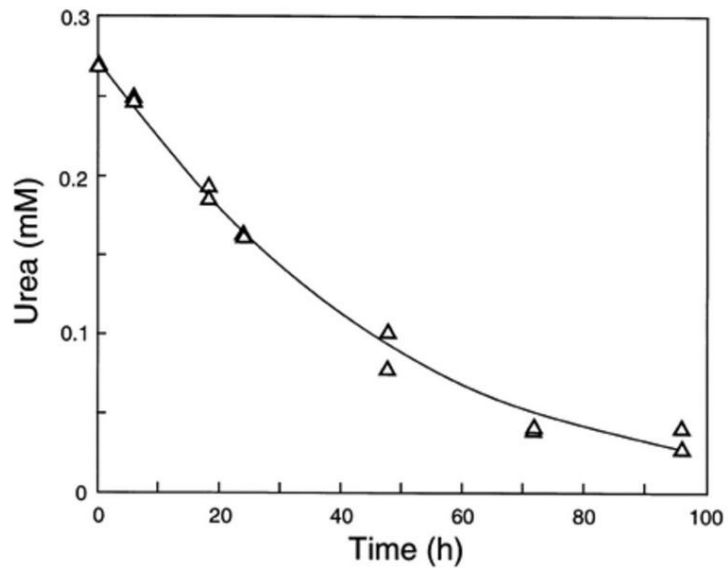
Imagen #4: Producción de amonio en pipas en dos tipos de reactores



(Udert *et al.* 2003)

En la Imagen #4 se observan los resultados de producción de amonio en un experimento realizado por Udert *et al.* (2003) con el objetivo de estudiar la dinámica entre la ureolisis y la precipitación de minerales en sistemas de recolección de orina. Específicamente, los autores se enfocaron en la estimación de la eficiencia de bacterias ureasa positivo en el tanque de almacenamiento y en las pipas de un sistema de recolección de orina, la dilucidación de la interacción entre la precipitación y la ureolisis y el estudio del mecanismo y la secuencia de precipitación. Para determinar la actividad ureolítica en el sólido presente en una pipa de un sistema NoMix, prepararon 2 reactores que contenían 700 mL de orina centrifugada y una muestra sólida proveniente de la pipa. Un reactor contenía una muestra sólida obtenida de la parte horizontal de la pipa (figura izquierda) y el otro reactor una muestra sólida de la parte vertical de la pipa (figura derecha). Realizaron un ajuste lineal a los datos. Los reactores se agitaron constantemente durante el experimento, lo cual acelera la ureolisis debido a un mayor contacto entre las bacterias y el sustrato. El amoníaco total se cuantificó con un método espectrofotométrico que utiliza púrpura de bromocresol.

Imagen #5: Disminución de la concentración de urea en un cultivo bacteriano



(Jiang y Bakken, 1999)

En la Imagen #5 se muestra la curva ajustada (asumiendo cinética de Michaelis-Menten) obtenida de un experimento para evaluar la afinidad por el sustrato de la ureasa de una cepa de *Nitrosospira*, la cual se hizo crecer en 60mL de medio LMU, el cual es una mezcla de LMA (medio básico de líquido mineral, enriquecido con amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) como sustrato energético) con urea. El inóculo inicial fue de  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  en medio LMA, el cual se consideró como un nivel alto de inoculación. El medio inoculado se colocó en botellas cerradas con una atmósfera enriquecida con  $\text{CO}_2$  y acetileno (este último para disminuir el crecimiento y la síntesis de novo de enzimas) durante 3 días a  $22^\circ\text{C}$  en condiciones de agitación. La urea se midió directamente con el método de diacetilmonoxima durante 3 días. (Jiang y Bakken, 1999).

## V. METODOLOGÍA

### A. Materiales y equipo

Las especificaciones de la cristalería y el equipo están disponibles en las Tablas 19 y 20.

- Balones volumétricos
- Pipetas volumétricas
- Pipetas automáticas y puntas
- Espectrofotómetro UV-Visible y celdas espectrofotométricas de cuarzo
- potenciómetro
- Guantes desechables
- Urinales
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Cloro, etanol y jabón blanco
- Agua destilada
- Botellas PET

### B. Reactivos

Las especificaciones de los reactivos están disponibles en la Tabla 21.

- kit UREA / BUN - COLOR de Biosystems
- Urea grado reactivo
- $\text{NH}_4\text{Cl}$

### C. Procedimientos

1. Aspectos éticos. La participación de sujetos humanos en este estudio no fue con motivos de investigación sino que únicamente con donadores de muestras de orina para estudios sobre cuantificación, degradación y neutralización de la urea. La recolección de orina es un procedimiento que se clasifica como de riesgo mínimo de acuerdo a regulaciones internacionales (45 CRF 46). No se recolectó información privada identificable de los donadores, por lo que no fue posible determinar la identidad de la persona que proporcionó cada muestra de orina. Las muestras recolectadas no se almacenaron para estudios futuros ni se compartieron para otras investigaciones, sino que fueron descartadas inmediatamente al terminar el análisis. En conclusión, se determinó que al presente estudio no le aplicaban regulaciones de investigación en sujetos humanos.

2. Solicitud de la muestra. Las muestras de orina se obtuvieron de personas voluntarias elegidas aleatoriamente dentro del campus central de la Universidad del Valle de Guatemala. El procedimiento de solicitud se describe a continuación: a) se abordó a la persona presentándose por el nombre del investigador, b) se le explicó que un equipo de estudiantes estaba llevando a cabo un Megaproyecto como trabajo de graduación, el cual consiste en generar energía a partir de orina, c) se aclaró que se requiere cuantificar la urea en la orina, un componente común en la orina, d) se informó que al conocer esta concentración no era posible realizar ningún tipo de diagnóstico médico y que la orina no se utilizaría para ningún otro fin, e) se aclaró que no se registraría ningún dato personal, como el nombre o la edad, f) se solicitó al participante proveer de los siguientes datos: la hora de la toma de la muestra y la cantidad de líquido consumida hasta ese momento, g) se explicó al voluntario el procedimiento a seguir para tomar la muestra, el cual varió según el objetivo (I o II) que se estuvo ejecutando.

3. Determinación del promedio de concentración de urea en orina. Se recolectaron 30 muestras de orina de personas diferentes sin controlar ninguna variable (nivel de hidratación, dieta u hora del día). Se solicitó al voluntario limpiar la zona genital con toallas húmedas proveídas por el investigador y orinar una poca cantidad previo a tomar la muestra. La orina se refrigeró hasta el momento del análisis (antes de que se cumplieran las 24 horas desde la recolección). Por cada muestra, se realizó una dilución 1:50 (20µL de orina por 980 µL de agua ultrapura) a partir de una alícuota. La urea se cuantificó en triplicado a partir de la dilución con un kit UREA / BUN - COLOR de Biosystems y un espectrofotómetro UV-Visible (Agilent, 8453E, ±0.005 AU, 190-1100nm) a

600 nm. Se calculó la concentración de urea a partir de las absorbancias correspondientes utilizando la curva de calibración 1, obtenida con lenguaje de programación R (datos originales: Tabla #22; ilustración: Imagen #16; algoritmo: Tabla #23). Se calculó el promedio del triplicado para obtener un único dato por individuo y se escogieron los 15 datos con un C.V.(%) entre 3% y 4%, o menor. Se analizaron los datos con el lenguaje de programación R para verificar la normalidad de las 15 muestras y calcular el promedio de la concentración de urea (datos originales: Tabla # 24; algoritmo: Tabla #25).

4. Exploración de la tendencia de la curva de la descomposición de urea en mezclas de orina almacenada. El intervalo de tiempo que duró el experimento se estableció previamente por medio de la cuantificación de urea periódica (con una diferencia de 1 o 2 días) de 200 mL de una solución pura de urea 50 mg/dL, la cual se almacenó en una botella PET vacía y cerrada de 800 mL, la cual se colocó en reposo y bajo sombra (entre 20 y 25°C); estas condiciones de almacenamiento eran las mismas que las condiciones de la orina almacenada en el prototipo de la máquina generadora de energía. Para tomar la muestra de orina, se solicitó al voluntario orinar directamente en el recipiente (sin ningún procedimiento previo de limpieza). Se prepararon 200 mL de dos tipos de mezcla de orina: a) una mezcla que contenía 50 mL de orina proveniente de 4 individuos diferentes y b) una mezcla que contenía 25mL de orina de 8 individuos diferentes, de los cuales 4 también brindaron la orina para la mezcla a). Por cada tipo de mezcla hubo 2 réplicas. Para cada réplica, se realizaron dos tipos de mediciones (amonio total y amonio en aumento), utilizando kits UREA / BUN - COLOR de Biosystems y un espectrofotómetro UV-Visible (Agilent, 8453E,  $\pm 0.005$  AU, 190-1100nm) a 600 nm. Cada tipo de medición se realizó en triplicado. Para cuantificar el amonio total, se requirió utilizar la enzima ureasa como reactivo. En este caso, la dilución de una alícuota de la muestra fue de 1:50 (20  $\mu$ L de orina por 980  $\mu$ L de agua ultrapura). Para calcular el amonio total se utilizaron las curvas de calibración de urea 5 y 6, obtenidas con lenguaje de programación R (datos originales: tabla #22; ilustración: imagen #16; algoritmo: tabla #23). Para cuantificar el amonio en aumento, no se utilizó la enzima ureasa como reactivo. En este caso, la dilución de la alícuota fue de 1:25 (40  $\mu$ L de orina por 960  $\mu$ L de agua ultrapura). Se calculó el promedio de cada triplicado. Para calcular el amonio en aumento se utilizaron las curvas de calibración de NH<sub>4</sub>Cl 1 y 2, obtenidas con lenguaje de programación R (datos originales: Tabla #27; ilustración: Imagen #17; algoritmo: Tabla #28).

Se realizó un análisis estadístico utilizando los datos de urea ( $n=22$ ), los cuales se obtuvieron por la resta entre los datos individuales de amonio total y de amonio en aumento, correspondiendo cada par según el día de medición. A estas diferencias también se les aplicó la técnica “TRP” para obtener regresiones lineales, logarítmicas y exponenciales con lenguaje de programación R. Se obtuvieron el  $R^2$  (ajustado), el error residual y estadístico F como criterios de selección estadísticos (datos originales: Tabla #29; datos de urea: Tabla #30; algoritmo de las regresiones: Tabla #31; algoritmo para la evaluación de supuestos de las regresiones: Tabla #34). El análisis estadístico se completó, con lenguaje de programación R, al aplicar la técnica de selección de variables “TRP” (Todas las Regresiones Posibles) a los datos de amonio en aumento ( $n=22$ ), junto con el análisis de supuestos de la regresión lineal múltiple, así como una prueba t para muestras independientes a los datos de amonio total ( $n=10$ ), junto con el análisis de supuestos para esa prueba (datos originales de amonio en aumento: Tabla #29; datos originales de amonio en aumento transformados con la función del logaritmo natural  $\ln()$ : Tabla #32; algoritmo de las regresiones de amonio en aumento: Tabla #33; algoritmo para la evaluación de supuestos de la regresiones elegidas: Tabla #34; datos originales de amonio total: Tabla #37; algoritmo de la prueba t para muestras independientes: Tabla #38; algoritmo para la evaluación de supuestos de la prueba t para muestras independientes: Tabla #40). Se calculó el poder estadístico de la prueba t para muestras independientes, utilizando la versión 3.1.9.2 del software G-Power (procedimiento: Tabla #41). Se promediaron los datos de amonio total (algoritmo para graficar la distribución y la media: Tabla #42) para calcular la constante y se construyeron los modelos matemáticos (modelos generales 1 y 2) como la diferencia entre la constante y la ecuación ajustada, obtenida con “TRP”, con mayor  $R^2$  (ajustado) y estadístico de F, y con menor error residual.

5. Efecto del KCl en los valores de concentración de urea en orina. Luego de calibrar el potenciómetro con tampones a pH 4, 7 y 10, se midió el pH de 5 muestras distintas de orina de 50 mL y se hizo una dilución 1:50 a cada una (20  $\mu\text{L}$  de orina por 980  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura). La urea se cuantificó en triplicado en la dilución utilizando un kit UREA / BUN - COLOR de Biosystems y un espectrofotómetro UV-Visible (Agilent, 8453E,  $\pm 0.005$  AU, 190-1100nm) a 600 nm. Se añadió KOH a cada muestra de orina original para llegar a una concentración de 5M. El KOH se neutralizó con HCl al 37%-38% hasta llegar al pH original. Se diluyó una alícuota de la orina tratada químicamente 1:50 (20  $\mu\text{L}$  de orina por 980  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura) y se cuantificó la urea en triplicado. Se calculó el promedio de cada triplicado para obtener una base de datos con  $n=5$  por grupo ( $n$  total = 10) y el porcentaje de cambio entre los dos grupos (concentración de urea previo y después del tratamiento químico). Utilizando lenguaje de programación R, se determinó la

diferencia entre los dos grupos por medio de una prueba t para muestras dependientes. También se determinó la diferencia entre el HCl agregado y el calculado requerido para neutralizar la concentración correspondiente de KOH por medio de una prueba t para muestras independientes. El poder estadístico de ambas pruebas se calculó con la versión 3.1.9.2 del software G-Power (datos originales de la urea previa y después al tratamiento químico: Tabla #43; algoritmo para la comparación de la urea previa y después del tratamiento químico: Tabla #44; procedimiento para calcular el poder estadístico de la prueba t para muestras dependientes: Tabla #45; volúmenes y concentración de KOH: Tabla #46; base de datos del HCl calculado y agregado: Tabla #47; algoritmo de la prueba t para muestras independientes: Tabla #48; temperatura de cada muestra durante la medición del pH: Tabla #51).

6. Controles. Se realizaron pruebas de referencia para evaluar el funcionamiento del espectrofotómetro UV-Visible, las cuales incluyeron: estabilidad, espectro de corriente oscura, ruido fotométrico, estabilidad fotométrica, monotonía de la línea base, intensidad y del espectro del patrón de óxido de olmio. Los resultados originales están disponibles en las Imágenes 21, 22, 23, 24 y 25.

Se evaluó la precisión del pipeteo con los cuatro volúmenes siguientes: 10  $\mu\text{L}$  (pipeta marca Eppendorf de 10  $\mu\text{L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  (pipeta marca Transferpette de 100  $\mu\text{L}$ ), 20  $\mu\text{L}$  (pipeta marca Transferpette de 100  $\mu\text{L}$ ) y 1000  $\mu\text{L}$  (pipeta marca Eppendorf de 1000  $\mu\text{L}$ ). Por cada volumen, se calculó el peso de agua por diferencia en 30 viales secos de 1.5mL y se calculó la media y la desviación estándar de los 30 datos recolectados. Los resultados originales de los volúmenes 1000, 10, 20 y 10, están disponibles en las Tablas 53, 54, 55 y 56, respectivamente (temperaturas registradas y densidad del agua durante el pipeteo: Tabla #52).

Se evaluó la estabilidad de la reacción para la cuantificación del amonio producido (reacción de *Berthelot*) al momento de la lectura espectrofotométrica. Al cumplirse los 20 minutos de la reacción, se midió la absorbancia a intervalos de 3 minutos por 50 minutos (datos originales: Tabla #57; algoritmo: Tabla #58).

Se realizó un análisis gráfico de los patrones de urea y cloruro de amonio. Los patrones se midieron cada día en que se trabajó en el laboratorio en los objetivos del estudio. Se calculó la media de todas las mediciones para cada patrón y se graficaron los datos según el orden temporal en que fueron medidos utilizando lenguaje de programación R (datos originales del patrón de urea:

Tabla #59; algoritmo para graficar el patrón de urea: Tabla #60; datos originales del patrón de cloruro de amonio: Tabla #61; algoritmo para graficar el patrón de cloruro de amonio: Tabla #62).

7. Limpieza de la cristalería y del equipo. Se realizó una limpieza específica a la cristalería para reducir la presencia de amonio ambiental, el cual es una de las fuentes de error experimental más significativas (POINTE SCIENTIFIC, INC., 2004). Los balones volumétricos utilizados para preparar las curvas de calibración, las puntas de las pipetas automáticas y los tubos de ensayo, en donde se llevaron a cabo las reacciones químicas, se lavaron con una solución de HCl al 2%, seguido de varios lavados con agua ultrapura. Los tubos de ensayo se secaron en un horno a 80°C posterior al lavado.

Las celdas espectrofotométricas se desaguaron con una solución NaOH 0.1M, seguido de la solución de HCl al 2% y 6 veces con agua ultrapura, según lo recomendado en el manual de instrucciones del espectrofotómetro BIO-RAD SmartSpec™ 3000. Este procedimiento se realizó entre cada medición espectrofotométrica.

## VI. RESULTADOS

### A. Determinación del promedio de concentración de urea en orina

#### 1. Curvas de calibración de urea (amonio total)

Tabla #2: Características de las curvas de calibración de urea

| Kit | Pendiente   | Error estándar | R <sup>2</sup> (ajustado) |
|-----|-------------|----------------|---------------------------|
| 1   | 8.009 e- 03 | 2.574 e- 05    | 0.9949                    |
| 2   | 8.518 e- 03 | 1.481 e- 05    | 0.9985                    |
| 3   | 8.499 e- 03 | 1.294 e- 05    | 0.9988                    |
| 4   | 8.297 e- 03 | 7.930 e- 05    | 0.9995                    |
| 5   | 8.699 e- 03 | 6.724 e-05     | 0.9997                    |
| 6   | 8.132 e- 03 | 4.466 e- 05    | 0.9998                    |

2. Pruebas estadísticas. La normalidad de la distribución de la población de concentración de urea en orina se analizó mediante los gráficos QQ, histograma y caja de diagrama-bigotes, estadística descriptiva, prueba de hipótesis formal de comprobación y análisis de datos atípicos.

Tabla #3: Estadística descriptiva de los datos de concentración de urea en orina

| <i>Promedios</i>          |           |
|---------------------------|-----------|
| Media                     | 1779.2079 |
| Mediana                   | 1817.7636 |
| Desviación estándar       | 778.1772  |
| Curtosis                  | -1.0382   |
| Coefficiente de asimetría | -0.2123   |
| Rango                     | 2474.7498 |
| Mínimo                    | 409.5322  |
| Máximo                    | 2884.2820 |
| Nivel de confianza(95.0%) | 430.9402  |

Como medidas de tendencia central fue posible obtener la mediana y la media. La media fue de 1779.2079  $\pm$ 430.9402 mg/dL, siendo el límite superior igual a 2210.1481 mg/dL y el límite inferior igual a 1348.2677 mg/dL. Como medidas para la evaluación de la normalidad se encuentra la curtosis, el coeficiente de asimetría y la desviación estándar.

Tabla #4: Pruebas de hipótesis para verificar normalidad

| Prueba       | Estadístico | Valor p |
|--------------|-------------|---------|
| Shapiro-Wilk | W = 0.95057 | 0.5334  |
| Curtosis     | T = 1.902   | 0.21    |
| Asimetría    | T = -0.1905 | 0.71    |

Ho: La población es normal

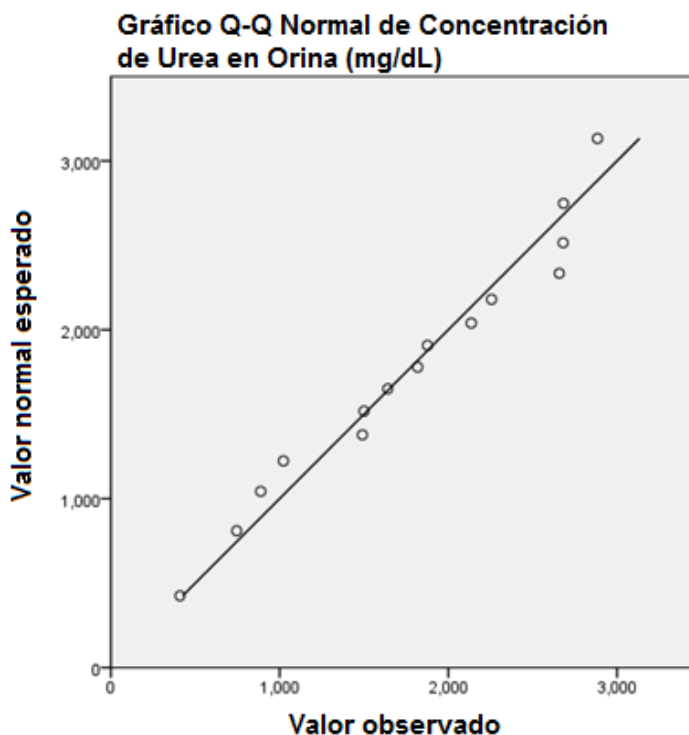
Ha: La población no es normal

Resultado Valor p > 0.05

Conclusión Con un valor de significancia de 0.05, se acepta Ho, la cual establece que la población es normal.

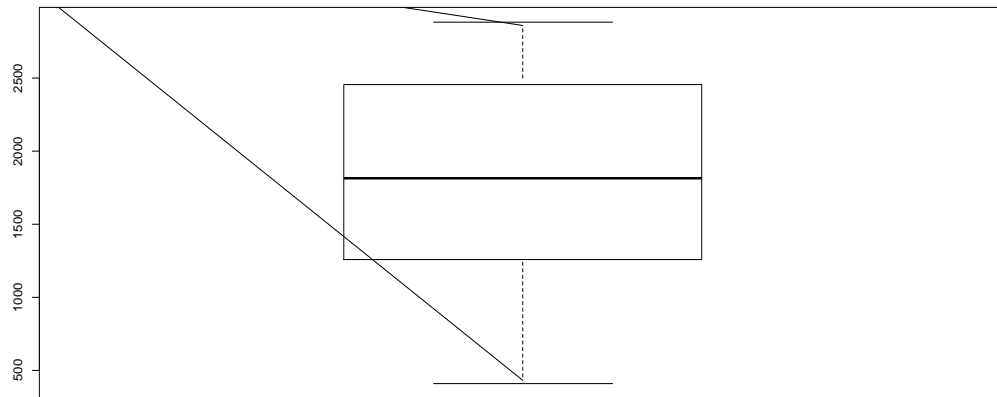
La normalidad se comprobó con las pruebas de Shapiro-Wilk, curtosis y asimetría; para las últimas dos se aplicó una simulación de Monte Carlo con  $n=100$ . Los estadísticos y valores  $p$  se observan en la Tabla #4. El valor  $p$  es mayor al valor de significancia (0.05) para las tres pruebas, por lo que no hubo suficiente información para rechazar la hipótesis nula.

Imagen #6: Gráfica Q-Q para los 15 promedios de concentración de urea en orina



En la Imagen #6 se observa el gráfico Q-Q, el cual describe el comportamiento de los datos experimentales con respecto a los normales correspondientes. Los datos se aproximan a la línea recta.

Imagen #7: Diagrama de caja-bigotes de los 15 datos de concentración de urea en orina



Se observó la normalidad del conjunto de datos de urea y la ausencia de datos atípicos en el diagrama de caja-bigotes de la Imagen #6.

Tabla #5: Valores Z modificados de la ecuación de Iglewicz y Hoaglin (1993)

| Promedios | Z modificado |
|-----------|--------------|
| 1490.5869 | -0.1872      |
| 1641.2938 | -0.1010      |
| 1876.2400 | 0.0335       |
| 2657.4517 | 0.4804       |
| 2884.2820 | 0.6102       |
| 2682.4239 | 0.4947       |
| 1817.7636 | 0.0000       |
| 2256.0956 | 0.2508       |
| 1022.5807 | -0.4549      |
| 887.9585  | -0.5320      |
| 1500.4112 | -0.1816      |
| 2680.3620 | 0.4935       |
| 409.5322  | -0.8057      |
| 745.2590  | -0.6136      |
| 2135.8770 | 0.1820       |

En la Tabla #5 se observan los valores Z modificados con la ecuación de Iglewicz y Hoaglin (1993) (disponible en la Tabla #26) para comprobar la ausencia de datos atípicos en el conjunto de datos de urea.

## B. Exploración de la tendencia de la curva de la descomposición de urea en mezclas de orina

### 1. Curvas de calibración de cloruro de amonio

Tabla #6: Características de las curvas de calibración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$

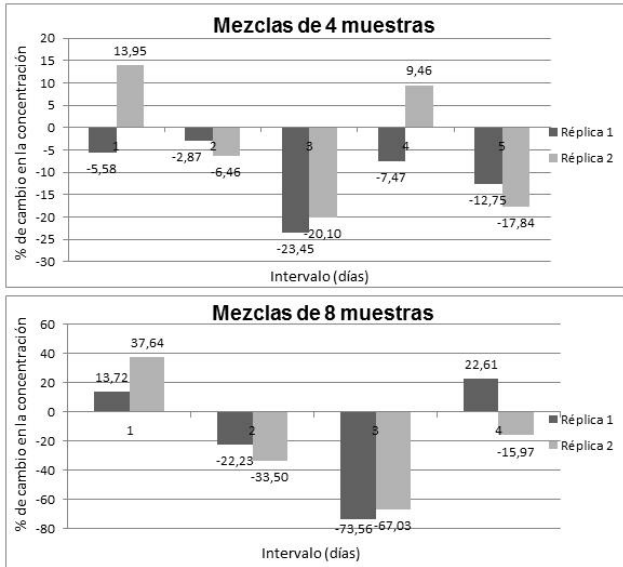
| Kit | Pendiente   | Error estándar | R <sup>2</sup> (ajustado) |
|-----|-------------|----------------|---------------------------|
| 1   | 4.404 e- 03 | 7.185 e- 05    | 0.9987                    |
| 2   | 4.453 e- 03 | 1.162 e- 04    | 0.9973                    |

2. Cambios observados en la orina almacenada en botellas PET. El objetivo de este estudio fue determinar la degradación de urea en mezclas de orina. Se trabajó con dos tipos de mezclas: a) mezcla de 4 orinas provenientes de diferentes individuos, b) mezcla de 8 muestras, 4 de la mezcla (a) y 4 adicionales de diferentes individuos. Por cada tipo de mezcla se prepararon dos réplicas. Los resultados de los análisis de urea realizados con estas mezclas se presentan a continuación.

