Nathalia Paredes Camacho¹, Germán Cuervo^{1*}, Sara Pereddo Vidal²

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Popayán - Colombia

² Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA), Colombia

Corresponding author: nparedes@unicauca.edu.co

Graphical abstract

Implementation of analytical methodologies for water characterization of sugar processing – Part 1: Analysis of bias

Abstract

The objective of this work was the validation of standardized chemical methods for the determination of water quality in the manufacturing units in the sugar processing. This was achieved through analysis of targets, patterns and samples that allowed knowing the functionality characteristics of the validated methods, such as: accuracy, precision, limit of detection and quantification, linear interval and uncertainty. Both the characterization of the process waters that are recovered, recirculated or transformed into effluents during the elaboration of sugar and the quantification of the loss of sucrose through a correlation DBO_{21} vs COD, are derived from the essential objective of this work of degree. The performance of the method showed that the accuracy of the methods in low and high concentration ranges is equivalent to that reported by the ASTM, SMEWW and EPA, the accuracy is acceptable with coefficients of variation lower than the Horwitz acceptance

Keywords

Sugar cane
Water quality
Validation
 DBO_{21} -COD correlation

criterion and the linear interval. The high and low range showed coefficients of determination r^2 greater than 0.995.

Implementación de metodologías analíticas para la caracterización de aguas del proceso de elaboración del azúcar – Part 1: Análisis del sesgo

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la validación de métodos químicos estandarizados para la determinación de la calidad del agua en las unidades fabriles del proceso de elaboración del azúcar. Esto se consiguió a través de análisis de blancos, patrones y muestras que permitieron conocer las características de funcionalidad de los métodos validados, como son: exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, intervalo lineal e incertidumbre. Tanto la caracterización de las aguas del proceso que se recuperan, recircula o se transforman en efluentes durante la elaboración del azúcar como la cuantificación de la pérdida de sacarosa a través de una correlación DBO_{21} vs DQO, se derivan del objetivo esencial de este trabajo de grado. El desempeño del método demostró que la exactitud de los métodos en rangos de concentración bajo y alto es equivalente a lo reportado por la ASTM, SMEWW y EPA, la precisión es aceptable con coeficientes de variación inferiores al criterio de aceptación de Horwitz y el intervalo lineal a rango alto y bajo arrojó coeficientes de determinación r^2 superiores al 0,995.

Palabras claves

Caña de azúcar
Calidad del agua
Validación
Correlación DBO_{21} -DQO

Received: 01-04-2017

Accepted: 21-04-2017

Publishing date: 15 – May – 2017

Revision Code: 20170401-MSPL [Pag. 108-125]

Corresponding author:

nparedes@unicauca.edu.co

Implementación de metodologías analíticas para la caracterización de aguas del proceso de elaboración del azúcar – Part 1: Análisis del sesgo

Nathalia P. Camacho^{1*}, Germán Cuervo¹, Sara Pereddo Vidal²

¹ *Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Popayán - Colombia*

² *Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA), Colombia*

Corresponding author: nparedes@unicauca.edu.co

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la validación de métodos químicos estandarizados para la determinación de la calidad del agua en las unidades fabriles del proceso de elaboración del azúcar. Esto se consiguió a través de análisis de blancos, patrones y muestras que permitieron conocer las características de funcionalidad de los métodos validados, como son: exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, intervalo lineal e incertidumbre. Tanto la caracterización de las aguas del proceso que se recuperan, recircula o se transforman en efluentes durante la elaboración del azúcar como la cuantificación de la pérdida de sacarosa a través de una correlación DBO₂₁ vs DQO, se derivan del objetivo esencial de este trabajo de grado. El desempeño del método demostró que la exactitud de los métodos en rangos de concentración bajo y alto es equivalente a lo reportado por la ASTM, SMEWW y EPA, la precisión es aceptable con coeficientes de variación inferiores al criterio de aceptación de Horwitz y el intervalo lineal a rango alto y bajo arrojó coeficientes de determinación r^2 superiores al 0,995.

Palabras Claves

Caña de azúcar
Calidad del agua
Validación
Correlación DBO₂₁-DQO

1. Introducción

La validación de un método es un proceso analítico que tiene como objeto recopilar información argumentable que caracterice e identifique el método basándose en los parámetros de calidad que permitan establecer si este es apto o no para un propósito [1]. En ese orden de ideas, la recopilación de información es la recolección de un conjunto de datos que generan los seguimientos programados por método analítico y las mediciones resultantes tienen la función de evaluar la capacidad de los métodos involucrados estimando su exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación. Durante este proceso de verificación, se realizan revisiones periódicas de los datos obtenidos,

evaluando los avances de cada método en términos de exactitud y límites de detección y cuantificación. Mediante este filtro, es posible reconocer las dificultades metodológicas que repercuten especialmente en la exactitud del método, por lo que es necesario realizar ajustes, modificaciones, y mejoras a las instrucciones metodológicas que deben propender por resultados más eficientes, esto es, en términos de exactitud, a porcentajes de recuperación aceptables o equivalentes respecto a los reportados en la literatura especializada [2]. La validación de cada método finaliza con el análisis estadístico de un grupo de datos. La información está constituida por las mediciones analíticas que aporta cada seguimiento, siendo este último conformado por replicados de muestras,

patrones y múltiples blancos de muestra que les dan un valor cuantitativo a los atributos estadísticos seleccionados.

La elección de los analitos a determinar depende de la necesidad del usuario y de la constitución e influencias que posea la matriz. Para darle confianza al resultado que entrega la caracterización, debe conocerse la respuesta del método en torno al mensurando, que como se ha mencionado, se consigue con el estudio de las características de confiabilidad que consti-tuyen la validación del método [2].

La caracterización toma importancia en la validación debido a la necesidad de reconocimiento en el material objeto de estudio, de manera que pueda encaminarse a nuevas alternativas de aprovechamiento. Especialmente en los procesos industriales que utilizan el agua como materia prima en donde se pueden y deben maximizarse esfuerzos en torno a la recuperación y al reúso del recurso hídrico. En particular, en los procesos de fabricación del azúcar de caña, se deben practicar análisis químicos cuantitativos a unidades del proceso fabril, que describan la calidad fisicoquímica de las aguas empleadas. Con este diagnóstico, es posible proponer y orientar usos futuros del recurso, de acuerdo a las exigencias de cada proceso con la garantía de tenerlo químicamente identificado. Esto por supuesto tendrá un enorme impacto positivo en la captación de agua que deben realizar los ingenios azucareros para mantenimiento de su infraestructura, reposición en los sistemas de enfriamiento y producción de azúcar; además, al conocer las características del agua que se requiere suministrar en cierto proceso durante la producción del azúcar o el mantenimiento de la fábrica, una fracción de la demanda de agua inherente a este desempeño fabril, sería abastecida por el agua que el mismo proceso recupera, sobre todo donde se operan transformaciones limpias, lo que reducirá la captación del recurso hídrico de fuentes superficiales y subterráneas. Por ejemplo, un tipo de agua de proceso con una concentración reducida de dureza y materia orgánica puede convertirse en una alternativa para el agua de refrigeración de accionamientos de molinos y turbos o ser una fuente de reposición para calderas. Por otro lado, cuantificar la contribución en términos de metales, sólidos y materia orgánica que arrastran las aguas recuperadas, recirculadas y los efluentes, permitirá decidir y planear tipos de tratamientos (sean físicos, químicos o microbio-

lógicos) que consigan una mejora en la calidad del agua (cuando la naturaleza de la matriz recuperada no satisfaga los requerimientos inmediatos del sistema) de manera que el agua tratada: Se vincule nuevamente a la actividad de la fábrica o, sea vertida cumpliendo con la normatividad ambiental y sobre todo contribuyendo a la desactivación o transformación de sustancias y especies potencialmente tóxicas para los cuerpos de agua.

