

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE WEST-GAEKE DE LA
P-ROSANILINA PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN AZÚCARES
EN EL LABORATORIO DE CALIDAD DE CONFORMIDAD DEL INGENIO
DEL CAUCA S.A.S**

ALEXIS JAVIER MUELAS PILLIMUÉ



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYAN
2019**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE WEST-GAEKE DE LA P-
ROSANILINA PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN AZÚCARES
EN EL LABORATORIO DE CALIDAD DE CONFORMIDAD DEL INGENIO
DEL CAUCA S.A.S**

ALEXIS JAVIER MUELAS PILLIMUÉ

**Proyecto de Trabajo de Grado en Modalidad de Pasantía
Requisito Parcial Para Optar el Título de Químico**

DIRECTOR

**Dr. GERMÁN CUERVO OCHOA
GRUPO DE INVESTIGACION GIPEL**

ASESOR

**JAIME ULPIANO SALAMANCA
ANALISTA QUÍMICO LABORATORIO CALIDAD INCAUCA S.A.S**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYAN**

2019

Nota de Aceptación

Director

German Cuervo Ochoa Ph.D.

Jurado

René Zúñiga Rengifo M.Sc.

Jurado

Jackeline Muñoz Zuñiga Ph.D.

Popayán, 28 de Febrero de 2019

DEDICATORIA

Quiero dedicar en primer lugar este trabajo a Dios, por guiarme en este camino y fortalecerme espiritualmente para empezar un camino lleno de éxitos.

A mis padres Edelmira Pillimue y Rodrigo Muelas por darme la vida y apoyarme durante este recorrido, que con gran esfuerzo y sacrificio lograron darme un estudio.

A mis hermanos Giovanni Anaya, Edy Hernán Pillimue y Martha Cecilia Muelas, por su apoyo en cada momento de mi vida.

A mi novia por darme la mano, comprenderme y ayudarme en este camino.

A mis compañeros de estudio Andrés Delgado, Jonatan Giraldo, Adrián Palechor, Leidy Conú, Eimy Ramírez y especialmente a Meliza Noriega por soportarme y ayudarme cuando más lo necesitaba.

A mis amigos de infancia Henry Flores, Andrés Felipe Castillo, Cristian León y Cristian Sánchez, por cada momento vivido.

A Vivian Astrid Zúñiga por acompañarme a mí y a mis padres en todo este tiempo convirtiéndose en un ser importante e incondicional para la familia.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia quienes han dado lo mejor de sí mismos y que con gran esfuerzo me dieron la posibilidad de poder lograr este objetivo.

Al profesor el Dr. Germán Cuervo Ochoa por su apoyo, su dedicación y confianza al aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección.

A la universidad del Cauca y al departamento de Química.

Al laboratorio de Calidad de Conformidad del ingenio Incauca S.A.S, a la directora y jefe Amalfi Otero, por acogerme y permitirme realizar la práctica profesional en tan prestigioso laboratorio, al Analista químico Jaime Ulpiano Salamanca, por su asesoría, enseñanza y tiempo dedicado.

A los jurados por su recepción y colaboración en el mismo.

A mis profesores por compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de ser no solo un profesional sino también un hombre con valores y ética.

A mis compañeros de carrera Meliza Noriega, Juan José Tobar, Andrés Delgado, Jonatan Giraldo, Adrián Palechor, Leidy Conú y Eimy Ramírez por todos los momentos compartidos durante mi trascurso por el alma máter.

A esas personas que de una u otra forma fueron parte de este proyecto de vida y me brindaron su apoyo incondicionalmente.

Muchas gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNICOS

- ANOVA** Análisis de varianza
- b** Intercepto de la curva en el eje Y
- CV** Coeficiente de variación
- EXT** Extracción
- F** Cociente de dos varianzas
- g** Gramos
- gl** Grados de libertad
- H_a** Hipótesis alternativa
- H₀** Hipótesis nula
- ICONTEC** Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
- ICUMSA** International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis
Comisión Internacional de Métodos Uniformes de Análisis del Azúcar
- ISO** International Organization for Standardization
- IEC** International Electrotechnical Commission
- IUPAC** International Union of Pure and Applied Chemistry LMP Límite
Máximo permitido
- LOD** Límite de detección
- LOQ** Límite de cuantificación
- m** Pendiente de la curva
- n** Número de lecturas o valores observados
- No** Número
- NTC** Norma técnica colombiana.
- P/P** Peso/Peso
- p** Significancia
- Pol** (Medición de la polarización)
- PGC** Proceso de gestión de calidad.
- R** Recuperación
- r** Coeficiente de correlación.

r² Coeficiente de regresión.

RSD Desviación estándar relativa.

RSDt Desviación estándar relativa total.

S Desviación estándar.

S.A.S Sociedad Anónima Simplificada

Sig Significancia.

SIGIN Sistema para la Gestión Industrial

SM Standard Methods.

SPSS Statistical Product and Service Solutions.

SRp Desviación estándar relativa de los recuperados.

t Valor estimado de la t de student

U Incertidumbre.

URP Incertidumbre de recuperación promedio

Xpro Promedio

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 13 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 14 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 15 |
| 4 OBJETIVOS | 17 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | 17 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 5 FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE | 18 |
| 5.1 PROCESO Y ELABORACIÓN DE AZÚCAR EN EL INGENIO DEL CAUCA S.A.S | 18 |
| 5.1.1 <i>Sulfitación, Pesaje y Alcalización</i> | 18 |
| 5.1.2 <i>Calentamiento y Clarificación</i> | 18 |
| 5.1.3 <i>Filtración</i> | 19 |
| 5.1.4 <i>evaporación</i> | 19 |
| 5.1.5 <i>Clarificación de Meladura</i> | 19 |
| 5.1.6 <i>Cristalización y Centrifugación</i> | 19 |
| 5.1.7 <i>Secado, Envase y Almacenamiento</i> | 20 |
| 5.2 NORMATIVIDAD | 21 |
| 5.3 ACREDITACIÓN | 21 |
| 5.4 VALIDACIÓN | 22 |
| 5.5 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO | 22 |
| 5.5.1 <i>Linealidad</i> | 22 |
| 5.5.2 <i>Sensibilidad</i> | 24 |
| 5.5.3 <i>Límites</i> | 25 |
| 5.5.4 <i>Exactitud</i> | 25 |
| 5.5.5 <i>Precisión</i> | 26 |
| 5.5.6 <i>Incertidumbre</i> | 26 |
| 5.5.7 <i>Robustez</i> | 30 |
| 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 30 |
| 5.6.1 <i>Pruebas de normalidad</i> | 30 |
| 5.6.2 <i>Pruebas paramétricas</i> | 31 |
| 5.6.3 <i>Pruebas no paramétricas</i> | 32 |
| 5.6.4 <i>Análisis de regresión lineal simple</i> | 33 |
| 5.7 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE | 33 |
| 5.7.1 <i>Método colorimétrico de West-Gaeke de la p-roanilina</i> | 34 |
| 5.7.2 <i>Características químicas y de toxicidad de los sulfitos</i> | 35 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6 | METODOLOGÍA | 37 |
| 6.1 | PREVALIDACIÓN | 37 |
| 6.2 | EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS | 37 |
| 6.2.1 | <i>Equipos</i> | 37 |
| 6.2.2 | <i>Materiales</i> | 38 |
| 6.2.3 | <i>Reactivos</i> | 38 |
| 6.3 | VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN MUESTRAS DE AZÚCAR | 40 |
| 6.3.1 | <i>Preparación de las curvas de calibración</i> | 40 |
| 6.3.2 | <i>Validación del sistema Instrumental</i> | 40 |
| 6.4 | VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA LA DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN MUESTRAS DE AZÚCAR | 41 |
| 6.4.1 | <i>Análisis en muestras de azúcar por Espectrofotometría UV-Vis</i> | 41 |
| 6.5. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS | 42 |
| 7. | RESULTADOS Y ANÁLISIS | 42 |
| 7.1 | VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN MUESTRAS DE AZÚCAR | 42 |
| 7.1.1 | <i>Pruebas de Normalidad</i> | 42 |
| 7.1.2 | <i>Evaluación de la sensibilidad y Linealidad Instrumental</i> | 45 |
| 7.1.3 | <i>Precisión Instrumental</i> | 48 |
| 7.1.4 | <i>Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación</i> | 49 |
| 7.2 | IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE SULFITOS | 50 |
| 7.2.1 | <i>Linealidad</i> | 51 |
| 7.2.2 | <i>Precisión y Exactitud</i> | 51 |
| 7.2.3 | <i>Análisis de las muestras por Espectrofotometría UV-Vis</i> | 52 |
| 7.2.4 | <i>Robustez y tolerancia</i> | 53 |
| 7.2.5 | <i>Estimación de la incertidumbre en la determinación de Sulfitos mediante la metodología de fuentes globales.</i> | 53 |
| 8. | CONCLUSIONES | 57 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 58 |

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1 Variables de control en la sulfitación de jugo. | 18 |
| Tabla 2 Datos para la preparación de las curvas de calibración de sulfitos en muestras de azúcar, la solución patrón en volumen de 100.00 mL. | 40 |
| Tabla 3 Diseño experimental para la implementación de la metodología en la determinación de Sulfitos en muestras de azúcar. | 41 |
| Tabla 4 Resultados de curvas de calibración de Sulfitos. | 43 |
| Tabla 5 Prueba de normalidad en función del día Shapiro-wilk. | 43 |
| Tabla 6 Prueba de normalidad en función del nivel de concentración Shapiro-wilk. | 44 |
| Tabla 7 Prueba ANOVA, el día como variable independiente. | 44 |
| Tabla 8 Prueba ANOVA, nivel de concentración como variable independiente. | 45 |
| Tabla 9 Prueba de Duncan. | 45 |
| Tabla 10 Pendientes, Interceptos y Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental para el método de determinación de sulfitos). | 46 |
| Tabla 11 Correlación de Pearson, Regresión lineal. | 46 |
| Tabla 12 Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto | 47 |
| Tabla 13 ANOVA para evaluar la Regresión lineal en las curvas de calibración. | 47 |
| Tabla 14 Curvas de calibración bajo condiciones de Repetibilidad. | 48 |
| Tabla 15 Evaluación de Curvas de calibración bajo condiciones de Precisión Intermedia. | 48 |
| Tabla 16 Precisión Instrumental Bajo Condiciones de Repetibilidad y Precisión Intermedia. | 49 |
| Tabla 17 Cálculo del Límite de Detección y Cuantificación. | 50 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 18 | Exactitud y Precisión del método. | 51 |
| Tabla 19 | Prueba estadística de homogeneidad de varianza para Sulfitos. | 51 |
| Tabla 20 | Exactitud y Precisión para la metodología global en la determinación de Sulfitos con base en la Mediana. | 52 |
| Tabla 21 | Resultados de análisis de muestras de la validación. | 52 |
| Tabla 22 | Resultados para Robustez y Tolerancia. | 53 |
| Tabla 23 | Contribución de las fuentes aleatorias. | 53 |
| Tabla 24 | Estimación de la contribución de las fuentes sistemáticas Sulfitos. | 54 |
| Tabla 25 | Evaluación de la significancia entre el factor 1 y el factor de recobro sulfitos. | 55 |
| Tabla 26 | Cálculo de la incertidumbre del método. | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | Pág. |
|-----------------|--|------|
| Figura 1 | Diagrama correspondiente al proceso elaboración de azúcar. | 21 |
| Figura 2 | a) Gráfica para la determinación del rango lineal, b) Curva de calibración respuesta vs concentración. | 23 |
| Figura 3 | Variación de la pendiente, a una mayor pendiente mejor discriminación de datos. | 25 |
| Figura 4 | Equipo espectrofotómetro UV-Vis utilizado para el análisis. | 34 |
| Figura 5 | Curva de Calibración para linealidad. | 46 |
| Figura 6 | Curva de Calibración de Sulfitos para Límites Críticos. | 50 |

ÍNDICE DE ESQUEMAS

| | | |
|------------------|---|----|
| ESQUEMA 1 | Reacción de Schiff (ácido para-rosanilina metilsulfónico) | 35 |
| ESQUEMA 2 | Disociación química del dióxido de azufre | 36 |

VALIDACIÓN DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE WEST-GAEKE DE LA P-ROSANILINA PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN AZÚCARES EN EL LABORATORIO DE CALIDAD DE CONFORMIDAD DEL INGENIO DEL CAUCA S.A.S

1. RESUMEN

Para la elaboración del azúcar se realizan diferentes procesos con el fin de obtener un producto final que cumpla con los estándares de calidad para el consumo humano, uno de estos es “la clarificación” que es usada para blanquear el azúcar, esta etapa se conoce como “sulfitación” se emplea óxido de azufre para obtener así una muestra clarificada y libre de impurezas. Sin embargo según la FAO y la OMS^[1], los sulfitos son alérgenos, que son consideradas sustancias indeseables en los alimentos, perjudiciales para la salud humana.

Este trabajo se inició con la elaboración e implementación de las curvas de calibración de SO₂ y los respectivos procesos para la determinación de la linealidad, repetibilidad y el rango de trabajo; seguidamente se trabajó con estándares y muestras de azúcar teniendo en cuenta las características analíticas típicas en la validación como son: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, robustez y tolerancia. Durante la etapa de validación del “método colorimétrico de (West-Gaeke) de la p-rosanilina”, se obtuvieron de forma experimental los valores estadísticos que sirvieron como criterios de confianza para el método analítico cumpliendo con la norma NTC-ISO/IEC 17025 ^[3] y con los procedimientos del sistema de gestión de calidad del laboratorio.

Para la determinación de sulfitos (SO₂) en muestras de azúcar blanco y crudo se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de (West-Gaeke) de la p-rosanilina, estipulado en el manual de métodos de la Comisión Internacional para la Uniformidad de métodos de Análisis de Azúcares (ICUMSA por sus siglas en inglés) ^[2], que se basa en la determinación colorimétrica de SO₂ por medio del color magenta formado por el complejo sulfito-rosanilina al reaccionar con formaldehído. Este complejo presenta absorbancia que puede medirse a 560 nm y es aplicable tanto para azúcar blanco como para azúcar crudo.

La metodología validada cumplió con los parámetros estadísticos requeridos como linealidad y precisión instrumental registrando coeficientes de variación menores al 5%, determinados en el laboratorio, se registraron límites de detección (LOD) límites de cuantificación (LOQ) de 0.22 mg SO₂ /kg y 0.72 mg SO₂ /kg, logrando validar una metodología sensible y lineal bajo los parámetros trabajados.

2. INTRODUCCIÓN

La industria azucarera colombiana se encuentra ubicada en el valle geográfico del río Cauca, en la zona sur occidental del país. En este valle como condición excepcional compartida únicamente por la zona norte del Ecuador, se presentan pronunciadas diferencias climáticas entre el día y la noche, condición necesaria para la concentración de sacarosa en la caña. Esta condición privilegiada permite moler caña y producir azúcar a lo largo del año, a diferencia de lo que ocurre en las demás zonas cañeras del mundo, en las cuales la cosecha de caña dura entre cuatro y seis meses. Como consecuencia, los costos fijos de inversión en fábrica, equipo de campo y capital de trabajo por tonelada de caña producida, son la mitad y hasta la tercera parte de los existentes en el promedio de las zonas cañeras del mundo.