A continuación 1. Derecha: cambios observados durante el almacenamiento de la orina almacenada en botellas PET, bajo sombra, a una temperatura entre 20 y 25 °C, por 12 días. En donde: 10 de septiembre; 2. 11 de septiembre; 3. 12 de septiembre; 4. 17 de septiembre; 5. 18 de septiembre; 6. 19 de septiembre del 2015. Izquierda superior: gráficos de barras para representar el porcentaje de cambio en la concentración de urea durante los 12 días de descomposición para las mezclas de 4 y 8 muestras. Los valores de x representan el intervalo en el tiempo. Intervalo 1 = % de cambio entre los días 1 y 3; Intervalo 2 = % de cambio entre los días 3 y 5; intervalo 3 = % de cambio entre los días 5 y 8; intervalo 4 = % de cambio entre los días 8 y 10; intervalo 5 = % de cambio entre los días 10 y 12. Izquierda inferior: Gráfico de barras para representar el porcentaje de cambio en la concentración de urea durante los 12 días de descomposición para las mezclas de 8 muestras. Los

valores de x representan el intervalo en el tiempo. Intervalo 1 = % de cambio entre los días 1 y 3; Intervalo 2 = % de cambio entre los días 3 y 5; intervalo 3 = % de cambio entre los días 5 y 10; intervalo 4 = % de cambio entre los días 10 y 12.

Imagen #8: Cambios observados durante el almacenamiento de la orina



## 3. Análisis estadístico y matemático

## a. Regresiones

Tabla #7: Regresión lineal para la disminución de la concentración de urea

| Modelo | VARIABLES indep.*         | R <sup>2</sup> (ajustado) | Error residual | F         | VARIABLES indep.* | VARIABLES indep.* significativas | Grados de libertad |
|--------|---------------------------|---------------------------|----------------|-----------|-------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1      | Días                      | 0.50                      | 164.90         | 19.8<br>5 | 1                 | 1                                | 18                 |
| 2      | Días + muestra            | 0.50                      | 169.60         | 9.39<br>7 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 3      | Réplicas + días           | 0.50                      | 169.20         | 9.47      | 2                 | 1                                | 17                 |
| 4      | Muestra + días + réplicas | 0.40                      | 174.30         | 5.96      | 3                 | 1                                | 16                 |

\*indep. =independientes

En la Tabla #7 se presentan los modelos de regresión lineal simple y múltiple utilizando la técnica de selección de variables “TRP” con las tres variables regresoras: muestras, días y réplicas. Variable dependiente: concentración de urea, calculada por la diferencia entre los valores experimentales de amonio total y amonio en aumento, correspondientes a cada día de medición. Criterios de selección del modelo: R<sup>2</sup> (ajustado), error residual, estadístico F, número de variables independientes incluidas en el modelo y número de variables independientes estadísticamente significativas.

Tabla #8: Regresión logarítmica de la disminución de la concentración de urea

| Modelo | VARIABLES indep.*             | R <sup>2</sup> (ajustado) | Error residual | F     | VARIABLES indep.* | VARIABLES indep.* significativas | Grados de libertad |
|--------|-------------------------------|---------------------------|----------------|-------|-------------------|----------------------------------|--------------------|
| 5      | Ln(Días)                      | 0.3307                    | 190.4          | 10.39 | 1                 | 1                                | 18                 |
| 6      | Ln(Días) + muestra            | 0.292                     | 195.9          | 4.917 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 7      | Réplicas + Ln(Días)           | 0.2941                    | 195.6          | 4.958 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 8      | Muestra + Ln(Días) + réplicas | 0.2507                    | 201.5          | 3.119 | 3                 | 1                                | 16                 |

\*indep. = independientes

En la Tabla #8 se presentan los modelos de regresión logarítmica utilizando la técnica de selección de variables “TRP” con las tres variables regresoras: muestras, días y réplicas. Variable dependiente: concentración de urea, calculada por la diferencia entre los valores experimentales de amonio total y amonio en aumento, correspondientes a cada día de medición. Criterios de selección del modelo: R<sup>2</sup> (ajustado), error residual, estadístico F, número de variables independientes incluidas en el modelo y número de variables independientes estadísticamente significativas.

Tabla #9: Regresión exponencial de la disminución de la concentración de urea

| Modelo | Variables indep.*         | R <sup>2</sup> (ajustado) | Error residual | F     | Variables indep.* | Variables indep.* significativas | Grados de libertad |
|--------|---------------------------|---------------------------|----------------|-------|-------------------|----------------------------------|--------------------|
| 9      | Días                      | 0.5089                    | 0.1349         | 20.69 | 1                 | 1                                | 18                 |
| 10     | Días + muestra            | 0.4809                    | 0.1387         | 9.799 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 11     | Réplicas + días           | 0.4807                    | 0.1387         | 9.793 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 12     | Muestra + días + réplicas | 0.4491                    | 0.1428         | 6.163 | 3                 | 1                                | 16                 |

\*indep. = independientes

En la Tabla #9 se presentan los modelos de regresión exponencial utilizando la técnica de selección de variables “TRP” con las tres variables regresoras: muestras, días y réplicas. Variable dependiente:  $\ln(\text{concentración de urea})$ , de donde la concentración de urea se calculó por la diferencia entre los valores experimentales de amonio total y amonio en aumento, correspondientes a cada día de medición. Criterios de selección del modelo: R<sup>2</sup> (ajustado), error residual, estadístico F, número de variables independientes incluidas en el modelo y número de variables independientes estadísticamente significativas.

Tabla #10: Regresión lineal del aumento de la concentración de amonio

| Modelo | VARIABLES indep.*         | R <sup>2</sup> (ajustado) | Error residual | F     | VARIABLES indep.* | VARIABLES indep.* significativas | Grados de libertad |
|--------|---------------------------|---------------------------|----------------|-------|-------------------|----------------------------------|--------------------|
| 13     | Días                      | 0.8611                    | 0.2502         | 118.8 | 1                 | 1                                | 18                 |
| 14     | Días + muestra            | 0.859                     | 0.243          | 65    | 2                 | 2**                              | 17                 |
| 15     | Réplicas + días           | 0.859                     | 0.253          | 58.63 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 16     | Muestra + días + réplicas | 0.880                     | 0.233          | 47.44 | 3                 | 1                                | 16                 |

\*indep. = independientes

\*\*El valor p de esta prueba t es muy cercano a 0.05.

En la Tabla #10 se presentan los criterios de selección del modelo de regresión múltiple, el cual se construyó utilizando la técnica de selección de variables “TRP” con las tres variables regresoras: muestras, días y réplicas, con los datos de amonio en aumento transformados con la función  $\ln(\cdot)$ . Variable dependiente: concentración de amonio.

Tabla #11: Regresión logarítmica del aumento de la concentración de amonio

| Modelo | Variables indep.*           | R <sup>2</sup> (ajustado) | Error residual | F     | Variables indep.* | Variables indep.* significativas | Grados de libertad |
|--------|-----------------------------|---------------------------|----------------|-------|-------------------|----------------------------------|--------------------|
| 17     | Ln(Días)                    | 0.7317                    | 119.6          | 52.82 | 1                 | 1                                | 18                 |
| 18     | Ln(Días) + Mezcla           | 0.7316                    | 119.6          | 26.9  | 2                 | 1                                | 17                 |
| 19     | Réplica + Ln(Días)          | 0.7179                    | 122.7          | 25.18 | 2                 | 1                                | 17                 |
| 20     | Mezcla + Ln(Días) + Réplica | 0.7169                    | 122.9          | 17.04 | 3                 | 1                                | 16                 |

\*indep. = independientes

En la Tabla #11 se presentan los criterios de selección del modelo logarítmico, el cual se construyó utilizando la técnica de selección de variables “TRP” con las tres variables regresoras: tipo de mezcla, días y réplica. Variable dependiente: ln(concentración de amonio)

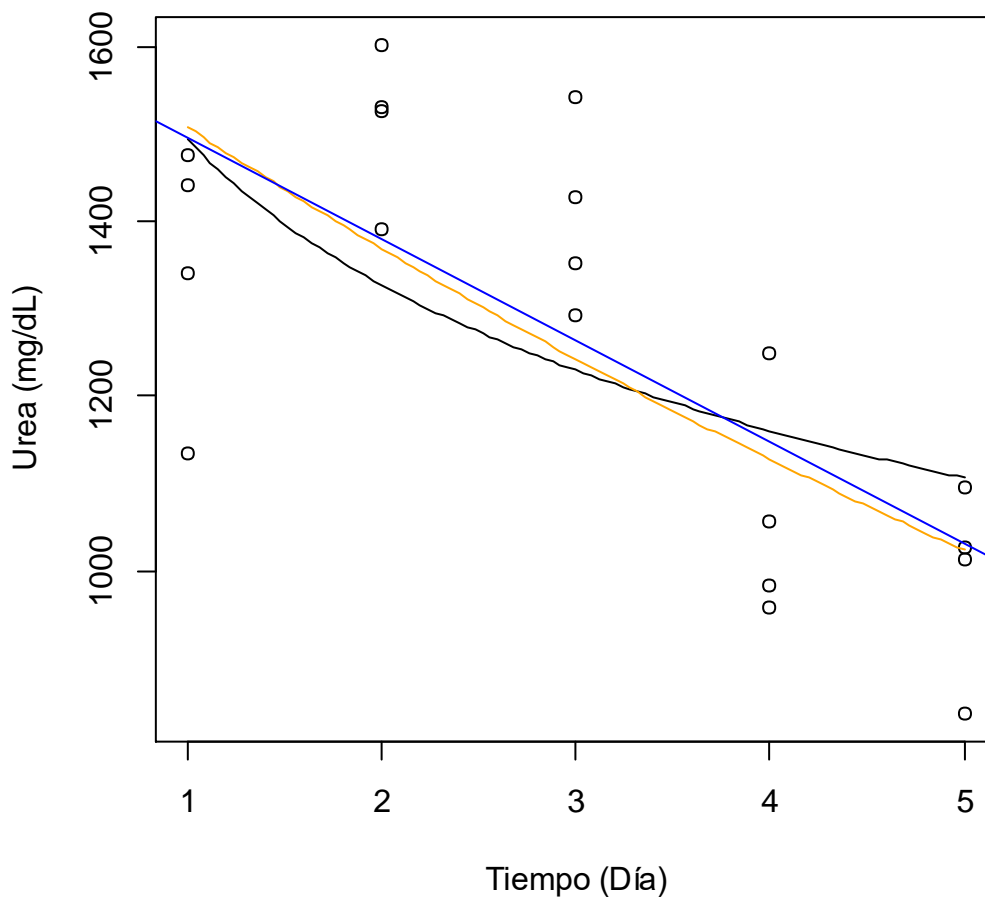
Tabla #12: Características matemáticas y estadísticas de los modelos seleccionados

| Características/<br>Supuestos |                                    | Modelo/Ecuación |           |              |           |              |           |              |           |              |           |              |           |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|                               |                                    | 1               |           | 5            |           | 9            |           | 13           |           | 14*          |           | 17           |           |
| Características               | Estimadores de los coeficientes    | Días            | -116,17   | Ln(Días)     | -241,42   | Días         | 7,42      | Días         | 0,15      | Días         | 0,15      | Ln(días)     | 216,32    |
|                               |                                    | (Intercepto)    | 1612,27   | (Intercepto) | 1494,91   | (Intercepto) | 0,10      | (Intercepto) | 4,82      | Mezcla       | 0,21      | (Intercepto) | 53,36     |
|                               |                                    |                 |           |              |           |              | -         |              |           | (Intercepto) | 4,51      |              |           |
|                               | Error estándar de los coeficientes | Días            | 26,07     | Ln(Días)     | 74,91     | Días         | 0,07      | Días         | 0,01      | Días         | 0,01      | Ln(días)     | 29,76     |
|                               |                                    | (Intercepto)    | 86,47     | (Intercepto) | 83,41     | (Intercepto) | 0,02      | (Intercepto) | 0,10      | Mezcla       | 0,10      | (Intercepto) | 52,02     |
|                               |                                    |                 |           |              |           |              |           |              |           | (Intercepto) | 0,18      |              |           |
|                               | Pr(> t ) de cada coeficiente       | Días            | 3,05 e-04 | Ln(Días)     | 4,72 e-03 | Días         | <2e-16    | Días         | 2,33 e-09 | Días         | 1,30 e-09 | Ln(días)     | 9,35 e-07 |
|                               |                                    | (Intercepto)    | 3,22 e-13 | (Intercepto) | 6,34 e-13 | (Intercepto) | 2,49 e-04 | (Intercepto) | < 2e-16   | Mezcla       | 0,0589    | (Intercepto) | 0,32      |
|                               |                                    |                 |           |              |           |              |           |              |           | (Intercepto) | 7,75 e-15 |              |           |
|                               | Pr(F)                              | 3,054 e-04      |           | 4,72 e-03    |           | 2,49 e-04    |           | 2,33 e-09    |           | 5,19 e-09    |           | 9,35 e-07    |           |
| R2 (ajustado)                 | 0,50                               |                 | 0,33      |              | 0,51      |              | 0,86      |              | 0,88      |              | 0,73      |              |           |
| Supuestos                     | Valor p Shapiro-Wilk               | 0,95            |           | 0,92         |           | 0,82         |           | 0,58         |           | 0,56         |           | 0,06         |           |
|                               | Valor Durbin-Watson                | 0,43            |           | 0,24         |           | 0,37         |           | 0,47         |           | 0,69         |           | 0,59         |           |
|                               | Valor p Breusch-Pagan              | 0,22            |           | 0,41         |           | 0,45         |           | 0,70         |           | 0,59         |           | 0,58         |           |
|                               | VIF                                | N.A.            |           | N.A.         |           | N.A.         |           | N.A.         |           | 1            |           | N.A.         |           |

\*Análisis de residuales adicionales del modelo 14 ver Tablas #35 y #36, Imagen #18.

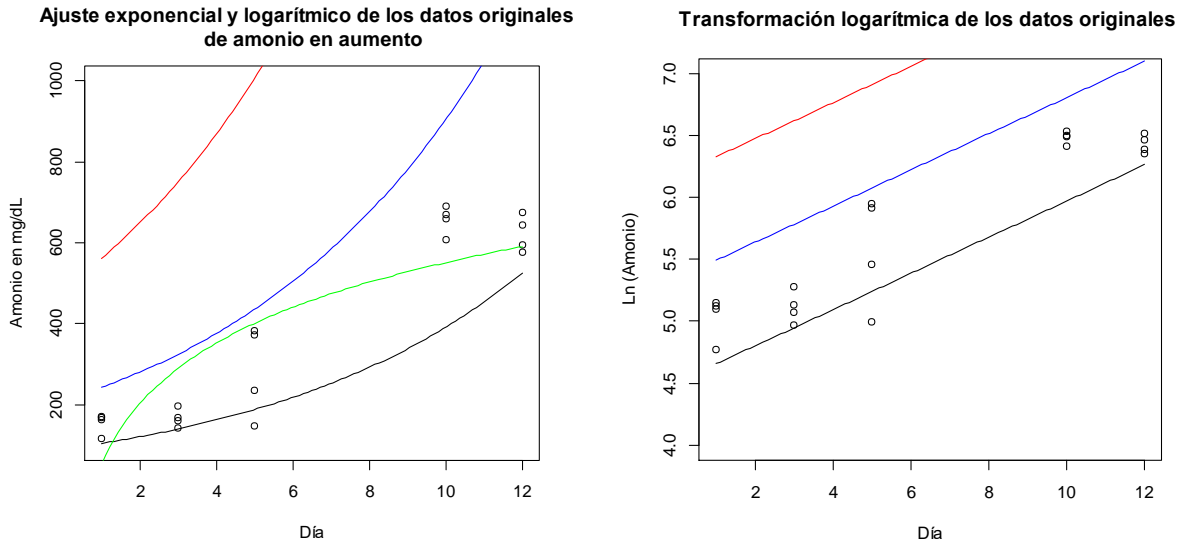
Imagen #9: Modelos de bondad y ajuste simples para describir la disminución de la concentración de urea en orina humana en función del tiempo

### Urea calculada con los datos experimentales



En la Imagen #9, la curva azul corresponde al ajuste lineal con el modelo 1 de la Tabla #7, la curva negra corresponde al ajuste logarítmico con el modelo 5 de la Tabla #8 y la curva naranja corresponde al ajuste exponencial con el modelo 9 de la Tabla #9. Se utilizaron los datos de la concentración de urea, obtenidos por la diferencia entre un valor de amonio total y otro de amonio en aumento, ambos correspondientes a un día de medición específico.

Imagen #10: Modelos de bondad y ajuste para describir el aumento de la concentración de amonio en orina humana en función del tiempo



En la figura de la izquierda de la Imagen #10 imagen se observa una curva negra, aplicada a los datos originales de amonio en aumento, la cual se obtuvo con la ecuación 13. Las curvas roja y azul se obtuvieron con la ecuación 14. La curva verde se obtuvo con la ecuación 17. En la imagen de la derecha, se observan las curvas de las ecuaciones 13 y 14, utilizando los datos originales de amonio en aumento transformados con la función  $\ln()$ .

b. Comparación de medias de amonio total para el cálculo de la constante del modelo de descomposición de urea en orina

Tabla #13: Prueba t para muestras independientes y la constante de amonio total

| Grupo          |            | Media por grupo (mg/dL) | Desviación estándar | Pr(> t ) | Media total (mg/dL) | Media total de la desviación estándar | IC95%             |
|----------------|------------|-------------------------|---------------------|----------|---------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Tipo de mezcla | 4 muestras | 1609.29                 | 134.09              | 0.345    | 1641.40             | 147.47                                | 1710.60 – 1572.22 |
|                | 8 muestras | 1673.51                 | 160.85              |          |                     |                                       |                   |

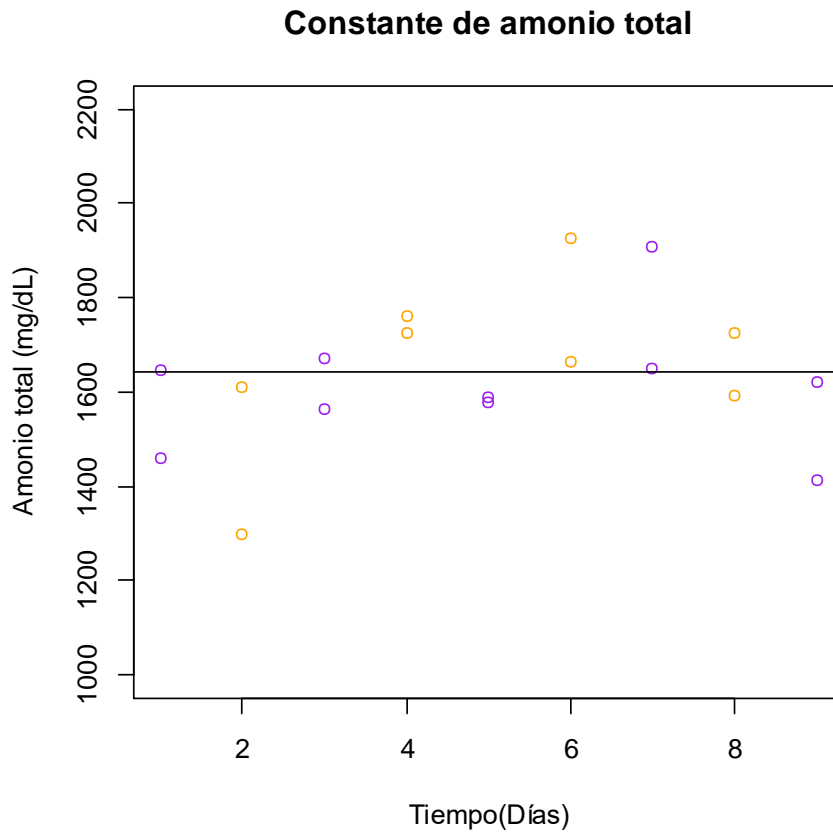
Valor p, prueba de Shapiro-Wilk, grupo 1 y 2: 0.2546 y 0.1307; valor p, prueba de Bartlett: 0.5962; Poder (1- $\beta$ ), con  $n_{total} = 20$ ,  $k = 2$ ,  $\alpha = 0.05$  y tamaño del efecto = 0.43: 0.15

Ho: Los grupos son iguales  
 Ha: Los grupos no son iguales  
 Resultado: Valor  $p > 0.05$   
 Conclusión: Con un valor de significancia de 0.05, se acepta Ho, la cual establece que los grupos son iguales.

En la Tabla #13 se observa la media y la desviación estándar de cada grupo (tipo de mezcla), así como el valor p de la prueba t de muestras independientes para comparar las medias de amonio total de los 2 tipos de mezcla. Se muestra el valor de la constante de amonio total (media total), junto con el intervalo de confianza al 95% que le corresponde. La diferencia entre las medias, el intervalo de confianza y los grados de libertad están disponibles en la Tabla #39. Debajo del cuadro se muestran los resultados de la evaluación de supuestos y el poder estadístico, así como las hipótesis, el resultado y la conclusión de la prueba. Se muestra el poder estadístico de la prueba t y los valores p de las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, para la comprobación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. El resto de los resultados de la evaluación de los

supuestos están disponibles en las Imágenes 19 y 20, comparación de la varianza de los grupos y la gráfica de medias de los grupos con IC al 95%, respectivamente.

Imagen #11: Distribución de los datos de amonio total



En la Imagen #11 se observa que los datos de la mezcla de 4 muestras de orina se presentan en color púrpura, mientras que para la mezcla de 8 muestras, en color naranja. La línea negra horizontal ilustra la media del amonio total (1641.4 mg/dL).

c. Modelos matemáticos compuestos. La diferencia entre la constante de amonio total presentada en la Tabla #13 y uno de los modelos del cuadro descritos en la Tabla #12, es igual a una concentración específica de urea (MODELO GENERAL 1). Debido a que los modelos 1 y 2 de la Tabla #8 presentaron un mejor ajuste para los datos de amonio en aumento, se eligieron las ecuaciones de ambos modelos (Tabla #10) para construir dos modelos distintos (A y B) a partir del modelo general 1, los cuales se presentan a continuación:

$$Urea = 1641.40 \pm 69.19 \frac{mg}{dL} - e^{[\ln(\text{amonio en aumento})]} \quad (\text{MODELO GENERAL 1})$$

En donde:

$$\ln(\text{amonio en aumento}) = 0.15 (\text{días}) + 4.82 \quad (\text{Para el modelo A})$$

ó

$$\ln(\text{amonio en aumento}) = 0.15 (\text{días}) + 0.21 (\text{mezcla}) + 4.55 \quad (\text{Para el modelo B})$$

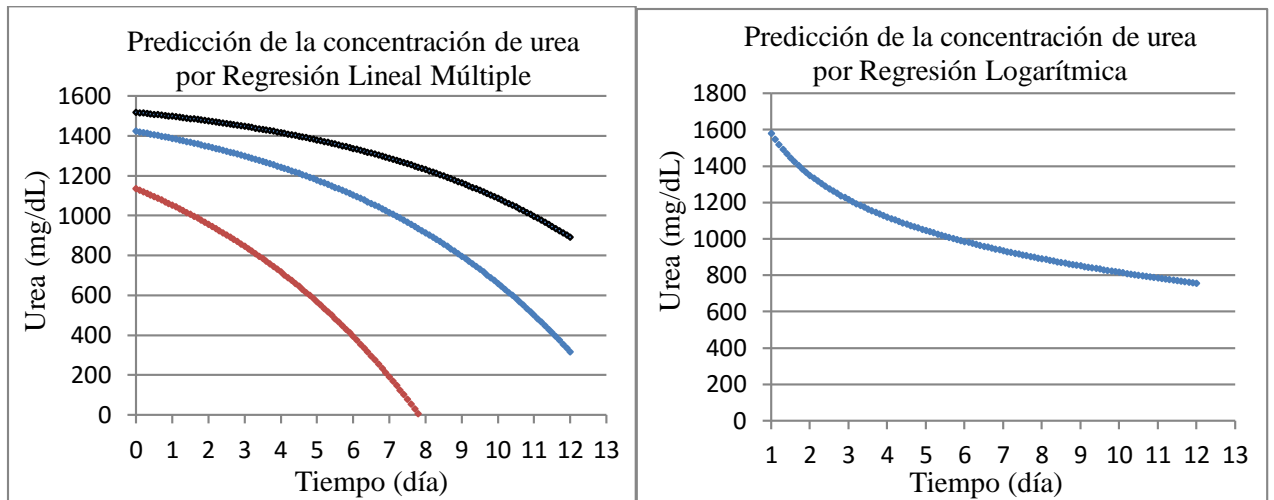
La concentración de urea también puede predecirse mediante el MODELO GENERAL 2, el cual se utilizó para construir un tercer modelo de tipo logarítmico (C) a partir de la ecuación 5 de la Tabla #10. A continuación se describe la estructura del modelo C:

$$Urea = 1641.40 \pm 69.19 \frac{mg}{dL} - \text{amonio en aumento} \quad (\text{MODELO GENERAL 2})$$

En donde:

$$\text{Amonio en aumento} = 216.32 * \ln(\text{días}) + 53.36 \quad (\text{Para el modelo C})$$

Imagen #12: Predicción de la concentración de urea con modelos matemáticos compuestos



En la Imagen #12 se observa la predicción a partir de los modelos A (ecuación A + MODELO GENERAL 1), B (ecuación B + MODELO GENERAL 1) y C se ilustran en la Imagen #12. En la gráfica derecha, se ilustran las curvas de los modelos A y B, mientras que en la gráfica derecha, se ilustra la curva del modelo C (ecuación C + MODELO GENERAL 2). Del lado izquierdo, se observa la comparación entre la curva roja y azul, calculadas con el modelo A. La curva roja describe la mezcla de 8 muestras (con  $n=78$ ). La curva azul describe la mezcla de 4 muestras (con  $n=120$ ). La curva negra describe la concentración de urea obtenida con el modelo B (con  $n=120$ ). Del lado derecho, se observa la curva calculada con el modelo C (con  $n=120$ ). Todas las gráficas aplican para un rango de 12 días. Obtenidas con Excel.