La validación de los métodos y la caracterización de las aguas de procesos es una iniciativa del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña que en la actualidad está integrada al proyecto “Balance de aguas y etanol”. Para su ejecución y desarrollo, Cenicaña ha logrado promocionar al sector azucarero, la importancia de caracterizar el agua de proceso fabril para un futuro aprovechamiento. Desde la perspectiva ambiental, la caracterización del agua de proceso, es una fuente de información que está siendo reconocida por los ingenios azucareros interesados en conocer la calidad de sus efluentes, de manera que puedan optar por hacer correcciones o procedimientos de mejora para reducir la contaminación que pueda estar aportando determinado tratamiento. Sin embargo, no todo el fluido que se inyecta a las etapas de mantenimiento y producción, se convierte en efluente. La industria azucarera en Colombia, utiliza corrientes de agua que obtiene por condensación para otros fines de la misma fábrica, las cuales se consideran aparentemente limpias o útiles, dependiendo de la demanda o requerimiento del destino de uso. Esta selección del agua recuperada para otros usos, toma relevancia con la caracterización, ya que la decisión contaría con un atributo cuantitativo (agua de proceso químicamente identificada), que le permite al ingenio con argumentos demostrables, tomar una decisión segura, la misma que por simple inspección o por ensayos muy específicos pueden dejar a la deriva o a la intuición, aportes significativos de otras impurezas que afectarían la producción de la materia prima. Si bien es una tarea ardua el reconocimiento del agua de proceso en cada etapa de producción, la inversión vale la pena si se tiene en cuenta que al caracterizar el agua de los procesos, prácticamente se está identificando la contribución del sistema de donde proviene; se potencia el uso, se reduce el consumo sobre cuerpos de agua y se tiene información para tomar acciones que mejoren las características químicas de una fuente relativamente limpia, para

que pueda inyectarse de nuevo y adicionalmente, se pueden planificar sistemas o tipos de tratamientos que entreguen un efluente compatible con el medio ambiente.

La elevada demanda del recurso hídrico en los procesos de producción que desarrollan las industrias, crea la necesidad de optimizar el consumo de agua, sobre todo si las fuentes de captación provienen de cuerpos de agua superficiales y subterráneos. En la industria azucarera, la validación y la caracterización de las aguas del proceso toma importancia porque permite reconocer la composición química del agua para hacer una buena gestión del recurso, especialmente cuando una fracción del agua que se recupera en las etapas de elaboración procede de transformaciones limpias que son potencialmente óptimas para abastecer las unidades del proceso. Por otro lado, la caracterización de las aguas del proceso del ingenio azucarero no ha sido objeto de estudio y su historial de análisis químico solo cuenta con determinaciones aisladas de hierro, calcio y magnesio, por ser la acumulación de estos un problema de incrustación y daño en tuberías, por ello, contar con una descripción química cuantitativa de sus caudales, se consolida como una prioridad para abordar problemáticas que serán más fáciles de resolver con el reconocimiento del material.

El objetivo del presente trabajo fue identificar la calidad del agua en los circuitos principales identificados en la planta de azúcar de un ingenio piloto, mediante pruebas fisicoquímicas que se respaldan estadísticamente con la estimación de los atributos de validación de los siguientes métodos analíticos: calcio, magnesio, hierro, demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), material extractable en hexano, sólidos suspendidos totales (SST), pH y conductividad.

2. Sección experimental

La metodología de este trabajo se inició con una fase de investigación, recopilación y selección de criterios de validación de los métodos, seguida por la asignación de normas internacionales que certifican la viabilidad de los mismos. Luego, se continuó con la ejecución de los procedimientos analíticos de cada determinación, siguiendo las instrucciones recomendadas por las normas que se establecieron para cada una de ellas. En algunos casos, la metodología se ajustó, complementando etapas del procedimiento que en la norma se omiten o simplemente que no están documentadas y se dejan a responsabilidad del analista. En la mayoría de los métodos se practicaron recomendaciones puntuales que no se describen en la norma, las cuales quedaron consignadas en los protocolos oficiales entregados al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña.

2.1 Asignación de estándares internacionales y ensayos previos

Las metodologías aplicadas en las diferentes determinaciones se basaron en los protocolos registrados en: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) [2], la *American Society for Testing and Materials* (ASTM) [3-5] y la Environmental Protection Agency (EPA) [6]. Se contrastaron entre ellos con el fin de escoger el método más adaptable a las necesidades de la validación y a la disponibilidad de equipos e infraestructura del laboratorio.

Los estándares seleccionados para cada determinación se relacionan a continuación:

Tabla 1. Estándares seleccionados para la determinación de parámetros de calidad de agua

Método	Concentración mg/L	Estándar
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	50-600	SMEWW
Demanda química de oxígeno (DQO)	350-750	ASTM
Calcio y magnesio (Ca y Mg)	13,3-2,38	ASTM
Hierro total (Fe)	0,2-4,4	ASTM
Material extractable en hexano (MEH)	20	EPA
Sólidos suspendidos totales (SST)	7-700	ASTM
Potencial de Hidrógeno (pH)	5 UpH	ASTM
Conductividad	81-706 μ S/cm	ASTM

La mayoría de los métodos se implementaron en el laboratorio de análisis de suelo y tejido foliar de Cenicaña y en el Laboratorio de Microbiología Industrial de Cenicaña.

Para las pruebas de rutina se establecieron dos rangos de concentración, que en adelante se llamarán rango alto (RA) y rango bajo (RB). Estos valores de concentración se aplicaron para todos los métodos analíticos a validar en aguas del proceso fabril. Para identificar los rangos de concentración, se analizaron diferentes tipos de aguas del proceso, con objeto de identificar una corriente que cumpliera con un rango alto y otra con un rango bajo de concentración, de manera general para todas las determinaciones, entre ellas: agua del sistema de tratamiento de efluentes (lagunas de oxidación y cenizas) agua del sistema de inyección y retorno, condensados de cuerpo, agua de lavado de caña y condensados de evaporadores. Se estableció *el agua de lavado de caña* como rango alto para la determinación de DBO, Ca y Mg, Fe, Grasas y/o Aceites, SST, pH y Conductividad y *el agua del sistema de retorno o rechazo* como rango alto para DQO. Los *condensados de calandria de evaporadores* se seleccionaron como una corriente de rango bajo para la determinación de DBO, DQO, Ca y Mg, Fe, SST, pH y Conductividad [7-9].