Por lo tanto, hablar de caña de azúcar en Colombia es hacer referencia a una región que se extiende desde el norte del Cauca (Santander de Quilichao) hasta los límites con Ortigal Miranda lugar donde se encuentra ubicado la industria azucarera más grande de Colombia, quien hoy en día es la responsable de más del 37% de azúcar producido a nivel nacional. [5]

Colombia exporta alrededor de un millón de toneladas anuales, equivalentes a la mitad de la producción total de azúcar colombiana, lo cual los convierte en un oferente de tamaño medio alto dentro de los estándares del mercado internacional del azúcar. El azúcar colombiano es apetecido en el exterior por la calidad del producto, es por ello que el control sobre el proceso de producción debe ser meticuloso asegurando así el producto final de excelente calidad.

El Ingenio INCAUCA S.A.S ha mejorado su posición económica dentro del mercado nacional e internacional, lo cual se ha logrado con la implementación de equipos que proporcionan una sobresaliente producción, aumentando la eficiencia de la etapa de clarificación del jugo, dado que es un factor determinante en el proceso de elaboración de azúcar blanco, por los beneficios no sólo económicos, sino operacionales que esto representa. La calidad del producto final va de la mano de como se da la obtención del jugo clarificado, especialmente en términos de pureza y turbiedad, también depende del rendimiento de operaciones posteriores como la filtración, circulación en los tachos, la calidad de los productos y sobre todo el rendimiento en azúcar crudo que es el aspecto de mayor importancia.

La clarificación de meladura que es el jugo clarificado y concentrado por evaporación, es un punto importante dentro del proceso de producción de azúcar debido a que este paso proporciona limpieza al material en la elaboración del producto final por medio de la clarificación por flotación, la cual es usada en las industrias azucareras para remover las impurezas tanto solubles como insolubles, tales como sólidos suspendidos, materiales coloidales, sustancias colorantes y constituyentes de las cenizas; utilizando como agentes clarificantes: la cal, el calor, el pH, floculante y el proceso de sulfitación. [5]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con la competitividad del mercado de azúcar, la garantía de una mejor calidad del producto final, se viene traduciendo en uno de los factores más importantes de diferenciación entre los ingenios, fundamental en la consolidación de clientes cautivos y la obtención de un producto que cumpla con los estándares para el consumo humano. Adicionalmente, viene creciendo rápidamente la demanda por la mejora del sistema de clarificación de meladura para la obtención de azúcar de buena calidad, debido a la relación costo/beneficio desfavorable hasta el momento como lo indica (J. E. Larrahondo, Ph.D). Sin embargo, el proceso de clarificación por medio de la sulfitación sigue siendo reconocido como una herramienta eficiente para la seguridad de obtención de un azúcar de muy buenas características para quien lo consume, especialmente en condiciones adversas de la materia prima caña.

En la industria azucarera existen laboratorios que se encargan de llevar un control de calidad de sus productos y procesos, con el fin de suministrar información real, precisa y confiable, acerca de las características del producto terminado y de su obtención. Por ello, certificar que los métodos utilizados para realizar los análisis de muestras del producto final tengan un correcto desempeño y generen resultados confiables, conlleva a un problema crucial con las políticas de calidad para el laboratorio responsable. El ingenio del Cauca S.A.S cuenta con un laboratorio de Calidad de Conformidad certificado por la NTC ISO 9001 versión 2008 [4], conformado por laboratorios en los cuales se realizan los respectivos análisis de aguas, biocombustibles, producto terminado y materiales en proceso. Es aquí donde a las distintas muestras de azúcares tales como azúcar crudo natural, azúcar blanco, azúcar blanco especial y azúcar crudo exportación, se les realizan pruebas de color, humedad, pol, grados brix, contenido de sulfitos (SO₂) entre otros. La concentración de sulfitos es un parámetro determinante para la calidad y rendimiento del producto terminado.

El proceso industrial para la elaboración de azúcar implica la aplicación de varios procedimientos para extraer la sacarosa del jugo de caña, mediante cristalización y depurarlos de manera natural de impurezas que puedan resultar dañinas para el organismo. Sin embargo, en los últimos años han aparecido numerosos artículos en revistas médicas describiendo reacciones adversas tras la ingestión de sulfitos en diferentes alimentos, muchos de ellos infieren que uno de los mayores responsables son los azúcares [7]. Estas enfermedades no afectan solamente a personas adultas, sino que también se ven reacciones alérgicas en los niños. Ya fueron descritos los primeros casos de reacciones por sulfitos en pacientes con asma (J. B. Adams). También se presentan reacciones anafilácticas, respiratorias, dérmicas, gastrointestinales, conjuntivitis, hipotensión y jaqueca, tras la ingesta de alimentos que contienen esta clase de aditivos, con mayor frecuencia en personas con crisis de asma crónica.

Así, con el fin de poder lograr obtener el mayor rendimiento posible en el producto de elaboración y al mismo tiempo poder brindar un producto de buena calidad que cumpla con los estándares legales mínimos requeridos para su consumo, se realiza el proceso de “clarificación” que es usada para blanquear el azúcar cuando se elabora azúcar blanco estándar y azúcar refinado, ambos de consumo nacional e internacional. Este proceso consiste en quemar azufre en estado sólido y haciendo burbujear el producto de combustión que es el dióxido de azufre (SO_2) a través del jugo de la caña, para ser sulfitado. Sin embargo, en el proceso de sulfitación no es fácil realizar un control que evidencie la concentración exacta de sulfitos presente en una muestra y que a su vez cumpla con los niveles máximos permitidos según la norma del CODEX ALIMENTARIUS para los azúcares CODEX STAN 212-1999^[8]. Una forma de poder dar respuesta al problema, se realiza bajo la norma técnica colombiana NTC-ISO/IEC 17025 analizando las mejores condiciones para el desarrollo experimental mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis con el fin de llevar a cabo el proceso de validación en el laboratorio de Calidad de Conformidad del Ingenio del Cauca S.A.S.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Validar el método de determinación de sulfitos en azúcares utilizando la técnica analítica espectrométrica UV-Vis con el método colorimétrico de la para-rosanilina en el laboratorio de calidad del Ingenio del Cauca S.A.S.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar el proceso de validación del método analítico para la cuantificación de sulfitos en muestras de azúcares: azúcar crudo natural, azúcar blanco, azúcar blanco especial y azúcar crudo exportación.
- Aportar información para estudios de monitoreo y control de calidad con relación al contenido de sulfitos en muestras de azúcar blanco y crudo para el laboratorio de Calidad de Conformidad del Ingenio del Cauca.
- Evaluar los parámetros de calidad como: sensibilidad, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), incertidumbre, límites de detección y de cuantificación e intervalo lineal para la metodología a validar por espectrofotometría UV-Vis.

5. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

5.1.PROCESO Y ELABORACIÓN DE AZÚCAR EN EL INGENIO DEL CAUCA S.A.S ^[5]

5.1.1. Sulfitación, Pesaje y Alcalización

El jugo de caña extraído en los molinos que se conoce con el nombre de “jugo de primera extracción” pasa por las básculas para su pesaje, con el propósito de evaluar el rendimiento del proceso y la cantidad de jugo que resulta de la caña procesada ver (figura 1). Posteriormente se pre-encala con la adición de lechada de cal (Cal disuelta en agua y a una contracción de 6 a 10°Bé (grados Baumé) para evitar la inversión de sacarosa y se envía hacia un primer calentamiento (65°C) para posteriormente realizar el proceso de sulfitación y la segunda alcalización (jugo de caña a pH entre 7,0 – 7,6). ^[5]

TABLA 1. Variables de control en la sulfitación de jugo

| REQUISITOS DE ENTRADA | CONDICIONES DE PROCESO | REQUISITO DE SALIDA |
|------------------------------|---|---|
| Jugo mezclado pH 5.2 –5.5 | Descenso de pH del jugo por la absorción de vapores de SO ₂ (anhidro sulfuroso) en una torre de sulfitación) | Jugo sulfitado variable pH 4.2 – 4.6 |

La sulfitación consiste en la adición de SO₂ (dióxido de azufre) al jugo mezclado para conseguir los siguientes objetivos:

- Retirar no-azúcares y sulfato de calcio (CaSO₄) por reacciones de precipitación para conseguir azúcar de color blanco. Además, el CaSO₄ forma cristales gruesos que son una excelente ayuda filtrante.
- Reducir el ion férrico a ferroso, lo que disminuye el efecto catalizador del primero en las reacciones de oxidación de azúcares reductores y polifenoles (taninos, hidroxilos fenólicos de la antocianina en la corteza y escaretina en la fibra) que producen compuestos coloreados.

El proceso de sulfitación se hace con el fin de evitar la producción de compuestos coloreados durante los procesos siguientes. El azufre es quemado para producir dióxido de azufre (SO₂) que se pone en contacto con el jugo por medio de eyectores. Después de la sulfitación, el jugo es alcalinizado hasta un pH de 7,0 -7,6.

5.1.2. Calentamiento y Clarificación

Como la operación de sulfitación conlleva una disminución del pH del jugo (acidificación) y a valores bajos de éste se favorece la inversión de la sacarosa; se hace necesario neutralizar el jugo lo cual se consigue mediante la adición de

lechada de cal o también con la adición de Sacarato de Calcio. Posteriormente, el jugo es alimentado a un clarificador rápido de bajo tiempo de retención en el que las impurezas del jugo se precipitan por la acción de la gravedad. El proceso de clarificación, se ayuda con la adición de floculante que al entrar en contacto con el jugo agrupa las impurezas y las precipita ver (figura 1). El precipitado formado en el jugo alcalinizado es de composición compleja, tiene una parte más ligera y otra más pesada que el jugo y está formado por los productos de las reacciones de la cal con el SO₂ y el calentamiento secundario (90°C).

5.1.3. Filtración

Los lodos sedimentados en el clarificador, se conducen a la estación de filtros con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de sacarosa que contienen. La filtración consiste en tomar los lodos y adicionarle bagacillo (partícula fina de bagazo) para darle mayor consistencia y mejorar la filtrabilidad. Esta mezcla se procesa en los filtros con el objetivo de separar las impurezas en forma de torta llamada cachaza de la parte líquida (jugo filtrado) ver (figura 1).

Para facilitar la extracción de sacarosa de los lodos, se adiciona agua caliente sobre la torta de cachaza, para lavarla y llevarse el material azucarado con el jugo filtrado. La cachaza es enviada al proceso de compostaje para la producción de abonos orgánicos y el jugo filtrado es retornado al proceso de calentamiento de jugo para ser reprocesado en la clarificación.

5.1.4. Evaporación

El jugo clarificado se bombea a un sistema de evaporación de quintuple efecto para eliminarle parte del agua que contiene. Por medio de vapor y el vacío, los evaporadores concentran el jugo desde 15 a 68 - 70°Brix, dando como resultado la meladura o jarabe. Además, el vapor generado por la evaporación del agua en estos equipos es la fuente de calor para los demás procesos que lo necesitan: Calentamiento de Jugo y Cristalización ver (figura 1).

5.1.5. Clarificación de Meladura

La meladura pasa por un proceso de clarificación por flotación ver (figura 1). Este es un proceso donde se le adiciona a la meladura ácido fosfórico, cal y floculante para coagular. Teniendo en cuenta que las partículas que se deben extraer en este proceso son livianas, se le adiciona también pequeñas burbujas de aire micronizado para hacer flotar las impurezas y removerlas.

5.1.6. Cristalización y Centrifugación

Para la producción de azúcar a partir de la meladura se utiliza un sistema de dos templas o etapas ver (figura 1). Las diferentes templas se elaboran en los tachos, evaporadores de simple efecto que trabajan al vacío, que pueden ser batch o continuos.

En la primera etapa la meladura se pone en contacto con núcleos de azúcar (grano pequeño de azúcar) bajo condiciones controladas de temperatura y Brix. Tales núcleos generan puntos de cristalización de la sacarosa que contiene la meladura, creciendo hasta el tamaño deseado del azúcar a producir.

Debido a que los granos de azúcar se encuentran inmersos en el material líquido de la meladura que no se cristalizó, se envía hacia las centrifugas para separarlos, obteniendo el azúcar comercial y una miel de la primera etapa (miel A). En esta etapa se utiliza agua caliente para lavar el cristal y bajar el color del azúcar resultante.

La miel A se alimenta a una segunda etapa de cristalización, utilizando como núcleo suspensión alcohólica (mezcla de azúcar pulverizada y alcohol isopropílico) para inducir la formación de cristales a partir de la sacarosa contenida en ella, obteniendo la masa B. Esta masa se envía a otra etapa de centrifugación para separar los pequeños cristales de azúcar (semilla B) de la miel Generada (miel B).

Los pequeños cristales de azúcar resultantes de esta etapa (semilla B) son los núcleos utilizados en la primera etapa de cristalización.

La miel B se envía a la destilería como materia prima para la producción de alcohol por su alto contenido de azúcares fermentables.

5.1.7. Secado, Envase y Almacenamiento

El azúcar producido en la primera etapa de cristalización sale con una humedad menor al 1% y se debe secar antes de envasarlo, para tal fin, se hace pasar por secadoras rotatorias en las que se ponen en contacto en contracorriente el azúcar húmedo y aire seco, para disminuir el contenido de humedad del azúcar.

El azúcar seco y frío se lleva a tolvas que alimentan a las envasadoras de azúcar en las diferentes presentaciones con que se surten los mercados nacional e internacional. Una vez envasado el azúcar se lleva a las bodegas de producto terminado donde se almacena y/o se carga en vehículos para su distribución ver (figura 1).