## C. Efecto del KCl en los valores de concentración de urea en orina

Tabla #14: Concentración de urea en orina antes y después de neutralizar

| Muestra | Urea previo al tratamiento<br>( $\pm$ mg/dL) | Urea después del tratamiento<br>(mg/dL) | Cambio<br>(%) |
|---------|--|---|---------------|
| 1       | 891.70                                       | 965.16                                  | + 8.24        |
| 2       | 2680.36                                      | 2755.20                                 | + 2.79        |
| 3       | 409.53                                       | 341.54                                  | -16.60        |
| 4       | 745.26                                       | 798.36                                  | +7.12         |
| 5       | 2135.88                                      | 1828.15                                 | -14.41        |

Valor p, prueba de Shapiro-Wilk de las diferencias: 0.052

Valor p, prueba t para muestras pareadas: 0.28

Poder (1- $\beta$ ), con  $n_{\text{total}} = 10$ ,  $k = 2$ ,  $\alpha = 0.05$  y tamaño del efecto =0.21: 0.093

Ho: Los grupos son iguales

Ha: Los grupos no son iguales

Resultado Valor  $p > 0.05$

Conclusión Con un valor de significancia de 0.05, se acepta Ho, la cual establece que los grupos son iguales.

En la Tabla #14 se observan las concentraciones de urea en 5 muestras de orina diferentes antes de agregar KOH a una concentración final de 5M a una muestra de orina y después de agregar el HCl necesario para neutralizarlo. También se presenta el porcentaje de cambio en la concentración de urea. En las muestras 3 y 5 se observa una disminución en la concentración luego de agregar los reactivos. Para el resto de muestra el cambio es positivo. Cada valor de concentración es el promedio de un triplicado. Debajo del cuadro se muestra el resultado de la prueba t y el poder estadístico. El valor p es mayor a 0.05, por lo que no se rechazó la hipótesis nula.

Tabla #15: Volumen de HCl calculado y agregado

| Muestra | HCl calculado (mL) | HCl agregado (mL) | HCl agregado-calculado (mL) |
|---------|--------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1       | 4.00               | 4.17 ± 0.013      | 0.17                        |
| 2       | 4.45               | 4.30 ± 5.66 e- 03 | -0.15                       |
| 3       | 4.00               | 4.24 ± 0.011      | 0.24                        |
| 4       | 4.01               | 4.03 ± 8.00 e- 03 | 0.02                        |
| 5       | 4.00               | 4.15 ± 3.21 e- 05 | 0.15                        |

Valor p, prueba t para muestras independientes y varianzas homogéneas: 0.4168

Poder (1-β), con  $n_{total} = 10$ ,  $k = 2$ ,  $\alpha = 0.05$  y tamaño del efecto = 0.54: 0.12

|            |  |
|------------|--|
| Ho:        | Los grupos son iguales   |
| Ha:        | Los grupos no son iguales  |
| Resultado  | Valor p > 0.05   |
| Conclusión | Con un valor de significancia de 0.05, se acepta Ho, la cual establece que los grupos son iguales. |

En la Tabla #15 se observa la diferencia entre el volumen de HCl agregado y calculado, requerido para neutralizar la cantidad correspondiente de KOH, así como la diferencia entre ambos. Para la muestra 2, la diferencia en el volumen de HCl es negativa. La diferencia de HCl no coincide con la diferencia del pH (Tabla #16), en el sentido que una mayor diferencia de HCl no implica una mayor diferencia del pH. Debajo de la Tabla #15 se muestra el resultado de la prueba t y el poder estadístico. Los valores p de los supuestos de normalidad y homocedasticidad están disponibles en las Tablas #49 y #50.

Tabla #16: pH antes y después de la neutralización

| Muestra | pH inicial | pH final | pH final-inicial |
|---------|------------|----------|------------------|
| 1       | 5.50       | 5.12     | 0.38             |
| 2       | 6.61       | 6.53     | 0.08             |
| 3       | 5.52       | 5.90     | 0.38             |
| 4       | 5.75       | ~6.0     | 0.25             |
| 5       | 6.62       | 6.50     | 0.12             |

En la Tabla #16 se observan los valores del pH inicial (antes de agregar el KOH y el HCl) y el pH final (después de agregar el KOH y el HCl), junto con el valor absoluto de la diferencia entre ambos. Las temperaturas de la muestra durante las mediciones están disponibles en la Tabla #51.

#### D. Controles

##### 1. Pruebas de referencia para la evaluación del funcionamiento del espectrofotómetro UV-Visible

Tabla #17: Pruebas de referencia del espectrofotómetro UV-Visible

| Prueba                                | Resultado |
|---------------------------------------|-----------|
| Estabilidad                           | Aprobado  |
| Espectro de corriente oscura          | Aprobado  |
| Ruido fotométrico                     | Aprobado  |
| Estabilidad fotométrica               | Reprobado |
| Monotonía de la línea base            | Aprobado  |
| Intensidad                            | Aprobado  |
| Espectro del patrón de óxido de olmio | Normal    |

T(°C) = 21

Se realizaron pruebas de al espectrofotómetro UV-Visible para verificar el buen funcionamiento del equipo, cuyo resumen se presenta en la Tabla #17. Debajo de la tabla se muestra la temperatura del laboratorio en donde se encuentra el equipo. Los resultados originales de las pruebas de estabilidad están disponibles en las Imágenes #21, #22, #23, #24 y #25.

## 2. Precisión del pipeteo

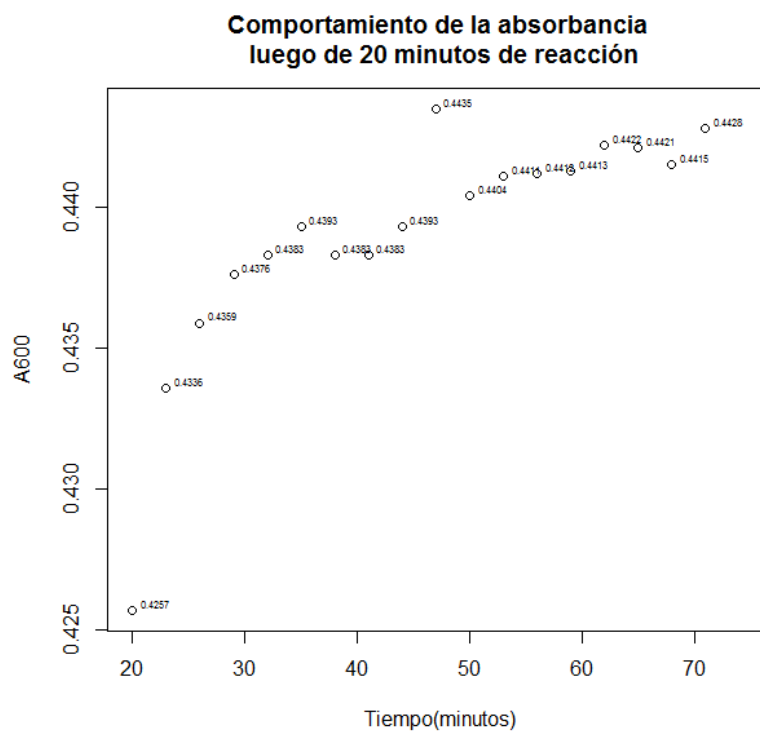
Tabla #18: Media y desviación estándar del pipeteo de 1000, 20 y 10  $\mu\text{L}$  de agua

| Pipeta        | V medido de H <sub>2</sub> O<br>( $\mu\text{L}$ ) | Media ( $\mu\text{L}$ ) | Desv. Est. ( $\pm \mu\text{L}$ ) |
|---------------|---|-------------------------|----------------------------------|
| Eppendorf     | 1000  | 990                     | 4                                |
| Eppendorf     | 10  | 9.6                     | 0.5                              |
| Transferpette | 20  | 19.5                    | 0.1                              |
| Transferpette | 10  | 9.8                     | 0.2                              |

Se determinó la media y la desviación estándar de 30 mediciones de gramos de agua para cada volumen utilizado en los experimentos. Para obtener cada peso de agua se taró un vial de 1 mL y se vertió el volumen de agua recogido con la pipeta automática. Se registraron los pesos y se obtuvo la media y la desviación estándar para cada volumen (Tabla #18). La temperatura registrada y la densidad del agua respectiva durante el pipeteo se encuentra en la Tabla #52.

3. Evaluación de la estabilidad de la reacción al momento de la lectura espectrofotométrica

Imagen #13: Comportamiento de la absorbancia al momento de realizar la lectura espectrofotométrica

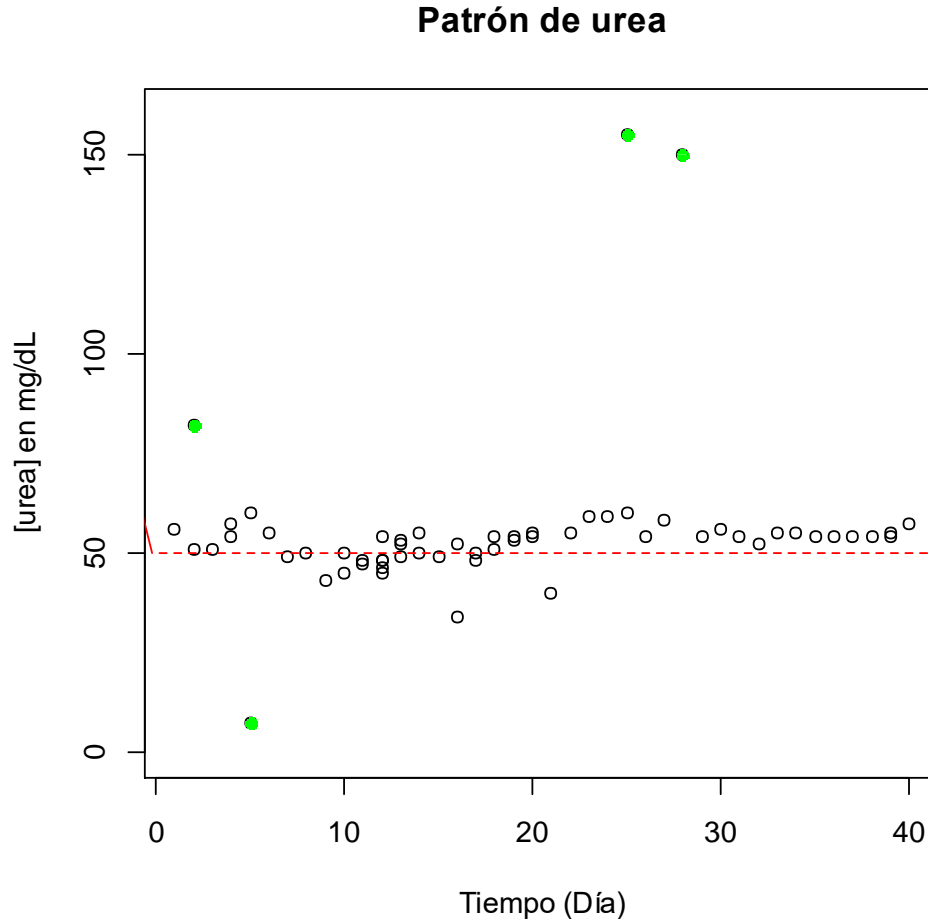


El momento de realizar la lectura espectrofotométrica corresponde al terminar los 20 minutos de la reacción para cuantificar la urea o el amonio, cuyo comportamiento se presenta en la Imagen #13. Se observa que el cambio de la absorbancia es más veloz entre los 20 y 30 minutos de la reacción.

#### 4. Análisis gráfico de los patrones de urea y cloruro de amonio

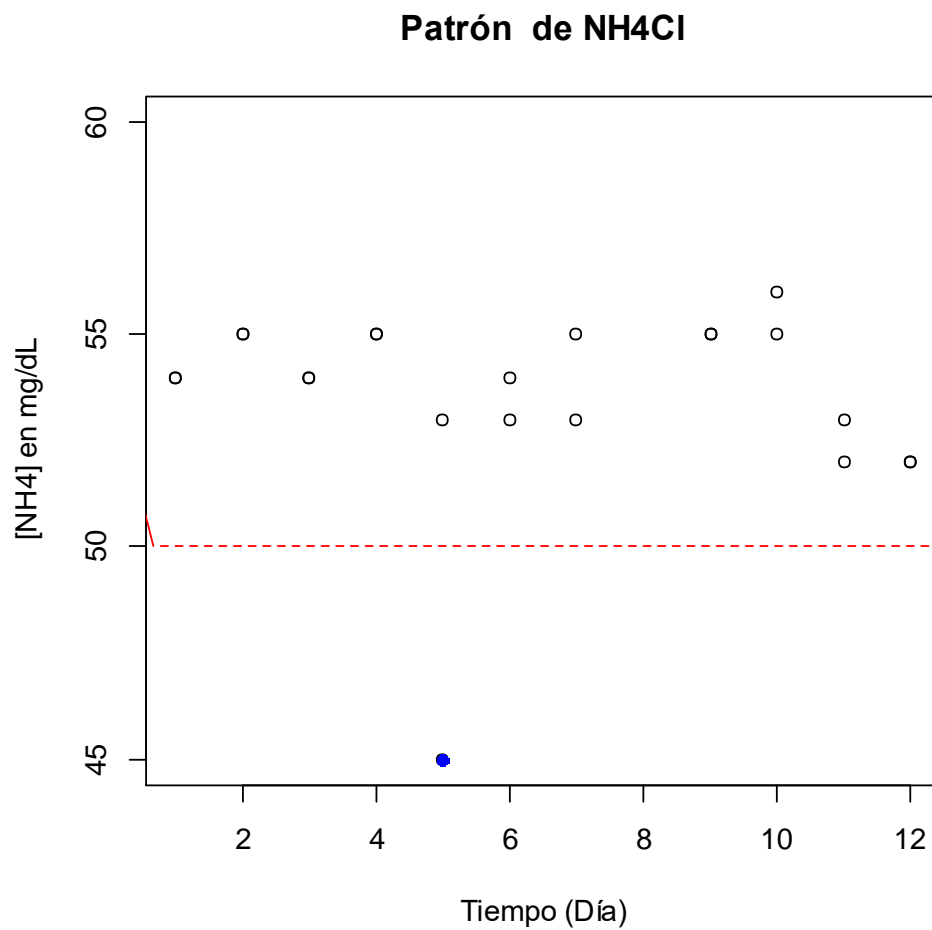
La línea horizontal roja ilustra la concentración teórica del patrón (50 mg/dL);  $SD = \pm 4.85$  mg/dL. Los datos atípicos están identificados como puntos verdes.

Imagen #14: Distribución de los valores del patrón de urea en el tiempo



En la Imagen #14 se observa la concentración del patrón de urea ordenados según el día de medición. Los datos se aproximan a la media (50mg/dL), representada como la línea punteada horizontal. También se observan 4 datos atípicos, representados como puntos verdes (días 2, 7, 25 y 28). La desviación estándar de los datos (SD) fue de  $\pm 4.85$  mg/dL de urea.

La línea horizontal roja ilustra la concentración teórica (calculada) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  utilizada para preparar el patrón.  $SD = \pm 1.83$ . El dato atípico está identificado como un punto azul.

Imagen #15: Distribución de los valores del patrón de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 

En la Imagen #15 se observa la concentración del patrón de cloruro de amonio, los datos son, en promedio, ligeramente mayores a la concentración teórica (50 mg/dL). El dato atípico. La desviación estándar de los datos (SD) fue de  $\pm 1.83$  mg/dL de cloruro de amonio.



## VII. DISCUSIÓN

### A. Cálculo de la media de concentración de urea en orina

Con respecto al objetivo 1, se evaluó la normalidad de la distribución de probabilidad de la población “concentración de urea en orina humana” y se esperó obtener un valor entre 930 y 2330  $\frac{mg}{dL}$ , según los valores proporcionados por Putnam (1979).

En la Tabla #2 se observan las características de las curvas de calibración utilizadas para calcular la concentración de urea en orina humana, las cuales demuestran la linealidad de los modelos, considerando los altos valores del  $R^2$  y los bajos valores del error estándar. El intercepto de las ecuaciones ajustadas se igualó a cero, debido a que se aplicó un blanco previo a leer la absorbancia de los estándares de urea. Cada curva corresponde a un kit de análisis de urea. La construcción de las curvas de calibración permitió corroborar la linealidad del método en el rango de concentración trabajado. En la Imagen #16 se observan las curvas de calibración para el cálculo de la concentración de urea en orina humana. En la leyenda se especifica el color de la curva de calibración, la cual corresponde a un kit de análisis de urea

La variable “concentración de urea en orina” es aleatoria debido a la alta variabilidad biológica que existe entre individuos. No se controló ningún parámetro determinante de la variable, como la hora de toma de muestra, la ingesta proteica, el estado de salud ni el estado de hidratación.

Se cuantificó la urea en un total de 30 muestras de orina, de los cuales 15 valores se escogieron con base en el coeficiente de variación (C.V.) del triplicado de cada muestra. Si el C.V. era menor al 4%, el dato podía ser considerado para el análisis estadístico. El C.V. para este método está reportado con un mínimo del 3% entre corridas (Burtis y Bruns, 2014), por lo que también se incluyeron aquellos valores por encima y cercanos al 3%.

En la Tabla #3 se muestra el valor de la mediana (1817.76358 mg/dL), la cual es mayor que la media 1779.2079  $\pm$ 430.9402 mg/dL. Considerando que la curva normal se caracteriza por ser simétrica y contar con mediana, media y moda idénticas, es evidente que la curva presenta cierto sesgo. La moda no se reportó debido a que no hubo datos repetidos. La desviación estándar es menor al valor de la media, lo cual no apunta hacia la falta de normalidad.

Se realizó prueba de hipótesis para curtosis y asimetría, cuyos estadísticos y valores p se muestran en la Tabla #4. Para obtener estos valores se realizó una simulación de Monte Carlo con  $n=100$  para obtener un número significativo de datos para evaluar el comportamiento de la distribución global, considerando que la variable es aleatoria. Con respecto a la asimetría, el estadístico (-0.1905) indica un ligero sesgo negativo, lo cual concuerda con los valores de la media y la mediana, ya que en un sesgo negativo de una distribución se espera que la mediana sea mayor que la media. El estadístico de curtosis (1.902), el cual se define aquí como el exceso de curtosis, muestra que el máximo de la curva es más severo (“puntiagudo”) con respecto a la curva normal neutra, la cual tiene un exceso de curtosis igual a 0. Para determinar qué tan significativas eran estas desviaciones, se analizó el valor p, tanto para la asimetría como la curtosis. En ambos casos, el valor p es mayor al nivel de significancia (0.05), por lo que no hay suficiente información para rechazar la hipótesis nula. Al aceptar la hipótesis nula, es probable que la distribución sea normal.

La normalidad se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilk, la cual es adecuada para tamaños de muestra pequeños debido al gran poder estadístico que posee. El estadístico se muestra en la Tabla #4 (0.95057), así como el valor p (0.5334). El valor crítico correspondiente al tamaño de muestra y un nivel de significancia del 5% (0.881) fue menor que el estadístico de prueba, por lo que no se obtuvo suficiente información para rechazar la hipótesis nula. La prueba de Shapiro-Wilk también indica que la muestra tiene una distribución aproximadamente normal.

En la Imagen #6 se observa el gráfico Q-Q. La información que podría brindar esta gráfica está limitada por la cantidad de puntos que conforman la muestra. Aunque, para esos datos, no se observan desviaciones importantes respecto a la recta.

En el diagrama de caja-bigotes de la Imagen #7, se observa que todos los puntos se encuentran dentro de 1.5 veces el rango intercuartil, por lo que en esta muestra de datos no hay datos atípicos que influyan en las pruebas de normalidad y los parámetros de estadística descriptiva dependientes del rango de la muestra. Para verificar la ausencia de datos atípicos, se utilizó la prueba de Iglewicz y Hoaglin, cuyos resultados se presentan en la Tabla #5. Ningún dato fue mayor a 3.5, por lo que ningún dato se reportó como atípico.

Puede inferirse que la media poblacional de concentración de urea calculada se encuentra entre 1348.2677 mg/dL y 2210.1481 mg/dL, lo cual puede aseverarse debido a que la distribución es simétrica con respecto a la media.

Los resultados de este análisis pueden mejorarse al aumentar la cantidad de datos, con el fin de aumentar la precisión de la estadística descriptiva y la simulación de Monte Carlo.

Calcular el promedio de la concentración de urea en orina humana proporcionará un valor de referencia para preparar la solución de urea que se utilizará para estudiar el funcionamiento y el rendimiento de la celda ureolítica construida. También se utilizará para calcular el rendimiento y la rentabilidad de la máquina generadora de energía.

#### B. Determinación del modelo matemático de predicción de urea en orina en función del tiempo

Con respecto al objetivo 2, se esperó que la curva de disminución de la concentración de urea en orina en función del tiempo (días) fuera una parábola cóncava, que cortara los ejes (x, y) en el primer cuadrante de un plano cartesiano. Con base en el resultado, se obtuvo una ecuación ajustada para la curva utilizando el modelo de regresión lineal múltiple.

Como introducción a la discusión de esta sección, se definirá la diferencia entre los conceptos de “aumento de amonio” y “amonio total”. El método de cuantificación de urea utilizado, consiste en hidrolizar la urea presente en la solución por medio de una enzima (esto dura alrededor de 10 minutos). La hidrólisis de la urea produce 2 moléculas de amoníaco (entre otras especies), el cual se encuentra en forma de ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). El amonio generado es cuantificado colorimétricamente por la reacción de *Berthelot* (Valdés Diez *et al.* 1997); (Burtis y Bruns, 2014), la cual no distingue la procedencia del amonio. A medida que transcurran los días, la urea en las mezclas de orina almacenada disminuye, por lo que cada día la concentración de urea es menor; sin embargo, la concentración de amonio en la mezcla permanece constante, considerando que no ocurre volatilización significativa del amoníaco al abrir las botellas. Para calcular la concentración de urea a medida que transcurren los días, se cuantificó la cantidad de amonio presente al obviar la adición de la ureasa, previo a cuantificar la urea remanente, la cual sí implica a hidrólisis por ureasa. Por lo tanto, el “aumento de amonio” se refiere al resultado obtenido por la medición del control negativo y se caracteriza porque aumenta conforme transcurren los días. El “amonio total” se refiere a la medición utilizando la hidrólisis de la urea y se caracteriza porque es constante en el tiempo.

En la Tabla #6 se observan las características de las curvas de calibración utilizadas para calcular la concentración de amonio en orina humana, las cuales demuestran la linealidad de los modelos, debido a los altos valores del  $R^2$  (ajustado) y los bajos valores del error estándar. El

intercepto de las ecuaciones ajustadas se igualó a cero, debido a que se aplicó un blanco previo a leer la absorbancia de los estándares de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Cada curva corresponde a un kit para el análisis del amonio. Se empleó  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para preparar los estándares, debido a que en solución disminuye el pH a 6 (Singh y Kaur, 2008), lo cual permite imitar aproximadamente las condiciones químicas de la orina. En la leyenda de la Imagen #17 se especifica el color de la curva de calibración, la cual corresponde a cada kit de análisis de amonio utilizado.

En la Imagen #8 se observa el cambio en la apariencia de la orina durante el tiempo de almacenamiento. En el día 2 se observa el inicio de la formación de un precipitado, el cual probablemente se componga de los minerales reportados en la literatura. Si la formación de fosfato de calcio se produce a 6.8 y el de MAP a 7.0, es posible asumir que para el día 2, el pH de la orina se encontraba en este rango. Según Hellström *et al.* (1999) se observa que la tasa de cambio del pH es mayor mientras mayor es la cantidad de heces agregada a la orina, debido a una mayor carga bacteriana. La carga bacteriana en el día 2 en las mezclas de orina en este experimento equivaldría a la que se encuentra a una concentración de 883 mg TS por litro de orina sin diluir. Si el aumento del pH para este experimento se asume según los resultados de Hellström *et al.* (1999), el pH es mayor a 8 en los días 10 y 12 de medición, por lo que el equilibrio está desplazado hacia la especie gaseosa y el amoníaco podría volatilizarse fácilmente al abrir las botellas. La volatilización se observaría en los datos como una disminución en la concentración de amonio total en un rango menor a  $\pm 147.47$  mg/dL, el cual corresponde a la desviación estándar promedio de la media del amonio total (Tabla #11). En los gráficos de barras de la figura 8 se observan porcentajes de cambio positivos durante el proceso de descomposición de la urea. Este resultado es inconsistente, ya que se esperó obtener únicamente disminución en la concentración y no incremento, considerando que solamente se han reportado bacterias marinas con capacidad para la síntesis de urea (Connelly *et al.* 2014).