2.2. Programación para la validación

Se estructuró un plan de trabajo para llevar a cabo la validación, caracterización y cuantificación de pérdida de sacarosa durante un periodo de 10 meses en el que se estableció:

- La evaluación de réplicas de patrones de alta y baja concentración, preparados con estándares certificados y agua grado reactivo Tipo II [10], mediante el cual se examinó la exactitud y repetibilidad del método.
- El análisis de réplicas de las muestras de rango alto por cada determinación, para lo cual se especifica que *el agua residual de lavado de caña* se empleó para todas las determinaciones a excepción de la DQO. Las réplicas de las muestras para la DQO se realizaron con *el agua del sistema de retorno o rechazo* del ingenio piloto. Los datos de las réplicas por muestra en su respectivo rango de concentración evaluaron la repetibilidad en la matriz natural. Para el caso de las muestras naturales, RA y RB hace referencia a la calidad de la matriz y no a la cantidad de patrón adicionado.

- El análisis de una réplica de muestra tanto de rango alto como de rango bajo de la misma recolección que los anteriores, los cuales se fortificaron con un estándar certificado. A través de estos ensayos se estimó la exactitud del método incorporando el efecto matriz de la muestra para cada uno de los rangos. En las muestras a RA se dopo con una concentración pequeña y para las muestras a RB se dopo con una concentración alta.

- Que los análisis anteriores se realizaran durante 5 ocasiones diferentes. En esta parte se involucró la variación del día en el que se toma la muestra, de las condiciones ambientales del laboratorio, de los equipos o instrumentos del laboratorio. Estos aspectos evaluaron la precisión intermedia de los métodos en agua tipo II y en la matriz analizada.

- La cuantificación de 15 blancos de muestra para cada determinación química. El blanco de muestra fue preparado primero por destilación y luego por desionización, lo que se clasifica por el tipo de tratamiento que recibe como agua Tipo II [10]. La evaluación de los 15 blancos de muestra se realizó simultáneamente con la instalación de las muestras. Todo el itinerario que se siguió para las muestras como digestión, adición de agentes químicos, ajuste de pH, filtración, lavados, enrase, etc., también se practicó en los blancos. El análisis cuantitativo de los blancos se realizó con agua Tipo II de diferentes días, en condiciones de temperatura y humedad variables entre días y con material de laboratorio distinto por vez. A través del análisis del conjunto de blancos se estimó el límite de detección y de cuantificación del método.

2.3. Procedimiento y seguimiento estadístico para estimar los criterios de confiabilidad

2.3.1 Límite de detección y cuantificación

El valor de σ se determinó con 15 blancos de muestra por método, a excepción de la determinación de MEH que se dedujo con 8 blancos. Para DBO es preciso aclarar la razón por la cual fue necesario cuantificar LD y LQ por separado para muestras y patrones así la técnica y el método que se aplicaron fueran los mismos. Los patrones que se preparan con agua destilada estéril, no tienen una población significativa de microorganismos, y para conseguirla es necesario agregar una simiente al volumen de patrón que se desea incubar mientras que las muestras de lavado de caña que se dopan,

Tabla 2. Constantes (✓) y variables (x) en la validación de los métodos

Precisión	Laboratorio	Material	Analista	Ambiente	Muestra	Equipo
r	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Intermedia	✓	✓	✓	x	x	✓

normalmente cuentan con una población vasta de microorganismos. Por lo tanto, el blanco para patrones es distinto al de muestras, uno involucra reactivos y simiente, el otro únicamente reactivos.

2.3.2. Exactitud y sesgo

El porcentaje de recuperación que se reporta por método se deduce como el promedio del porcentaje de recuperación individual conseguido en todos los seguimientos. La exactitud evaluó dos rangos de concentración tanto en patrones como en muestras naturales. La designación de RB y RA en muestras naturales, hace referencia a las características de la muestra natural y no a la concentración adicionada o dope. El criterio de aceptación que se referenció para comparar el %R experimental es el reportado por las normas que se indican en 0. El sesgo se obtuvo a partir del promedio del error sistemático obtenido en todos los seguimientos que constituyeron la validación tanto en patrones como en muestras naturales. Para demostrar la evidencia de error sistemático se utilizó el contraste de significación “comparación de una media experimental con un valor conocido” [11]. Este contraste, se trata de una prueba t student de dos colas (bilateral) que permite decidir si $\bar{x}$ y μ son iguales. En algunas evaluaciones experimentales, la forma del contraste de significación puede tomarse como unilateral (de una cola) [11]. Sin embargo, la prueba t student de este caso es bilateral. Esto, porque la hipótesis que se planteó no intenta decidir si la diferencia de $\bar{x}$ es mayor o menor que μ (una cola), sino que $\bar{x}$ es igual μ .

2.3.3. Precisión

Con las réplicas de cada conjunto de datos se determinó el coeficiente de variación. Se utilizó como criterio de aceptación el coeficiente de variación de Horwitz el cual ha sido propuesto como un valor de referencia para evaluar el desempeño de laboratorios de química analítica [12-15]. Para estimar la repetibilidad y la precisión intermedia se informó a SAEE sobre las condiciones que se mantuvieron constantes y aquellas no controladas

en la ejecución de los métodos. La Tabla 2 especifica las condiciones generales de validación. Para descartar la presencia de resultados anómalos se empleó el contraste de Dixon o contraste Q. Este se aplicó en un seguimiento por duplicado de la determinación de la DQO RB.

2.3.4. Incertidumbre

Para la determinación de la incertidumbre en cada método, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Se identificaron todas las fuentes de incertidumbre posibles que afectan el mensurando teniendo presente los pasos críticos de la técnica analítica del método desarrollado.

Se cuantificaron cada una de ellas como $\mu(x)$, $\mu(y)$, $\mu(z)$, etc.

Se aplicó la ley de propagación de la incertidumbre para estimar la incertidumbre combinada μ_c . En otras palabras, se combinó la incertidumbre de cada fuente individual.

Se calculó la incertidumbre expandida U_{exp} multiplicando la incertidumbre combinada μ_c por el factor de cobertura recomendado, que en este caso es 2 y representa una probabilidad del 95%. Este factor es el recomendado por Eurachem para la determinación de la incertidumbre en análisis químicos [1].

Como no se trató de una determinación analítica simple sino de un compendio de análisis en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, el intervalo de confianza que se reportó en cada método es un atributo descriptivo de la capacidad del método en cierto rango de concentración.

2.3.5. Intervalo lineal

Para la determinación de hierro total por el método espectrofotométrico el intervalo o rango lineal se analizó durante la validación del método.

Este procedimiento se completó con 3 curvas de calibración para un intervalo de concentraciones conocido como rango bajo en el que se involucraron 9 estándares de concentración conocida de 0,2 hasta 1 mg/L Fe y otras 3 curvas de calibración para un intervalo de concentraciones de rango alto que

cuenta con 7 estándares que van desde 3 hasta 6 mg/L Fe.