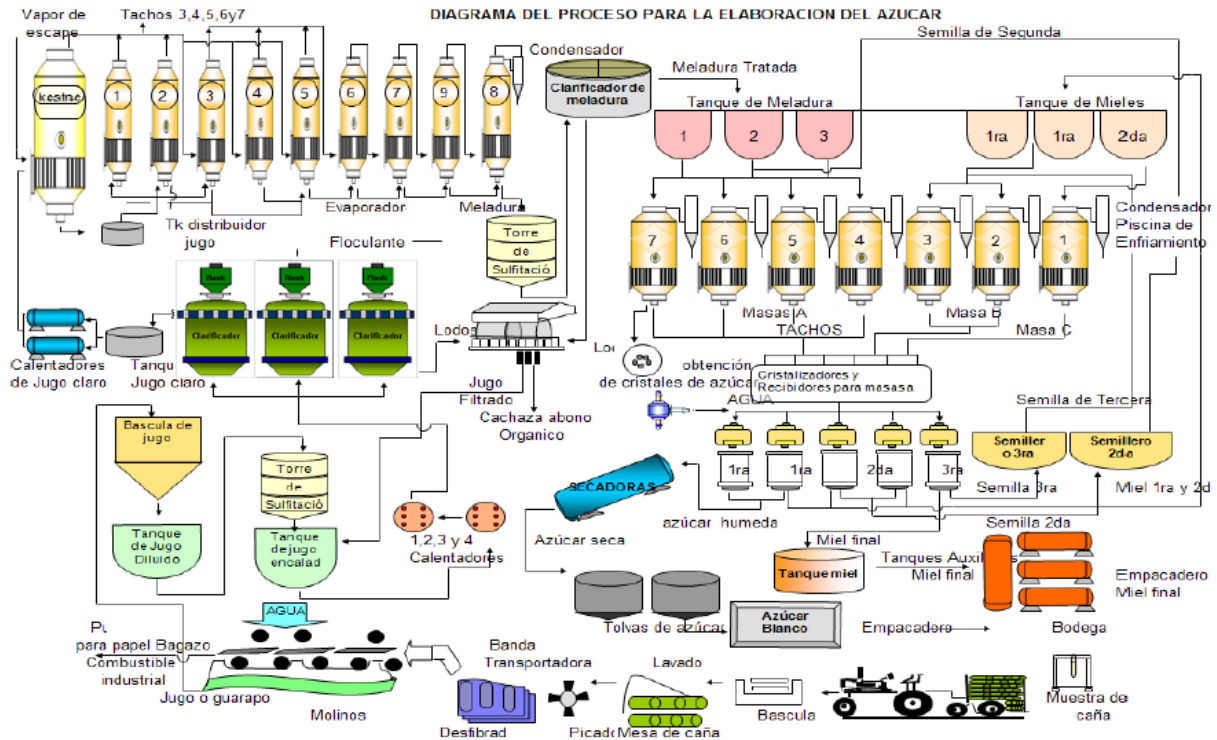


Figura 1. Diagrama correspondiente al proceso elaboración de azúcar.

5.2. NORMATIVIDAD

- ✓ **CODEX STAN 212-1999 - Norma del Codex para los azúcares:** este reglamento técnico establece los requisitos que debe cumplir el azúcar destinado al consumo humano que sea producido y comercializado en la república de Colombia. Incluye el azúcar vendido directamente al consumidor final y el azúcar utilizado como ingrediente en la industria alimentaria, deben enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables, para sulfitos (SO₂) se toma como valor máximo permisible para azúcar blanco (150 mg/kg) y para azúcar crudo (350mg/kg). [8,9]
- ✓ **Políticas de Calidad**

Con el fin de garantizar a sus clientes y proveedores productos de la mejor calidad, bajo los más altos estándares de higiene y seguridad, así como una mayor eficiencia y productividad en los procesos, el ingenio del Cauca se ha certificado en la producción de azúcares, que aseguran no sólo la calidad de sus productos, sino también el compromiso que ha adquirido con el país, estos son:

Sello de calidad ICONTEC a los azúcares
 Certificación de Aseguramiento de la Calidad ISO 9001 versión 2008.
 Certificación del Sistema de Gestión ambiental ISO 14001 versión 2004.[4]

5.3. ACREDITACIÓN

La acreditación es la herramienta establecida a escala internacional para generar confianza sobre la actuación de un tipo de organización que se denomina de manera general organismo de evaluación de la conformidad y que abarca a los laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, entidades de inspección, entidades de certificación y verificadores ambientales.^[10] El proceso de acreditación de un laboratorio ante una organización como el IDEAM o por el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia ONAC proporciona reconocimiento y mayor confianza y los servicios ofrecidos garantizan la adopción de un sistema de gestión de calidad a todos sus procesos organizativos, además asegura su competencia técnica dando peso a unos resultados satisfactorios.^[11,12]

ISO/IEC 17025. La norma técnica colombiana NTC. ISO/IEC 17025 fue ratificada por el concejo directivo ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) en 2005-10-26. En esta norma se establecen los requisitos generales para la competencia de laboratorios en la realización de muestreos, ensayos y calibraciones, en donde al cumplirlos se debe demostrar que funcionan con un sistema de calidad, siendo así técnicamente competentes y se encuentran capacitados para generar resultados válidos y confiables.^[4]

5.4. VALIDACIÓN

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable.^[14]

Para este trabajo se propone realizar una validación menor, puesto que se trata con métodos normalizados y se adecúan haciendo mínimas modificaciones o ninguna.^[14]

5.5. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

Para demostrar objetivamente que se cumple con los requisitos exigidos para cada uno de los métodos se realiza la determinación estadística de figuras analíticas de mérito como son: intervalo de respuesta lineal, linealidad, sensibilidad, LOD, LOQ, precisión, exactitud y robustez.^[14]

5.5.1. LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la concentración del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar un gráfico de respuesta versus concentración, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP (límite máximo permitido) o al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores). Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el intervalo lineal (fig.2a). Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la curva de trabajo o curva de calibración (fig.2b). Se deben graficar los datos de concentración de la lectura observada (Y) v/s los estándares de calibración estimados (X). [14]

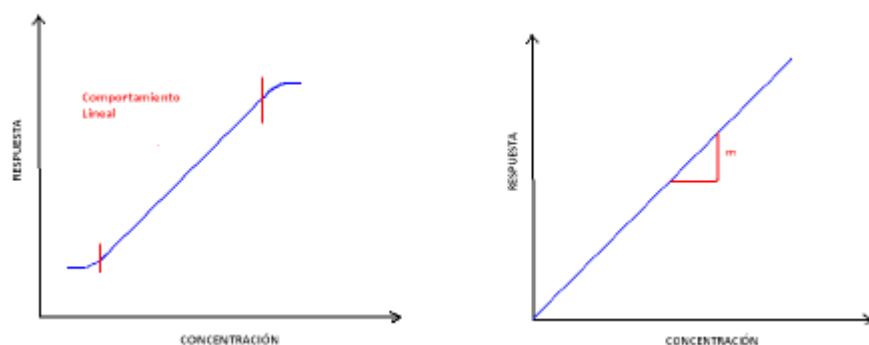


Figura 2. a) Gráfica para la determinación del rango lineal, b) Curva de calibración respuesta vs concentración.

Se evalúan los estimadores de regresión lineal del gráfico: pendiente (m), coeficiente de correlación (r), punto de corte (intercepto) con el eje de la ordenada (b).

$$Y = mx + b$$

Ecuación 1

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación:

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1 . El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando $r = 0$, no existe correlación alguna, por lo que existiría independencia total de los valores X e Y. [14]

En la práctica, si r tiene un valor cercano a uno (1), esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor

o igual a 0,999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99.

Se puede realizar una evaluación de curva de calibración global (construida con más de una curva de calibración de las mismas características) en la cual se puede realizar una evaluación estadística de prueba t - student, como un mejor indicador del modelo lineal. Se calcula un valor de t con n-2 grados de libertad y se compara con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0,05$), dos-colas, en este caso para un "n" (observaciones) que depende de los niveles de calibración.

Se desea probar si existe entonces una correlación significativa: planteando la hipótesis nula H_0 "no existe correlación significativa entre las variables x e y". Si el valor observado de " t_r " es mayor que " t_{cri} " este valor crítico se obtiene de la tabla de t-student para un determinado porcentaje de confiabilidad (normalmente se utiliza el 95% de confianza, es decir, un valor α de 0,05) ver (Anexo A), teniendo en cuenta esto se debe rechazar la hipótesis nula H_0 , siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada. [14]

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

t_r = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación.

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación.

$n - 2$ = Número de grados de libertad.

r^2 = Valor del coeficiente de determinación.

5.5.2 SENSIBILIDAD

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. [14]

En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración (figura 3).

Se calcula como:

$$m = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / n)} \quad \text{Ecuación 3}$$

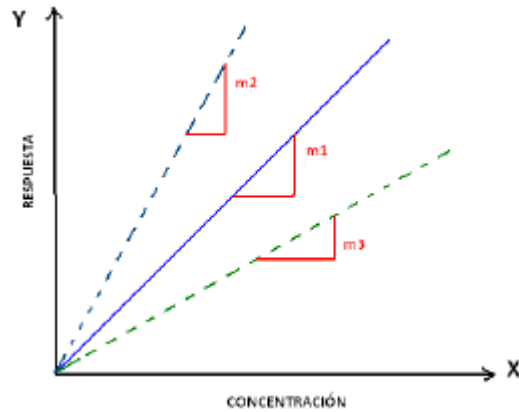


Figura 3. Variación de la pendiente, a una mayor pendiente mejor discriminación de datos.

Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada variación de la cantidad de analito. [14]

5.5.3 LÍMITES

Límite de cuantificación: Es la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. El LOQ se expresa mediante la ecuación 4. [15, 16]

$$\text{LOQ} = \frac{10S_b}{m_{\text{promedio}}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde m_{promedio} es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas; S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas y se puede estimar ya sea por el análisis de un número apropiado de muestras de blanco (muestra sin analito o con concentración cercana a cero) o a partir de los interceptos de las curvas realizadas.

Límite de detección: El límite de detección se define como la menor concentración de un elemento en la solución que se puede detectar con un 95% de certeza, y es, por lo tanto, la concentración que produce una desviación igual a 3 veces la desviación estándar del blanco. [15,16]

Este parámetro es una cifra teórica y no debería tratar de medirse rutinariamente. Se define en la siguiente ecuación. [14, 15,16]

$$\text{LOD} = \frac{3S_b}{m_{\text{promedio}}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y m_{promedio} es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas mediante repetibilidad.

5.5.4 EXACTITUD

Refleja la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero. La exactitud mide el error sistemático del método y se puede expresar en términos del porcentaje de error o porcentaje de recuperación. Es la proximidad entre el resultado de una medición y la media de un conjunto de datos.

Se puede medir a partir de la comparación de los valores obtenidos por medio de las metodologías disponibles, respecto a los emitidos por la empresa proveedora de las soluciones, o por medio del porcentaje de recuperación o de error. [14, 15, 16]

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Resultado Obtenido Experimental}}{\text{Resultado Real Esperado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

5.5.5 PRECISIÓN

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados. [14, 15, 16]

- **Repetibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

Se puede determinar registrando a lo menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la Desviación Estándar (S) y el porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

- **Precisión Intermedia:** Resultados obtenidos dentro del laboratorio por el mismo analista, con los mismos equipos, en un intervalo largo de tiempo (días distintos) y con la misma muestra homogénea.

5.5.6 INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando. [14, 15, 16]

En este sentido, es importante que, para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- Muestreo.

- Efectos de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento, etc.
- Sesgos Instrumentales: Las debidas a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura.
- Pureza de Reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.
- Analista: Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralelaje.
- Condiciones de medición: Las debidas al certificado de calibración ya que en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de k determinado (este es el factor de cobertura el cual suele ser simbolizada como k y toma valores entre 2 y 3), ^[14] en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico, etc.
- Condiciones de medición: temperatura, presión, humedad, el pH, etc.
- Otras: Método (por ejemplo, al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo, las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, etc.

La incertidumbre de la medición comprende, en general, muchos componentes. Algunos de estos pueden ser evaluados por tipo.

Para este fin el laboratorio deberá realizar una evaluación de las incertidumbres tipo A y B que están presentes en el método:

Evaluación de incertidumbre tipo A: Evaluación de un componente por un análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definidas. Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad.

Evaluación de incertidumbre tipo B: Es aquella que se obtiene mediante el uso de información externa u obtenida por experiencia. Estas fuentes de información pueden ser: certificados de calibración, manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento, normas o literatura, valores de mediciones anteriores, conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición ^[15, 16].

La determinación de la incertidumbre incluye generalmente 4 pasos, el primero como se ha dicho anteriormente corresponde a la determinación de las fuentes, el segundo en expresar los componentes en una incertidumbre estándar, el

tercero combinar las diferentes incertidumbres y el cuarto paso es la determinación de la incertidumbre expandida es decir, multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura (k) = 2, a fin de entregar un 95% de confianza, y así establecer el intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se pueden atribuir razonablemente al mesurando.

En algunos casos pueden existir mayores exigencias en cuanto al valor del factor de cobertura utilizado para obtener la incertidumbre expandida, pudiéndose solicitar o requerir un $k = 3$, a fin de entregar un 99,7 % de confianza, esto generalmente se puede solicitar frente a determinados contaminantes o residuos.

La determinación de la incertidumbre realizada por el laboratorio debe estar debidamente documentada.

Para demostrar que un método analítico es adecuado para el fin previsto, el laboratorio deberá demostrar a través de una evidencia objetiva que el método analítico ha sido adecuadamente validado o verificado. [14, 20]

- **Cálculo de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuentes globales de incertidumbre** [17]

Se calcula con base en los resultados de evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, de la siguiente forma:

Se calcula inicialmente el promedio de los resultados obtenidos tanto a concentraciones bajas de analito, como a altas concentraciones mediante la ecuación 7.

$$X_{prom} = \frac{\sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación 7}$$

Se calcula la desviación de los resultados obtenidos aplicando ecuación 8.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Posteriormente se calcula la desviación estándar relativa de cada grupo de datos Ecuación 9.

$$RSD = \frac{s}{X_{prom}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Finalmente, mediante ecuación 10 se calcula la Desviación Estándar Relativa del total de datos (**RSDt**)

$$RSDt = \sqrt{\frac{\left(\left(\frac{S_1}{\bar{x}_{p1}}\right)^2 X(n-1)\right) + \left(\left(\frac{S_2}{\bar{x}_{p2}}\right)^2 X(n-1)\right)}{(n-1)_1 + (n-1)_2}}$$

Ecuación 10

Y adicionalmente se calcula la recuperación en función de porcentajes (%R) de los patrones con base en la ecuación 11.

$$\%R = \frac{\text{ConcentraciónExperimentalObtenida}}{\text{ConcentraciónRealPreparada}} * 100$$

Ecuación 11

Se calcula el promedio de los porcentajes de recuperación con ecuación 12

$$\bar{R}_p = \frac{\sum \%R_i}{n}$$

Ecuación 12

La desviación estándar de los recuperados (**SRp**) con ecuación 13

$$SRp = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_{prom})^2}{(n-1)}}$$

Ecuación 13

También se debe calcular la incertidumbre en la recuperación promedio, mediante la ecuación 14:

$$U_{SRp} = \frac{SRp}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 14

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia (a) del 5% y un nivel de confianza del 95%, para (n-1) grados de libertad (gl). Para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1.

Se establece la hipótesis nula (H_0). El factor de recobro es significativamente diferente de 1.

Se calcula el t experimental (t_{exp}) (ecuación 15) y se compara con el t crítico (t_{crit}).

Si $t_{exp} > t_{crit}$ se rechaza la H_0 .