En las Tablas #7, #8 y #9 se presentan los criterios estadísticos para seleccionar el modelo de regresión múltiple más adecuado para describir la disminución de urea en el tiempo. Los modelos de la Tabla #7 se obtuvieron a partir de valores de urea obtenidos a partir de la diferencia entre un valor de amonio total y otro de amonio en aumento, ambos correspondientes a un día de medición. Se utilizó la técnica de selección de variables “Todas las Regresiones Posibles” (TRP) con las siguientes variables regresoras: días, réplica y tipo de mezcla. Para evaluar la calidad de predicción de estos modelos y determinar si existen modelos más adecuados para predecir la concentración de urea en orina almacenada bajo las condiciones de almacenamiento descritas, se construyeron 8 modelos adicionales, utilizando la técnica TRP y las mismas variables regresoras. Cuatro de estos

modelos adicionales describen el aumento de amonio en el tiempo por regresión logarítmica (Tabla #8) y los 4 restantes describen el aumento de amonio por regresión exponencial (Tabla #9). Para calcular la concentración de urea a partir de estos modelos que describen el aumento de amonio en el tiempo, se calculó una constante al promediar todos los valores de amonio total. La diferencia entre la constante y un punto específico de uno de los modelos, permite obtener la concentración de urea en un tiempo específico. Los 12 modelos se compararon mediante 5 criterios de selección:  $R^2$  (ajustado), error residual, magnitud del estadístico de F y la cantidad de variables independientes significativas.

En la Tabla #10 se presentan los criterios estadísticos para seleccionar el modelo de regresión lineal más adecuado que describe el aumento de amonio en el tiempo. Para obtener una predicción más exacta, se linealizaron los datos mediante la transformación con la función  $\ln(\ )$ . Se escogió el modelo 5 para construir el modelo matemático que predice la concentración de urea en el tiempo (MODELO GENERAL 1), debido a que cuentan con la menor cantidad de variables regresoras significativas. El  $R^2$  (ajustado) y el error residual son similares a los otros tres modelos, por lo que no se contemplaron en esta comparación. En la Tabla #9 se presentan los criterios para seleccionar el modelo de regresión logarítmica más adecuado. Se escogió el modelo 9 de la Tabla #9 para construir otro modelo que predice la concentración de urea en el tiempo (MODELO GENERAL 2), debido a que cuenta con la menor cantidad de variables regresoras significativas. El  $R^2$  (ajustado) y el error residual son similares a los otros tres modelos, por lo que no se contemplaron en esta comparación. Se escogió el modelo 5 de la Tabla #8, el modelo 9 de la Tabla #9 y el modelo 17 de la Tabla #11 por la misma razón. El modelo 5 se utilizó para construir el MODELO GENERAL 1, el modelo 9 se utilizó para construir el MODELO GENERAL 2 y el modelo 17 se utilizó para construir el MODELO GENERAL 3, los cuales predicen la concentración de urea en el tiempo. Se escogió el modelo 14 de la Tabla #10, debido a que el valor de la prueba t de significancia para la variable regresora “tipos de mezcla” fue cercano a 0.05 (ver Tabla #12), por lo que la conclusión de rechazo de la hipótesis nula carece de peso estadístico. Esta variable, junto con la variable “días”, también podría ser significativa. Se determinó que el modelo 14 es el más adecuado en términos estadísticos para construir un modelo que prediga la concentración de urea en el tiempo, debido a que cuentan con mayor  $R^2$  (ajustado) y un error residual pequeño, en comparación con los otros modelos escogidos. El estadístico de F muestra ser mayor para los modelos de la Tabla #10 (el cual se compara entre aquellos modelos con los mismos grados de libertad), lo cual indica un mayor tamaño del efecto.

Se escogió un modelo de cada tabla (7, 8, 9, 10 y 11), el cual contaba con las características estadísticas más óptimas según lo evaluado mediante los criterios de selección. Aunque en términos estadísticos el modelo 14 es el más adecuado de los 20 modelos, se consideró adecuado contemplar los demás tipos de modelos matemáticos como posibles soluciones al objetivo 2, en caso que se obtuvieran resultados estadísticos distintos en un experimento similar con mayor cantidad de réplicas o utilizando un método distinto de cuantificación. Como resultado se escogieron los modelos 1, 5, 9, 13, 14 y 17. En la Tabla #12 se observan las características, las pruebas de significancia y la evaluación de los supuestos de los modelos 1, 5, 9, 13, 14 y 17. Se comprobaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia. Debido a que el valor  $p$  es  $> 0.05$ , se comprobó la normalidad de los residuos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para los modelos 1, 5, 9, 13 y 14. El valor  $p$  es cercano a 0.05 para el modelo 17, por lo que la conclusión podría cambiar si se aumenta el tamaño de la muestra. Se determinó la ausencia de autocorrelación con la prueba de Durbin-Watson y la presencia de homocedasticidad con Breusch-Pagan. Un valor igual a 1 del factor de inflación de la varianza (VIF) indica que no existe multicolinealidad entre las variables regresoras del modelo 14.

En la Imagen #9 se observan las curvas de la ecuación lineal, exponencial y logarítmica útiles para predecir la concentración de urea. Cada dato original es el promedio de un triplicado. El modelo exponencial parece ajustarse mejor a los datos; además el modelo exponencial cuenta con un  $R^2$  (ajustado) mayor en comparación con el modelo lineal y el logarítmico. Los resultados de Jiang y Bakken (1999) (Imagen # 5) también indican que la disminución de la concentración de urea se produce exponencialmente.

En la Imagen #10 se ilustran las curvas de los modelos 13, 14 y 17, cuyas características se presentan en la Tabla #12. La gráfica de la izquierda ilustra las curvas correspondientes a los modelos 13, 14 y 17, así como la exactitud con que se ajustan a los datos originales de amonio en aumento sin transformar con la función  $\ln(\ )$ . Cada dato original es el promedio de un triplicado. Para graficar las curvas de los modelos 13 y 14, se requirió utilizar la función  $e^x$ , en donde  $x$  es igual a la ecuación 13 o 14. En el caso de la curva del modelo 17, no fue necesario utilizar la función  $e^x$ , debido a que se utilizaron los datos originales sin transformar para obtener la ecuación. En la gráfica de la derecha, se ilustran las curvas de las ecuaciones de los modelos 13 y 14, utilizando los datos transformados de amonio en aumento. Los resultados de Udert *et al.* (2013) demuestran que el aumento de amonio es lineal para un intervalo de aproximadamente 5 horas, lo cual discrepa con los resultados obtenidos en este experimento. Considerando los resultados de Jiang y Bakken (1999) (Imagen #5) como referencia, se esperó obtener una tendencia logarítmica

como del modelo 17 (curva verde), para después obtener una curva exponencial como resultado de la diferencia entre una constante y los valores calculados con la ecuación 17. La diferencia podría radicar en que el tiempo de duración de ambos experimentos es distinto; este experimento duró 12 días, lo cual permitió registrar un conjunto más grande de cambios y con ello observar una tendencia distinta a la lineal. Aunque esta tendencia pareciera exponencial en lugar de logarítmica según los resultados gráficos y estadísticos.

En la imagen de la izquierda, se observa que la curva negra (ecuación 13) se encuentra desplazada por debajo de la curva roja y azul (ecuación 14), y se encuentra más próxima a los datos originales, en comparación con las otras dos. La curva roja es la que se encuentra más alejada de los datos, por lo que es probable que la variable “mezcla” no sea significativa. El valor  $p$  de la prueba  $t$  de significancia para el coeficiente de la variable “mezcla” es cercano a 0.05, por lo que la conclusión de la prueba de hipótesis es ambigua. Al aumentar el tamaño de muestra en otro experimento, es probable encontrar que esta variable no es significativa.

Para completar el modelo matemático que pudiera predecir la descomposición de urea bajo las condiciones experimentales establecidas, se calculó una constante de amonio total al promediar todos los datos recolectados para esa variable. Se obtuvo este promedio, ya que previamente se determinó que no existe diferencia entre los dos tipos de mezcla. En la Tabla #13, se observa el valor  $p$  de la prueba  $t$  para muestras independientes, el cual indica que la diferencia entre los dos tipos de mezcla (4 y 8 muestras) no es significativa, debido a que el valor  $p > 0.05$ . En el mismo cuadro se presentan las medias y desviaciones estándar respectivas de los dos grupos. Debajo del cuadro se muestra el poder estadístico de la prueba  $t$  y los valores  $p$  de las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, para la comprobación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Debido a que los valores  $p$  son mayores a 0.05, se concluyó que era adecuado utilizar esta prueba. Sin embargo, el poder estadístico es del 15%, por lo que se recomienda incrementarlo aumentando el tamaño de muestra por grupo. Considerando que la prueba  $t$  indica que no existe diferencia entre los grupos, se calculó la media de todos los valores de amonio total para obtener una constante igual a 1641.40 con un IC 95% de  $\pm 69.20$  mg/dL. Este valor se encuentra dentro del rango estimado para la concentración media de urea en orina (objetivo 1), la cual fue de 1779.21 con un IC 95% de  $\pm 430.94$  mg/dL. La diferencia en el IC 95% es aproximadamente 6 veces más grande en el objetivo 1, debido a la presencia de una mayor variabilidad biológica. Esta constante se utilizó para construir los modelos A, B y C, los cuales se describen a continuación.

En la Imagen #11 se observa la distribución de los datos de amonio total, los cuales siguen una tendencia lineal alrededor de la media de 1641.40 mg/dL (línea horizontal negra).

Los valores predichos a partir de los modelos A, B y C se ilustran en la Imagen #12. En la gráfica derecha, se ilustran las curvas de los modelos A y B, mientras que en la gráfica derecha, se ilustra la curva del modelo C. El objetivo de este estudio fue encontrar el modelo que representara el mejor ajuste, según los criterios estadísticos. Los modelos A y B muestran ser más adecuados en términos estadísticos que el modelo C. Sin embargo, en comparación con los resultados de Jiang y Bakken, (1999), cuya curva es de tipo cóncava, es evidente que el modelo C coincide con el comportamiento cóncavo, a diferencia de los modelos A y B. En el estudio de Jiang y Bakken (1999), se utilizó acetileno en el cultivo bacteriano para disminuir el crecimiento y la síntesis de novo de enzimas, lo cual permite conocer la tendencia de la disminución de la concentración de urea en presencia de una concentración constante de la enzima ureasa. Según lo que se conoce sobre los fenómenos que rigen el metabolismo, a medida que la concentración de un sustrato disminuye, también lo hacen los niveles de saturación enzimáticos en presencia de una concentración constante de enzima; como resultado, la velocidad de desaparición del sustrato disminuye. En este estudio, no se controló el crecimiento bacteriano ni la síntesis enzimática, por lo que no puede afirmarse que la concentración de ureasa fue constante, ni que el modelo C es el más adecuado para predecir la concentración de urea en función del tiempo en orina bajo estas condiciones de almacenamiento. Al emplear acetileno en otro experimento, utilizando las mismas condiciones de almacenamiento, podrá comprobarse si el MODELO GENERAL 1 es adecuado para describir la disminución de urea en el tiempo.

En el estudio de Udert *et al.* (2013), se determinó que la urea se degrada completamente en pocos días si el sistema no se encuentra en agitación constante. Según el modelo logarítmico, el modelo de regresión lineal simple y la predicción del modelo de regresión lineal múltiple para la mezcla de 4 muestras, la urea tarda más de 12 días en degradarse cuando la orina se encuentra almacenada en botellas PET cerradas, bajo sombra a una temperatura entre 20 y 25°C. Según la predicción para la mezcla de 4 muestras, la urea tarda aproximadamente 8 días en degradarse. La ureolisis puede producirse más lentamente bajo estas condiciones, debido a que el sistema contiene únicamente orina, por lo que la carga bacteriana inicial es baja. El tamaño del inóculo bacteriano inicial explicaría la lentitud de la ureolisis, si fue suficientemente pequeño en relación al volumen de la mezcla. Al encontrarse las botellas cerradas, no se produce contaminación continua de la orina con bacterias ureasa positivo. Al no existir circulación de la orina, se favorece la interacción entre la enzima, ureasa, y el sustrato: la urea.

En la gráfica izquierda de la Imagen #12, se observa que la urea en la orina tardaría más de 12 días en descomponerse. Según el modelo ecuación B, la mezcla de 8 muestras de orina se descompone más rápidamente que la de 4 muestras, respectivamente. Según el modelo A, la urea tarda en descomponerse más tiempo de lo que predice la ecuación del modelo B. Al aumentar el número de réplicas por tipo de mezcla de orina, así como la cantidad de mediciones en el tiempo, podrá verificarse si existe una diferencia significativa entre ambas mezclas para determinar, entre A y B, cuál es el más apto.

Los cambios porcentuales positivos en la Imagen #8, se asociaron a errores experimentales, que podrían incluir la técnica, el equipo o interferencias asociadas al método de medición (especies químicas interferentes derivadas del proceso natural de descomposición de la orina).

Para mejorar la capacidad del modelo matemático de predecir la descomposición de urea en cualquier tipo de mezcla, se recomienda aumentar la cantidad de réplicas por tipo de mezcla y comparar contra más tipos de mezcla (16, 24 muestras). Aumentar las réplicas por tipo de mezcla y la cantidad de mediciones en el tiempo permitirá verificar la significancia estadística de la variable “tipo de mezcla” como variable regresora. La adecuación del método de *Berthelot* para este experimento se recomienda compararla contra otros métodos, como los métodos que utilizan diacetilmonoxima o púrpura de bromocresol.

El principio de la navaja de Ockham, también conocido como principio de economía o parsimonia, establece que “La explicación más simple y suficiente es la más probable, mas no necesariamente la verdadera” (García-Albi y Isamat, 2010). Podrían existir más variables regresoras significativas que deberían ser incluidas en el modelo. La carga bacteriana o la concentración enzimática podrían ser de interés, considerando que aumentan a medida que el tiempo transcurre. Esta investigación es de tipo exploratoria, por lo que los resultados obtenidos pretenden ser el inicio de varios estudios de seguimiento.

La importancia de este estudio radica en la necesidad de un modelo matemático que prediga la concentración de urea. El modelo se utilizará como herramienta en la planificación de las dimensiones de un tanque de almacenamiento, el cual provee la orina a una máquina generadora de energía que utiliza la urea como sustrato.

### C. Efecto del KCl en los valores de concentración de urea en orina

Considerando que las altas concentraciones de sal producidas por la reacción de neutralización entre el KOH y el HCl podrían disminuir la actividad de la ureasa al momento de la cuantificación, adicionalmente se evaluó el efecto de la adición de KOH y HCl a la orina sobre la concentración de urea.

En la Tabla #14 se observan los porcentajes de cambio entre ambos grupos, y debajo del mismo cuadro se presenta el valor  $p$  de la prueba  $t$  para muestras dependientes. El supuesto sobre la normalidad de las diferencias se cumple, considerado que el valor  $p$  para la prueba de Shapiro-Wilk es  $>0.05$ . Como el valor  $p > 0.05$  para la prueba  $t$ , los grupos podrían considerarse iguales; el poder de la prueba es del 63.4%. Al aumentar el tamaño de muestra para la prueba y con ello el poder estadístico, podría detectarse una diferencia significativa. Para obtener un poder del 80%, se requeriría un  $N_{\text{total}}$  igual a 7, suponiendo que el tamaño del efecto es aproximadamente 1.08 (grande).

Debido a que, según los resultados de la prueba  $t$  para muestras dependientes, no existe diferencia entre los grupos, la variabilidad en los porcentajes de cambio de la Tabla #14 está asociada a errores de tipo experimental y no a interferencias por concentración con la actividad de la ureasa utilizada para cuantificar la urea.

Las diferencias con signo positivo observadas en la Tabla #14 podrían deberse a la reacción del HCl con otros componentes de la orina, lo cual requiere agregar mayor cantidad de HCl para llegar al pH original. La diferencia con signo negativo puede explicarse con la disminución de la concentración del HCl en solución como resultado de la rápida volatilización. Otra explicación para la diferencia con signo negativo es la presencia de una reacción entre el KOH con otros componentes de una muestra orina, la cual cuenta con una concentración baja de componentes capaces de reaccionar con el HCl, resultando en la formación de algún complejo que impide la difusión libre de los iones  $\text{OH}^-$  para aumentar el pH. Esta hipótesis surge de haber observado que al momento de agregar KOH a la orina, aumenta la temperatura de la mezcla y se volatiliza un olor peculiar, el cual está ausente en la orina original.

En la Tabla #15 se observa que la diferencia entre el HCl calculado y el HCl agregado para neutralizar la cantidad de KOH correspondiente agregado a la orina. En la Tabla #16 se observa que se procuró regresar las muestras al pH original al agregar el KOH.

Debajo de la Tabla #15 se presenta el valor p de la prueba t para muestras independientes y el poder estadístico respectivo. Se utilizó la prueba t considerando la homocedasticidad y la normalidad de los datos de HCl agregados, ya que  $p > 0.05$ , y que el conjunto de datos de HCl calculados es aproximadamente una constante. Aunque ambos grupos podrían ser iguales, dado que el valor  $p > 0.05$ , para tamaños de muestra menores a 10, el poder estadístico de las pruebas paramétricas disminuyen considerablemente. Para esta prueba, el poder es del 19%. Para obtener un poder del 80%, se requeriría un tamaño de muestra de 75 por grupo, suponiendo que el tamaño del efecto es aproximadamente 0.54 (considerado mediano).

La limitante de este experimento es la dificultad de llevar el pH al estado original luego de agregar el KOH. La cantidad de HCl requerida para neutralizar el KOH agregado no coincide con la cantidad de HCl requerida para regresar al pH original, lo cual obliga al experimentador a agregar el reactivo tentativamente hasta alcanzar este estado. El pH disminuye drásticamente luego del punto de equivalencia en respuesta a cantidades mínimas de HCl concentrado (37%-38%), lo cual eventualmente puede demandar un nuevo ajuste con KOH. Aunque la dilución del HCl puede considerarse una opción, es necesario contemplar el aumento del error sistemático al momento de cuantificar la urea, debido a la dilución de la orina. Este problema resulta relevante debido al pequeño volumen de orina utilizado (10 mL).

Determinar si existe una diferencia significativa entre la concentración de urea anterior y posterior a la adición de KOH y HCl a la orina, permitirá evaluar la posibilidad de utilizar este método enzimático de cuantificación de urea para estudiar la cinética de la reacción de ureolisis en una celda electrolítica que utiliza KOH como electrolito, y la cual forma parte de la máquina generadora de energía a partir de orina humana.

Determinar si existe diferencia entre el HCl calculado y agregado permitirá comprobar que es adecuado utilizar KCl para realizar los estudios sobre el efecto de la adición de KOH y HCl a la orina sobre la concentración de urea.

#### D. Controles

En la Tabla #17 se observan los resultados de las pruebas de referencia para comprobar el buen funcionamiento del espectrofotómetro UV-Visible. Se observa que, a excepción de la estabilidad fotométrica (en donde AU/h fue  $> 0.001$ ), todas las pruebas fueron aprobadas y que la temperatura del laboratorio en donde reside el equipo es constante. Aunque la estabilidad fotométrica no cumplió con las expectativas requeridas, es posible determinar que el equipo se encontró en buen estado al momento del experimento, debido a que los patrones de urea y de cloruro de amonio presenta una tendencia constante en el período que se realizaron las mediciones (Imágenes #14 y #15).

En la Tabla #18 se observa que se evaluó la precisión del pipeteo utilizando pipetas automáticas con diferentes capacidades y con los volúmenes críticos para los experimentos, lo cual, junto con la precisión del espectrofotómetro, brinda un valor aproximado del error experimental. Para medir los volúmenes de  $10\mu\text{L}$  y  $20\mu$  se escogió la pipeta marca Transferpette debido a que obtuvo la menor desviación estándar. Las temperaturas registradas (Tabla #52), y por ende la densidad, fueron constantes, lo cual permitió realizar la comparación entre pipetas.

En la Imagen #13 se observa que la lectura espectrofotométrica, la cual se realiza luego de 20 minutos de haberse iniciado la reacción para la cuantificación de la urea o amonio, se toma en el momento de mayor cambio de la absorbancia. La velocidad de cambio de la absorbancia es más veloz entre los 20 y 30 minutos aproximadamente, debido a que el ángulo de la pendiente es mayor.

En la Imagen #14 se observa que la concentración de urea del patrón fue aproximadamente constante a lo largo de los días; la media experimental resultó ser 2 unidades mayor ( $52\text{ mg/dL}$ ) a la media teórica ( $50\text{ mg/dL}$ ), sin contemplar los cuatro datos atípicos resaltados en verde (que se observan en las mediciones de los días 2, 7, 25 y 28). Por lo tanto, las concentraciones de urea calculadas utilizando las curvas de calibración de la Tabla #2 podrían estar sobreestimadas 2 unidades en promedio. La medición del patrón permitió monitorear el funcionamiento del kit; en caso de producirse una disminución en la actividad de la ureasa o un defecto de fábrica en las mezclas de reactivos, se proyectaría como una disminución significativa en la concentración del patrón.

En la Imagen #15 se observa que la concentración de amonio del patrón de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fue aproximadamente constante durante el tiempo que duró el experimento para la determinación del

modelo matemático de predicción de urea en orina en función del tiempo; la media experimental resultó ser 3.5 unidades mayor (53.5 mg/dL) a la media teórica (50 mg/dL), sin contemplar el dato atípico resaltado en azul (que se observa en la medición del día 5). Consecuentemente, las concentraciones de amonio calculadas utilizando las curvas de calibración de la Tabla #6 podrían estar sobreestimadas 3.5 unidades en promedio. Se empleó  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como patrón, debido a que en solución es una sal ácida (Karimi, 2015), lo cual permitió imitar aproximadamente las condiciones químicas de la orina, en las cuales se producía la reacción.

Como se observó en la Imagen #13, el intervalo de tiempo de 20 a 30 minutos, en el que el cambio de la absorbancia fue más veloz, es el de menor estabilidad en la formación del complejo cromogénico o de menor estabilidad fotométrica. La alta tasa de variación contribuye al aumento de la desviación con respecto al valor real de la absorbancia y al aumento de la diferencia entre repeticiones.

La importancia de realizar la medición y el análisis de los controles radicó en la necesidad de disminuir y detectar el error experimental, lo cual permitió generar un panorama más amplio para evaluar la precisión de los resultados obtenidos. A partir de los resultados de esta evaluación fue posible determinar con mayor profundidad qué aspectos hay que contemplar para optimizar los experimentos realizados, y con ello obtener resultados más confiables y precisos.



## VIII. CONCLUSIONES

Con respecto a la primera interrogante, se encontró que la concentración de urea en orina es una variable que puede que se distribuya normalmente, con una media de  $1779.2079 \pm 430.9402$  mg/dL, por lo que se recomendó que la concentración de la solución de urea, requerida para estudiar el funcionamiento, el rendimiento y la rentabilidad de la máquina, se encontrase en este rango.

Con respecto a la segunda interrogante, se calcularon tres modelos matemáticos para predecir la concentración de urea en mezclas de orina: el primero con regresión lineal simple, el segundo con regresión lineal múltiple y el tercero con regresión logarítmica. La orina mezclada se almacenó en botellas PET a  $25^{\circ}\text{C}$  y se midió la urea por 12 días. Se determinó que, en términos estadísticos, el modelo con el mejor ajuste fue el de regresión lineal múltiple. La concentración de urea, según este modelo, está en función del tiempo (días) y el tipo de mezcla (4 u 8 muestras de orina), y describe una parábola convexa que corta ambos ejes (x, y) en el primer cuadrante de un plano cartesiano. Según este modelo, el cálculo de la dimensión del tanque de almacenamiento deberá contemplar la cantidad de muestras de orina que conforman la mezcla, ya que la mezcla de 8 muestras se degrada completamente en aproximadamente 8 días, mientras que la mezcla de 4 muestras tarda más de 12 días. Existe la posibilidad de que el tipo de mezcla no sea una variable regresora significativa y que uno de los otros dos modelos sea más adecuado para describir la disminución de la concentración de urea en función del tiempo.

El efecto de la neutralización HCl-KOH *in situ* en la orina sobre los valores de la concentración de urea en orina no es significativo, según los resultados de la prueba t para muestras pareadas. La diferencia entre el HCl calculado y agregado tampoco es significativa, según los resultados de la prueba t para muestras independientes. Es posible utilizar el método de Berthelot para estudiar la cinética de la reacción de ureolisis en una celda electrolítica que utiliza KOH como electrolito y es posible sustituir la neutralización *in situ* por KCl.

El espectrofotómetro UV-Visible pasó las pruebas de estabilidad, espectro de corriente oscura, ruido fotométrico, monotonía de la línea base, intensidad y espectro del patrón de óxido de olmio, a excepción de la prueba de estabilidad fotométrica. Se observó la máxima tasa de variación de la absorbancia entre los 20 y 30 minutos después de que iniciara la reacción de cuantificación de urea. Los *kits* de reactivos se encontraron en condiciones óptimas durante las mediciones y las

concentraciones de urea y amonio calculadas están sobreestimadas en promedio 2 unidades y 3.5 unidades, respectivamente. El error experimental proveniente del pipeteo fue:  $\pm 4 \mu\text{L}$  para  $1000 \mu\text{L}$ ,  $\pm 0.1 \mu\text{L}$  para  $20 \mu\text{L}$  y  $\pm 0.2 \mu\text{L}$  para  $10 \mu\text{L}$ .

## IX. RECOMENDACIONES

Se sugiere aumentar la velocidad y disminuir el error experimental de los análisis con la técnica CFA (*Continuos Flow Analysis*), cuyo instrumento se conoce como autoanalizador.