La linealidad de cada curva se verificó por inspección visual a través de la curva de Ringbom y se comprobó matemáticamente con un: Contraste t de dos colas, análisis de varianza y test de linealidad.

El contraste t de dos colas se utilizó para probar una correlación significativa, (si y y x estaban linealmente correlacionados), es decir, H_0 = correlación cero; el análisis de varianza permitió decidir si las tres graficas de calibrado que constituyeron la curva de trabajo no difieren significativamente y el test de linealidad determinó si el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta fue inferior al 5%.

2.4. Caracterización

La caracterización se llevó a cabo en las siguientes corrientes de proceso: salida de condensados de calandria sin dulce, salida de condensados de calandria con dulce, entrada y salida de la torre de enfriamiento de molinos, entrada y salida de la torre de enfriamiento de turbos, entrada y salida de la trampa de grasas. Se aplicó un muestreo simple para todas las ante-riores, a excepción del circuito de la trampa de grasas donde se realizó un muestreo compuesto de 1 hora a la entrada y salida del sistema.

2.5. Procedimiento Experimental

2.5.1. Muestreo y preservación

La recolección y preservación de las muestras en general, se llevó a cabo siguiendo las pautas recomendadas por el ASTM D3370 [12]. En primer lugar, se destinaron recipientes de polietileno de 2 L o 1 galón para la recolección de las muestras, los cuales se etiquetaron previamente identificando: Tipo de muestra, hora de recolección, fecha de recolección, ingenio piloto, volumen recolectado, responsable del análisis. Se manejó una bitácora de control donde se tuvo presente el responsable del muestreo cuando difería del responsable del análisis, así como el lugar, la jornada de muestreo, el tipo de preservante usado cuando este era necesario y la apariencia del agua de proceso en los términos de color, olor y presencia de sólidos. Se establecieron los puntos de muestreo más representativos de cada uno de los sistemas, diferen-

ciando en aquellos que son circuitos, la entrada y la salida. Así, el agua de rechazo, se tomó de la canal del circuito, a la salida del condensador barométrico. El agua de lavado de caña, se recolectó en la canal por donde circula el agua después de lavarse la caña. El agua de condensados de calandria de evaporadores se tomó de sus propios muestreadores. El agua de la trampa de grasas se tomó a la entrada y salida del circuito.

Los casos que hayan presentado variaciones que se consideren relevantes durante esta etapa, serán especificadas, como ocurre para grasas y/o aceites. La homogeneización de las muestras empleadas para cada metodología (excepto grasas y/o aceites) se realizó a través de agitación magnética con el recipiente sellado. Cada muestra se mezcló meticulosamente durante un período de 15 minutos previa división o repartición de la misma muestra. Las alícuotas tomadas para el análisis que se aislaron de la muestra dividida, también se agitaron permitiendo su homogeneización y uniformidad.

2.5.2. Procedimiento para DBO

Los análisis de DBO se llevaron a cabo dentro de los tiempos de conservación sugeridos por el SMEWW

[8] y por la NTC-ISO 5667-3 [11]. La determinación se realizó por el método respirométrico empleando botellas ámbar con sensores de presión en el cabezal. El equipo es de la marca OXITOP® dotado de una bandeja de agitación e incubadora con control de temperatura. Para el banco e inóculo se utilizó un equipo agitador (shaker) marca Heindolph modelo Unimax 1010.

2.5.3. Agua de condensados de calandrias para el banco de microorganismos

Una de las condiciones determinantes para la cuantificación de la DBO, es la presencia de una población apta de microorganismos, capaz de transformar la materia orgánica biodegradable. Esta población, se extrae de una fuente de agua apropiada y se utiliza para la preparación del inóculo. Un banco de microorganismos es una reserva de seres vivos microscópicos, aislada de una fuente de agua apta, esto es, libre de compuestos que afecten la viabilidad de los mismos [2,14]. Para propósitos de la validación de la DBO, el banco de microorganismos se preparó para mantener una

fuelle de microorganismos para la preparaci3n del in3culo cada vez que fuese requerido.

La reserva de microorganismos que se emple3 para todos los ensayos de validaci3n y caracterizaci3n, se prepar3 con el agua de condensados de calandria de evaporadores de segundo y tercer efecto. 3sta, se obtiene durante la concentraci3n del jugo diluido, en el que ocurre un cambio f3sico de la materia (condensaci3n). La transformaci3n f3sica del vapor de agua (estado gaseoso) al estado l3quido, recupera aguas del proceso que se conocen como “condensados de calandria”. Durante dicho proceso, la probabilidad de que el agua condensada contenga impurezas en su mayor parte de car3cter org3nico, es elevada. Durante la condensaci3n del agua, algunas part3culas que se mantienen suspendidas en el evaporador por efecto de la temperatura, la presi3n y la cin3tica de las mol3culas, pueden ser arrastradas hacia el agua. Debido a que el jugo diluido es principalmente una mezcla de agua y sacarosa, la composici3n del agua condensada contendr3 al menos sacarosa o los productos de la hidr3lisis microbiol3gica de 3sta.

La elecci3n de los condensados de calandria para la reserva de microorganismos, deriv3 de su calidad y del conocimiento del proceso fabril por el cual se obtiene. Esta fuente de agua est3 libre de sustancias t3xicas que puedan afectar las caracter3sticas deseables del in3culo. Para confirmar lo anterior, primero se describi3 el proceso de recuperaci3n del condensado, descartando la posible intervenci3n de sustancias da1inas para los microorganismos y luego se analizaron algunas caracter3sticas qu3micas del agua de condensados de calandria de los evaporadores como el pH, la concentraci3n de hierro y la dureza. Las condiciones para la validaci3n se describen en la Tabla 3.

2.5.4. Procedimiento para la demanda qu3mica de ox3geno (DQO)

Los an3lisis de DQO se llevaron a cabo dentro de los tiempos de conservaci3n sugeridos por la ASTM D1252-06 [3] y por la NTC-ISO 5667-3 [13]. La determinaci3n volum3trica se realiz3 por el m3todo de reflujo cerrado, empleando como digestor un termorreactor spectroquant® TR-620 marca MERCK con control de temperatura y como instrumento de medici3n bureta marca BRAND y condiciones de ejecuci3n equivalentes a las de la ASTM D1252-06 [13]. Las condiciones de validaci3n se muestran en la Tabla 4.

2.5.5. Procedimiento para calcio y magnesio

La recolecci3n y preservaci3n de la muestra se realiz3 como se describe en la metodolog3a experimental 0. Los an3lisis de Calcio y Magnesio se llevaron a cabo dentro de los tiempos de conservaci3n sugeridos por la ASTM D511-09 [14] y por la NTC-ISO 5667-3 [13]. Debido a que se trat3 de una determinaci3n de calcio y magnesio total, ninguna de las muestras se filtr3 sobre membrana de 0,45 μm durante la recolecci3n de la muestra. La determinaci3n se realiz3 por volumetr3a, empleando como instrumento de medici3n bureta marca BRAND y las condiciones de ejecuci3n equivalen a ASTM D511-09 [14]. Las condiciones para la validaci3n de calcio y magnesio se relacionan en Tabla 5.