Si $t_{exp} < t_{crit}$ se acepta la H_0 .

$$t_{exp} = \frac{|R-1|*\sqrt{n}}{S} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde t_{exp} es el t experimental; R es el factor de recobro experimental; S es la Desviación estándar y n es el número de datos.

La incertidumbre se calcula mediante las ecuaciones 16.17 y 18.

Incertidumbre Combinada Total ($U_{C_{total}}$).

$$U_{C_{total}} = \sqrt{\left(\left(\frac{U_{Rp}}{Rp}\right)^2 + RSDt^2\right)} \quad \text{Ecuación 16}$$

Incertidumbre Expandida del Método ($U_{exp\ met}$) (\pm)

$$U_{exp\ met} = 2 * U_{C_{total}} \quad \text{Ecuación 17}$$

La incertidumbre expandida en la medición $U(\pm)$ se expresa:

$$U = \mp C * U_{expmet} \quad \text{Ecuación 18}$$

5.5.7 ROBUSTEZ

Este método analítico se define como la medida de su capacidad para permanecer inalterado, ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina. Es por la tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar datos validos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método susceptible de producirse durante su utilización.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este análisis se realizará mediante el paquete estadístico SPSS versión 24.0, un software que facilita el análisis estadístico de los datos, como su ilustración gráfica. Entre las pruebas más utilizadas aplicadas para el análisis de datos están:

5.6.1 Pruebas de normalidad

La distribución normal es, probablemente, la distribución teórica más importante en estadística y sirve como punto de referencia para describir cómo se distribuyen muchos de los datos de los análisis que realizamos. Se utilizan dos pruebas, la de Shapiro-Wilk para un tamaño de muestra menor o igual a 50 (número de datos), y la prueba de Kolmogorov-Smirnof que se utiliza para un

mayor número de datos, mayores a 50. Ambas pruebas permiten contrastar la hipótesis nula de que los datos de los resultados de los análisis proceden de poblaciones normales. Rechazaremos la hipótesis de normalidad cuando el nivel crítico o significancia (Sig.) sea menor que el nivel de significación establecido (generalmente 0,05). Cuando los valores presentan una distribución normal, se acepta la hipótesis nula y se aplican pruebas paramétricas. Cuando ocurre lo contrario, se aplican pruebas no paramétricas.^[14]

5.6.2 Pruebas Paramétricas

Son pruebas de hipótesis estadísticas que asumen cierto comportamiento de muestras obtenidas aleatoriamente, distribución normal de las observaciones y donde existe un parámetro de interés que buscamos estimar. ^[15] Son un tipo de pruebas de significación estadística que cuantifican la asociación o independencia entre una variable cuantitativa y una categórica. Las pruebas paramétricas exigen ciertos requisitos previos para su aplicación: la distribución normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan y la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos.

- **Análisis de Varianza (ANOVA) de un Factor:** El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés, la hipótesis es evaluada de la siguiente forma: Si el nivel crítico asociado al estadístico F es menor que 0,05, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no se puede rechazar la hipótesis de igualdad y no se puede afirmar que los grupos comparados difieran en sus promedios poblacionales. En otras palabras, nos ayuda a comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica (nominal u ordinal) que define los grupos que deseamos comparar la llamamos independiente o factor. A la variable cuantitativa (de intervalo o razón) en la que deseamos comparar los grupos la llamamos dependiente ^[15, 16].
- **Prueba de Tukey – Prueba de Duncan:** Son test de comparaciones múltiples. Permiten comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Todos los test de comparaciones múltiples son test que tratan de perfilar, tratan de especificar, tratan de concretar una hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los test ANOVA. ^[15, 16]

- **Prueba T:** Esta Prueba permite contrastar hipótesis con base a una media poblacional, ajustándose a un modelo de distribución de probabilidad t de student cuando la población muestreada es normal. [14] La realización de esta prueba con el paquete estadístico SPSS permite contrastar dos muestras independientes o relacionadas según sea el caso.

Prueba T Para Muestras Independientes: Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes. Si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es mayor que 0,05, podremos suponer que las varianzas poblacionales son iguales; si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es menor que 0,05, rechazaremos la hipótesis de igualdad de varianzas y supondremos que son distintas.

Prueba T Para Muestras Relacionadas: Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias relacionadas. Si el valor del nivel crítico $< 0,05$ se rechaza la hipótesis de igualdad de medias.

- **Coefficiente de Correlación de Pearson (r):** Es una prueba paramétrica que mide el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas, tomando valores entre -1 y +1. Los valores próximos a +1 indican una fuerte asociación lineal positiva; los valores próximos a -1 indican una fuerte asociación lineal negativa; valores próximos a 0 indican que no existe asociación lineal entre las variables. [14]

5.6.3 Pruebas No Paramétricas

Una prueba no paramétrica es una prueba de hipótesis que no requiere que la distribución de la población se caracterice en función de determinados parámetros. Por ejemplo, numerosas hipótesis se basan en el supuesto de que la población sigue una distribución normal con los parámetros μ y σ . Las pruebas no paramétricas no tienen este supuesto, de modo que son útiles cuando sus datos sean firmemente no normales y resistentes a transformaciones. [15]

Sin embargo, las pruebas no paramétricas no están completamente exentas de supuestos sobre los datos. Por ejemplo, las pruebas no paramétricas requieren que los datos sean una muestra aleatoria independiente. Se aplican a una gran variedad de situaciones, ya que no se requiere que cumplan ciertas condiciones como lo es el de la distribución normal de los datos como es el caso de los métodos paramétricos. Los resultados estadísticos se obtienen de procedimientos de ordenación o en otros casos de recuento, donde el parámetro de centralización es la mediana que se define como un punto donde el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima. Como pruebas no paramétricas se tiene:

- **Prueba de Kruskal Wallis:** Es un método para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Esta prueba es paralela al

ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Para determinar las diferencias significativas se aplica la prueba U de Mann-Whitney.

- **Prueba de U Mann Whitney:** Es una excelente alternativa a la prueba t sobre diferencia de medias cuándo:

1) no se cumplen los supuestos en los que se basa la prueba t (normalidad y homocedasticidad).

2) no es apropiado utilizar la prueba t porque el nivel de medida de los datos es ordinal.

- **Coefficiente de Correlación de Spearman (Rho):** Es una prueba que mide la asociación o interdependencia entre dos variables discretas medidas, al menos una de ellas, en escala ordinal. Los valores próximos a +1 indican una correlación fuerte y positiva. Los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa. Los valores próximos a 0 indican que no hay correlación lineal. [14]

5.6.4 Análisis de Regresión Lineal Simple

En estadística, la **regresión lineal** o **ajuste lineal** es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente Y , las variables independientes X_i y un término aleatorio ϵ . El procedimiento implica, básicamente, obtener la ecuación mínimo-cuadrática que mejor expresa la relación entre la variable dependiente y la variable independiente y estimar mediante el coeficiente de determinación la calidad de la ecuación de regresión obtenida. [15]

5.7 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica en la cual se utiliza un equipo especial para realizar la cuantificación de un analito (figura 4) el cual mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética, basándose en la medición de absorción de radiación UV o visible por determinadas moléculas que contienen en su estructura grupos cromóforos, la radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético causa transiciones electrónicas a longitudes de onda característica de la estructura molecular de un compuesto. [21]

La luz que se encuentra en la radiación visible y la luz ultravioleta de los espectros electromagnéticos presenta una energía de $150-400 \text{ kJmol}^{-1}$. La energía de la luz es usada para promover electrones de un estado fundamental a otro excitado. De ahí que un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud de onda.

La absorbancia de un soluto depende linealmente de su concentración y por consiguiente la espectrofotometría de absorción es ideal para hacer mediciones cuantitativas. La longitud de absorción y la fuerza de absorbancia de una molécula no sólo dependen de la naturaleza química, si no del ambiente molecular en donde se encuentre el cromóforo. La Ley de Beer-Lambert estipula que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución, por lo que la espectrofotometría UV-Vis puede usarse para determinar la concentración de un soluto en una solución. [21, 22]

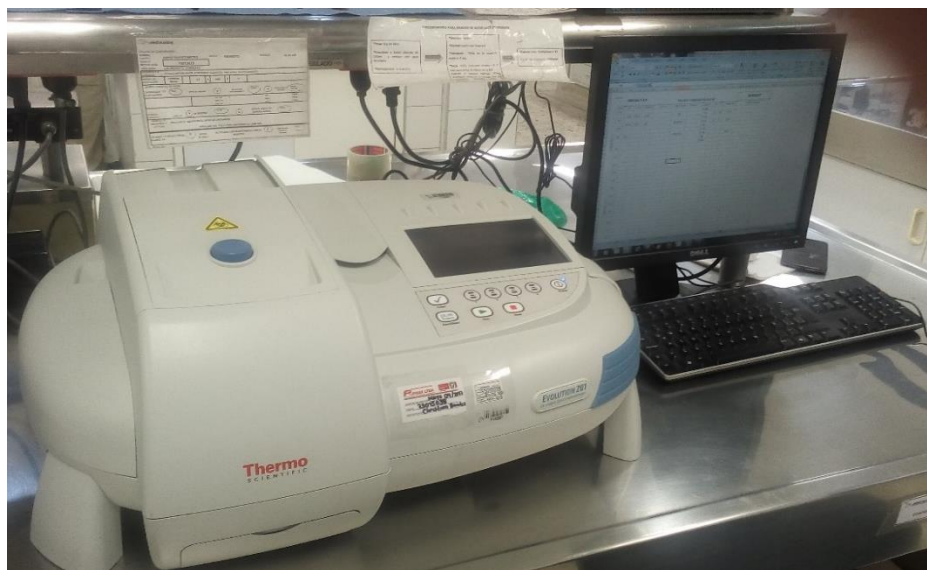
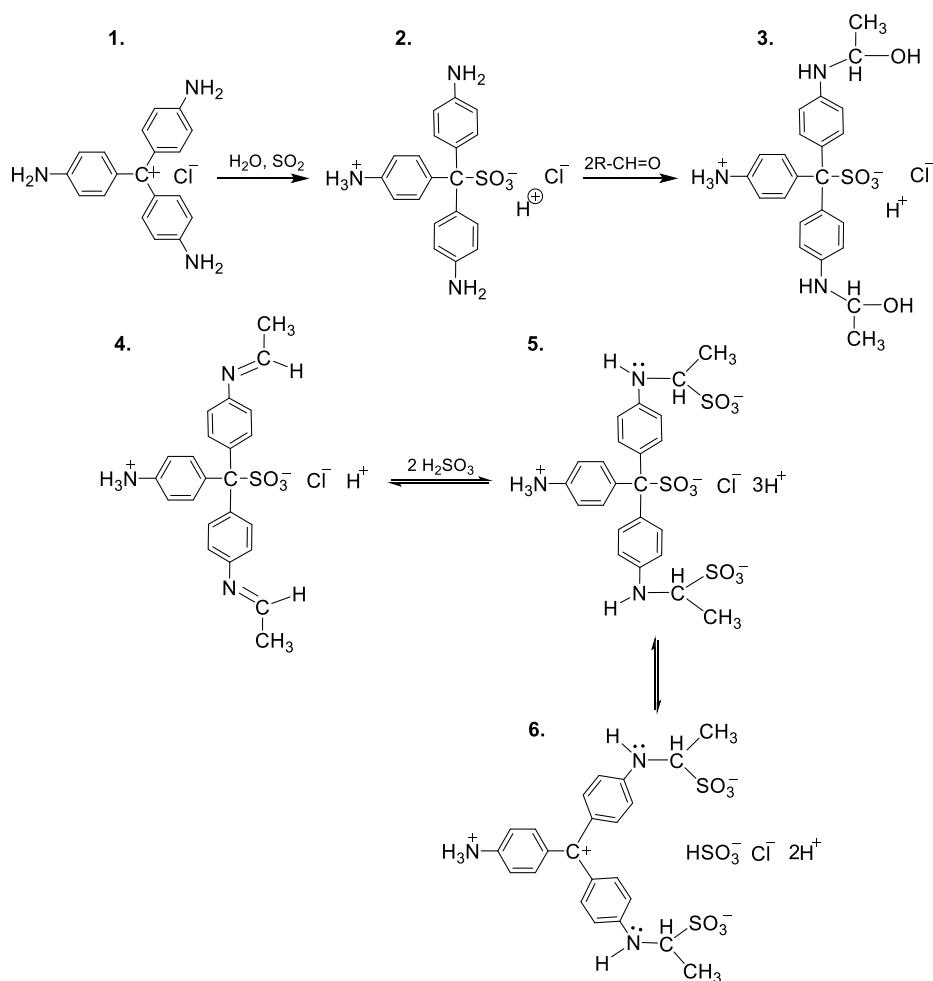


Figura 4. Equipo espectrofotometro UV-Vis utilizado para el analisis.

Esta clase de espectrofotometría de absorción es por lo tanto una excelente técnica para seguir reacciones de unión a ligando, catálisis enzimáticas y transiciones conformacionales en proteínas y ácidos nucleicos.

5.7.1 MÉTODO COLORIMÉTRICO DE WEST-GAEKE DE LA P-ROSANILINA

La determinación de dióxido de azufre (SO_2) en azúcares, tiene lugar a partir de una reacción con una solución de cloruro de para-rosanilina decolorada ver (esquema 1) en donde dicha reacción parte del compuesto (1), dentro de un periodo de tiempo especificado que va entre 30 minutos y 24 horas [2], en donde en esta solución de rosanilina se da la interacción del óxido de azufre (IV) o SO_2 con el carbono central de (1), formando de esta manera el cloruro ácido de para-rosanilina sulfónico (2). Luego, por la adición de formaldehído, se genera una carbonilamina (3) y posteriormente se produce una diimina (4) que reacciona con 2 moléculas de ácido sulfuroso, generando un intermediario a partir del cual, en medio ácido, se produce la formación de un compuesto intensamente coloreado color magenta, este es el ácido para-rosanilinetilsulfónico el cual es causante de dicho color gracias a sus grupos cromóforos que tiene un máximo de absorbancia a 560 nm. [23, 24]



Esquema 1. Reacción de Schiff (Ácido para-rosanilinetilsulfónico). [24]

La intensidad del color del compuesto formado está relacionada con la cantidad de SO_2 que ha reaccionado, ya que según la Ley de Lambert-Beer donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra, permitirá poder registrar la señal que servirá para la cuantificación del analito de interés en la Reacción de Schiff (ácido para-rosanilinetilsulfónico) teniendo su máximo de absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. [21, 22]

5.7.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y DE TOXICIDAD DE LOS SULFITOS

Los sulfitos son sustancias derivadas del azufre que si bien se encuentran presentes de forma natural en algunos alimentos han sido sintetizados para evitar el crecimiento de ciertas bacterias, mohos y levaduras, prevenir la oxidación de aceites y grasas y evitar la decoloración o el oscurecimiento de muchos alimentos principalmente de vegetales y crustáceos, así como para mantener la acción de algunos fármacos. Los sulfitos que hoy en día se están agregando a numerosos productos a pesar de que se sabe desde hace al menos tres décadas que si bien para la mayoría de la población no suponen aparentemente peligro al menos a corto plazo a muchas personas si les afecta

alimentos, suele predominar la forma parcialmente ionizada, el ion bisulfito (o sulfito ácido) SO_3H^- .