El método utilizado en el experimento para calcular el modelo matemático que predice la concentración de urea en la orina en función del tiempo puede optimizarse tratando la muestra de orina en descomposición con un buffer de borato a pH 9.5 para disminuir la hidrólisis de compuestos orgánicos y cianatos (si hubiera). El  $\text{NH}_3$  se destila con una solución de ácido bórico (O'Dell *et al.* 1993). Luego del tratamiento es posible utilizar la reacción de *Berthelot* (el método de O'Dell *et al.* (1993) utiliza fenol en vez de salicilato; el fenol es tóxico, por lo que ha sido sustituido por salicilato, el cual no es tóxico). Este método aplica en un rango de 0.01-2.0 mg/L  $\text{NH}_3$  como N y tiene capacidad para el análisis de 60 muestras por hora, debido a que utiliza la técnica CFA (*Continuous Flow Analysis*). Se recomienda comprobar la linealidad mediante una curva de calibración que abarque el rango, dentro del cual se encontrará la muestra diluida.

La cuantificación de amonio acoplado a la hidrólisis de urea en estas condiciones también puede realizarse utilizando la reacción con púrpura de bromocresol, según lo emplearon Udert *et al.* (2003). El aumento en la concentración de amoníaco, producto de la hidrólisis de la urea, induce un cambio de color lineal cuando el pH aumenta de 4.8 a 5.2, el cual puede detectarse espectrofotométricamente (Ngo, 2012). Los autores utilizaron FIA (*Flow Injection Analysis*), el cual se deriva de la técnica CFA. Asimismo, la reacción de *Berthelot* puede acoplarse a FIA, según FASSAI, 2015.

Para el estudio del aumento del pH durante el almacenamiento de la orina, se recomienda preparar una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , el cual es una sal ácida en solución (Karimi, 2015), por lo que puede imitar aproximadamente las condiciones de la orina. Esta solución funcionaría como patrón y deberá simular los aumentos de pH, lo cual permitirá aproximar la pérdida de amoníaco por volatilización utilizando la reacción de *Berthelot* o algún método similar.

Se sugiere evaluar la posible significancia de otras variables regresoras para incluirlas en el modelo, como la carga bacteriana o la concentración de enzima. También se recomienda estudiar el efecto que tiene el aumentar la cantidad de muestras que conforman la mezcla para determinar

si verdaderamente existe una diferencia significativa en la velocidad del aumento de amonio entre los tipos de mezcla.

Se recomienda aumentar el número de réplicas por tipos de mezcla para calcular un modelo matemático estandarizado que permita predecir la concentración de urea en orina en función del tiempo bajo condiciones generalizadas. Aumentar la cantidad de réplicas por tipo de mezcla y comparar contra más tipos de mezcla (16, 24 muestras). Aumentar las réplicas por tipo de mezcla también permitirá verificar la significancia estadística del “tipo de mezcla” como variable regresora. La adecuación del método de *Berthelot* para este experimento se recomienda compararla contra otros métodos, como los métodos que utilizan diacetilmonoxima o púrpura de bromocresol.

En estudios futuros es conveniente analizar los cambios de pH en función del aumento de amonio en las mezclas de orina almacenadas, lo cual permitiría determinar cuál es la relación existente entre la tasa de descomposición de la urea y el pH bajo estas condiciones específicas. Hellström *et al.* (1999) determinaron que ocurre la inhibición del crecimiento bacteriano cuando el pH llega a 9 sin agregar ningún ácido como preservante. Los autores también determinaron que la carga bacteriana era pequeña a un pH de 3. Futuras investigaciones podrían utilizar KOH como inhibidor del crecimiento bacteriano y con ello impedir la descomposición de la urea. La ventaja radica en que puede utilizarse junto con una celda ureolítica que emplea KOH como electrolito (Botte, 2009); (Boggs *et al.* 2009), por lo que no se requieren más recursos y el costo de producción no aumenta. También podrían considerarse otros químicos de bajo costo, como la soda cáustica o el ácido muriático. En el estudio de Gutiérrez Mendieta *et al.* (1998) para la determinación de urea en ecosistemas costeros, los autores utilizan  $H_2SO_4$  para conservar las muestras en congelamiento, previo al análisis.

Para automatizar la cuantificación de urea en la máquina generadora de energía, se recomienda implementar un sistema basado en voltametría cíclica, en el cual el voltaje de la celda ureolítica sería una función de la concentración de urea (Botte, 2009). Esta opción elimina la necesidad de añadir otros complementos a la máquina.

Aumentar el tamaño de muestra de los grupos de comparación a un mínimo de 12 para el experimento de neutralización con HCl y KOH en orina con el fin de aumentar el poder estadístico de la prueba t con muestras dependientes y la prueba t con muestras independientes. En caso de

que la diferencia entre la concentración de urea en la orina original y la concentración de urea en la orina mezclada con KOH y HCl fuera estadísticamente significativa y constante, podría calcularse un factor de corrección o implementarse otro método para la cuantificación que no sea enzimático. Al aumentar N, podría encontrarse no normalidad en el conjunto de datos, por lo que se requeriría aplicar la variante no paramétrica de la prueba t para muestras independientes, conocida como la prueba U de Mann-Whitney, y para muestras dependientes, conocida como la prueba de los rangos signados de Wilcoxon.

Se recomienda utilizar KCl en lugar de la neutralización en estudios posteriores, considerando que las medias de volúmenes de HCl calculadas y agregadas no son estadísticamente distintas. Y realizar las pruebas en otros materiales para el almacenamiento, los cuales sean accesibles económicamente para los miembros de la comunidad.



## X. LITERATURA CITADA

Boggs, B. K., King, R. L., & Botte, G. G. (2009). Urea electrolysis: direct hydrogen production from urine. *Chemical Communications*, (32), 4859. <http://doi.org/10.1039/b905974a>

Botte, G. G. 2009. Electrolytic Cells and Methods for the Production of Ammonia and Hydrogen. U.S., 20090095636 A1. (Solicitud), 16 Abr 2009. Appl. 12/250, 864, 14 Oct 2008. 6p.

Brunzel, N. A. (2013). *Fundamentals of Urine and Body Fluid Analysis*. Elsevier Health Sciences.

Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2014). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Health Sciences.

Carter, E. L. et al. 2010. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*. 1(3): 207-221

Dunn, S. (2003). Hydrogen futures: toward a sustainable energy system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(3), 235-264. [http://doi.org/10.1016/S0360-3199\(01\)00131-8](http://doi.org/10.1016/S0360-3199(01)00131-8)

Edin-Liljegren, A., Grenabo, L., Hedelin, H., Pettersson, S., & Wang, Y. H. (1992). The influence of pH and urine composition on urease enzymatic activity in human urine. *Urological Research*, 20(1), 35-39. <http://doi.org/10.1007/BF00294332>

Francis, P. S.; Lewis, S. W. Kieran, F. L. (2002). Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *Trends in analytical chemistry*. 21(5): 389 – 400.

Gelman, R. (2012). *Renewable Energy Data Book*. U.S. Department of Energy. Recuperado a partir de <http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60197.pdf>

Georgia State University. 2005. Electrolysis of Water. Disponible en: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/Hbase/thermo/electrol.html> [Consultado el 17.12.2014]

Hellström, D., Johansson, E., & Grennberg, K. (1999). Storage of human urine: acidification as a method to inhibit decomposition of urea. *Ecological Engineering*. 12(3-4), 253-269.

Jiang, Q. Q., & Bakken, L. R. (1999). Comparison of Nitrosospira strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(2), 171-186. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00646.x>

Jones, B. (2010). *Comprehensive Medical Terminology*. Cengage Learning.

Karge, H. G., & Weitkamp, J. (2006). *Characterization II*. Springer Science & Business Media.

Kempers, A. J. y C. J. Kok. (1989). RE-EXAMINATION OF THE DETERMINATION OF AMMONIUM AS THE INDOPHENOL BLUE COMPLEX USING SALICYLATE. *Analytica Chimica Acta*. 221:147-155

Lv, J.; Y. Jiang; Q. Yu y S. Lu. 2010. Structural and functional role of nickel ions in urease by molecular dynamics simulation. *J Biol Inorg Chem*. 16: 125-135

McClatchey, K. D. (2002). *Clinical Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins. 1693 pp.

Maker Faire Africa. (2012). A Urine Powered Generator. Recuperado el 5 de junio del 2015 a partir de <http://makerfaireafrica.com/2012/11/06/a-urine-powered-generator/>

Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1), 85-108.

Mundt, L. A., & Shanahan, K. (2010). *Graff's Textbook of Routine Urinalysis and Body Fluids*. Lippincott Williams & Wilkins.

Ohio University. (2015, junio 5). Urea electrolysis. Recuperado 5 de junio de 2015, a partir de <http://www.ohio.edu/engineering/ceer/research/urea.cfm>

Piddock, C. 2011. Liquid Gold. *Current Science*. 96(10), 8.

Putnam, D. F. (1971). *Composition and concentrative properties of human urine*. Recuperado a partir de <http://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19710023044>

Riedel, C. et al. 2015. Extended Data Figure 5: Structures of the enzymes studied with active site components highlighted. *Nature*. 517: 227- 230.

Sampson, E. J., Baird, M. A., Burtis, C. A., Smith, E. M., Witte, D. L., & Bayse, D. D. (1980). A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clinical Chemistry*, 26(7), 816-826.

TECHO | Argentina. (2015, junio 5). Recuperado 5 de junio de 2015, a partir de <http://www.techo.org/paises/argentina/informate/panimache-v-y-sus-mujeres/>

Udert, K. M., Larsen, T. A., Biebow, M., & Gujer, W. (2003). Urea hydrolysis and precipitation dynamics in a urine-collecting system. *Water Research*, 37(11), 2571-2582. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00065-4](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00065-4)

UN Industrial Development Organization. 1998. Fertilizer Manual. Springer Science & Business Media. 615 pp.

Valdés Diez, L., García, G., Iliana, Á., Párraga, R., Elena, M., Rodríguez Villar, O., & Sijó Yero, M. (1997). Variantes del método de Berthelot. *Revista Cubana de Farmacia*, 31(2), 96-101.

Walia, A. (2013). Urine Powered Generator: 6 Hours Of Power On 1 Litre Of Pee. (2015, junio 5). Recuperado 5 de junio de 2015, a partir de <http://www.collective-evolution.com/2013/12/23/urine-powered-generator-6-hours-of-power-on-1-liter-of-pee/>

## XI. ANEXOS

Tabla #19: Especificaciones de la cristalería volumétrica

T.D. at 20 °C (pipetas). Ln 20°C (balones)

| Instrumento        | Marca       | Modelo    | Cantidad | Capacidad | Precisión |
|--------------------|-------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| Balón volumétrico  | Interlabs   | NS 12/21  | 4        | 50 mL     | ±0.06 A   |
| Balón volumétrico  | Brand       | NS 12/21  | 1        | 50 mL     | ±0.06 A   |
| Balón volumétrico  | LMS         | NS12      | 1        | 100 mL    | ± 0.1 A   |
| Pipeta volumétrica | COREX       | 7100-A    | 1        | 10mL      | A         |
| Pipeta volumétrica | FISHERbrand | 13 650 2M | 1        | 15 mL     | ±0.03 A   |
| Pipeta volumétrica | COREX       | 7100 -A   | 1        | 2 mL      | A         |
| Pipeta volumétrica | FISHERbrand | 13 650 2A | 1        | 0.5 mL    | ±0.006 A  |

Tabla #20: Especificaciones del equipo

| Equipo   | Marca                      | Modelo        | Capacidad     | Precisión |
|--|----------------------------|---------------|---------------|-----------|
| Espectrofotómetro<br>UV-Visible con<br>arreglo de diodos | Agilent                    | 8453E         | 190-1100nm    | ±0.005 AU |
| NANOpure Infinity<br>ultrapure water<br>system           | Barnstead<br>International | D8961         | -             | -         |
| Pipeta automática<br>Eppendorf                           | Eppendorf                  | Reference     | 0.5 - 10 µL   | -         |
| Pipeta automática<br>Transferpette                       | Brand                      | Transferpette | 10 - 100 µL   | -         |
| Pipeta automática<br>Eppendorf                           | Eppendorf                  | Reference     | 100 - 1000 µL | -         |

Tabla #21: Especificaciones de los reactivos

| Reactivo             | Marca      | Pureza           |
|----------------------|------------|------------------|
| NaOH                 | Merck      | 99%              |
| HCl                  | Merck      | 37-38%           |
| KOH                  | RGH        | Grado industrial |
| Urea                 | Merck      | 99.5%            |
| NH <sub>4</sub> Cl   | Merck      | 99.8%            |
| Kit UREA/BUN - COLOR | BioSystems | -                |

Tabla #22: Concentraciones reales y absorbancias de los estándares de urea

|                      |               |                      |               |
|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| Concentración_real_1 | Absorbancia_1 | Concentración_real_4 | Absorbancia_4 |
| 2.50                 | 0.021         | 5.01                 | 0.044         |
| 5.00                 | 0.040         | 15.04                | 0.13          |
| 10.00                | 0.077         | 25.06                | 0.20          |
| 15.00                | 0.11          | 40.10                | 0.33          |
| 20.00                | 0.17          | 55.14                | 0.46          |
| Concentración_real_2 | Absorbancia_2 | Concentración_real_5 | Absorbancia_5 |
| 2.51                 | 0.024         | 5.00                 | 0.052         |
| 5.02                 | 0.046         | 15.00                | 0.13          |
| 10.04                | 0.086         | 25.00                | 0.22          |
| 15.06                | 0.12          | 40.00                | 0.34          |
| 20.08                | 0.17          | 55.00                | 0.48          |
| Concentración_real_3 | Absorbancia_3 | Concentración_real_6 | Absorbancia_6 |
| 5.04                 | 0.046         | 5.00                 | 0.041         |
| 15.11                | 0.12          | 15.00                | 0.12          |
| 25.18                | 0.23          | 25.00                | 0.20          |
| 40.28                | 0.33          | 40.00                | 0.33          |
| 55.39                | 0.48          | 55.00                | 0.44          |

Imagen #16: Curvas de calibración para el cálculo de la concentración de urea en orina

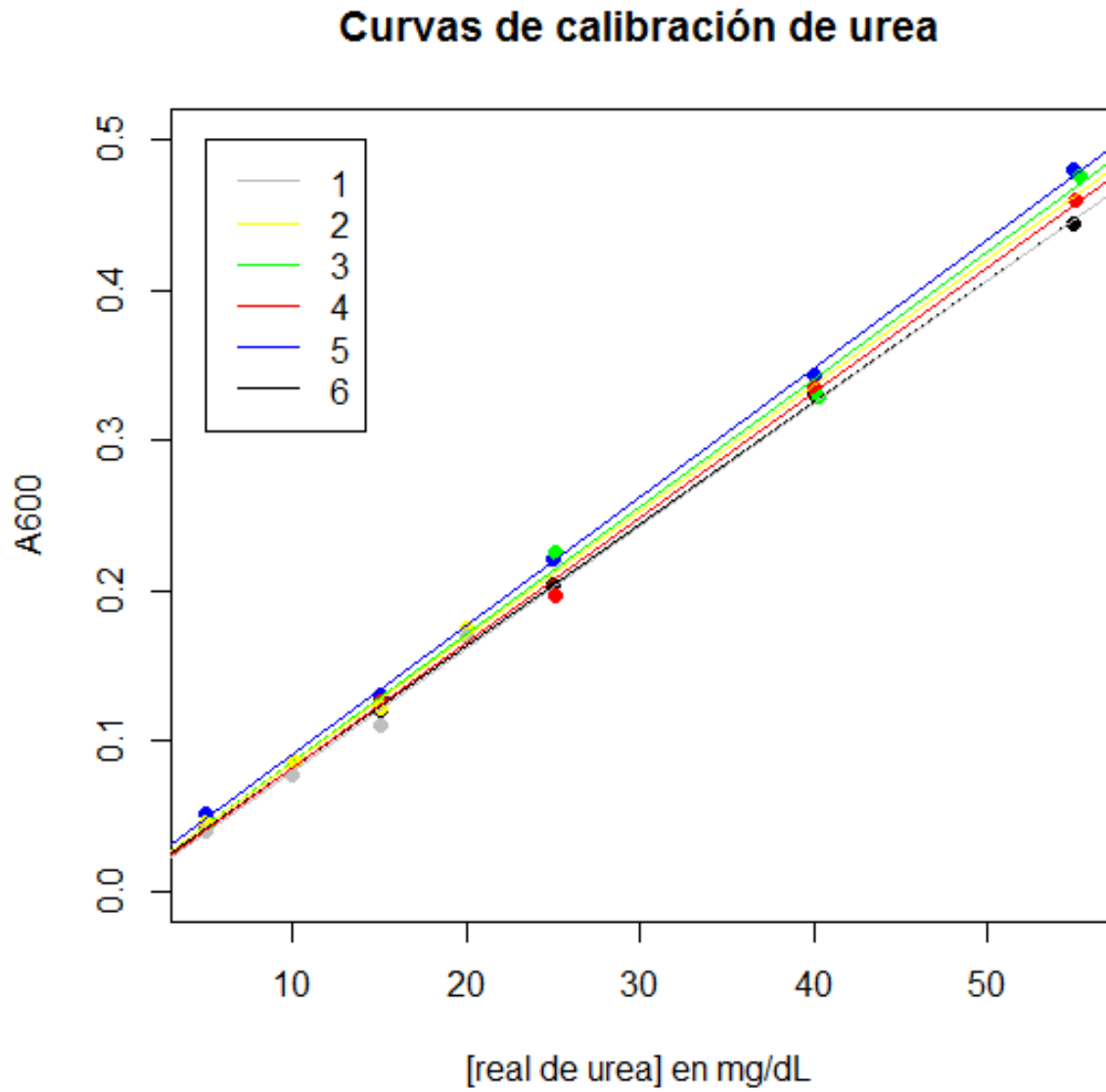


Tabla #23: Algoritmo en R: curvas de calibración de urea

| # | Comando   | Descripción   |
|---|---|---|
| 1 | <code>curvas &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la Tabla #22 para generar la Imagen #16 y la Tabla #2. |
| 2 | <code>plot(curvas\$Absorbancia_6~curvas\$Concentración_real_6, ylab="A600",<br/>xlab="[real de urea] en mg/dL", main="Curvas de calibración de urea",<br/>ylim=c(0, 0.5), col="black", pch=16)</code> | Grafica los puntos de la curva de calibración 6.                |
| 3 | <code>abline(lm(curvas\$Absorbancia_6~curvas\$Concentración_real_6))</code>   | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos de la curva 6.   |
| 4 | <code>lines(curvas\$Asorbancia_5~curvas\$Concentración_real_5, col="blue",<br/>type="p", pch=16)</code>   | Grafica los puntos de la curva de calibración 5.                |
| 5 | <code>abline(lm(curvas\$Asorbancia_5~curvas\$Concentración_real_5), col="blue")</code>  | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos de la curva 5.   |
| 6 | <code>lines(curvas\$Absorbancia_4~curvas\$Concentración_real_4, col="red",<br/>type="p", pch=16)</code>   | Grafica los puntos de la curva de calibración 4.                |
| 7 | <code>abline(lm(curvas\$Absorbancia_4~curvas\$Concentración_real_4), col="red")</code>  | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos de la curva 4.   |
| 8 | <code>lines(curvas\$Absorbancia_3~curvas\$Concentración_real_3, col="green",<br/>type="p", pch=16)</code>   | Grafica los puntos de la curva de calibración 3.                |

Continuación Tabla #23

| #  | Comando  | Descripción   |
|----|--|---|
| 9  | <code>abline(lm(curvas\$Absorbancia_3~curvas\$Concentración_real_3), col="green")</code>   | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos de la curva 3.               |
| 10 | <code>lines(curvas\$Absorbancia_2~curvas\$Concentración_real_2, col="yellow", type="p", pch=16)</code>                                     | Grafica los puntos de la curva de calibración 2.                            |
| 11 | <code>abline(lm(curvas\$Absorbancia_2~curvas\$Concentración_real_2), col="yellow")</code>  | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos de la curva 2.               |
| 12 | <code>lines(curvas\$Absorbancia_1~curvas\$Concentración_real_1, col="grey", type="p", pch=16)</code>                                       | Grafica los puntos de la curva de calibración 1.                            |
| 13 | <code>abline(lm(curvas\$Absorbancia_1~curvas\$Concentración_real_1), col="grey")</code>  | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos de la curva 1.               |
| 14 | <code>legend(5, 0.5, c("1", "2", "3", "4", "5", "6"), lty=c(1,1,1,1,1,1), col=c("grey", "yellow", "green", "red", "blue", "black"))</code> | Agrega la leyenda a la imagen #16.  |
| 15 | <code>curva1 &lt;- lm(curvas\$Absorbancia_1~-1+curvas\$Concentración_real_1)</code><br><code>summary(curva1)</code>                        | Calcula la ecuación, el error estándar y el $R^2$ (ajustado) de la curva 1. |
| 16 | <code>curva2 &lt;- lm(curvas\$Absorbancia_2~-1+curvas\$Concentración_real_2)</code><br><code>summary(curva2)</code>                        | Calcula la ecuación, el error estándar y el $R^2$ (ajustado) de la curva 2. |

Continuación Tabla #23

| #  | Comando   | Descripción   |
|----|---|---|
| 17 | <code>curva3 &lt;- lm(curvas\$Absorbancia_3~-1+curvas\$Concentración_real_3)</code><br><code>summary(curva3)</code> | Calcula la ecuación, el error estándar y el $R^2$ (ajustado) de la curva 3. |
| 18 | <code>curva4 &lt;- lm(curvas\$Absorbancia_4~-1+curvas\$Concentración_real_4)</code><br><code>summary(curva4)</code> | Calcula la ecuación, el error estándar y el $R^2$ (ajustado) de la curva 4. |
| 19 | <code>curva5 &lt;- lm(curvas\$Asorbancia_5~-1+curvas\$Concentración_real_5)</code><br><code>summary(curva5)</code>  | Calcula la ecuación, el error estándar y el $R^2$ (ajustado) de la curva 5. |
| 20 | <code>curva6 &lt;- lm(curvas\$Absorbancia_6~-1+curvas\$Concentración_real_6)</code><br><code>summary(curva6)</code> | Calcula la ecuación, el error estándar y el $R^2$ (ajustado) de la curva 6. |

Tabla #24: Media de urea y coeficiente de variación (C.V. ) del triplicado

| Muestra | Urea (mg/dL) | C.V(%) |
|---------|--------------|--------|
| 1       | 1490.5869    | 2.4819 |
| 2       | 1641.2938    | 0.7988 |
| 3       | 1876.2400    | 1.4356 |
| 4       | 2657.4517    | 2.6116 |
| 5       | 2884.2820    | 3.6797 |
| 6       | 2682.4239    | 1.6796 |
| 7       | 1817.7636    | 2.2080 |
| 8       | 2256.0956    | 2.0418 |
| 9       | 1022.5807    | 1.5446 |
| 10      | 887.9585     | 2.6122 |
| 11      | 1500.4112    | 2.8689 |
| 12      | 2680.3620    | 2.6470 |
| 13      | 409.5322     | 1.2679 |
| 14      | 745.2590     | 3.0566 |
| 15      | 2135.8770    | 1.6638 |

Tabla #25: Algoritmo en R: pruebas de normalidad para objetivo 1

| Número | Comando  | Descripción  |
|--------|--|--|
| 1      | <code>data1 &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code> | Solicita la Tabla #24.   |
| 2      | <code>require(normtest)</code>                             | Paquete que solicita varios test de normalidad.  |
| 3      | <code>skewness.norm.test(data1\$Urea, nrepl=100)</code>    | Evalúa la normalidad con la prueba de hipótesis para asimetría y curtosis a través de la simulación de Monte Carlo con 100 repeticiones. |
| 4      | <code>Kurtosis.norm.test(data1\$Urea, nrepl=100)</code>    |  |
| 5      | <code>shapiro.test(data1\$Urea)</code>                     | Evalúa la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk   |
| 6      | <code>qqnorm(data1\$Urea)</code>                           | Proporciona los puntos del gráfico de normalidad (QQ)  |
| 7      | <code>qqline(data1\$Urea, col="black", lty=1)</code>       | Proporciona la línea de tendencia en el gráfico QQ   |
| 8      | <code>boxplot(urea)</code>                                 | Proporciona el diagrama de caja-bigotes.   |

Tabla #26: Ecuación de Iglewicz y Hoaglin (1993)

| Número de la ecuación | Estadístico                                  | Ecuación                                   | Especificaciones   | Cita                    |
|-----------------------|--|--|--|-------------------------|
| 1                     | Valores Z modificados de Iglewicz y Hoaglin. | $M_i = 0.6745 \frac{(x_i - \bar{x})}{MAD}$ | $\bar{x}$ = mediana<br>$x_i$ = valor i del conjunto de datos<br>MAD = <i>median absolute deviation</i> (desviación absoluta de la mediana) | (Dewan y Corner, 2013). |

Tabla #27: Concentraciones reales y absorbancias de los estándares de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 

| Concentración_real_1_A | Absorbancia_1_A |
|------------------------|-----------------|
| 5.00                   | 0.019           |
| 15.00                  | 0.069           |
| 25.00                  | 0.12            |
| 40.00                  | 0.18            |
| 55.00                  | 0.24            |
| Concentración_real_2_A | Absorbancia_2_A |
| 5.00                   | 0.016           |
| 15.00                  | 0.060           |
| 25.00                  | 0.11            |
| 40.00                  | 0.18            |

Imagen #17: Curvas de calibración para el cálculo de la concentración de amonio en orina