2.5.6. Procedimiento para hierro

La recolecci3n y preservaci3n de la muestra se realiz3 como se describe en la metodolog3a experimental 0. Los an3lisis de hierro se llevaron a cabo dentro de los tiempos de conservaci3n sugeridos por la ASTM D511-09 [14] y por la NTC-ISO 5667-10 [3]. La determinaci3n se realiz3 por espectrofotometr3a empleando un equipo de absorci3n at3mica de llama marca Perkin Elmer modelo AAnalyst 400. Las condiciones de trabajo en el equipo fueron: presi3n del oxidante (aire) 400 kPa; presi3n del combustible (acetileno) 15 psi; longitud de onda 248.3 nm con lecturas de muestra por duplicado y tiempos de inyecci3n de 3 segundos. Las condiciones para la validaci3n de hierro se relacionan en las referencias.

La curva de calibraci3n se realiz3 en dos rangos de concentraci3n 0,2-1,0 mg/L Fe y 3,0-6,0 mg/L Fe. El blanco para la curva se prepar3 y emple3 en una proporci3n 1:500 entre 3cido n3trico y agua desionizada respectivamente.

2.5.7. Grasas y/o aceites

La recolecci3n de las muestras para el an3lisis de material extractable en hexano (MEH) se realiz3 en recipientes de vidrio nuevos 3mbar marca SCHOOT DURAN. Durante la validaci3n del m3todo se hizo un muestreo simple que se aplic3 3nicamente para muestras a RA. La recolecci3n se logr3 por inmersi3n del recipiente a la unidad de proceso, hasta obtener un llenado directo y completo.

La medici3n de pH y temperatura no se efectu3 en

Tabla 3. Condiciones de la validación para DBO₅

Rango	Muestra	Muestra enriquecida	Patrón
Alto	Sin inóculo (SI)	100 mg/L glucosa SI	600 mg/L glucosa CI
Bajo	Con inóculo (CI)	300 mg/L glucosa CI	50 mg/L glucosa CI

Tabla 4. Condiciones de la validación para DQO

Rango	Muestra	Muestra enriquecida	Patrón
Alto	Dilución 1:4	150 mg/L C ₈ H ₅ O ₄ K*	750 mg/L C ₈ H ₅ O ₄ K
Bajo	Sin dilución	270 mg/L C ₈ H ₅ O ₄ K	350 mg/L C ₈ H ₅ O ₄ K

*Ftalato ácido de potasio

Tabla 5. Condiciones de la validación para calcio y magnesio

Rango	Muestra enriquecida		Patrón	
	Calcio	Magnesio	Calcio	Magnesio
Alto	10 mg/L	10 mg/L	NA	NA
Bajo	NA*	NA*	13,3 mg/L	2,38 mg/L

NA=no aplica

Tabla 6. Condiciones de la validación para hierro

Rango	Muestra enriquecida	Patrón
Alto	0,5 mg/L de Hierro	0,2 mg/L de Hierro
Bajo	3,0 mg/L de Hierro	4,4 mg/L de Hierro

Tabla 7. Condiciones de la validación para grasas y/o aceites

Rango	Muestra enriquecida mg/L hexadecano: ácido esteárico	Patrón mg/L hexadecano: ácido esteárico
Alto	20	20

Tabla 8. Condiciones de la validación para sólidos suspendidos totales

Rango	Volumen óptimo de filtración, mL	Implementos en la filtración
Alto	20	Filtro microfibras vidrio* 1,2µm + fibra óxido de aluminio
Bajo	70	Filtro microfibras vidrio* 1,2µm

*Whatman Grado GF/C 25mm Ø

muestras destinadas a la determinación de Grasas y/o Aceites ya que el contacto de la muestra con el electrodo, papel indicador, termómetro u otros materiales puede adherir MEH a estos elementos. En los casos en el que la partición de la muestra fue imprescindible para réplicas de validación, el contenedor de la muestra se agitó manualmente y se distribuyó sobre sendos recipientes de vidrio con

tapa, para su posterior extracción. La preservación se practicó con ácido sulfúrico concentrado y refrigeración a 4 °C durante un tiempo de conservación que no superó los 28 días [15-17]. El muestreo compuesto solo se estableció en el circuito de la trampa de grasas. La muestra se reunió durante 1 hora, tomando una muestra simple de 160mL cada 10 minutos. La determinación se realizó por

gravimetría, empleando una balanza Mettler Toledo modelo ML204 con capacidad de 220 g, horno de secado marca Precision modelo CC0042 y embudo de separación de 500 mL. Los tiempos de extracción y separación de la fase acuosa y orgánica fueron de 3 y 15 minutos respectivamente. Las condiciones para la validación se muestran en la Tabla 7.

2.5.8. Sólidos Suspendidos Totales (SST)

La recolección y preservación de la muestra se realizó como se describe en la metodología experimental 0. Los análisis de Sólidos Suspendidos Totales se llevaron a cabo dentro de los tiempos de conservación sugeridos por la ASTM D3976-92 [17]. Los volúmenes de muestra para SST RB y RA no son arbitrarios, estos se determinaron construyendo una gráfica de tiempo versus volumen de muestra que identificó el punto de quiebre o razón de cambio [18].

La determinación se realizó por gravimetría empleando una balanza Mettler Toledo modelo ML204 con capacidad de 220 g y horno de secado marca Precision modelo CC0042. La metodología es equivalente a ASTM 5907-10 [18]. Las condiciones para la validación se indican en la Tabla 8. Todas las muestras de la caracterización se filtraron con el equipamiento de RB.

2.5.9. Procedimiento para pH y conductividad

El muestreo se efectuó como se practicó en 0 La medición de temperatura, pH, y conductividad se realizó in situ. Ninguna de las determinaciones anteriores se generó después de la adición de preservantes u otro tipo de sustancias, ni después de enfriarse o exponerse más de una hora al ambiente; tener presente que la transferencia de dióxido de carbono cambia las propiedades químicas del agua, lo que repercute especialmente en el valor del pH y la conductividad. Solo cuando era estrictamente necesario dividir la muestra original en diferentes recipientes para objetivos de la validación o para otras determinaciones químicas, la medición se realizó 10 o 15 minutos después de su recolección, exponiendo la muestra a las condiciones ambientales del laboratorio menos de 5 minutos. Los análisis se llevaron a cabo según la norma ASTM D1293-12 [19] y ASTM D1125-95 [20]. La determinación se realizó usando la técnica electroquímica con un pH metro marca HACH HQd modelo de sonda PHC10101 y un conductímetro

marca HACH HQ14d modelo de sonda CDC401101.

2.5.10. Procedimiento de la demanda bioquímica de oxígeno final (DBO_f) para cuantificación de la pérdida de sacarosa

La determinación de la DBO_f se realizó por el método respirométrico [2] empleando botellas ámbar, bandeja de agitación e incubadora marca OXITOP®. La determinación de la DQO se ejecutó por volumetría y su procedimiento es equivalente al descrito en 0 con la distinción de que la digestión se llevó a cabo en plancha de calentamiento con baño de arena a ~120 °C por reflujo abierto [13].