6. METODOLOGÍA

6.1. PREVALIDACIÓN

Se realizó la etapa de pre validación siguiendo uno a uno los procesos establecidos en el laboratorio de Calidad de Conformidad del Ingenio del Cauca S.A.S de la siguiente manera:

- Se seleccionó el método analítico y se realizaron los procedimientos necesarios para la determinación de sulfitos en las muestras de azúcar crudo natural, azúcar blanco, azúcar blanco especial y azúcar crudo exportación, de acuerdo a los materiales y reactivos que existen en el Laboratorio de Calidad de Conformidad.
- Se realizó un inventario de equipos, reactivos necesarios para el proceso de estandarización y validación (identificación, cantidad, calidad, pureza), del material de vidrio y demás, señalando las cantidades necesarias para lograr un procedimiento exitoso.
- Se definió el intervalo de trabajo para la determinación de sulfitos en donde se tuvo en cuenta: los protocolos y las normas establecidas, ensayos preliminares realizados en el laboratorio y rangos de concentración de sulfitos esperados para las distintas muestras de azúcar.
- Se verificó el correcto funcionamiento de los equipos, agitador rotatorio, Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201, material volumétrico, campana extractora, nevera, Equipo de purificación de agua (Milli-Q de Millipore) y elementos del laboratorio (material de vidrio). Se utilizó material certificado, se verificaron y se calibraron los diferentes materiales de vidrio mediante ensayos preliminares de acuerdo a los protocolos.
- Se optimizaron las condiciones y parámetros instrumentales, donde se incluyen las titulaciones y curvas de calibración que se utilizarán durante el proceso de validación.

6.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

6.2.1. EQUIPOS

Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201 con lámpara de flash Xenon y detector fotodiodos duales de silicio, ancho de banda de $\pm 0,8$ nm y rango de longitud de onda de trabajo comprendido entre 190 –1100 nm, baño Termostático, plancha Fisher Scientific Isotemp con agitador magnético

11-100-100SH, balanza analítica METTLER TOLEDO AL204, micropipetas Schott Duran, celdas de cuarzo, embudos de caña larga, magnetos.

6.2.2. MATERIALES

Cápsula de níquel de capacidad adecuada, bureta de 25.0 mL graduada en 0.05 mL, matraces aforados clase A de 25, 50, 100, 1000 y 2000 mL, matraz erlenmeyer de 100.0 mL, pipetas volumétricas de 2, 5, 10 y 25 mL, probeta graduada de 100.0 mL. Material común de laboratorio.

Material de vidrio clase A, marca Schott Duran, beakers, balones aforados, erlenmeyers, buretas, probetas.

6.2.3. REACTIVOS

6.2.3.1 Los reactivos aquí mencionados son de grado analítico, así como también el agua que se utilizó para el análisis, las soluciones se prepararon de acuerdo a lo estipulado en el manual de métodos de la "Comisión Internacional para la Uniformidad de métodos de Análisis de Azúcares (ICUMSA por sus siglas en inglés)".

6.2.3.2 Solución saturada de hidrocloreuro de rosanilina ($C_{20}H_{19}N_3HCl$).

Suspender 1.00 g de hidrocloreuro de rosanilina en 100.0 mL \pm 0.10 de agua; calentar a 50°C en baño termostático y enfriar a la vez que se agita. Dejar reposar 48 h y filtrar.

6.2.3.3 Solución de rosanilina decolorada.

Adicionar 8.00 mL con pipeta volumétrica de 10 mL \pm 0.03 de solución saturada de hidrocloreuro de rosanilina en un matraz aforado de 100 \pm 0.10 mL; agregar 12.00 mL de ácido clorhídrico concentrado; agitar y aforar. En corto tiempo el color desaparece, pero la solución debe dejarse reposar cuando menos 1 h antes de usarse.

6.2.3.4 Solución 0.2g/100 mL, de formaldehído (COH_2).

Adicionar 5 mL \pm 0.015 de solución al 40 % de formaldehído en un balón aforado de 1000 mL \pm 0.40; aforar con agua y agitar.

6.2.3.5 Solución de sacarosa pura

Adicionar 200.00 g de sacarosa grado reactivo libre de sulfitos en un balón aforado de 2000 mL \pm 0.60, disolver en agua de grado analítico y aforar.

6.2.3.6 Solución 0.1 M de hidróxido de sodio.

6.2.3.7 Solución 0.05 M de yodo.

6.2.3.8 Ácido clorhídrico concentrado (1.18 g/mL).

6.2.3.9 Solución ácido clorhídrico, aproximadamente 1M

6.2.3.10 Solución de tiosulfato de sodio, 0.1 mol/L.

Disolver 24.817g de tiosulfato de sodio pentahidratado de grado analítico con 200.00 mL de agua Mili-Q en un balón aforado de 1000.00 mL y aforar.

6.2.3.11 Solución patrón de sulfito de sodio. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Adicionar 0.2500 g de sulfito de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), en un balón aforado de 100 mL \pm 0.10; disolver con solución de sacarosa pura (6.2.2.5) y aforar con esta misma solución en un balón de 50 \pm 0.060 mL. Determinar el título de esta solución de la manera siguiente:

En un Erlenmeyer de 250 mL \pm 0.50 adicionan 25.00 mL de solución 0.05 M de yodo, adicionar 10.00 mL de la solución de ácido clorhídrico de concentración 1M junto con 100.00 mL de agua Mili-Q. Con una pipeta de 25 mL \pm 0.03 adicionar la solución patrón de sulfito mediante agitación continua. Posteriormente se valora el exceso de yodo con la solución de tiosulfato de sodio 0.1 M hasta obtener un color amarillo pálido. Adicionar luego indicador de yodo (almidón) 1.00 mL al Erlenmeyer y continuar con la valoración hasta que desaparezca el color azul, anotar el título t .

Se calcula el valor exacto del contenido del patrón de sulfito c a partir del título t , así:

$$c = (25 - t) \times 3.203 \times \mu\text{g SO}_2/\text{mL} \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde:

c = concentración de sulfito

t = título (mL de tiosulfato gastados en la titulación)

6.2.3.12 Expresión de resultados

La cantidad de SO_2 se calcula interpolando la lectura de absorbancia en la curva patrón y los resultados se expresan como mg de SO_2 /kg de azúcar blanco o crudo.

$$\frac{(\text{ppm SO}_2 \text{ de la curva}) \times 10}{\text{peso de azúcar empleado en 6.4.1}} \frac{\text{mg SO}_2}{\text{kg azúcar}} \quad \text{Ecuación 22}$$

6.3 Validación para la determinación de Sulfitos en Muestras de Azúcar

La metodología a implementar para el proceso de validación está basada en la guía *Validación de Métodos y Determinación de la incertidumbre de la medición*, 1ª Edición. Santiago de Chile. 2010, Aspectos generales para la validación de métodos. [14]

6.3.1. Preparación de las curvas de calibración

Se utilizaron estándares de sulfito y sacarosa (ver tabla 2), soluciones de hidróxido de sodio, yodo y formaldehído, ácido clorhídrico concentrado y solución saturada de clorhidrato de rosanilina marca Merck, conforme el numeral 3 ICUMSA [2], para preparar soluciones patrón con el propósito de obtener las curvas de calibración en un rango lineal, determinando el respectivo coeficiente de correlación.

Luego se prepararon a partir de la solución patrón de sulfito de sodio (6.2.2.11) las 7 concentraciones para la curva de calibrado, siendo de 0.64, 1.28, 1.92, 3.20, 4.48, 6.41, 8.33 mg/L de sulfito respectivamente. Se adicionaron a cada matraz 4.00 mL de hidróxido de sodio 0.1 M (6.2.2.6) finalmente fueron aforados en matraces de 100 mL \pm 0.10 con solución de sacarosa grado reactivo libre de sulfitos (6.2.2.5). Posteriormente se tomaron alícuotas de 10.00 mL de cada uno de los patrones y se transfirieron a vasos de precipitado de 100.00 mL limpios y secos, junto con 2.00 mL de solución de rosanilina decolorada (6.2.2.3) y 2.00 mL de solución de formaldehído (6.2.2.4) los cuales se dejan reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, posterior a este tiempo se procede a leer uno a uno en sentido creciente de concentración en el equipo y por triplicado en una celda de cuarzo de 1.0 cm en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.[2]

Tabla 2. Datos para la preparación de las curvas de calibración de sulfitos en muestras de azúcar, la solución patrón en volumen de 100.00 mL.

| Estándar de SO ₂ | Volumen (mL) | Concentración (mg/L) |
|-----------------------------|--------------|----------------------|
| 1 | 0.10 | 0.64 |
| 2 | 0.20 | 1.28 |
| 3 | 0.30 | 1.92 |
| 4 | 0.50 | 3.20 |
| 5 | 0.70 | 4.48 |
| 6 | 1.00 | 6.41 |
| 7 | 1.30 | 8.33 |

6.3.2. Validación del sistema Instrumental

Se llevará a cabo con curvas de calibración de sulfitos, en agua Mili-Q. Se evaluaron la linealidad y precisión en términos de precisión intermedia y límites críticos.

- **Linealidad del método analítico:** Se prepararon 6 curvas de calibración con 7 niveles de concentración de patrón de sulfitos, una curva de calibración por día. El análisis se realizó por triplicado en cada punto de la curva. Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permitieron determinar la linealidad del método analítico en el rango utilizado.

- **Precisión instrumental:** La precisión se estableció en términos de repetibilidad y reproducibilidad. En la repetibilidad (el mismo día) se prepararon 5 curvas de calibración con 7 niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Bajo condiciones de precisión intermedia (días diferentes), se prepararon 6 curvas de calibración durante 6 días diferentes, una curva de calibración por día. Se obtuvo el porcentaje del coeficiente de variación (CV%) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.
- **Límites críticos (LOD y LOQ):** Los límites de detección y cuantificación de sulfitos en muestras de azúcar blanco y crudo se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).^[33]

6.4. Validación de la metodología para la determinación de sulfitos en Muestras de Azúcar.

Para implementar la metodología en la determinación de sulfitos se evaluaron los siguientes parámetros consignados en el diseño experimental. (Ver tabla 3).

Tabla 3. Diseño experimental para la implementación de la metodología en la determinación de Sulfitos en muestras de azúcar.

| Pruebas y parámetros a evaluar para la validación | |
|--|---|
| Linealidad | |
| Exactitud | Sesgo Porcentaje de recuperación |
| Precisión | Desviación estándar Precisión intermedia Varianza Error relativo Coeficiente de variación |
| Incertidumbre | Precisión intermedia |
| Robustez | |

6.4.1 Análisis en muestras de azúcar por Espectrofotometría UV-Vis.

Para el análisis se emplearon 4 tipos diferentes de azúcar (azúcar crudo natural, azúcar blanco, azúcar blanco especial y azúcar crudo exportación) que son suministrados y recolectados a diferentes horas del día al azar por un operario de la fábrica.

- **Tratamiento de la muestra**

Previo al análisis se pesó cada una de las muestras de azúcar, tomando 40.0000 g para las muestras de azúcar blanco y 5.0000 g para azúcar crudo, estas se transfirieron a un balón de 100.00 mL que contenía agua Mili-Q, al

cual se le adicionó 4.00 mL de solución de hidróxido de sodio 0.1 M, se agitó y se aforó con agua Mili-Q. Luego se transfirió una alícuota de 10.0 mL a un tubo de ensayo limpio y seco. Se adicionaron 2.00 mL de solución de rosanilina decolorada junto con 2.00 mL de solución de formaldehído, se dejó reposar durante unos 30 minutos, posteriormente se procedió a leer la absorbancia en una celda de cuarzo de 1.0 cm en un espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201 a una longitud de onda de 560 nm.

- **Análisis de las curvas de Sulfitos por Espectrofotometría UV-Vis**

Se preparó un estándar de sulfitos al cual se le calculó su concentración por medio de una valoración redox entre el tiosulfato y yodo. Una vez obtenida su concentración se prepararon los patrones respectivos para la curva de calibración y se ajustaron las condiciones del equipo como se especificaron en el numeral 6.2.1. Para la determinación se utilizó agua grado HPLC (Mili-Q) como blanco, a la cual se le adicionaron volúmenes de soluciones de hidróxido de sodio, rosanilina decolorada y formaldehído para el desarrollo del color. Luego de 30 minutos se leyeron los patrones de la curva de calibración en orden ascendente de concentración. Estas lecturas se guardaron en el software del equipo, como estándares de calibración externos para sulfitos. Posteriormente se leyeron las muestras de azúcar teniendo en cuenta el peso para cada tipo de azúcar y se observan sus respectivas absorbancias.

6.5. Análisis estadístico de los resultados

Con el objetivo de validar las metodologías utilizadas, se aplicó un tratamiento estadístico a todos los resultados obtenidos, utilizando hoja de cálculo de Excel 2016 y el paquete estadístico SPSS versión 24.0, también se aplicaron pruebas paramétricas como ANOVA o no paramétricas, según corresponda.

7. RESULTADOS Y ANALISIS

7.1 Validación para la determinación de Sulfitos en Muestras de Azúcar

Con las condiciones establecidas, se procedió a realizar las pruebas necesarias y sus correspondientes análisis estadísticos, teniendo como fin, mostrar resultados confiables, reproducibles y precisos en la determinación de sulfitos en muestras de azúcar blanco y crudo en el laboratorio de calidad del ingenio del cauca S.A.S. cumpliendo con los requisitos de calidad establecidas por la Norma ISO/IEC 17025.

7.1.1. Pruebas de Normalidad

Con el fin de determinar cuál es la distribución que siguen los datos obtenidos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, puesto que nuestro tamaño de muestra es menor de 50.

Se evaluaron 7 niveles de concentración durante 6 días diferentes. Se preparó una curva de calibración por día, la cual se sometió al método descrito en las metodologías. Los datos se representan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de curvas de calibración de Sulfitos.

| Sustancia | Concentración (ppm) | Absorbancias (nm) | | | | | |
|-----------|---------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
| Sulfito | 0,64 | 0,08 | 0,07 | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,07 |
| | 1,28 | 0,10 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,10 | 0,10 |
| | 1,92 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,13 |
| | 3,20 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,19 |
| | 4,48 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,24 |
| | 6,41 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,33 | 0,33 |
| | 8,33 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,41 | 0,41 |

El criterio de rechazo se da para valores de significancia menor a $(p) = 0,05$ los resultados se consignan en las tablas 5 y 6 para Sulfitos.

Se realizó una serie de pruebas con el paquete estadístico SPSS (versión 24.0), planteando dos hipótesis: una hipótesis nula (H_0), hipótesis alternativa (H_a). Con base en el valor de significancia, se acepta o se rechaza la H_0 , de acuerdo a si este sistema es mayor, igual o menor a 0,05 respectivamente. Si se rechaza la hipótesis nula, se debe aceptar la hipótesis alternativa en cada prueba.