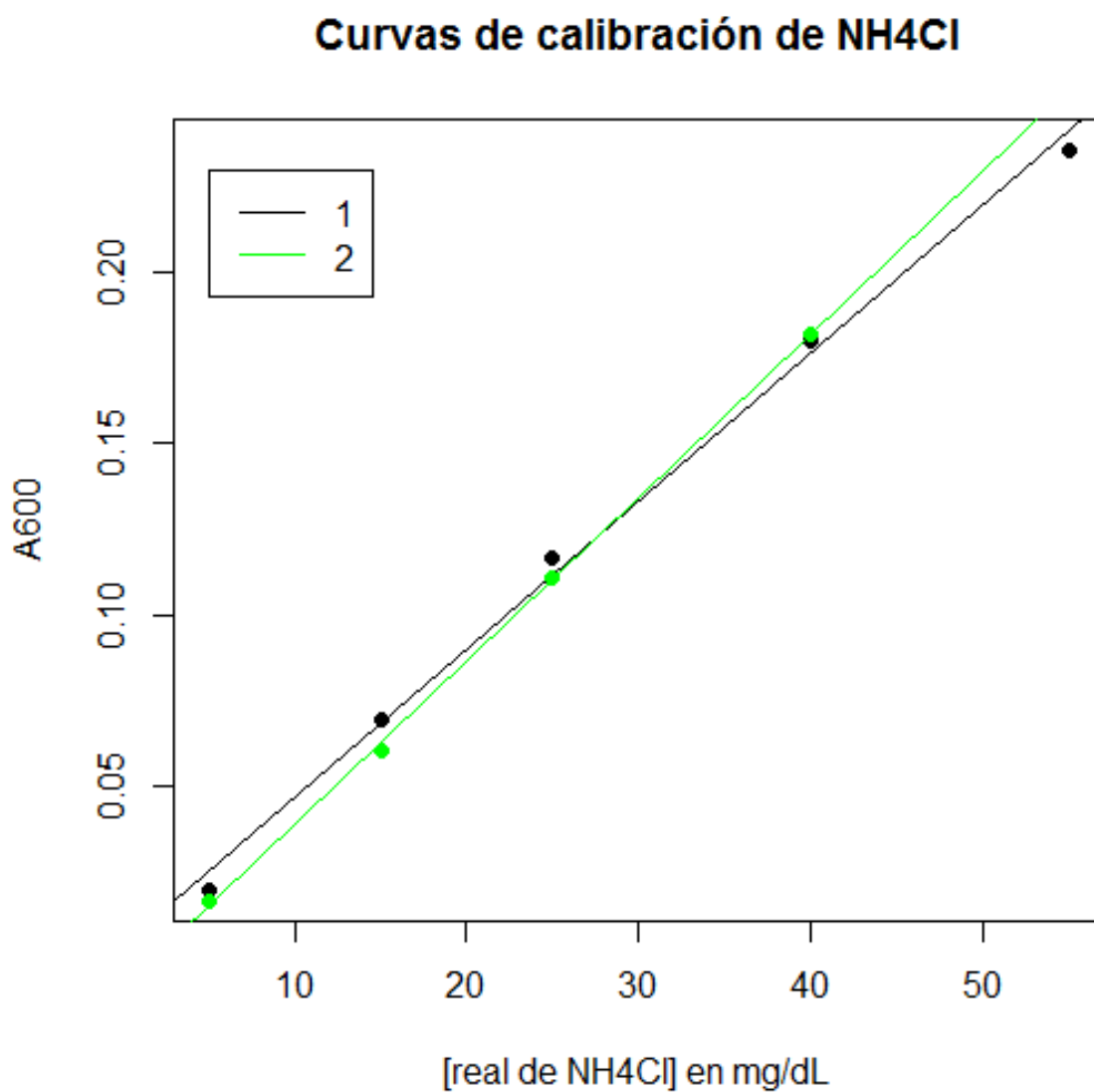


Tabla #28: Algoritmo en R: curvas de calibración de NH<sub>4</sub>Cl

| # | Comando   | Descripción  |
|---|---|--|
| 1 | <code>curvas_amonio1 &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la Tabla #27 para generar la Imagen #17.                        |
| 2 | <code>plot(curvas_amonio1\$Absorbancia_1_A~curvas_amonio1\$Concentración_real_1_A, ylab="A600", xlab="[real de NH4Cl] en mg/dL", main="Curvas de calibración de NH4Cl", col="black", pch=16)</code> | Grafica los puntos de la curva de calibración 1.                         |
| 3 | <code>abline(lm(curvas_amonio1\$Absorbancia_1_A~curvas_amonio1\$Concentración_real_1_A))</code>   | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos graficados de la curva 1. |
| 4 | <code>curvas_amonio2 &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita los datos de la curva 2, de la base de datos del cuadro 10.     |
| 5 | <code>lines(curvas_amonio2\$Absorbancia_2_A~curvas_amonio2\$Concentración_real_2_A, col="green", type="p", pch=16)</code>   | Grafica los puntos de la curva de calibración 2.                         |
| 6 | <code>abline(lm(curvas_amonio2\$Absorbancia_2_A~curvas_amonio2\$Concentración_real_2_A), col="green")</code>  | Grafica la línea de tendencia sobre los puntos graficados de la curva 2. |
| 7 | <code>legend(5, 0.23, c("1", "2"), lty=c(1,1), col=c("black", "green"))</code>  | Agrega la leyenda a la Imagen #17.                                       |
| 8 | <code>curva1A &lt;- lm(curvas_amonio1\$Absorbancia_1_A~1+curvas_amonio1\$Concentración_real_1_A)<br/>summary(curva1A)</code>  | Proporciona las características de la curva de calibración 1.            |
| 9 | <code>curva2A &lt;- lm(curvas_amonio2\$Absorbancia_2_A~1+curvas_amonio2\$Concentración_real_2_A)</code>   | Proporciona las características de la curva de calibración 2.            |

Tabla #29: Concentración de amonio total y amonio en aumento

C.V. = coeficiente de variación del triplicado

| Amonio total (mg/dL) | C.V. (%) amonio total | Amonio en aumento (mg/dL) | C.V. (%) amonio en aumento | Tipos de mezcla | Réplica | Día |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|---------|-----|
| 1646.13              | 5.56                  | 171.62                    | 30.50                      | 4               | 1       | 1   |
| 1458.18              | 14.42                 | 118.26                    | 13.62                      | 4               | 2       | 1   |
| 1609.16              | 10.10                 | 168.40                    | 10.16                      | 8               | 1       | 2   |
| 1298.78              | 11.23                 | 163.67                    | 17.25                      | 8               | 2       | 2   |
| 1562.22              | 19.59                 | 169.92                    | 8.24                       | 4               | 1       | 3   |
| 1670.66              | 10.28                 | 143.81                    | 14.90                      | 4               | 2       | 3   |
| 1762.62              | 10.53                 | 160.08                    | 20.02                      | 8               | 1       | 4   |
| 1726.6               | 13.57                 | 196.79                    | 15.65                      | 8               | 2       | 4   |
| 1588.08              | 15.52                 | 235.77                    | 1.69                       | 4               | 1       | 5   |
| 1576.59              | 14.24                 | 148.35                    | 17.45                      | 4               | 2       | 5   |
| 1925.09              | 19.55                 | 383.17                    | 4.01                       | 8               | 1       | 6   |
| 1665.29              | 2.54                  | 372.19                    | 8.38                       | 8               | 2       | 6   |
| 1648.43              | 7.29                  | 690.65                    | 5.57                       | 4               | 1       | 7   |
| 1909.18              | 0.62                  | 659.99                    | 1.53                       | 4               | 2       | 7   |
| 1726.41              | 2.10                  | 669.45                    | 17.44                      | 8               | 1       | 8   |
| 1592.1               | 3.50                  | 609.47                    | 10.06                      | 8               | 2       | 8   |
| 1412.97              | 13.82                 | 577.26                    | 24.13                      | 4               | 1       | 9   |
| 1620.46              | 10.56                 | 594.10                    | 4.52                       | 4               | 2       | 9   |
| 1740.78              | 2.45                  | 645.37                    | 15.37                      | 8               | 1       | 10  |
| 1688.28              | 7.33                  | 675.68                    | 14.46                      | 8               | 2       | 10  |

Tabla #30: Concentración de urea experimental

Diferencia = amonio total - amonio en aumento

| correlativo | días | mezcla | replica | diferencia |
|-------------|------|--------|---------|------------|
| 1           | 1    | 0      | 1       | 1474.51    |
| 2           | 2    | 0      | 1       | 1392.30    |
| 3           | 3    | 0      | 1       | 1352.31    |
| 4           | 4    | 0      | 1       | 1035.15    |
| 5           | 5    | 0      | 1       | 957.79     |
| 6           | 6    | 0      | 1       | 835.71     |
| 7           | 1    | 0      | 2       | 1339.92    |
| 8           | 2    | 0      | 2       | 1526.85    |
| 9           | 3    | 0      | 2       | 1428.24    |
| 10          | 4    | 0      | 2       | 1141.21    |
| 11          | 5    | 0      | 2       | 1249.19    |
| 12          | 6    | 0      | 2       | 1026.36    |
| 13          | 1    | 1      | 1       | 1440.75    |
| 14          | 2    | 1      | 1       | 1602.54    |
| 15          | 3    | 1      | 1       | 1541.92    |
| 16          | 5    | 1      | 1       | 1056.95    |
| 17          | 6    | 1      | 1       | 1095.41    |
| 18          | 1    | 1      | 2       | 1135.11    |
| 19          | 2    | 1      | 2       | 1529.81    |
| 20          | 3    | 1      | 2       | 1293.10    |
| 21          | 5    | 1      | 2       | 982.63     |
| 22          | 6    | 1      | 2       | 1012.60    |

Tabla #31: Algoritmo en R: modelos de regresión lineal, exponencial y logarítmico de la disminución en la concentración de urea experimental

| #                | Comando  | Descripción   |
|------------------|--|---|
| Regresión lineal |  |   |
| 1                | <code>datos &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>                             | Solicita la Tabla #30 para generar las Tablas #7.   |
| 2                | <code>reg1 &lt;- lm(datos\$diferencia~datos\$dias)</code>                              | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando la variable días.                       |
| 3                | <code>summary(reg1)</code>   | Proporciona las características de reg1.  |
| 4                | <code>reg2 &lt;- lm(datos\$diferencia~datos\$dias+datos\$mezcla)</code>                | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando las 2 variables: días y tipo de mezcla. |
| 5                | <code>summary(reg2)</code>   | Proporciona las características de reg2.  |
| 6                | <code>reg3 &lt;- lm(datos\$diferencia~datos\$dias+datos\$replica)</code>               | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando las 2 variables: días y réplica.        |
| 7                | <code>summary(reg3)</code>   | Proporciona las características de reg3.  |
| 8                | <code>reg4 &lt;- lm(datos\$diferencia~datos\$dias+datos\$replica+datos\$mezcla)</code> | Calcula la regresión lineal con 3 variables independientes.                                       |
| 9                | <code>summary(reg4)</code>   | Proporciona las características de reg4.  |

Continuación Tabla #31

| #                     | Comando  | Descripción  |
|-----------------------|--|--|
| 10                    | plot(dat\$Días, dat\$Diferencia, main="Urea calculada con los datos experimentales") | Grafica la concentración de urea calculada por diferencia en función del tiempo. |
| 11                    | abline(lm(datos\$Diferencia~datos\$dias), col="blue")                                | Grafica la curva de la ecuación 1.   |
| Regresión logarítmica |  |  |
| 12                    | datos <- read.table('clipboard', header=T)   | Solicita la Tabla #30 para generar la Tabla #8.                                  |
| 13                    | tras <- log(datos\$dias)   | Calcula el log de la variable independiente.                                     |
| 14                    | reg_ln_log <- lm(datos\$Diferencia~tras)   | Calcula la regresión logarítmica con 1 variable independiente.                   |
| 15                    | summary(reg_ln_log)  | Proporciona las características de reg_ln_log.                                   |
| 16                    | reg_lnm_log <- lm(datos\$Diferencia~tras+datos\$muestra)                             | Calcula la regresión logarítmica con 2 variables independientes.                 |
| 17                    | summary(reg_lnm_log)   | Proporciona las características de reg_ln_log.                                   |
| 18                    | reg_lnr_log <- lm(datos\$Diferencia~tras+datos\$replica)                             | Calcula la regresión logarítmica con 2 variables independientes.                 |
| 19                    | summary(reg_lnr_log)   | Proporciona las características de reg_lnr_log.                                  |
| 20                    | reg_lnrm_log <- lm(datos\$Diferencia~tras+datos\$replica+datos\$muestra)             | Calcula la regresión logarítmica con 3 variables independientes.                 |
| 21                    | summary(reg_lnrm_log)  | Proporciona las características de reg_lnrm_log.                                 |

Continuación Tabla #31

| #                     | Comando  | Descripción  |
|-----------------------|--|--|
| 22                    | <code>plot(dat\$Días, dat\$Diferencia, main="Urea calculada con los datos experimentales")</code>    | Grafica la concentración de urea calculada por diferencia en función del tiempo. |
| 23                    | <code>curve(reg_ln_log\$coefficient[1]+reg_ln_log\$coefficient[2]*log(x), add=T, col="black")</code> | Grafica la curva de la ecuación 5.   |
| Regresión exponencial |  |  |
| 24                    | <code>datos &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la Tabla #30 para generar la Tabla #9.                                  |
| 25                    | <code>logi &lt;- log(dat\$Diferencia)</code>   | Calcula el log de la diferencia.   |
| 26                    | <code>regalfa &lt;- lm(logi~dat\$Días)</code>  | Calcula la regresión logarítmica con 1 variable dependiente.                     |
| 27                    | <code>summary(regalfa)</code>  | Proporciona las características de regalfa.                                      |
| 28                    | <code>regbeta &lt;- lm(logi~dat\$Días+dat\$Mezcla)</code>  | Calcula la regresión logarítmica con 2 variable dependientes.                    |
| 29                    | <code>summary(regbeta)</code>  | Proporciona las características de regbeta.                                      |
| 30                    | <code>reggamma &lt;- lm(logi~dat\$Días+dat\$Mezcla+dat\$Réplica)</code>                              | Calcula la regresión logarítmica con 3 variable dependiente.                     |
| 31                    | <code>summary(reggamma)</code>   | Proporciona las características de reggamma.                                     |
| 32                    | <code>regkappa &lt;- lm(logi~dat\$Días+dat\$Réplica)</code>  | Calcula la regresión logarítmica con 2 variable dependiente.                     |
| 33                    | <code>summary(regkappa)</code>   | Proporciona las características de regkappa.                                     |

Continuación Tabla #31

| #  | Comando   | Descripción  |
|----|---|--|
| 34 | plot(dat\$Días, dat\$Diferencia, main="Urea calculada con los datos experimentales")    | Grafica la concentración de urea calculada por diferencia en función del tiempo. |
| 35 | curve(exp(regalfa\$coefficient[1])*exp(regalfa\$coefficient[2]*x), add=T, col="orange") | Grafica la curva de la ecuación 9.   |

Tabla #32: Amonio en aumento transformado con la función  $\ln()$ 

| correlativo | días | mezcla | replica | ln_amonio |
|-------------|------|--------|---------|-----------|
| 1           | 1    | 0      | 1       | 5.15      |
| 2           | 2    | 0      | 1       | 5.14      |
| 3           | 3    | 0      | 1       | 5.46      |
| 4           | 4    | 0      | 1       | 6.16      |
| 5           | 5    | 0      | 1       | 6.54      |
| 6           | 6    | 0      | 1       | 6.36      |
| 7           | 1    | 0      | 2       | 4.77      |
| 8           | 2    | 0      | 2       | 4.97      |
| 9           | 3    | 0      | 2       | 5.00      |
| 10          | 4    | 0      | 2       | 6.04      |
| 11          | 5    | 0      | 2       | 6.49      |
| 12          | 6    | 0      | 2       | 6.39      |
| 13          | 1    | 1      | 1       | 5.13      |
| 14          | 2    | 1      | 1       | 5.08      |
| 15          | 3    | 1      | 1       | 5.95      |
| 16          | 5    | 1      | 1       | 6.51      |
| 17          | 6    | 1      | 1       | 6.47      |
| 18          | 1    | 1      | 2       | 5.10      |
| 19          | 2    | 1      | 2       | 5.28      |
| 20          | 3    | 1      | 2       | 5.92      |
| 21          | 5    | 1      | 2       | 6.41      |
| 22          | 6    | 1      | 2       | 6.52      |

Tabla #33: Algoritmo en R: modelos y gráficas de regresión lineal y logarítmica del amonio en aumento

| #                | Comando  | Descripción  |
|------------------|--|--|
| Regresión lineal |  |  |
| 1                | <code>datos &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code> | Solicita la Tabla #32 para generar la Tabla #10.   |
| 2                | <code>reg1=lm(ln_amonio~dias+mezcla+replica)</code>        | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando las 3 variables: días, tipo de mezcla y réplica. |
| 3                | <code>summary(reg1)</code>                                 | Proporciona las características de reg1.   |
| 4                | <code>reg2=lm(ln_amonio~dias+replica)</code>               | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando las 2 variables: días y réplicas.                |
| 5                | <code>summary(reg2)</code>                                 | Proporciona las características de reg2.   |
| 6                | <code>reg3=lm(ln_amonio~dias+mezcla)</code>                | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando las 2 variables: días y tipo de mezcla.          |
| 7                | <code>summary(reg3)</code>                                 | Proporciona las características de reg3.   |
| 8                | <code>reg4=lm(ln_amonio~dias)</code>                       | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando las 1 variable: días.                            |

Continuación Tabla #33

| #  | Comando  | Descripción  |
|----|--|--|
| 9  | summary(reg4)  | Proporciona las características de reg4.   |
| 10 | plot(data\$dias, data\$amonio, xlab="Día", ylab="Amonio en mg/dL",<br>main="Ajuste exponencial y logarítmico de los datos originales \n de<br>amonio en aumento", ylim=c(100, 1000)) | Grafica los datos de amonio en aumento en función de los días.                             |
| 11 | curve(exp(reg3\$coefficient[1]+reg3\$coefficient[2]*x+reg_log\$coefficie<br>nt[3]*4), add=T, col="blue")   | Grafica la curva de la ecuación 14 con mezcla = 4.   |
| 12 | curve(exp(reg3\$coefficient[1]+reg3\$coefficient[2]*x+reg_log\$coefficie<br>nt[3]*8), add=T, col="red")  | Grafica la curva de la ecuación 14 con mezcla = 8.   |
| 13 | curve(exp(reg4\$coefficient[1]+reg4\$coefficient[2]*x), add=T,<br>col="black")   | Grafica la curva de la ecuación 13.  |
| 14 | plot(data\$Dias, log_amonio, xlab="Día", ylab="Ln (Amonio)",<br>main="Transformación logarítmica de los datos originales", ylim=c(4,<br>7))  | Grafica los datos transformados con ln ( ) de amonio en aumento<br>en función de los días. |
| 15 | curve(reg3\$coefficient[1]+reg3\$coefficient[2]*x+reg3\$coefficient[3]*4,<br>add=T, col="blue")  | Grafica la forma linealizada de la ecuación 14 con mezcla = 4.                             |

Continuación Tabla #33

| #                     | Comando  | Descripción   |
|-----------------------|--|---|
| 16                    | <code>curve(reg3\$coefficient[1]+reg3\$coefficient[2]*x+reg3\$coefficient[3]*8, add=T, col="red")</code> | Grafica la forma linealizada de la ecuación 14 con mezcla = 8.                        |
| 17                    | <code>curve(reg4\$coefficient[1]+reg4\$coefficient[2]*x, add=T, col="black")</code>                      | Grafica la forma linealizada de la ecuación 13.                                       |
| Regresión logarítmica |  |   |
| 18                    | <code>datos &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la Tabla # 29 para generar la Tabla #11.                                     |
| 19                    | <code>tras &lt;- log(data\$Dias)</code>  | Calcula el log de la variable independiente.  |
| #                     | Comando  | Descripción   |
| 20                    | <code>rega &lt;- lm(data\$amonio~tras+data\$Muestra)</code>  | Calcula el modelo de regresión logarítmico utilizando 2 variables independientes.     |
| 21                    | <code>summary(rega)</code>   | Proporciona las características de rega.  |
| 22                    | <code>regb &lt;- lm(data\$amonio~tras+data\$Replica)</code>  | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando 2 variables independientes. |
| 23                    | <code>summary(regb)</code>   | Proporciona las características de regb.  |
| 24                    | <code>regc &lt;- lm(data\$amonio~tras+data\$Muestra+data\$Replica)</code>                                | Calcula el modelo de regresión lineal múltiple utilizando 3 variables independientes. |
| 25                    | <code>summary(regc)</code>   | Proporciona las características de regc.  |

Continuación Tabla #33

| #  | Comando   | Descripción  |
|----|---|--|
| 26 | <code>plot(data\$dias, data\$amonio, xlab="Día", ylab="Amonio en mg/dL",<br/>                     main="Ajuste exponencial y logarítmico de los datos originales \n de<br/>                     amonio en aumento", ylim=c(100, 1000))</code> | Grafica los datos de amonio en aumento en función de los días. |
| 27 | <code>curve(reg5\$coefficient[1]+reg5\$coefficient[2]*log(x), add=T,<br/>                     col="green")</code>   | Grafica la curva de la ecuación 17.                            |

Tabla #34: Algoritmo en R: evaluación de supuestos de las regresiones lineales, exponenciales y logarítmicas

| #  | Comando  | Descripción   |
|--|--|---|
| 1  | <code>datos &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>         | Solicita las Tablas #29, #30 o #32.                                 |
| Normalidad                                 |  |   |
| 2  | <code>shapiro.test(reg3\$residuals)</code>                         | Evalúa la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk.                 |
| 3  | <code>coef(reg3)</code>  | Proporciona los coeficientes del modelo (pendiente e intercepto).   |
| 4  | <code>mean(reg3\$residuals)</code>                                 | Proporciona la media de los residuales.                             |
| 5  | <code>summary(reg3)</code>   | Proporciona la mediana y los intercuartiles 1 y 3 de los residuos.  |
| 6  | <code>boxplot(reg3\$residuals)</code>                              | Proporciona el diagrama de cada-bigotes de los residuales.          |
| 7  | <code>res=(reg3\$residuals)</code><br><br><code>t.test(res)</code> | Proporciona el intervalo de confianza (IC95%) de la media.          |
| Homocedasticidad (prueba de Breusch-Pagan) |  |   |
| 8  | <code>require(lmtest)</code>                                       | Solicita varias pruebas para evaluar modelos de regresión lineal.   |
| 9  | <code>bptest(reg3)</code>  | Evalúa la homogeneidad de varianzas con la prueba de Breusch-Pagan. |

Continuación Tabla #34

| #  | Comando      | Descripción  |
|--|--------------|--|
| 10   | dwtest(reg3) | Evalúa la independencia de los datos con la prueba de Durbin-Watson. |
| Multicolinealidad (Factor de Inflación de la Varianza) |              |  |
| 11   | vif(reg3)    | Evalúa la multicolinealidad entre variables regresoras con el VIF.   |

Tabla #35: Indicadores de la distribución de los residuales del modelo 14

| Media    | IC 95% |       | Mediana | 1Q     | 3Q    |
|----------|--------|-------|---------|--------|-------|
| 5.05e-18 | -0.013 | 0.103 | 0.013   | -0.167 | 0.205 |

Tabla #36: Estadísticos y valores p de las prueba de hipótesis para la evaluación de los supuestos de los residuos del modelo 14

| Test            | Estadístico | Valor p |
|-----------------|-------------|---------|
| Shapiro – Wilk  | 0.95        | 0.35    |
| Durbin – Watson | 2.00        | 0.38    |
| Breusch – Pagan | 1.82        | 0.40    |
| VIF             | 1.00        | N.A     |

N.A. = No Aplica

Imagen #18: Diagrama de caja-bigotes de los residuales del modelo 14

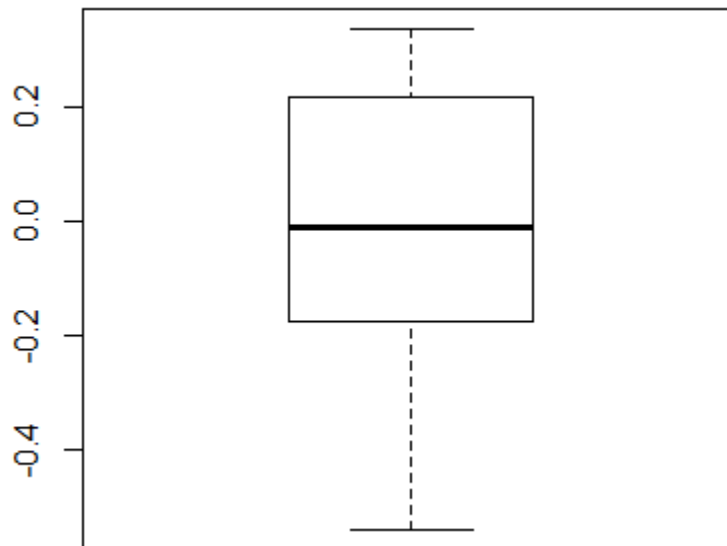


Tabla #37: Amonio total (base de datos para prueba t)

Base de datos para realizar la prueba t para comparar los dos tipos de mezcla de orina, en donde: 1 = mezcla de 4 muestras y 2 = mezcla de 8 muestras

| Grupo | Amonio_total |
|-------|--------------|
| 1     | 1646.13      |
| 1     | 1562.22      |
| 1     | 1588.08      |
| 1     | 1648.43      |
| 1     | 1412.97      |
| 1     | 1458.18      |
| 1     | 1670.66      |
| 1     | 1576.59      |
| 1     | 1909.18      |
| 1     | 1620.46      |
| 2     | 1609.16      |
| 2     | 1762.62      |
| 2     | 1925.09      |
| 2     | 1726.41      |
| 2     | 1740.78      |
| 2     | 1298.78      |
| 2     | 1726.6       |
| 2     | 1665.29      |
| 2     | 1592.10      |
| 2     | 1688.28      |