3. Resultados y discusión

En este artículo se analizan y muestran los resultados relacionados con el sesgo. La información asociada con otros parámetros de calidad analítica no son descritos aquí.

3.1. Factores críticos del tipo de muestreo y la distribución de la muestra

Debido a que se trata de corrientes de agua que provienen de procesos variables en cantidad y calidad, la determinación de la calidad promedio de las corrientes que surgen de la elaboración del azúcar, debe llevarse a cabo a través de un monitoreo permanente durante las jornadas de proceso, que cuente con muestreadores que identifiquen la variación del caudal y parámetros críticos como el pH y la turbiedad [11].

Como ya se ha mencionado, el muestreo para la “*Caracterización de las corrientes del proceso de elaboración del azúcar*” fue puntual, esto es, según la NTC-ISO 5667-10 “muestra discreta tomada aleatoriamente (con relación a tiempo y/o ubicación) de un cuerpo de agua” [11]. La información que se consiguió de cada corriente en los diferentes parámetros analíticos está relacionada con el momento en cuestión, en una jornada y en un sitio de muestreo específico. Sin embargo, no se trata de una caracterización atípica o no coincidente en un futuro con el promedio de la corriente porque de hecho es representativa para el muestreo en particular, si se tiene en cuenta que se efectuó en condiciones normales y con la variabilidad propia del sistema en el momento dado.

No obstante, no se puede generalizar la caracterización puntual porque se desconoce la tendencia del sistema en cuanto a flujo, presencia de otras especies y otras situaciones que participen o modifiquen la composición del agua.

No solo la selección del tipo de muestreo es relevante, también la forma de llevarlo a cabo. Un muestreo compuesto busca determinar la concentración media de la sustancia que se está analizando. Esto involucra lo que se conoce como representatividad, donde una porción del agua que se selecciona representa en volumen, flujo y calidad, el agua de estudio. Para conseguir tal significancia se convierten en factores críticos: (i) La permanencia del muestreo, si es continua o periódica, (ii) el flujo de la corriente del cual se seleccionará el volumen de la muestra y (iii) el intervalo y volumen entre muestras, si es constante o no.

En la fábrica del ingenio piloto, el diseño de un muestreo compuesto estuvo siempre restringido debido a las dificultades de la infraestructura en el punto de muestreo ideal para la toma, y a los riesgos térmicos de algunas corrientes con elevadas temperaturas. Así mismo, la forma de muestreo estuvo limitada por la falta de instrumentación mínima que permitiera el reconocimiento del caudal, para decidir sobre la proporción del volumen representativo a tomar.

Cuando se planea realizar múltiples ensayos a partir de una misma toma, la distribución de la muestra es crucial y debe ser motivo de consideración, sobre todo en aquellas fuentes de agua que contienen diversos materiales sólidos. Aunque la matriz fue la misma, la composición fue completamente diferente entre muestras que provienen de distintas variables del proceso. Cuando se realizó la división de una muestra, no fue posible generalizar la decantación de los sólidos en un tiempo promedio para todas las muestras involucradas porque esto depende de las características de las partículas en suspensión. Es necesario para futuros ensayos, estimar el tiempo mínimo en el que ciertas partículas de distintos tipos de muestra se depositan. Así, el proceso de medición podrá controlar aquellas variables que pueden afectar la determinación de SST y análisis afines. Si bien se utilizaron tiempos de agitación de 15 minutos y de traslado del material de apenas segundos, aquellas partículas más densas y por ende más susceptibles a rápida decantación

podieron quedar por fuera del análisis al momento de la distribución. Si este error se propagó, la precisión de la determinación deberá entonces respaldarlo, pero esto no resuelve el hecho de que se haya realizado una medición alterada. Tampoco da certeza de que los tiempos de ensayo fueran inapropiados para estas determinaciones, por lo que la incertidumbre deberá involucrar como posibilidad el momento de la división de la muestra, aunque sea un tipo de error indeterminado.

3.2. Análisis de la exactitud en patrones de los métodos validados

La eficiencia del método experimental con patrones preparados a partir de materiales de referencia certificados (CMRs *por su sigla en inglés*) es comparable con la reportada por los estándares internacionales ASTM, EPA y SMEWW en la mayoría de las determinaciones según la Tabla 9. Con un margen de recuperación superior al 95% en DQO, Hierro RA, Calcio y Magnesio, puede inferirse que, en los rangos de concentración indicados, los métodos tienen una proximidad elevada al valor de referencia aceptado con un sesgo igual o inferior al 5%.

Debido a que las condiciones experimentales para el análisis de la exactitud contaron con un par de corridas completas por día y esta condición se repitió en diferentes días, la exactitud del método incorpora solamente los siguientes componentes: el sesgo del método completo como la suma del error sistemático aportado por los pasos metodológicos, el sesgo del laboratorio, el efecto de la corrida del día que se ejecutó, y el efecto combinado del sesgo del método y del laboratorio donde se realizaron los análisis [24-28].

Los principales sesgos a considerar son:

- *Sesgo del método*: Abarcó las etapas de la metodología analítica, como los errores de vaciado, de calibración, del indicador, de distribución de la muestra y en general de las omisiones cometidas en este sentido en el desarrollo de las metodologías.
- *Sesgo del laboratorio*: Contempló el error sistemático que aportó la oscilación de las condiciones ambientales del espacio de trabajo, sobre todo las que fueron drásticas tales como el aire del laboratorio, la temperatura, la humedad, la vibración. Así mismo, la contaminación del área de trabajo.

Tabla 9. Exactitud experimental obtenida en patrones versus los valores reportados por normas, y con muestra fortificada

Parámetro analítico	Concentración en patron	Porcentaje de recuperación con patrón	Porcentaje de recuperación con patrón (ASTM, EPA o SMEWW)	*Muestras naturales fortificadas por rango	Porcentaje de recuperación con muestras naturales fortificadas
DBO ₅	RB 50 mg/L glucosa	88,01 ± 16,7	No reportado	RB 300 mg/L glucosa	85,94 ± 15,47
	RA 600 mg/L glucosa	81,13 ± 10,84	No reportado	RA 100 mg/L glucosa	98,75 ± 2,80
DQO	RB 411,3 mg/L O ₂	97,98 ± 3,6	94,00	RB 270 mg/L ftalato	92,60 ± 2,10
	RA 881,4 mg/L O ₂	98,03 ± 0,8	98,14	RA 150 mg/L ftalato	99,02 ± 0,01
Grasas	RB 20 mg/L MEH	83,53 ± 5,98	78-114	RB 20 mg/L MEH	97,12 ± 2,87
Hierro	RB 0,2 mg/L Fe	93,60 ± 4,20	100,00	RB 4,0 mg/L Fe	92,02 ± 8,35
	RA 4,4 mg/L Fe	95,66 ± 3,53	97,73	RA 0,5 mg/L Fe	0,40 ± 0,9
Calcio	RB 13,3 mg/L Ca	96,82 ± 3,14	101,50	RA 10,0 mg/L Ca	91,02 ± 8,09
Magnesio	RB 2,38 mg/L Mg	98,98 ± 1,94	106,72	RA 10,0 mg/L Mg	93,71 ± 7,66