Con estos datos se calcula la normalidad de los datos en función del día y en función del nivel de concentración de sulfitos, aplicando la prueba de Shapiro-Wilk, partiendo de que se tiene un número de datos menor a 50 y teniendo en cuenta el valor de significancia (p) de la prueba Shapiro-Wilk, las hipótesis planteadas fueron:

H_0 : Los datos obtenidos provienen de una población normal.

H_a : Los datos obtenidos no provienen de una población normal.

Con esta información se optará por realizar pruebas paramétricas y pruebas no paramétricas en caso de obtener datos que no sean normales. Los resultados se presentan en las siguientes tablas 5 y 6.

Tabla 5. Prueba de normalidad en función del día Shapiro-wilk.

| Día | Sulfitos | | |
|-----|-------------|----|---------------|
| | Estadístico | gl | significancia |
| 1 | 0,930 | 5 | 0,555 |
| 2 | 0,934 | | 0,585 |
| 3 | 0,939 | | 0,626 |
| 4 | 0,938 | | 0,619 |
| 5 | 0,933 | | 0,579 |
| 6 | 0,938 | | 0,624 |

Tabla 6. Prueba de normalidad en función del nivel de concentración Shapiro-wilk.

| Niveles de concentración | Sulfitos | | |
|--------------------------|-------------|----|---------------|
| | Estadístico | gl | significancia |
| 1 | 0,864 | 6 | 0,204 |
| 2 | 0,951 | | 0,750 |
| 3 | 0,889 | | 0,313 |
| 4 | 0,891 | | 0,324 |
| 5 | 0,864 | | 0,202 |
| 6 | 0,819 | | 0,086 |
| 7 | 0,812 | | 0,075 |

Se evaluó la normalidad de los datos aplicando el test de Shapiro-Wilk encontrando que los resultados tanto en función de los días como en función de la concentración, provienen de una población con distribución normal con una significancia estadística superior a 0,05, por lo tanto, la hipótesis nula H_0 es aceptada y se considera que en función de los días y de la concentración los resultados siguen una distribución normal. La normalidad de estos resultados, permitió aplicar pruebas paramétricas para el correspondiente análisis estadístico, en cada sustancia.

Para saber si existen diferencias significativas entre las medias de los valores de absorbancia de cada uno de los 7 niveles de concentración, se realizó la prueba ANOVA en función del día y del nivel de concentración. Los resultados de la prueba se registran en las tablas 7 y 8 respectivamente, para sulfitos.

Tabla 7. Prueba ANOVA, el día como variable independiente.

| Absorbancia | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | sig |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|-------|
| Inter-grupos | 0,000 | 5 | 0,000 | 0,002 | 1,000 |
| Intra-grupos | 0,650 | 36 | 0,018 | | |
| Total | 0,650 | 41 | | | |

La prueba ANOVA para los valores de absorbancia de los diferentes niveles de concentración en función del día, (Tabla 7) muestra que no existe diferencia significativa entre los valores de absorbancia (**sig** > 0,05) en función del día, se concluye que la absorbancia de cada concentración no presenta variación con el tiempo, por tanto, se establece que la metodología aplicada es reproducible.

Ahora se aplica la prueba ANOVA para saber si existen diferencias significativas entre los valores de absorbancia en función del nivel de concentración.

En cuanto a la variable nivel de concentración, la prueba de ANOVA (Tabla 8) muestra que los valores de absorbancia difieren significativamente ya que (**sig** < 0,05) para cada nivel de concentración.

Tabla 8. Prueba ANOVA, nivel de concentración como variable independiente.

| Absorbancia | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | sig |
|---------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|----------|------------|
| Inter-grupos | 0,649 | 6 | 0,108 | 2209,370 | 0,000 |
| Intra-grupos | 0,002 | 35 | 0,000 | | |
| Total | 0,650 | 41 | | | |

Por tanto, para determinar en cuales niveles hay diferencia se aplica la prueba de Duncan como se puede observar en la tabla 9.

Tabla 9. Prueba de Duncan.

| Concentración (ppm) | N | Subconjunto para alfa = 0.5 | | | | | | |
|----------------------------|----------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0,64 | 6 | 0,6538 | | | | | | |
| 1,28 | 6 | | 0,9455 | | | | | |
| 1,92 | 6 | | | 0,1230 | | | | |
| 3,20 | 6 | | | | 0,1857 | | | |
| 4,48 | 6 | | | | | 0,2491 | | |
| 6,41 | 6 | | | | | | 0,3354 | |
| 8,33 | 6 | | | | | | | 0,4302 |
| Sig | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

En la prueba de Duncan, tabla 9, se determinó que existen 7 grupos en donde la absorbancia difiere significativamente y es proporcional al nivel de concentración, lo cual indica la relación directa entre absorbancia y concentración, a mayor concentración mayor absorbancia.

7.1.2 Evaluación de la Sensibilidad y Linealidad Instrumental

Para la evaluación de la sensibilidad y la linealidad se utilizaron los datos de la tabla 4 y se elaboró un gráfico relacionando la absorbancia respecto al nivel de concentración, para sulfitos, las gráficas se muestran en la figura 5. Donde se observa la tendencia lineal de los resultados, por lo que se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal que relaciona la cantidad de sulfitos con la señal de respuesta que es la absorbancia.

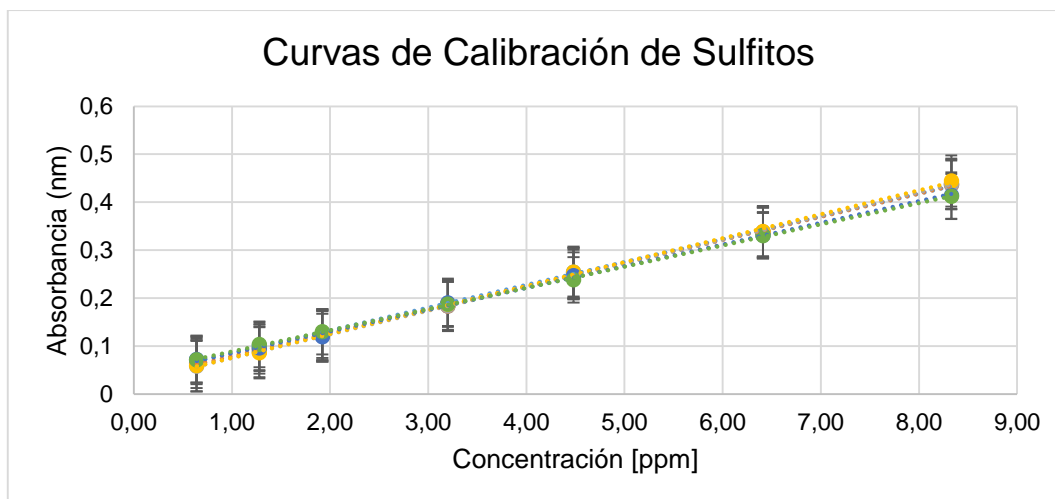


Figura 5. Curvas de Calibración para linealidad.

Se determinaron los valores para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y sus respectivas desviaciones estándar, obteniendo los resultados expresados en la tabla 10.

Tabla 10. Pendientes, Interceptos y Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental para el método de determinación de sulfitos).

| Sustancia | Parámetro | Símbolo | Valor | Desviación estándar | Coefficiente de variación (%) |
|-----------|----------------------------|---------|--------|---------------------|-------------------------------|
| Sulfitos | Coeficiente de correlación | r | 0,9993 | 0,00035 | 0,035 |
| | Pendiente | m | 0,0474 | 0,0023 | |
| | Intercepto | b | 0,0341 | 0,008 | |

El coeficiente de correlación se evaluó estadísticamente mediante correlación de Pearson (ver tabla 11) teniendo como H_0 : “No existe correlación significativa entre las variables x e y”. Para ello se realiza una prueba de significancia con el propósito de aceptar o rechazar la hipótesis nula.

Tabla 11. Correlación de Pearson, Regresión lineal.

| Variables | Parámetro | Concentración | Absorbancia |
|---------------|------------------------|---------------|-------------|
| Concentración | Correlación de pearson | 1,000 | 0,999 |
| | Sig. (bilateral) | | 0,000 |
| | N | 42 | 42 |
| Absorbancia | Correlación de pearson | 0,999 | 1,000 |
| | Sig. (bilateral) | 0,000 | |
| | N | 42 | 42 |

Se puede observar en la tabla 11 que la prueba de significancia tiene un valor de 0.000, para la muestra de sulfitos, por lo que se rechaza la hipótesis nula y

se concluye que existe una correlación altamente significativa entre la concentración y la absorbancia, con una correlación de Pearson de 1.0.

Para evaluar estadísticamente la m y b ver (tabla 12) se tienen las siguientes hipótesis.

- Para la pendiente se tiene como H_0 : “la pendiente no es significativamente diferente de cero” la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando $\text{sig} \leq 0,05$.
- Para el intercepto se tiene como H_0 : “El intercepto no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando $\text{sig} \leq 0,05$.

Tabla 12. Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto.

| | Parámetros | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|-----------------|------------|--------------------------------|--------------|-----------------------------|---------|-------|
| | | Beta | Error típico | Beta | | |
| Sulfitos | Intercepto | 0,034 | 0,002 | 0,999 | 18,501 | 0,000 |
| | Pendiente | 0,047 | 0,000 | | 117,708 | 0,000 |

La significancia estadística para la pendiente (m) es inferior a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que la pendiente es significativamente diferente de cero. La significancia estadística para el intercepto (b) es inferior a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que el intercepto es significativamente diferente de cero.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se evaluó estadísticamente la regresión lineal en las curvas de calibración de la tabla 4, los resultados se muestran en la tabla 13, donde se observa si la significancia para la regresión es menor o mayor de 0,05.

Tabla 13. ANOVA para evaluar la Regresión lineal en las curvas de calibración.

| Modelo | Parámetros | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | f | sig |
|-----------------|------------|-------------------|----|------------------|-----------|-------|
| Sulfitos | Regresión | 0,648 | 1 | 0,648 | 13855,081 | 0,000 |
| | Residual | 0,002 | 40 | 0,000 | | |
| | total | 0,649 | 41 | | | |

Para evaluar la regresión lineal se tiene como hipótesis nula: “No existe regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$)”, y como hipótesis alternativa “Hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$)”. Como se puede observar en la tabla 13, la significancia para la regresión es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, lo cual nos permite concluir que la regresión lineal es estadísticamente significativa en la curva de calibración para Sulfitos.

Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad permiten concluir que el método instrumental empleado para la determinación de Sulfitos es lineal en el rango de concentración establecido.

7.1.3 Precisión Instrumental

La precisión refleja la reproducibilidad de las medidas, es decir, la cercanía entre los resultados obtenidos entre sí, dicho de otra manera, refleja el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas. Se evaluó bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día) y precisión intermedia (días diferentes). En condiciones de repetibilidad se prepararon cinco (5) curvas de calibración con 7 niveles de concentración las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14, donde se observa que los datos de las 5 curvas para sulfitos presentan valores similares entre sí.

Tabla 14. Valores de absorbancia para las curvas de calibración bajo condiciones de Repetibilidad.

| Concentración (ppm) | Curvas SO ₂ | | | | |
|---------------------|------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | Curva 4 | Curva 5 |
| 0,64 | 0,068 | 0,070 | 0,075 | 0,073 | 0,073 |
| 1,28 | 0,098 | 0,095 | 0,101 | 0,101 | 0,101 |
| 1,92 | 0,121 | 0,126 | 0,128 | 0,128 | 0,127 |
| 3,20 | 0,193 | 0,189 | 0,198 | 0,198 | 0,197 |
| 4,48 | 0,248 | 0,246 | 0,250 | 0,250 | 0,251 |
| 6,41 | 0,337 | 0,327 | 0,338 | 0,337 | 0,337 |
| 8,33 | 0,433 | 0,423 | 0,431 | 0,431 | 0,434 |

Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon seis curvas de calibración durante seis días diferentes, una curva de calibración por día, los resultados se expresan en la tabla 15.

Tabla 15. Valores de absorbancia para la evaluación de Curvas de Calibración Bajo Condiciones de Precisión Intermedia.

| Sustancia | Concentración (ppm) | Absorbancia (nm) | | | | | |
|-----------|---------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
| Sulfitos | 0,64 | 0,073 | 0,068 | 0,068 | 0,068 | 0,066 | 0,062 |
| | 1,28 | 0,098 | 0,097 | 0,097 | 0,098 | 0,098 | 0,098 |
| | 1,92 | 0,128 | 0,124 | 0,124 | 0,125 | 0,123 | 0,124 |
| | 3,20 | 0,197 | 0,184 | 0,186 | 0,185 | 0,187 | 0,187 |
| | 4,48 | 0,247 | 0,245 | 0,251 | 0,248 | 0,245 | 0,248 |
| | 6,41 | 0,339 | 0,339 | 0,336 | 0,335 | 0,339 | 0,339 |
| | 8,33 | 0,432 | 0,435 | 0,437 | 0,436 | 0,436 | 0,436 |

Se determinó el coeficiente de variación (%CV) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Los resultados se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Precisión Instrumental Bajo Condiciones de Repetibilidad y Precisión Intermedia.

| Nivel de concentración | Repetibilidad | | | Precisión intermedia | | |
|------------------------|---------------|---------------------|------|----------------------|---------------------|------|
| | Promedio | Desviación estándar | % CV | Promedio | Desviación estándar | % CV |
| 1 | 0,071 | 0,003 | 3,9 | 0,067 | 0,0036 | 4,35 |
| 2 | 0,099 | 0,003 | 2,9 | 0,098 | 0,0005 | 0,52 |
| 3 | 0,126 | 0,003 | 2,3 | 0,125 | 0,0016 | 1,30 |
| 4 | 0,195 | 0,004 | 2,0 | 0,188 | 0,0046 | 2,46 |
| 5 | 0,249 | 0,002 | 0,9 | 0,247 | 0,0022 | 0,88 |
| 6 | 0,335 | 0,005 | 1,4 | 0,338 | 0,0018 | 0,53 |
| 7 | 0,431 | 0,005 | 1,1 | 0,436 | 0,0018 | 0,42 |

Como se puede observar en la tabla 16. Los %CV son bajos al ser inferiores al 5%, se debe tener en cuenta que el MS. Propone que los coeficientes de variación deben ser inferiores a 10. Sin embargo, no se observa variabilidad en los resultados en días diferentes (precisión intermedia) respecto a los obtenidos el mismo día (repetibilidad), lo cual indica que la preparación diaria de las curvas de calibración y la variabilidad en el comportamiento del equipo entre días es constante.

7.1.4 Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación de Sulfitos se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC.