Tabla #38: Algoritmo en R: prueba t de muestras independientes para la comparación de las medias de amonio total

| #                    | Comando   | Descripción  |
|----------------------|---|--|
| 1                    | <code>amonio_total &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la Tabla #37.   |
| Análisis descriptivo |   |  |
| 2                    | <code>tapply(amonio_total\$Amonio_total, amonio_total\$Grupo, mean)</code>  | Proporciona la media de amonio total de cada grupo.  |
| 3                    | <code>tapply(amonio_total\$Amonio_total, amonio_total\$Grupo, sd)</code>  | Proporciona la desviación estándar de amonio total de cada grupo.  |
| 4                    | <code>t.test(datos\$Amonio_total[datos\$Grupo==1], datos\$Amonio_total[datos\$Grupo==2], var.equal=TRUE, paired=FALSE)</code> | Compara la igualdad de la media de los dos grupos mediante la prueba t para muestras independientes y varianzas iguales. |

Tabla #39: Prueba t para comprobar la igualdad de medias de los dos tipos de mezcla

| Prueba                         | Diferencia entre medias | Intervalo de confianza al 95% para la diferencia |       | Grados de libertad |
|--------------------------------|-------------------------|--|-------|--------------------|
|                                |                         | LI   | LS    |                    |
| t para muestras independientes | 64.22                   | -203.35  | 74.91 | 18                 |

Tabla #40: Algoritmo en R: evaluación de supuestos de la prueba t de muestras independientes para la comparación de los dos tipos de mezcla

| Número           | Comando   | Descripción   |
|------------------|---|---|
| 1                | <code>amonio_total &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la base de datos de la Tabla #37.  |
| Normalidad       |   |   |
| 2                | <code>tapply(amonio_total\$Amonio_total, amonio_total\$Grupo, shapiro.test)</code>  | Evalúa la normalidad de cada grupo con la prueba de Shapiro-Wilk.                               |
| Homocedasticidad |   |   |
| 3                | <code>bartlett.test(amonio_total\$Amonio_total~amonio_total\$Grupo)</code>  | Evalúa la homocedasticidad mediante la prueba de Bartlett.                                      |
| 4                | <code>plot(Amonio_total~Grupo, data=amonio_total, main="Comparación de las varianzas de los dos grupos", xlim=c(0, 3))</code>   | Proporciona los datos de amonio total respectivos en función del grupo correspondiente.         |
| 5                | <code>require(gplots)</code>  | Paquete que solicita varios tipos de gráficas.  |
| 6                | <code>plotmeans(amonio_total\$Amonio_total~amonio_total\$Grupo, connect=F, barcol="black", main="Gráfica de medias \n de los dos grupos con IC95%", xlab="Grupo", ylab="Amonio total (mg/dL)")</code> | Proporciona el gráfico de medias de cada grupo con el intervalo de confianza respectivo al 95%. |

Imagen #19: Comparación de la varianza de los dos tipos de mezcla

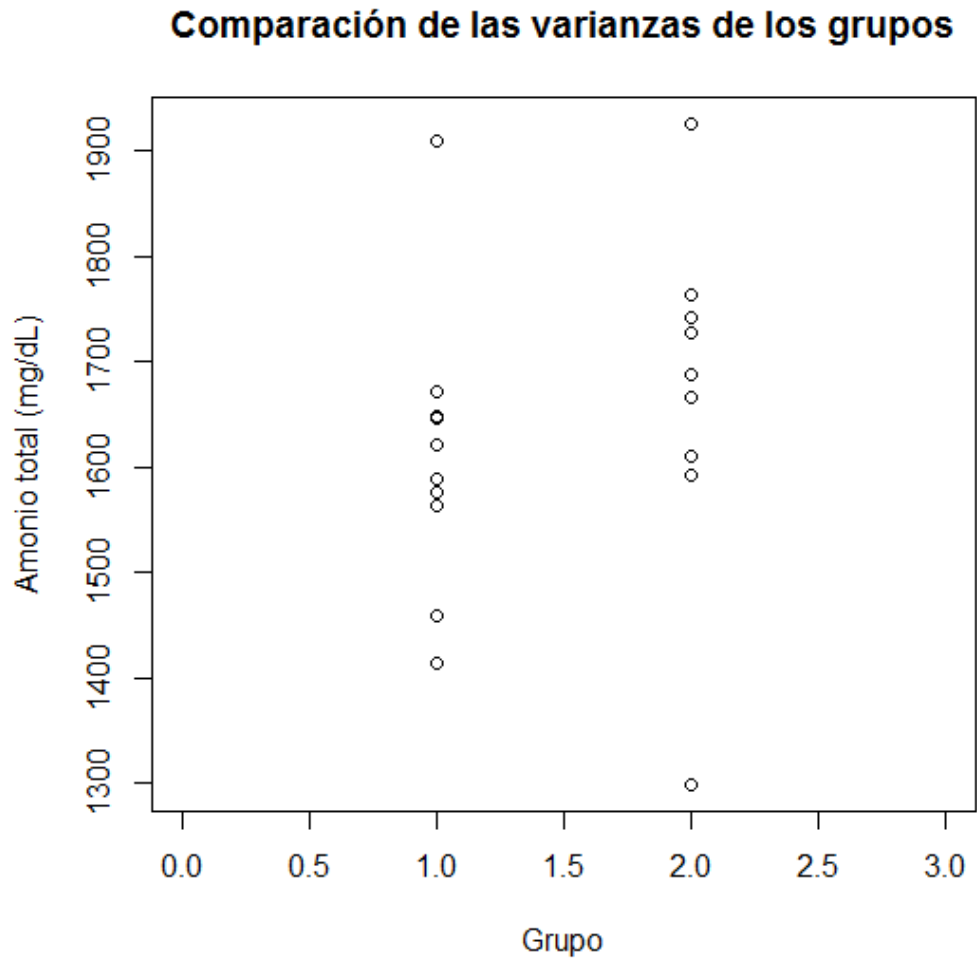


Imagen #20: Comparación de las medias e intervalos de confianza de los dos tipos de mezcla

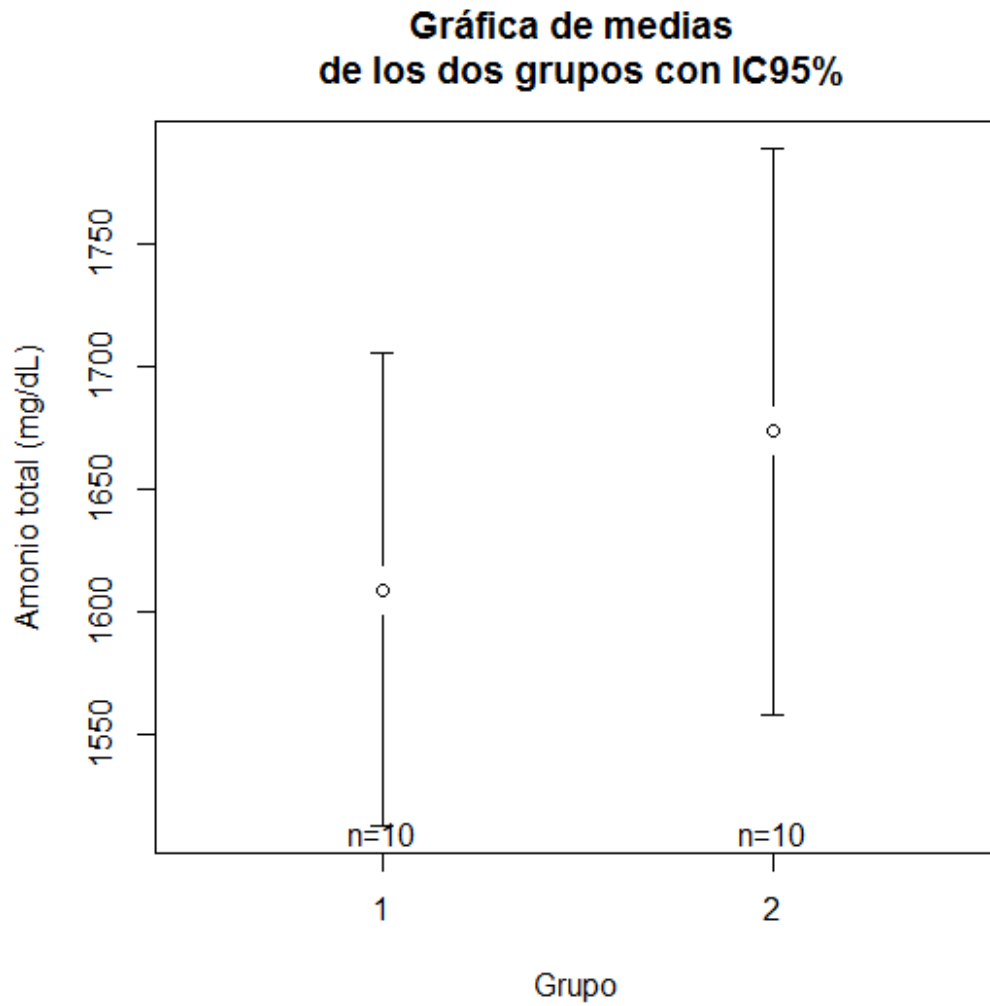


Tabla #41: Procedimiento para calcular el poder estadístico de la prueba t para la comparar los dos tipos de mezcla

| Paso | Especificación  |
|------|---|
| 1    | Ingresar a la interfase de G-Power versión 3.1.9.2  |
| 2    | Pinchar en “Tests”  |
| 3    | Colocarse en la pestaña “Means”   |
| 4    | Seleccionar la opción “Two independent groups”.   |
| 5    | Pinchar en “Type of power analysis”   |
| 6    | Seleccionar la opción “Post hoc: Compute achieved power – given $\alpha$ , sample size, and effect size”. |
| 7    | Pinchar en “Determine”, localizado en el cuadro titulado “Input Parameters”                               |
| 8    | Ingresar la media y la desviación estándar de cada grupo.   |
| 9    | Calcular el tamaño del efecto   |
| 10   | Transferir el valor del tamaño del efecto.  |
| 11   | Corregir el tamaño de n1 y n2.  |
| 12   | Calcular el poder estadístico.  |

Tabla #42: Procedimiento para graficar la distribución y la media de los valores de amonio total

| Paso | Comando   | Descripción   |
|------|---|---|
| 1    | <code>datos &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>  | Solicita la Tabla # 29.   |
| 2    | <code>filtro_mezcla_4 &lt;-<br/>data\$Amonio_total[data\$Mezcla==4]</code>  | Selecciona únicamente los datos correspondientes a la mezcla de 4 muestras de orina.  |
| 3    | <code>filtro_dia_4 &lt;- data\$Dia[data\$Mezcla==4]</code>  | Selecciona los días correspondientes a los valores de amonio total de la mezcla de 4 muestras de orina.                       |
| 4    | <code>plot(filtro_mezcla_4~filtro_dia_4,<br/>main="Constante de amonio total",<br/>xlab="Tiempo(Días)", ylab="Amonio total<br/>(mg/dL)", ylim=c(1000, 2200), col="purple")</code> | Grafica los valores de amonio total de la mezcla de 4 muestras en función de los días.  |
| 5    | <code>filtro_mezcla_8 &lt;-<br/>data\$Amonio_total[data\$Mezcla==8]</code>  | Selecciona únicamente los datos correspondientes a la mezcla de 8 muestras de orina.  |
| 6    | <code>filtro_dia_8 &lt;- data\$Dia[data\$Mezcla==8]</code>  | Selecciona los días correspondientes a los valores de amonio total de la mezcla de 8 muestras de orina.                       |
| 7    | <code>mean(data\$Amonio_total) #1641.4</code>   | Calcula la media de todos los datos de amonio total (1641.4mg/dL)   |
| 8    | <code>lines(filtro_mezcla_8~filtro_dia_8, type="p",<br/>col="orange")</code>  | Grafica los valores de amonio total de la mezcla de 8 muestras en función de los días sobre la gráfica obtenida en el paso 3. |
| 9    | <code>abline(1641.4, 0, col="black", lty=1, pch=2)</code>   | Traza una línea horizontal en y = 1641.4  |



Tabla #43: Concentración de urea antes y después de la neutralización (base de datos)

En donde 1 = Urea “antes”, 2 = Urea “después” y 3 = Urea “antes” – Urea “después”

| grupo | urea    |
|-------|---------|
| 1     | 891.7   |
| 1     | 2680.36 |
| 1     | 409.53  |
| 1     | 745.26  |
| 1     | 2135.88 |
| 2     | 965.16  |
| 2     | 2755.2  |
| 2     | 341.54  |
| 2     | 798.36  |
| 2     | 1828.15 |
| 3     | -73.46  |
| 3     | -74.84  |
| 3     | 67.99   |
| 3     | -53.1   |
| 3     | 307.73  |

Tabla #44: Algoritmo en R: comparar la concentración de urea antes y después de la neutralización

| # | Comando  | Descripción  |
|---|--|--|
| 1 | <code>datos_urea &lt;- read.table('clipboard',<br/>header=T)</code>                    | Solicita la Tabla #43.   |
| 2 | <code>diferencia &lt;-<br/>(datos_urea\$urea[datos_urea\$grupo==3])</code>             | Solicita las diferencias entre la concentración de urea antes de agregar KOH y HCl y la concentración de urea después de agregarlos. |
| 3 | <code>shapiro.test(diferencia)</code>  | Evalúa la normalidad de las diferencias.   |
| 4 | <code>t.test(hcl\$HCL[hcl\$grupo==1],<br/>hcl\$HCL[hcl\$grupo==2], paired=TRUE)</code> | Realiza la prueba t para muestras dependientes utilizando los valores de concentración de urea “antes” y “después”.                  |

Tabla #45: Procedimiento para calcular el poder estadístico de la prueba t para la comparar la concentración de urea antes y después de la neutralización

| Paso | Especificación  |
|------|---|
| 1    | Ingresar a la interfase de G-Power versión 3.1.9.2  |
| 2    | Pinchar en “Tests”  |
| 3    | Colocarse en la pestaña “Means”   |
| 4    | Seleccionar la opción “Two dependent groups (matched pairs)”.   |
| 5    | Pinchar en “Type of power analysis”   |
| 6    | Seleccionar la opción “Post hoc: Compute achieved power – given $\alpha$ , sample size, and effect size”. |
| 7    | Pinchar en “Determine”, localizado en el cuadro titulado “Input Parameters”                               |
| 8    | Ingresar la media y la desviación estándar de las diferencias   |
| 9    | Calcular el tamaño del efecto   |
| 10   | Transferir el valor del tamaño del efecto.  |
| 11   | Corregir el tamaño de N total a 5.  |
| 12   | Calcular el poder estadístico.  |

Tabla #46: Volúmenes y concentraciones de KOH en solución

| Muestra | KOH 5M             | C inicial (M) | V final (L) | V inicial (L) | C final (M) |
|---------|--------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| 1       | 2.8055 ± 0.0001 g* | 5             | 0.01000     | 0.01000       | N.A.        |
| 2       | 11.12 ± 0.010      | 5             | 0.02112     | 0.01112       | 2.632575758 |
| 3       | 10.01 ± 0.013      | 5             | 0.02001     | 0.01001       | 2.501249375 |
| 4       | 10.03 ± 0.013      | 5             | 0.02003     | 0.01003       | 2.503744383 |
| 5       | 10.01 ± 0.013      | 5             | 0.02001     | 0.01001       | 2.501249375 |

\* Para la muestra 1, la dimensional son gramos y para el resto es mililitros de KOH 5M

Tabla #47: HCl calculado y agregado (base de datos)

En donde 1 = HCl calculado y 2 = HCl agregado

| Grupo | HCL  |
|-------|------|
| 1     | 4.00 |
| 1     | 4.45 |
| 1     | 4.00 |
| 1     | 4.01 |
| 1     | 4.00 |
| 2     | 4.17 |
| 2     | 4.3  |
| 2     | 4.24 |
| 2     | 4.03 |
| 2     | 4.15 |

Tabla #48: Algoritmo en R: comparar HCl calculado y agregado

| # | Comando   | Descripción   |
|---|---|---|
| 1 | <code>hcl &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>  | Solicita la Tabla #47.  |
| 2 | <code>tapply(hcl\$HCL, hcl\$grupo, shapiro.test)</code>   | Evalúa la normalidad para los dos grupos separados de HCl agregado y HCl calculado.                                       |
| 3 | <code>require(car)</code>   | Paquete que incluye varias pruebas y opciones de regresión.   |
| 4 | <code>leveneTest(hcl\$HCL, hcl\$grupo)</code>   | Evalúa la homocedasticidad cuando los datos no son normales.  |
| 5 | <code>t.test(hcl\$HCL[hcl\$grupo==1],<br/>hcl\$HCL[hcl\$grupo==2], var.equal=TRUE,<br/>paired=FALSE)</code> | Realiza la prueba t para muestras independientes y varianzas iguales, utilizando los valores de HCl calculado y agregado. |

Tabla #49: Prueba de Shapiro-Wilk para HCl calculado y HCl agregado

| Prueba estadística | Grupo         | Valor p   |
|--------------------|---------------|-----------|
| Shapiro-Wilk       | HCl calculado | 0.0002183 |
|                    | HCl agregado  | 0.9103    |

Tabla #50: Prueba de Levene entre HCl calculado y HCl agregado

| Prueba estadística | Grupos comparados               | Valor p |
|--------------------|---------------------------------|---------|
| Levene             | HCl calculado y<br>HCl agregado | 0.8366  |

Tabla #51: Temperatura durante la medición del pH

| Muestra | T(°C) |
|---------|-------|
| 1       | 25    |
| 2       | 23    |
| 3       | 25    |
| 4       | 25.1  |
| 5       | 25.6  |

Imagen #21: Prueba de estabilidad

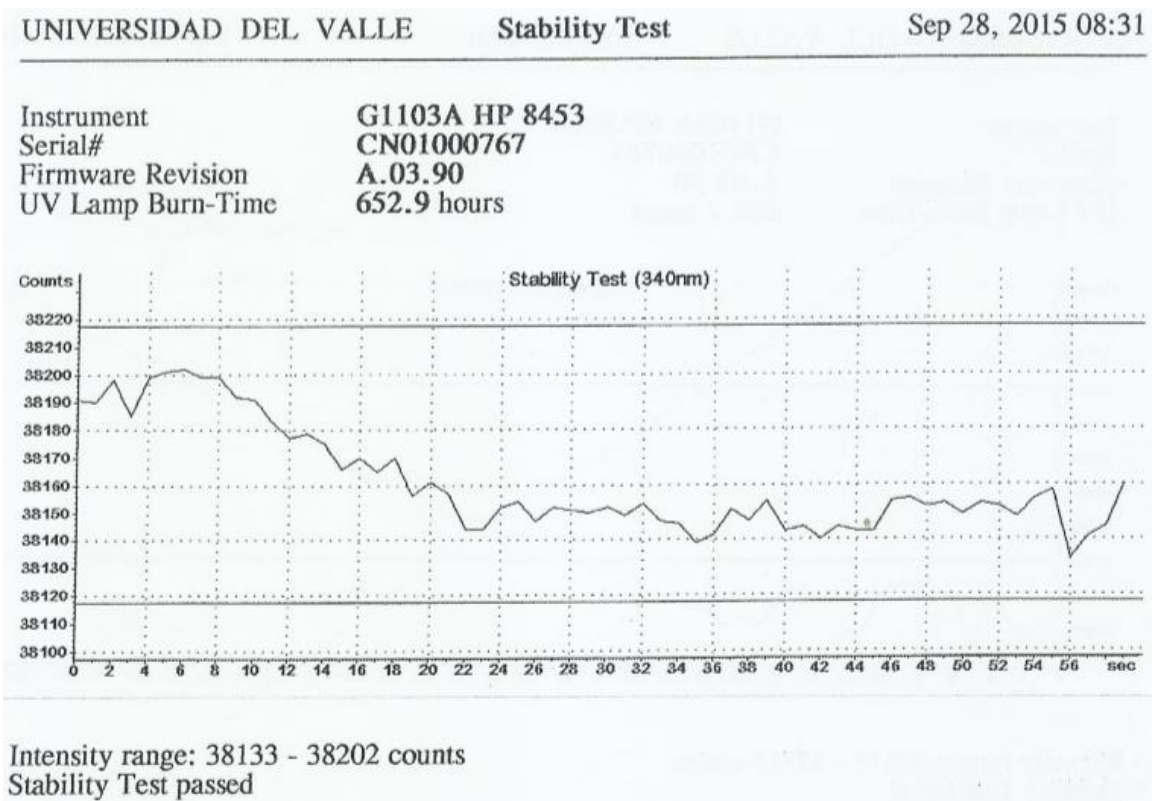
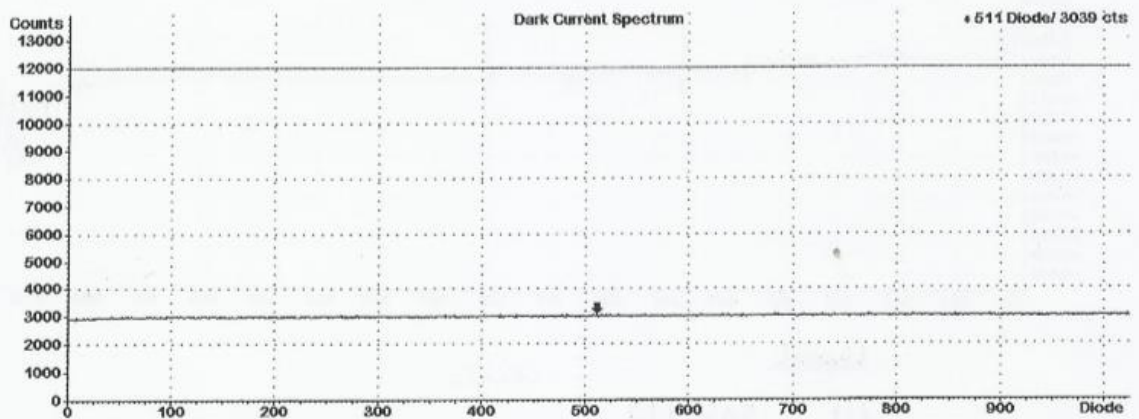


Imagen #22: Prueba del espectro de corriente oscura

UNIVERSIDAD DEL VALLE Dark Current Spectrum Sep 30, 2015 09:54

Instrument G1103A HP 8453  
 Serial# CN01000767  
 Firmware Revision A.03.90  
 UV Lamp Burn-Time 661.2 hours

Minimum/Maximum Values

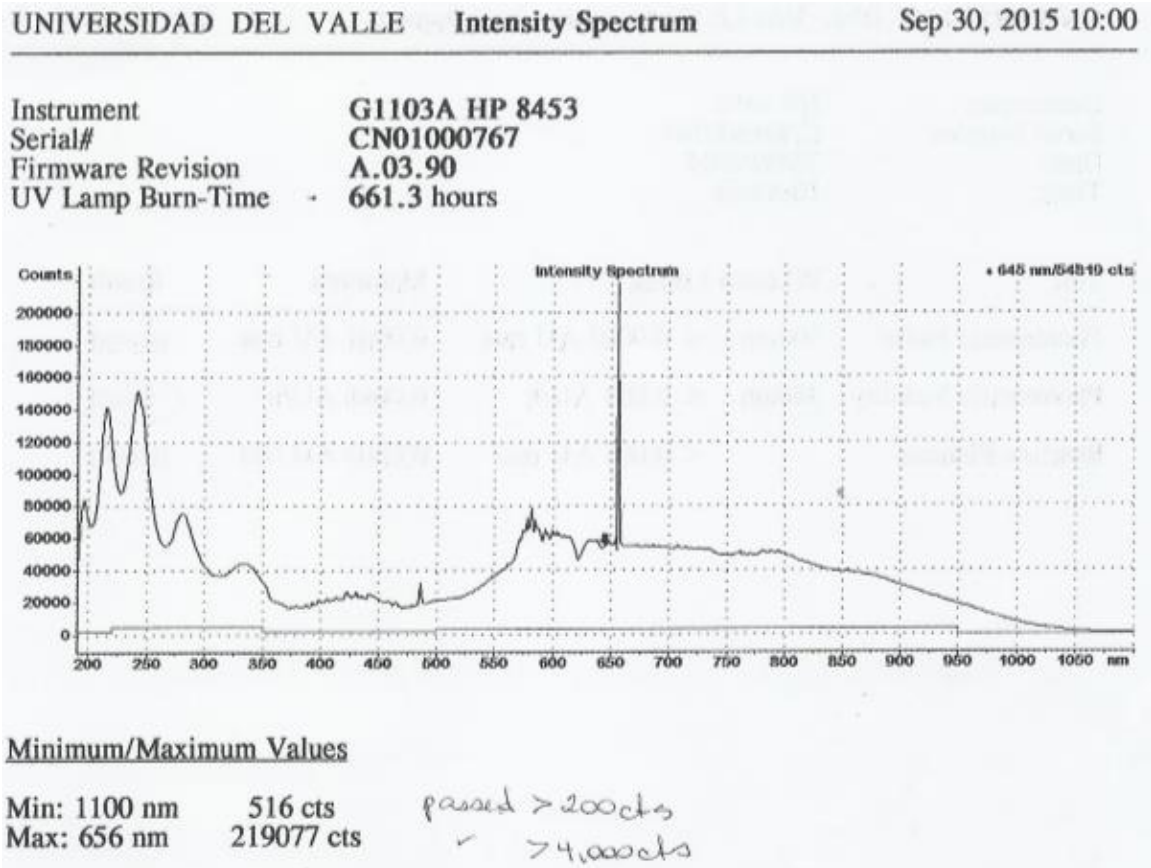
Min: 7 Diode 2892 cts  
 Max: 520 Diode 3052 cts