*Los rangos en este caso se refieren a las características de la muestra natural y no a la concentración con que se dopan

Tabla 10. Sesgo en los patrones

Parámetro analítico	Concentración del patron	Sesgo absoluto experimental con patrón	Porcentaje de sesgo experimental con patrón	Porcentaje de sesgo reportado (norma ASTM)
DQO	RB 411,3 mg/L O ₂	-16,5	SI	-6,00
	ES (%)			NO
	RA 881,4 mg/L O ₂	-20,64	SI	-2,00
	ES (%)			SI
Grasas	RB 20 mg/L MEH	-3,30	NO	NR
	ES (%)			NO
Hierro	RB 0,2 mg/L Fe	(+)0,01	NO	(±) 0
	ES (%)			NO
	RA 4,4 mg/L Fe	-0,03	NO	-2,30
	ES (%)			SI
Calcio	RB 13,3 mg/L Ca	-0,42	NO	(+)1,5
	ES (%)			NO
Magnesio	RB 2,38 mg/L Mg	-0,02	NO	(+)6,70
	ES (%)			NO

• *Sesgo de la corrida:* Fue la ocasionada por errores fortuitos o indeterminados durante el tratamiento de la muestra que no necesariamente se propagaron en los diferentes análisis. Por ejemplo, la incorporación de partículas externas en la muestra (contaminación cruzada) que provienen de un ambiente contaminado. Adicionalmente, el sesgo de la corrida vincula también el generado por el método.

• *Sesgo combinado del método y laboratorio:* Es diferente al que se describió individualmente. Esto, porque el sesgo del método y del laboratorio de una

medición simple será distinto al sesgo aportado a lo largo de múltiples mediciones, aunque se sigan las mismas instrucciones. Por ejemplo, en un caso hipotético viable que pudo darse con las mediciones que involucraron determinaciones de materia orgánica, se generó un delta positivo drástico en la temperatura promedio del laboratorio que desencadenó la descomposición de la muestra (oxidación de la materia orgánica).

Este efecto hipotético fue aislado para cierto seguimiento y por ningún motivo es equivalente al efecto combinado.

Tabla 11. Sesgo en muestra natural

Parámetro analítico	Concentración muestras naturales	Sesgo absoluto experimental con muestra (mg/L)	Porcentaje de sesgo experimental con muestra
DQO	RB 270 mg/L ftalato ES 95%	-23,48	SI
	RA 150 mg/L ftalato ES 95%	-1,73	SI
Hierro	RB 3,0 mg/L Fe ES 95%	-0,20	NO
Calcio	RB 10,0 mg/L Ca ES 95%	-0,90	SI
Magnesio	RB 10,0 mg/L Mg ES 95%	-0,63	SI
DBO	RA 100 mg/L ES 95%	-1,25	SI

Los rangos en este caso se refieren a las características de la muestra natural y no a la concentración con que se dopan
ES: Estadísticamente significativo (nivel de significación del 95%)

El sesgo combinado del método y laboratorio es el error sistemático constante que se propagó en los múltiples ensayos para cuantificar materia orgánica, como el de calibración, el error de vaciado, el de la temperatura, etc.

El manejo estricto de los reactivos, el uso de CMRs, el aseguramiento de la calidad del agua de dilución (matriz), la preparación de los patrones y el juicio y la precisión para desarrollar las etapas del método son factores que en el proceso de medición químico se controlaron minuciosamente para lograr que el desempeño metodológico de las determinaciones resultara superior o al menos tan representativo como el referenciado por el estándar internacional. Al comparar los resultados de la Tabla 9 se identifica una cercanía tanto al porcentaje de recuperación teórico (100 %) como a los establecidos por la literatura, lo cual aprueba y confirma el buen desempeño del método en términos de exactitud. Las determinaciones con porcentajes de recuperación inferiores al 90 % como la DBO y grasas cumplen con el propósito de lograr una eficiencia mayor o igual respecto a SMEWW [2] y EPA [16] respectivamente.

Aunque en la DBO las condiciones biológicas son una limitante por el hecho de no poderse fijar y prácticamente comportarse como variables de proceso en el ensayo, los esfuerzos que se hicieron por mantener una misma fuente de microorganismos para preparar el inóculo tuvieron una respuesta positiva y se considera un logro adicional obtenido en el proceso de validación de esta metodología. Se trata de que el 90% de las muestras

que se evaluaron tanto en patrones como en muestras naturales que se fortificaron, mostraron eficiencias superiores al 65 %, que es lo documentado en la literatura como el consumo que deben realizar los microorganismos al cabo de 5 días de incubación. Este avance, se le atribuye principalmente al banco de microorganismos, porque la población de bacterias que se suministra al medio cuando se prepara el inóculo proviene de la misma fuente natural que se está analizando, la cual es rica en azúcares y presenta condiciones de pH y temperatura extremas. Esto indica que los microorganismos que se lograron extraer de dicha fuente aun con factores no tan favorables de pH y T, fueron capaces de adaptarse a un medio de reacción neutro, aclimatado a 20 °C que, en efecto, terminó potenciando el consumo promedio de los microorganismos.

En cuanto a la determinación de grasas, la exactitud fue un criterio que se distanció del objetivo. Las razones están fuertemente relacionadas con la reducida probabilidad de contacto entre las sustancias apolares de la matriz acuosa y el solvente. A pesar de que es una metodología estandarizada por la Environmental Protection Agency (EPA), la técnica gravimétrica presenta inconsistencias difíciles de reducir en la fase de agitación ya que la técnica de separación para que el solvente pueda extraer el material extractable de la muestra puede variar entre seguimientos porque requiere componentes que no se pueden medir, ni fijar, como la fuerza del analista y la cantidad de movimientos durante la agitación. Otra limitante es

el tiempo de decantación que puede durar más de 10 minutos y que es el lapso de tiempo recomendado por la norma. Si entre el proceso de agitación y decantación el solvente no se distribuye lo suficiente con el material graso, la solubilización del analito no se consigue o, en el mejor de los casos, solo se recupera la tercera parte de la fracción orgánica total susceptible de extracción. Para obtener un proceso de extracción medianamente eficiente, es necesario practicar al menos 5 o 6 extracciones por muestra que cuenten con movimientos vigorosos en todas las direcciones de rotación, distribuir solvente adicional por las paredes del recipiente para fomentar el descenso del material graso y aceitoso y además, invertir al menos 15 o 20 minutos para favorecer una decantación completa ya que las paredes del embudo empapadas de agua representan un obstáculo para el descenso del analito.

La EPA en su protocolo para MEH, da instrucciones menos específicas y subestima el tiempo de extracción, de decantación y minimiza el número de extracciones sucesivas que debe realizarse sobre la muestra. Esto, para que cumpla con el modelo de una metodología práctica, sencilla y relativamente rápida, sin embargo, esto es casi como sacrificar la calidad ideal del método por lo pragmático.