Se prepararon tres curvas de calibración de Sulfitos, las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones, ver tabla 14. Con los resultados obtenidos, se elaboró un gráfico donde se relacionó la absorbancia vs la concentración las cuales se muestran en la figura 6.

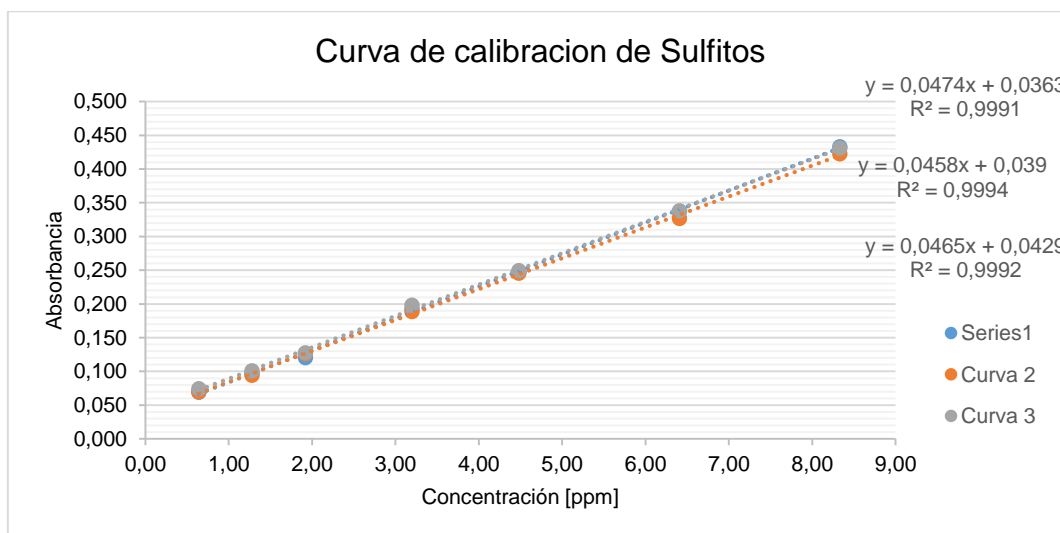


Figura 6. Curva de Calibración de Sulfitos para Límites Críticos.

Seguidamente, se calculó mediante el método de mínimo cuadrados las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una de las curvas de calibración, con esos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos (S_b) y el promedio de las pendientes (promedio m). Finalmente se aplicaron las ecuaciones 23 y 24 para establecer teóricamente los valores del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), los resultados se muestran en la tabla 17.

$$\text{LOD} = \frac{3 S_b}{m_{\text{promedio}}} \quad \text{Ecuación 23}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_b}{m_{\text{promedio}}} \quad \text{Ecuación 24}$$

Tabla 17. Calculo del Límite de Detección y Cuantificación.

| Parámetros | Curvas | | | Promedio | Desviación Estándar | LOD mg/kg | LOQ mg/kg |
|-------------------|--------|--------|--------|----------|---------------------|-----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | |
| Pendiente | 0,0474 | 0,0458 | 0,0465 | 0,0466 | 0,0008 | 0,22 | 0,72 |
| Intercepto | 0,0363 | 0,0390 | 0,0429 | 0,0394 | 0,0033 | | |

Los límites de detección y cuantificación son adecuados, como se observa el sistema instrumental brinda una exactitud y precisión aceptables.

7.2 Implementación y Validación de la metodología para determinación de Sulfitos.

Para la implementación de la metodología se evaluaron los parámetros linealidad, exactitud, precisión y límites críticos de acuerdo a los PGC de la metodología analítica. Para la evaluación de estos parámetros se empleó el software estadístico SPSS (versión 24.0).

7.2.1 Linealidad

Corresponde a la linealidad instrumental, por lo que se emplearon curvas de calibración sometidas a la metodología planteada.

7.2.2 Precisión y exactitud

Se prepararon 6 curvas de calibración durante 6 días diferentes, una curva de calibración por día, los resultados obtenidos se expresan en la tabla de evaluación de la curva de calibración en términos de la precisión intermedia ver (tabla 15). Se determinó la precisión y exactitud por niveles de concentración en las curvas de calibración, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 18. Los %CV obtenidos son inferiores al 5% y los % R son adecuados.

Tabla 18. Precisión y Exactitud del método.

| Nivel | Desviación estándar | %CV | % R |
|-------|---------------------|-----|-------|
| 1 | 1,7 | 1,6 | 104,1 |
| 2 | 2,7 | 2,8 | 98,4 |
| 3 | 2,2 | 2,3 | 95,7 |
| 4 | 0,9 | 0,9 | 103,8 |
| 5 | 0,6 | 0,6 | 99,9 |
| 6 | 0,4 | 0,4 | 98,7 |
| 7 | 0,1 | 0,1 | 100,5 |

Con el propósito de determinar la exactitud y precisión para la metodología global se le aplicó la prueba estadística de homogeneidad de varianza (estadístico de Levene), teniendo como H_0 que “El nivel de concentración no afecta la variabilidad de los porcentajes de recuperación”. Los resultados de la prueba se presentan la tabla 19.

Tabla 19. Prueba estadística de homogeneidad de varianza para Sulfitos.

| Porcentaje de recuperación | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|--|-----------------------|-----|--------|-------|
| Basándose en la media | 2,285 | 6 | 35 | 0,038 |
| Basándose en la mediana | 1,116 | 6 | 35 | 0,373 |
| Basándose en la mediana y con gl corregido | 1,116 | 6 | 13,913 | 0,402 |
| Basándose en la mediana recortada | 1,989 | 6 | 35 | 0,094 |

Como se puede observar en la tabla 19. La significancia estadística basándose en la media para el estadístico de Levene es menor de 0.05, por lo que la prueba estadística es significativa y por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que el nivel de concentración si afecta la variabilidad en los % R obtenidos. Por lo tanto, para cada nivel de concentración se debe tener en cuenta su porcentaje de recuperación.

La significancia estadística basándose en la mediana para el estadístico de Levene es mayor a 0,05 (sig = 0,373), por lo que la prueba estadística es no significativa y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, concluyendo que el nivel de concentración no afecta la variabilidad en los % R obtenidos. Esto permite calcular un $\%R_{\text{promedio}}$ basándose en la mediana de los datos del porcentaje de recuperación para cada nivel y un %CV para la metodología global. Los resultados se presentan en la tabla 20.

Donde los bajos %CV muestran la precisión y el porcentaje de recuperación promedio, la exactitud, ya que se encuentra en el rango apropiado (95–105 %).

Tabla 20. Exactitud y Precisión para la metodología global en la determinación de Sulfitos con base en la Mediana.

| Nivel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | R _{prom} | Des. Est. | %CV |
|--------------|-------|------|------|-------|------|------|-------|-------------------|-----------|-----|
| %R (mediana) | 105,3 | 98,4 | 95,5 | 103,7 | 99,8 | 98,7 | 100,5 | 100,3 | 3,3 | 3,3 |

Los % R obtenidos en base a la mediana y el % R_{promedio} son aceptables, encontrándose dentro del intervalo normal (95 al 105 %), de igual forma los %CV siendo estos inferiores al 5%.

7.2.3 Análisis de las muestras por Espectrofotometría UV-Vis

La implementación de la metodología se realizó analizando muestras diferentes (**azúcar blanco, azúcar blanco especial, azúcar crudo natural y Azúcar crudo exportación**), las muestras fueron analizadas por triplicado durante 6 días diferentes, preparando una curva de calibración por día y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente. Se realizó la correlación en la concentración de sulfito para cada muestra teniendo en cuenta la reproducibilidad del método. Se determinó la precisión en términos del %CV, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 21, en la cual se puede apreciar que la determinación de sulfitos en diferentes muestras de azúcar presenta bajos coeficiente de variación (% CV), demostrando que la metodología implementada es precisa y genera resultados confiables. Además de que los valores obtenidos para su concentración están dentro de los valores máximos permisibles 150 ppm para azúcar blanco y 350 ppm para azúcar crudo. [8]

Tabla 21. Resultados de análisis de muestras de la validación.

| Muestras | Sulfitos | | | |
|--------------------------|----------|---------------------|---------------------------|------------------------|
| | Promedio | Desviación estándar | Coefficiente de variación | ppm de SO ₂ |
| Azúcar blanco | 0,0529 | 0,0011 | 2,0006 | 93,8818 |
| Azúcar blanco especial | 0,0623 | 0,0009 | 1,4376 | 141,3502 |
| Azúcar crudo natural | 0,0427 | 0,0013 | 3,0003 | 298,9473 |
| Azúcar crudo exportación | 0,0391 | 0,0003 | 0,7565 | 151,8987 |

7.2.4 Robustez y tolerancia

La robustez y tolerancia del método se realizó con la variación de equipo y analista, su análisis se hizo mediante un contraste de comparación de las medias muestrales, planteando como hipótesis nula H₀: que tanto los equipos y analista proporcionan los mismos resultados en una muestra determinada”, es

decir $u_1 = u_2$ donde u_1 y u_2 son las medias muestrales obtenidas por cada analista con su respectivo equipo. Para decidir si la diferencia entre las dos medias muestrales, es significativa se calcula el estadístico t.

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 21}$$

Dónde:

x_1 y x_2 : son los promedios obtenidos por el método 1 y 2.

s: Es la desviación estándar calculada a partir de la siguiente ecuación

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Ecuación 22}$$

Tabla 22. Resultados para Robustez y Tolerancia.

| Experimentos | Promedio | Desviación estándar | %CV |
|--|----------|---------------------|--------|
| Analista A Equipo: SHIMADZU Lab: Refinería | 0,1196 | 0,0025 | 2,0930 |
| Analista B Equipo: Thermo Evolution Lab: Calidad de Conformidad | 0,1173 | 0,0025 | 2,0900 |
| t-crítico | | 2,2600 | |
| t-experimental | | 2,0751 | |

En la tabla anterior se puede observar que la t calculada es menor que el t -crítico o tabulado, por lo tanto, la diferencia entre analista **A** y **B** no son significativamente diferentes para un intervalo de confianza al 95% por lo que se acepta la hipótesis nula, y se concluye que las medias no difieren significativamente. Permitiendo establecer que el método es robusto y tolerante para las condiciones establecidas.

7.2.5 Estimación de la incertidumbre en la determinación de Sulfitos mediante la metodología de fuentes globales.

Se determinó la incertidumbre de la metodología para la determinación de SO₂ en los niveles de concentración de la curva.

Inicialmente se realiza el cálculo de las fuentes aleatorias, siendo entonces necesario encontrar un valor promedio (X_{prom}), una desviación estándar (S) y una desviación estándar relativa (RSD) de cada grupo de datos con los cuales se calcula la desviación estándar relativa (RSDt) del total de los datos. Los resultados se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 23. Contribución de las fuentes aleatorias.

| Números de análisis | Niveles de concentración | | | | | | |
|---------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 0,666 | 1,226 | 1,978 | 3,219 | 4,517 | 6,449 | 8,411 |
| 2 | 0,642 | 1,355 | 1,955 | 3,297 | 4,432 | 6,666 | 8,358 |

| | | | | | | | |
|-------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3 | 0,677 | 1,233 | 1,957 | 3,117 | 4,580 | 6,697 | 8,469 |
| 4 | 0,617 | 1,301 | 1,922 | 3,213 | 4,413 | 6,645 | 8,473 |
| 5 | 0,612 | 1,283 | 1,932 | 3,186 | 4,565 | 6,423 | 8,252 |
| 6 | 0,609 | 1,287 | 1,868 | 3,218 | 4,530 | 6,461 | 8,278 |
| Xpro | 0,637 | 1,281 | 1,935 | 3,208 | 4,506 | 6,557 | 8,373 |
| S | 0,029 | 0,048 | 0,038 | 0,058 | 0,069 | 0,125 | 0,094 |
| N° | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| RSD | 0,046 | 0,037 | 0,020 | 0,018 | 0,015 | 0,019 | 0,011 |
| RSDt | 0,0266 | | | | | | |

También se determina la contribución de las fuentes sistemáticas en la incertidumbre del método con los porcentajes de recuperación de la concentración de los patrones, donde se hace necesario calcular el promedio de los recuperados (R_p) y su desviación estándar (S_{Rp}) para poder calcular la incertidumbre en la recuperación promedio (U_{Rp}), los resultados se presentan en la tabla 24.

Tabla 24. Estimación de la contribución de las fuentes sistemáticas Sulfitos.

| Números de análisis | Porcentajes de recuperación | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 1,041 | 0,958 | 1,030 | 1,006 | 1,008 | 1,006 | 1,010 |
| 2 | 1,003 | 1,059 | 1,018 | 1,030 | 0,989 | 1,040 | 1,003 |
| 3 | 1,058 | 0,963 | 1,019 | 0,974 | 1,022 | 1,045 | 1,017 |
| 4 | 0,965 | 1,017 | 1,001 | 1,004 | 0,985 | 1,037 | 1,017 |
| 5 | 0,956 | 1,002 | 1,006 | 0,996 | 1,019 | 1,002 | 0,9911 |
| 6 | 0,951 | 1,006 | 0,973 | 1,006 | 1,011 | 1,008 | 0,994 |
| Rp | 1,006 | | | | | | |
| S_R | 0,026 | | | | | | |
| N° | 42 | | | | | | |
| U_{Rp} | 0,004 | | | | | | |

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95% para (n-1) grados de libertad, es decir; para ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y estableciendo como H_0 : “el factor de recobro es significativamente diferente de 1”, para esto se calcula el It_{expl} y se compara con el It_{critl} , siendo que si $It_{expl} > It_{critl}$ se rechaza la H_0 y si el $It_{expl} < It_{critl}$ se acepta la H_0 .

En la tabla número 25 se muestran los resultados de acuerdo a los cuales se observa que el t-experimental es menor que el t-crítico, por lo tanto, se utiliza la fórmula de incertidumbre combinada total, con la que se calcula la incertidumbre expandida del método que se registra en tabla 26, aceptando la hipótesis nula.

Tabla 25. Evaluación de la significancia entre el factor 1 y el factor de recobro sulfitos.

| Muestra | α (%) | Nivel de confianza | Grados de libertad | t. critico | t. experimental |
|----------|--------------|--------------------|--------------------|------------|-----------------|
| Sulfitos | 5 | 95 | 41 | 1,6829 | 1,4500 |

Tabla 26. Cálculo de la incertidumbre expandida del método.

| | Sulfitos |
|---|----------|
| Incertidumbre combinada total ($U_{c_{total}}$) | 0,026 |
| Incertidumbre expandida del método ($U_{exp\ mét}$) | 0,054 |
| Concentración del analito | 100,000 |
| Incertidumbre expandida en la medición | 5,400 |

Con los cálculos de las incertidumbres se obtienen las gráficas de la figura 9 representadas en forma de barras. Los valores para la contribución de las diferentes fuentes de incertidumbre a la incertidumbre global en la determinación de Sulfitos se pueden observar en la tabla 1 del anexo B.