*passed*  $\geq 0$  cts

*passed*  $\leq 12,000$  cts

**Imagen #23:** Pruebas del ruido, la estabilidad fotométricos y monotonía de la línea base

| UNIVERSIDAD DEL VALLE Performance Test Report |            | Sep 28, 2015 10:49 |               |        |
|---|------------|--------------------|---------------|--------|
| Instrument:                                   | HP 8453    |                    |               |        |
| Serial Number:                                | CN01000767 |                    |               |        |
| Date:   | 28/09/2015 |                    |               |        |
| Time:   | 10:43:54   |                    |               |        |
| Test  | WL(nm)     | Limits             | Measured      | Result |
| Photometric Noise                             | 500nm      | < 0.0002 AU rms    | 0.0001 AU rms | passed |
| Photometric Stability                         | 340nm      | < 0.001 AU/h       | 0.0086 AU/h   | failed |
| Baseline Flatness                             |            | < 0.001 AU rms     | 0.0003 AU rms | passed |

**Imagen #24:** Prueba del espectro de intensidad

**Imagen #25:** Prueba del espectro del patrón de óxido de olmio

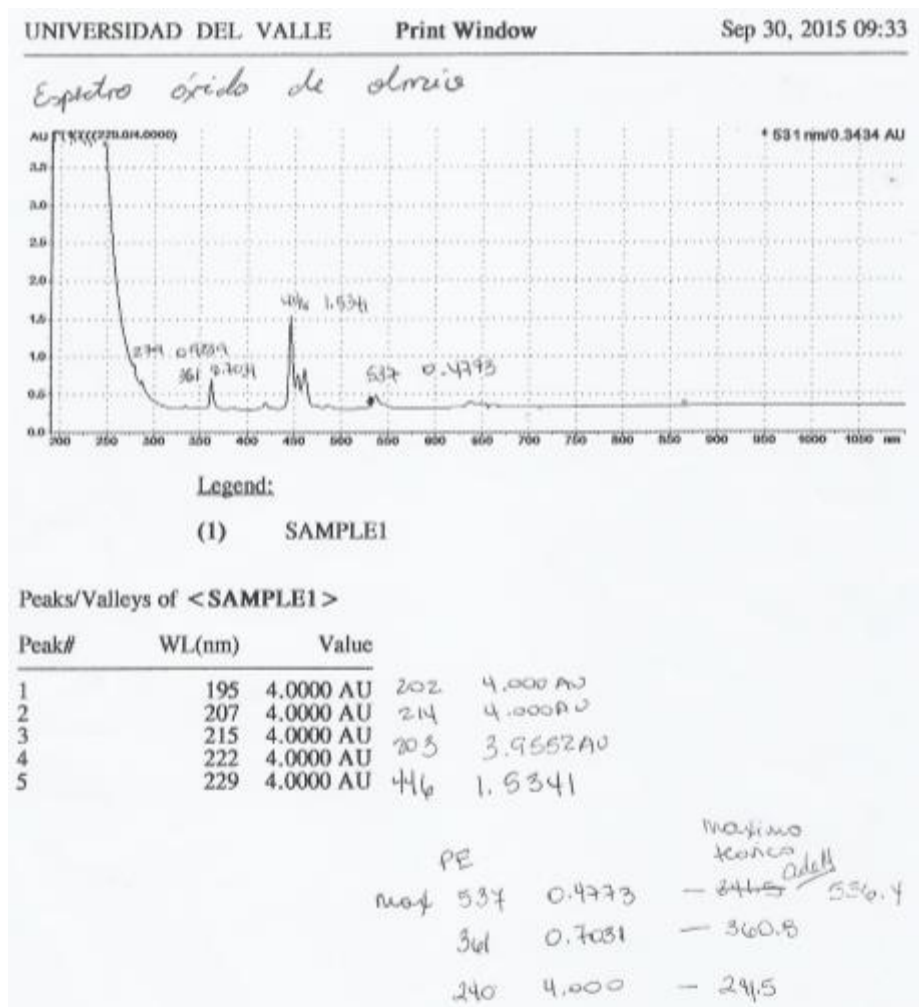


Tabla #52: Temperatura registrada y densidad del agua durante las mediciones de la precisión del pipeteo

| Pipeta        | T (°C) | Densidad |
|---------------|--------|----------|
| Eppendorf     | 24     | 0.997327 |
| Eppendorf     | 23     | 0.997569 |
| Transferpette | 24     | 0.997327 |
| Transferpette | 24     | 0.997327 |

Tabla #53: Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Eppendorf de 1000  $\mu$ L T( $^{\circ}$ C)

= 24

| # Vial | Inicial ( $\pm 0.00001$ g) | Final ( $\pm 0.00001$ g) | Diferencia ( $\pm 1.41421 \times 10^{-5}$ g) | mL H <sub>2</sub> O | $\mu$ L H <sub>2</sub> O |
|--------|----------------------------|--------------------------|--|---------------------|--------------------------|
| 1      | 2.5569                     | 3.54993                  | 0.99303                                      | 0.99569             | 995.69148                |
| 2      | 2.55702                    | 3.54221                  | 0.98519                                      | 0.98783             | 987.83047                |
| 3      | 2.49142                    | 3.48384                  | 0.99242                                      | 0.99508             | 995.07985                |
| 4      | 2.57176                    | 3.55127                  | 0.97951                                      | 0.98214             | 982.13525                |
| 5      | 2.50239                    | 3.48973                  | 0.98734                                      | 0.98999             | 989.98623                |
| 6      | 2.53658                    | 3.5189                   | 0.98232                                      | 0.98495             | 984.95278                |
| 7      | 2.6458                     | 3.62616                  | 0.98036                                      | 0.98299             | 982.98753                |
| 8      | 2.6022                     | 3.58467                  | 0.98247                                      | 0.98510             | 985.10318                |
| 9      | 2.4219                     | 3.40578                  | 0.98388                                      | 0.98652             | 986.51696                |
| 10     | 2.60413                    | 3.59277                  | 0.98864                                      | 0.99129             | 991.28972                |
| 11     | 2.63783                    | 3.63102                  | 0.99319                                      | 0.99585             | 995.85191                |
| 12     | 2.58066                    | 3.57275                  | 0.99209                                      | 0.99475             | 994.74896                |
| 13     | 2.63056                    | 3.61965                  | 0.98909                                      | 0.99174             | 991.74092                |
| 14     | 2.48007                    | 3.46874                  | 0.98867                                      | 0.99132             | 991.31980                |
| 15     | 2.5346                     | 3.52061                  | 0.98601                                      | 0.98865             | 988.65267                |
| 16     | 2.59801                    | 3.58849                  | 0.99048                                      | 0.99313             | 993.13465                |
| 17     | 2.58975                    | 3.58209                  | 0.99234                                      | 0.99500             | 994.99963                |
| 18     | 2.69588                    | 3.68568                  | 0.9898                                       | 0.99245             | 992.45283                |
| 19     | 2.58308                    | 3.57174                  | 0.98866                                      | 0.99131             | 991.30977                |
| 20     | 2.5659                     | 3.55453                  | 0.98863                                      | 0.99128             | 991.27969                |
| 21     | 2.63331                    | 3.61309                  | 0.97978                                      | 0.98241             | 982.40597                |
| 22     | 2.49345                    | 3.48225                  | 0.9888                                       | 0.99145             | 991.45015                |
| 23     | 2.46744                    | 3.45992                  | 0.99248                                      | 0.99514             | 995.14001                |
| 24     | 2.59892                    | 3.58736                  | 0.98844                                      | 0.99109             | 991.08918                |
| 25     | 2.5669                     | 3.55247                  | 0.98557                                      | 0.98821             | 988.21149                |
| 26     | 2.59503                    | 3.57744                  | 0.98241                                      | 0.98504             | 985.04302                |
| 27     | 2.58029                    | 3.56254                  | 0.98225                                      | 0.98488             | 984.88259                |
| 28     | 2.62335                    | 3.61389                  | 0.99054                                      | 0.99319             | 993.19481                |
| 29     | 2.59317                    | 3.58306                  | 0.98989                                      | 0.99254             | 992.54307                |
| 30     | 2.58883                    | 3.57772                  | 0.98889                                      | 0.99154             | 991.54039                |

Tabla #54: Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Eppendorf para medir 10  $\mu$ LT( $^{\circ}$ C) = 23

| Vial # | Inicial ( $\pm 0.00001$ g) | Final ( $\pm 0.00001$ g) | Diferencia ( $\pm 1.41421 \times 10^{-5}$ g) | mL H <sub>2</sub> O | $\mu$ L H <sub>2</sub> O |
|--------|----------------------------|--------------------------|--|---------------------|--------------------------|
| 1      | 2.59023                    | 2.59993                  | 0.0097                                       | 0.00972             | 9.72364                  |
| 2      | 2.43489                    | 2.44427                  | 0.00938                                      | 0.00940             | 9.40286                  |
| 3      | 2.45758                    | 2.46748                  | 0.0099                                       | 0.00992             | 9.92413                  |
| 4      | 2.63051                    | 2.6404                   | 0.00989                                      | 0.00991             | 9.91410                  |
| 5      | 2.5452                     | 2.55467                  | 0.00947                                      | 0.00949             | 9.49308                  |
| 6      | 2.49936                    | 2.50897                  | 0.00961                                      | 0.00963             | 9.63342                  |
| 7      | 2.65486                    | 2.66466                  | 0.0098                                       | 0.00982             | 9.82388                  |
| 8      | 2.59585                    | 2.60382                  | 0.00797                                      | 0.00799             | 7.98942                  |
| 9      | 2.59892                    | 2.60881                  | 0.00989                                      | 0.00991             | 9.91410                  |
| 10     | 2.58664                    | 2.59638                  | 0.00974                                      | 0.00976             | 9.76374                  |
| 11     | 2.65194                    | 2.6618                   | 0.00986                                      | 0.00988             | 9.88403                  |
| 12     | 2.64276                    | 2.6526                   | 0.00984                                      | 0.00986             | 9.86398                  |
| 13     | 2.57498                    | 2.58479                  | 0.00981                                      | 0.00983             | 9.83391                  |
| 14     | 2.45163                    | 2.46146                  | 0.00983                                      | 0.00985             | 9.85395                  |
| 15     | 2.59067                    | 2.60027                  | 0.0096                                       | 0.00962             | 9.62339                  |
| 16     | 2.56867                    | 2.57644                  | 0.00777                                      | 0.00779             | 7.78893                  |
| 17     | 2.59322                    | 2.60306                  | 0.00984                                      | 0.00986             | 9.86398                  |
| 18     | 2.59236                    | 2.60216                  | 0.0098                                       | 0.00982             | 9.82388                  |
| 19     | 2.44715                    | 2.45642                  | 0.00927                                      | 0.00929             | 9.29259                  |
| 20     | 2.46855                    | 2.47828                  | 0.00973                                      | 0.00975             | 9.75371                  |
| 21     | 2.5458                     | 2.55568                  | 0.00988                                      | 0.00990             | 9.90408                  |
| 22     | 2.64973                    | 2.65946                  | 0.00973                                      | 0.00975             | 9.75371                  |
| 23     | 2.63205                    | 2.64186                  | 0.00981                                      | 0.00983             | 9.83391                  |
| 24     | 2.6114                     | 2.62123                  | 0.00983                                      | 0.00985             | 9.85395                  |
| 25     | 2.6052                     | 2.61445                  | 0.00925                                      | 0.00927             | 9.27254                  |
| 26     | 2.48141                    | 2.49124                  | 0.00983                                      | 0.00985             | 9.85395                  |
| 27     | 2.45523                    | 2.46498                  | 0.00975                                      | 0.00977             | 9.77376                  |
| 28     | 2.58379                    | 2.59367                  | 0.00988                                      | 0.00990             | 9.90408                  |
| 29     | 2.61577                    | 2.62511                  | 0.00934                                      | 0.00936             | 9.36276                  |
| 30     | 2.58938                    | 2.59913                  | 0.00975                                      | 0.00977             | 9.77376                  |

Tabla #55: Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Transferpette para medir  
20 $\mu$ L

T( $^{\circ}$ C) = 24

| # Vial | Inicial ( $\pm 0.00001$ g) | Final ( $\pm 0.00001$ g) | Diferencia ( $\pm 1.41421 \times 10^{-5}$ g) | mL H <sub>2</sub> O | $\mu$ L H <sub>2</sub> O |
|--------|----------------------------|--------------------------|--|---------------------|--------------------------|
| 1      | 2.56791                    | 2.58757                  | 0.01966                                      | 0.01971             | 19.71269                 |
| 2      | 2.57182                    | 2.59143                  | 0.01961                                      | 0.01966             | 19.66256                 |
| 3      | 2.58988                    | 2.60966                  | 0.01978                                      | 0.01983             | 19.83301                 |
| 4      | 2.58249                    | 2.60196                  | 0.01947                                      | 0.01952             | 19.52218                 |
| 5      | 2.61974                    | 2.63903                  | 0.01929                                      | 0.01934             | 19.34170                 |
| 6      | 2.53617                    | 2.55553                  | 0.01936                                      | 0.01941             | 19.41189                 |
| 7      | 2.63071                    | 2.6501                   | 0.01939                                      | 0.01944             | 19.44197                 |
| 8      | 2.60458                    | 2.62406                  | 0.01948                                      | 0.01953             | 19.53221                 |
| 9      | 2.6443                     | 2.66367                  | 0.01937                                      | 0.01942             | 19.42191                 |
| 10     | 2.58698                    | 2.60655                  | 0.01957                                      | 0.01962             | 19.62245                 |
| 11     | 2.56742                    | 2.58663                  | 0.01921                                      | 0.01926             | 19.26149                 |
| 12     | 2.61258                    | 2.63194                  | 0.01936                                      | 0.01941             | 19.41189                 |
| 13     | 2.61467                    | 2.63395                  | 0.01928                                      | 0.01933             | 19.33167                 |
| 14     | 2.59366                    | 2.61287                  | 0.01921                                      | 0.01926             | 19.26149                 |
| 15     | 2.42974                    | 2.44926                  | 0.01952                                      | 0.01957             | 19.57232                 |
| 16     | 2.56738                    | 2.58681                  | 0.01943                                      | 0.01948             | 19.48208                 |
| 17     | 2.58395                    | 2.60339                  | 0.01944                                      | 0.01949             | 19.49210                 |
| 18     | 2.50684                    | 2.5263                   | 0.01946                                      | 0.01951             | 19.51216                 |
| 19     | 2.62391                    | 2.64342                  | 0.01951                                      | 0.01956             | 19.56229                 |
| 20     | 2.58419                    | 2.6036                   | 0.01941                                      | 0.01946             | 19.46202                 |
| 21     | 2.58602                    | 2.60537                  | 0.01935                                      | 0.01940             | 19.40186                 |
| 22     | 2.46046                    | 2.47989                  | 0.01943                                      | 0.01948             | 19.48208                 |
| 23     | 2.62657                    | 2.64605                  | 0.01948                                      | 0.01953             | 19.53221                 |
| 24     | 2.57533                    | 2.5949                   | 0.01957                                      | 0.01962             | 19.62245                 |
| 25     | 2.63015                    | 2.64986                  | 0.01971                                      | 0.01976             | 19.76283                 |
| 26     | 2.64123                    | 2.66092                  | 0.01969                                      | 0.01974             | 19.74277                 |
| 27     | 2.62609                    | 2.64553                  | 0.01944                                      | 0.01949             | 19.49210                 |
| 28     | 2.61238                    | 2.63198                  | 0.0196                                       | 0.01965             | 19.65253                 |
| 29     | 2.62324                    | 2.64271                  | 0.01947                                      | 0.01952             | 19.52218                 |
| 30     | 2.60176                    | 2.62114                  | 0.01938                                      | 0.01943             | 19.43194                 |

Tabla #56: Datos originales para la prueba de precisión de la pipeta Transferpette para medir  
10 $\mu$ L

T( $^{\circ}$ C) = 24

| #Vial | Inicial ( $\pm 0.00001$ g) | Final ( $\pm 0.00001$ g) | Diferencia ( $\pm 1.41421 \times 10^{-5}$ g) | mL H <sub>2</sub> O | $\mu$ L H <sub>2</sub> O |
|-------|----------------------------|--------------------------|--|---------------------|--------------------------|
| 1     | 2.56662                    | 2.57645                  | 0.00983                                      | 0.00986             | 9.85635                  |
| 2     | 2.58503                    | 2.59504                  | 0.01001                                      | 0.01004             | 10.03683                 |
| 3     | 2.5536                     | 2.56352                  | 0.00992                                      | 0.00995             | 9.94659                  |
| 4     | 2.59521                    | 2.60519                  | 0.00998                                      | 0.01001             | 10.00675                 |
| 5     | 2.60229                    | 2.61212                  | 0.00983                                      | 0.00986             | 9.85635                  |
| 6     | 2.56223                    | 2.57207                  | 0.00984                                      | 0.00987             | 9.86637                  |
| 7     | 2.5442                     | 2.55439                  | 0.01019                                      | 0.01022             | 10.21731                 |
| 8     | 2.54085                    | 2.55054                  | 0.00969                                      | 0.00972             | 9.71597                  |
| 9     | 2.55327                    | 2.56315                  | 0.00988                                      | 0.00991             | 9.90648                  |
| 10    | 2.6082                     | 2.61818                  | 0.00998                                      | 0.01001             | 10.00675                 |
| 11    | 2.626                      | 2.63585                  | 0.00985                                      | 0.00988             | 9.87640                  |
| 12    | 2.60098                    | 2.61093                  | 0.00995                                      | 0.00998             | 9.97667                  |
| 13    | 2.59362                    | 2.60358                  | 0.00996                                      | 0.00999             | 9.98669                  |
| 14    | 2.47707                    | 2.48709                  | 0.01002                                      | 0.01005             | 10.04686                 |
| 15    | 2.56407                    | 2.57392                  | 0.00985                                      | 0.00988             | 9.87640                  |
| 16    | 2.55716                    | 2.56642                  | 0.00926                                      | 0.00928             | 9.28482                  |
| 17    | 2.58386                    | 2.59329                  | 0.00943                                      | 0.00946             | 9.45527                  |
| 18    | 2.59186                    | 2.6016                   | 0.00974                                      | 0.00977             | 9.76610                  |
| 19    | 2.63232                    | 2.64205                  | 0.00973                                      | 0.00976             | 9.75608                  |
| 20    | 2.63435                    | 2.64462                  | 0.01027                                      | 0.01030             | 10.29753                 |
| 21    | 2.5779                     | 2.58756                  | 0.00966                                      | 0.00969             | 9.68589                  |
| 22    | 2.64299                    | 2.65282                  | 0.00983                                      | 0.00986             | 9.85635                  |
| 23    | 2.57911                    | 2.58901                  | 0.0099                                       | 0.00993             | 9.92653                  |
| 24    | 2.59543                    | 2.60515                  | 0.00972                                      | 0.00975             | 9.74605                  |
| 25    | 2.55394                    | 2.56372                  | 0.00978                                      | 0.00981             | 9.80621                  |
| 26    | 2.54562                    | 2.5554                   | 0.00978                                      | 0.00981             | 9.80621                  |
| 27    | 2.61361                    | 2.62324                  | 0.00963                                      | 0.00966             | 9.65581                  |
| 28    | 2.56911                    | 2.5787                   | 0.00959                                      | 0.00962             | 9.61570                  |
| 29    | 2.62742                    | 2.6372                   | 0.00978                                      | 0.00981             | 9.80621                  |
| 30    | 2.6319                     | 2.64126                  | 0.00936                                      | 0.00939             | 9.38509                  |

Tabla #57: Datos originales para la evaluación del comportamiento de la absorbancia después de cumplirse los 20 minutos de la reacción para la cuantificación de urea

| Tiempo (min) | A600   |
|--------------|--------|
| 20           | 0.4257 |
| 23           | 0.4336 |
| 26           | 0.4359 |
| 29           | 0.4376 |
| 32           | 0.4383 |
| 35           | 0.4393 |
| 38           | 0.4383 |
| 41           | 0.4383 |
| 44           | 0.4393 |
| 47           | 0.4435 |
| 50           | 0.4404 |
| 53           | 0.4411 |
| 56           | 0.4412 |
| 59           | 0.4413 |
| 62           | 0.4422 |
| 65           | 0.4421 |
| 68           | 0.4415 |
| 71           | 0.4428 |

Tabla #58: Algoritmo en R: graficar el comportamiento de la absorbancia después de haberse cumplido los 20 minutos de la reacción para la cuantificación de urea

| # | Comando  | Descripción  |
|---|--|--|
| 1 | <pre>tiempo &lt;- read.table('clipboard', header=T)</pre>  | Solicita la Tabla # 57.  |
| 2 | <pre>plot(A600~Tiempo, data=tiempo, main="Comportamiento de la absorbancia \n luego de 20 minutos de reacción", xlab="Tiempo(minutos)", xlim=c(20,75))</pre> | Grafica los puntos de la absorbancia en función del tiempo.  |
| 3 | <pre>require(calibrate)</pre>  | Paquete para elaboración de escalas calibradas con marcas de graduación en gráficos de dispersión. |
| 4 | <pre>textxy(tiempo\$Tiempo, tiempo\$A600, tiempo\$A600, col="black", cex=0.5)</pre>  | Añade los valores originales de la absorbancia como etiqueta a los puntos graficados.              |

## Continuación Tabla #59

Tabla #59: Datos originales de la concentración del patrón de urea

| Orden de medición | [urea] en mg/dL |
|-------------------|-----------------|
| 1                 | 56.19           |
| 2                 | 82.28           |
| 2                 | 50.82           |
| 3                 | 50.57           |
| 4                 | 54.00           |
| 4                 | 56.62           |
| 5                 | 7.16            |
| 5                 | 59.81           |
| 6                 | 54.94           |
| 7                 | 49.13           |
| 8                 | 50.37           |
| 9                 | 42.55           |
| 10                | 45.49           |
| 10                | 49.98           |
| 11                | 47.70           |
| 11                | 46.97           |
| 12                | 45.52           |
| 12                | 48.45           |
| 12                | 44.52           |
| 12                | 54.11           |
| 12                | 47.66           |
| 13                | 48.97           |
| 13                | 51.96           |
| 13                | 53.05           |

| Orden de medición | [urea] en mg/dL |
|-------------------|-----------------|
| 14                | 54.68           |
| 14                | 50.35           |
| 15                | 48.84           |
| 16                | 52.45           |
| 16                | 34.29           |
| 17                | 49.62           |
| 17                | 47.89           |
| 18                | 53.55           |
| 18                | 50.52           |
| 19                | 54.16           |
| 19                | 53.33           |
| 20                | 53.85           |
| 20                | 55.13           |
| 21                | 40.47           |
| 22                | 54.62           |
| 23                | 58.56           |
| 24                | 58.61           |
| 25                | 60.41           |
| 25                | 154.57          |
| 26                | 54.40           |
| 27                | 58.25           |
| 28                | 149.94          |
| 29                | 54.31           |
| 30                | 56.48           |
| 31                | 54.23           |
| 32                | 51.76           |

Continuación Tabla #59

| Orden de medición | [urea] en mg/dL |
|-------------------|-----------------|
| 33                | 54.57           |
| 34                | 55.13           |
| 35                | 54.03           |
| 36                | 53.67           |
| 37                | 53.90           |
| 38                | 54.03           |
| 39                | 54.42           |
| 39                | 54.90           |
| 40                | 56.91           |

Tabla #60: Algoritmo en R: graficar el comportamiento del patrón de urea en función del tiempo

| # | Comando  | Descripción   |
|---|--|---|
| 1 | <code>urea &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>  | Solicita la Tabla # 59.   |
| 2 | <code>plot(Concentración~Orden_de_Medición,<br/>data=urea, ylim=c(0, 100), xlab="Orden de<br/>medición", ylab="[urea] en mg/dL",<br/>main="Patrón de urea")</code> | Grafica la concentración del patrón de urea en función del orden en que fue medido.                           |
| 3 | <code>abline(50, 0, col="red", lty=2)</code>   | Traza una línea horizontal en $y = 50$ , para ilustrar la concentración teórico del patrón de urea (50 mg/dL) |

Tabla #61: Datos originales de la concentración del patrón de cloruro de amonio

| Día | Réplica_1  |
|-----|------------|
| 1   | 53.9952523 |
| 2   | 54.8807927 |
| 3   | 53.9952523 |
| 4   | 55.3122097 |
| 5   | 52.7464135 |
| 6   | 53.4730106 |
| 7   | 54.6310249 |
| 9   | 55.0170296 |
| 10  | 55.8571576 |
| 11  | 52.4527104 |
| 12  | 52.1383534 |
| 1   | 54.1769016 |
| 2   | 54.6991434 |
| 3   | 53.7454846 |
| 4   | 54.8126742 |
| 5   | 45.3214986 |
| 6   | 53.5865414 |
| 7   | 52.6555888 |
| 9   | 54.6310249 |
| 10  | 55.1532666 |
| 11  | 52.5200726 |
| 12  | 51.8464504 |

Tabla #62: Algoritmo en R: graficar el comportamiento del patrón de cloruro de amonio en función del tiempo

| # | Comando  | Descripción   |
|---|--|---|
| 1 | <code>nh4cl &lt;- read.table('clipboard', header=T)</code>   | Solicita la Tabla #61.  |
| 2 | <code>plot1 &lt;- plot(Réplica_1~Día, data=nh4cl, ylim=c(45,60), type="p", ylab="[NH4] en mg/dL", main="Patrón de NH4Cl")</code> | Grafica la concentración del patrón de cloruro de amonio en función del orden en que fue medido.      |
| 3 | <code>abline(50, 0, col="red", lty=2)</code>   | Traza una línea horizontal en $y = 50$ , para ilustrar la concentración teórico del patrón (50 mg/dL) |