Se observa que la mayor contribución la hace la incertidumbre combinada aportada por fuentes aleatorias en la determinación de sulfitos en muestras de azúcar. Estas incluyen limitaciones en los instrumentos y otras variables que no pueden ser controladas, mientras que las fuentes sistemáticas relacionadas con el funcionamiento del equipo o el procedimiento realizado por el operario, presentan el menor aporte en la incertidumbre de la medida.

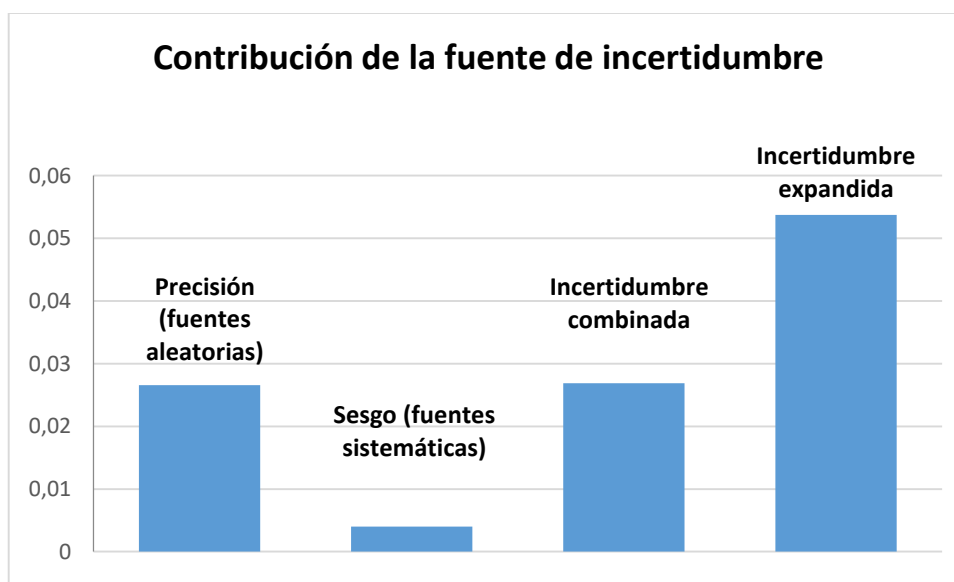


Figura 9. Gráfico de la contribución de la fuente: sulfitos.

El reporte de la incertidumbre en un análisis se hace en las mismas unidades del parámetro determinado a través de la desviación estándar. Por lo tanto, para la determinación Sulfitos.

$$\text{SO}_2 \text{ (ppm)} = \text{valor medido} \pm (\text{valor medido} \times 0,054)$$

Hay aproximadamente un 95% de probabilidad de que el valor verdadero de la concentración de SO₂ de una muestra se encuentre dentro del intervalo dado por el valor obtenido al analizar la muestra y su incertidumbre.

De todas las consideraciones anteriores, se deduce que la metodología, queda debidamente implementada, validada siendo un método robusto, sensible preciso exacto y lineal.

8. CONCLUSIONES

Se implementó la metodología GS2/1/7-33/2005 del manual de métodos ICUMSA (2002) para la determinación de sulfitos en 4 muestras de azúcar diferentes en el laboratorio de Calidad del ingenio del Cauca S.A.S, del cual se concluye que es un método sensible, preciso, exacto, lineal, reproducible y robusto.

Los resultados obtenidos, evaluados en un intervalo de confianza del 95% nos indican que la metodología implementada da resultados confiables para evaluar la concentración de Sulfitos en muestras de azúcares.

La determinación de sulfito en diferentes muestras de azúcar presenta bajos coeficiente de variación (% CV), demostrando que la metodología implementada es precisa generando resultados confiables. Los valores obtenidos para la concentración de sulfitos por esta metodología están dentro de los valores máximos permisibles 150 ppm para azúcar blanco y 350 ppm para azúcar crudo. [8]

Los límites de detección y de cuantificación del método colorimétrico de la para-rospanilina por espectrofotometría UV-Vis son adecuados para cada curva de calibración en diferentes muestras de azúcar, están sobre el primer nivel y permiten tener una cuantificación sensible a bajas concentraciones del compuesto.

Los datos obtenidos en la validación provienen de una población de datos normales permitiendo aplicar pruebas estadísticas paramétricas como ANOVA, que sirve para determinar las diferencias significativas en los resultados obtenidos en base a repetibilidad y precisión intermedia del método.

La robustez y tolerancia del método se realizó mediante la variación de equipo y analista, su análisis se hizo mediante un contraste de comparación de las medias muestrales, obteniendo que las medias no difieren significativamente, lo que permite establecer, que el método es robusto y tolerante para las condiciones establecidas.

Los datos obtenidos en la validación, protocolos de ensayo e instructivos técnicos, necesarios para llevar a cabo de manera clara la determinación de Sulfitos mediante el método colorimétrico de la para-rospanilina por espectrofotometría UV-Vis se elaboraron y se implementará su aplicación en los laboratorios del ingenio del Cauca S.A.S.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] FAO/OMS, Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento., 18th ed. p.24-25. 2016.
- [2] INTERNATIONAL COMMISSION FOR UNIFORM METHODS OF SUGAR ANALYSIS. Determinación de sulfito con el método colorimétrico de rosanilina en azúcares blanco y crudo. Alemania. ICUMSA 2002 (GS2/1/7-33/2005).
- [3] Norma Técnica Colombiana NTC ISO/IEC 17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Icontec. Bogotá, 2005.
- [4] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. "Sistema de gestión de la calidad. NTC- ISO 9001: 2008." Recuperado de: <http://incauca.incc.4cloud.co/wp-content/uploads/2016/05/Certificado-Icontec-NTC-ISO-9001-2008.pdf>. Citado 17-08-2017
- [5] Giraldo, F. "Cosecha, alce y transporte para el cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali". CENICAÑA. p.357-362. 1995.
- [6] Gani. A, Yuwono. M, y Kuswandi. B, «Development of Optical Chemical Sensor Based on Pararosaniline in Sol-Gel Matrix for Detection of Formaldehyde in Food Samples», *Am. J. Anal. Chem.*, Vol. 2, p.8-9, 2013.
- [7] INCAUCA, "Procesos de producción industrial." Recuperado de: <http://www.incauca.com/es/procesos.pdf>, Citado 17-08-2017
- [8] C. Stan, "Norma Del Codex Para Los Azuceres Codex Stan 212-1999," p. 5, 2001.
- [9] N. S. y M. S. B. Silvia Zossi, Gerónimo J. Cárdenas, "Análisis del proceso de sulfitación en la remoción de compuestos no azúcares en jugos de variedades de caña de Tucumán (R. Argentina," *Rev. Ind. y Agrícola Tucumán R. Argentina*, Clarificación de jugos de caña de azúcar por sulfitación, Vol 1. tomo 89. p. 9-24, 2012.
- [10]. Entidad Nacional de Acreditacion ENAC. Recuperado de: <http://www.enac.es/web/enac/acreditacion>. Citado 20-03-2018.
- [12]. ORGANISMO NACIONAL DE ACREDITACIÓN DE COLOMBIA, ONAC. Servicio de Acreditación. Colombia. Recuperado de: <http://www.onac.org.co/modulos/contenido/default.asp?idmodulo=243>. Citado 17 de diciembre 2017
- [13] ORGANISMO HONDUREÑO DE NORMALIZACIÓN. Acreditación Colombia. Recuperado de: <http://www.hondurascalidad.org/acreditacion.htm>. Citado el 14-08-2017

[14] S. Sandoval, "Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos," *Dep. salud Ambiental. Santiago de Chile*, p. 66-78, 2010.

[15] J. N. Miller and J. M. Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4th ed. Pearson Educación, 2002.

[16] Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. McGraw Hill, 5th ed. 2001.

[17] G. F. Mercader, *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*, 2nd ed. Mexico, 2005.

[18] R. Castillo A., Beatriz, Gonzalez H., "Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la cuantificación de Fármacos.," *Rev. Cuba. Farm.*, p.22-25, 1996.

[19] J. Hipp, C. Hill, and M. Hall, "Evaluación de datos de medición Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida," *Test*, p. 309-326, 2007.

[20] M. A. Dosal and M. Villanueva, "INTRODUCCIÓN A LA METROLOGÍA QUÍMICA: Curvas de calibración en los métodos analíticos," *Antología Química Analítica Exp.*, p. 18-25, 2008.

[21] N. O. Identificación, D. E. L. Producto, P. De, N. Tecnica, and C. Ntc, "Ficha técnica para azúcar blanco y azúcar blanco especial en presentaciones familiares ingenio Pichichi," Vol. 11, p.44-46, 2017.

[22] Fernández, F. J., B. Lumas y Beaty, M. M. *A New Burner System for Atomic Absorption Spectrophotometry. Atomic Spectroscopy*. Vol 1, p. 55 -57. 1980.

[23] Brown, Ch. Ultraviolet, visible, and near-infrared spectrophotometers. *Applied Spectroscopy Reviews*, Vol. 5, p. 151-173. 2000.

[24] J. H. Robins, G. D. Abrams, and J. A. Pincock, "The structure of Schiff reagent aldehyde adducts and the mechanism of the Schiff reaction as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy," *Can. J. Chem.*, Vol. 58, p. 339-347, 1980.

[25] A. A. Gani, M. Yuwono, and B. Kuswandi, "Development of Optical Chemical Sensor Based on Pararosaniline in Sol-Gel Matrix for Detection of Formaldehyde in Food Samples," *Am. J. Anal. Chem.*, Vol.13, p. 9-11, 2013.

- [26] J. B. Adams, "Food additive-additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids: A review," *Food Chem.*, Vol. 59, p. 401-409, 1997.
- [27] A. En *et al.*, "Reevaluación De Los Aditivos Del Grupo Anhídrido Sulfuroso Y Sulfitos Por La Autoridad Europea De Seguridad Alimentaria (Efsa)," p. 2-7, 2016.
- [28] Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo, "Dióxido de azufre," *Doc. Límites Expo. Prof.*, p. 1-5, 2014.
- [29] Aguirre, L. Validación de Métodos Analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de Industria. Barcelona, España, p. 55, 2001.
- [30] Bento, L. S. M. UV spectrophotometric analysis of cane sugar colorants. *Zuckerindustry*. Vol. 3, p. 19-22, 1995.
- [31] Bento, L. S. M. Applications of UV spectrophotometry to study sugar colorants throughout the refining process. En: *Proc. of SIT Conference*, p. 219-237. 1995.
- [32] Dasgupta, P. K., DeCesare, K., & Ullrey, J. C. *Determination of sulfur dioxide without tetrachloromercurate (II) and the mechanism of the Schiff reaction*. *Analytical Chemistry*, Vol. 52, p. 1912-1922. 1998.
- [33]. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. Recuperado de:
https://www.researchgate.net/profile/Nguyen_Vuong/post/How_to_calculate_limit_of_detection_limit_of_quantification_and_signal_to_noise_ratio/attachment/59d6445cc49f478072ead2d2/AS%3A273815119040512%401442294020170/download/Methods+for+the+determination+of+limit+of+detection+and.pdf. Citado el 14-08-2018

ANEXOS

Anexo A. Tabla de la distribución t -Student.

| 2 colas | 80% | 90% | 95% | 98% | 99% |
|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|
| $\alpha/2$ | 0.10 | 0.05 | 0.025 | 0,01 | 0,0015 |

| 1 cola | 90% | 95% | 97.5% | 99% | 99,5% |
|----------|-------------|--------------|---------------|-------------|---------------|
| α | 0.10 | 0.05 | 0.025 | 0,01 | 0,0015 |
| ν | | | | | |
| 1 | 3.078 | 6.314 | 12.706 | 31.821 | 63.657 |
| 2 | 1.886 | 2.920 | 4.303 | 6.965 | 9.925 |
| 3 | 1.638 | 2.353 | 3.182 | 4.541 | 5.841 |
| 4 | 1.533 | 2.132 | 2.776 | 3.747 | 4.604 |
| 5 | 1.476 | 2.015 | 2.571 | 3.365 | 4.032 |
| 6 | 1.440 | 1.943 | 2.447 | 3.143 | 3.707 |
| 7 | 1.415 | 1.895 | 2.365 | 2.998 | 3.499 |
| 8 | 1.397 | 1.860 | 2.306 | 2.896 | 3.355 |
| 9 | 1.383 | 1.833 | 2.262 | 2.821 | 3.250 |
| 10 | 1.372 | 1.812 | 2.228 | 2.764 | 3.169 |
| 11 | 1.363 | 1.796 | 2.201 | 2.718 | 3.106 |
| 12 | 1.356 | 1.782 | 2.179 | 2.681 | 3.055 |
| 13 | 1.350 | 1.771 | 2.160 | 2.650 | 3.012 |
| 14 | 1.345 | 1.761 | 2.145 | 2.624 | 2.977 |
| 15 | 1.341 | 1.753 | 2.131 | 2.602 | 2.947 |
| 16 | 1.337 | 1.746 | 2.120 | 2.583 | 2.921 |
| 17 | 1.333 | 1.740 | 2.110 | 2.567 | 2.898 |
| 18 | 1.330 | 1.734 | 2.101 | 2.552 | 2.878 |
| 19 | 1.328 | 1.729 | 2.093 | 2.539 | 2.861 |
| 20 | 1.325 | 1.725 | 2.086 | 2.528 | 2.845 |
| 21 | 1.323 | 1.721 | 2.080 | 2.518 | 2.831 |
| 22 | 1.321 | 1.717 | 2.074 | 2.508 | 2.819 |
| 23 | 1.319 | 1.714 | 2.069 | 2.500 | 2.807 |
| 24 | 1.318 | 1.711 | 2.064 | 2.492 | 2.797 |
| 25 | 1.316 | 1.708 | 2.060 | 2.485 | 2.787 |
| 26 | 1.315 | 1.706 | 2.056 | 2.479 | 2.779 |
| 27 | 1.314 | 1.703 | 2.052 | 2.473 | 2.771 |
| 28 | 1.313 | 1.701 | 2.048 | 2.467 | 2.763 |
| 29 | 1.311 | 1.699 | 2.045 | 2.462 | 2.756 |
| 30 | 1.310 | 1.697 | 2.042 | 2.457 | 2.750 |
| 40 | 1.303 | 1.684 | 2.021 | 2.423 | 2.704 |
| 60 | 1.296 | 1.671 | 2.000 | 2.390 | 2.660 |
| 120 | 1.289 | 1.658 | 1.980 | 2.358 | 2.617 |
| ∞ | 1.282 | 1.645 | 1.960 | 2.326 | 2.576 |

Anexo B.

Tabla 1. Contribución de las fuentes de incertidumbre de sulfitos.

| | Sulfitos |
|---------------------------------------|-----------------|
| Precisión (fuentes aleatorias) | 0,027 |
| Sesgo (fuentes sistemáticas) | 0,004 |
| Incertidumbre combinada | 0,026 |
| Incertidumbre expandida | 0,054 |