El rendimiento del método es tan relativo, que la EPA lo reporta como un intervalo amplio que va desde el 78 al 114%. Durante la validación de grasas y/o aceites, el %R experimental en patrones estuvo alrededor del 83%, una cifra intermedia respecto a la reportada por la EPA. Esto es positivo ya que se alcanzó el criterio de aceptación que reporta la norma. Para conseguirlo fue necesario aumentar en todos los seguimientos los tiempos de extracción y decantación para reducir la dispersión de los datos. En general, el rendimiento de los métodos a RB presenta una tendencia ligeramente menor que la del RA, coherente en este sentido con la información de la norma (Tabla 9). Esto puede explicarse para los casos de Fe (0,2 mg/L), DBO (50 mg/L O₂) y Ca (10 mg/L) porque el límite de cuantificación de estos métodos es muy cercano al rango bajo validado, lo que hace que la determinación en dichas concentraciones sea menos sensible.

Por otro lado, para el caso del Ca, la tonalidad de las muestras o patrones con concentraciones bajas del metal, son muy parecidos al punto de equivalencia y aun empleando un blanco de control, el indicador

puede incidir en la respuesta del método para identificar el viraje correcto.

3.3. Exactitud en muestras naturales

En la Tabla 9 se muestra la exactitud experimental obtenida en muestras naturales (primera columna de la derecha). El análisis y la interpretación del desempeño del método sobre muestras naturales, tiene un enfoque particular pero no muy distinto al que se acaba de realizar ya que la exactitud de las determinaciones evaluadas es buena (mayor al 91%) a pesar de que en algunos casos específicos como calcio, magnesio, DQO a RB, Hierro a RB es menor que la mencionada para patrones y nula para Hierro a RA, según se indica en la En la Tabla .

Note que la muestra a RA se fortificó con una cantidad de patrón pequeña mientras que la muestra a RB se dopó con una cantidad de patrón superior. Este procedimiento se realizó con el fin de evaluar el comportamiento del método a concentraciones bajas, cuando hay influencias propias de la matriz como la presencia de impurezas e interferentes a concentraciones elevadas y en el mismo sentido para concentraciones altas sobre una muestra con menor influencia de otras especies ajenas al analito. La evaluación de los criterios de validación con esta singularidad se puso en marcha porque permite el reconocimiento de la validación y por supuesto del mensurando en una matriz legítima que ha estado sujeta a la mayor variación posible del sistema o unidad fabril de donde proviene. Así, las conclusiones que surjan de estos ensayos tienen la garantía de estar basadas en condiciones de proceso representativas para el objeto de estudio.

En general, la exactitud de la matriz fabril tiene registros superiores al 91% según se observa en la tabla 9. En comparación con los patrones, la tendencia de estos es mucho más marcada hacia %R más altos. Sin embargo, se destacan mejoras en el RA de DQO y DBO con porcentajes de recuperación de 99 % y una tendencia similar para grasas con la acotación de que este último corresponde a un %R preliminar, debido a que los seguimientos programados no se culminaron. De la exactitud experimental obtenida en muestras se ratifican varias premisas que se mencionaron al inicio de este análisis. La primera de ellas está relacionada con la DBO.

Nótese que la eficiencia para RA cuando la muestra

se fortifica con 100 ppm de glucosa es aproximadamente del 99 % lo cual no es sorprendente si se tiene presente que la calidad de una muestra a RA está constituida por cualquier cantidad de materia orgánica, que ha estado expuesta a condiciones ambientales no restringidas y alcanza un pH cercano a la neutralidad. Esta matriz no sólo cuenta con una población abundante de microorganismos, sino que favorece por obvias razones (nutrientes, oxígeno y condiciones ambientales) el crecimiento de los microorganismos y con ello la capacidad oxidativa. La segunda encaja con las razones que explican la merma recuperación del MEH en patrones. En una matriz concentrada de grasas y aceites, la probabilidad de contacto entre el solvente y las sustancias extractables se eleva y, por tanto, la extracción de los analitos resulta ser más eficiente. Evidencia de ello se identifica en el %R preliminar de la muestra natural. El rendimiento del método a RA de hierro está relacionado con el límite de cuantificación (0,25 mg/L Fe) y la sensibilidad del espectrofotómetro. Cuando la matriz a RA, se fortificó con 0,5 ppm de hierro, el resultado fue nulo, es decir, el equipo es incapaz de cuantificar una adición de 0,5 ppm sobre una matriz que tiene un elevado nivel de impurezas de diversos tipos. No solo se atribuye a la sensibilidad del equipo, también hay una componente conocida como efecto de la matriz, que se descubre cuando se examina la exactitud y está relacionada con las interferencias químicas y físicas que pueden alterar la cuantificación del analito.

3.4. Sesgo en patrones

Por las características de este proceso de validación, el sesgo que se ha indicado en la

Tabla 10 y 11 se denomina *Sesgo del método* [23]. El sesgo del método está conformado por la contribución del laboratorio, el método (metodología), la corrida de la muestra y el efecto combinado del método y del laboratorio después de numerosas mediciones.

Una analogía entre el sesgo del método experimental y el indicado por la norma, muestra en casi todos los casos que los resultados asocian un error sistemático positivo o negativo. El sesgo negativo se inclina en este sentido cuando el valor encontrado ($\bar{x}$) es inferior al valor conocido (μ) y por tanto su

diferencia es negativa. De la misma forma, es positiva cuando el valor encontrado es superior al valor conocido. Las determinaciones de DQO, Grasas, Hierro, Calcio y Magnesio presentan un sesgo negativo lo que significa que el error sistemático está subestimando el valor verdadero del analito. Sin embargo, la diferencia entre $\bar{x}$ y μ no es estadísticamente significativa para Hierro, Calcio y Magnesio, lo que quiere decir que la hipótesis nula $H_0: \bar{x} = \mu$ es verdadera. El rechazo o la aceptación de la hipótesis no es más que un argumento estadístico que a través de un nivel de significación respalda respectivamente la evidencia o no de errores sistemáticos.

Es importante señalar que la aprobación de la hipótesis “no significa que no existan errores sistemáticos, sino que no se ha podido constatar su evidencia” [27]. Por otro lado, si el efecto del error sistemático en las determinaciones mencionadas no es significativo, entonces su desviación es atribuible a la variación aleatoria.

Un enfoque más detallado sobre la tabla 11, muestra que a pesar de ser menor el sesgo experimental en DQO RB respecto al de la norma, la contribución del error sistemático es estadísticamente significativa para el primer caso. Esto tiene su origen principalmente en la réplica de una muestra que en este rango presenta una dispersión importante. El error sistemático fue aportado principalmente por una concentración que se alejó del promedio de los resultados (Sesgo de la corrida). Pese a que el dato es atípico, no es un resultado anómalo. Esto se comprobó mediante el contraste de Dixon o contraste Q, donde el Q tabulado (0,57) con un nivel de confianza del 99% es mayor que el Q calculado (0,35). Cuando $Q_{\text{tab}} > Q_{\text{cal}}$ el resultado sospechoso no se rechaza. Es viable de hecho considerar por la tendencia del resto de registros, que la repetición de un solo seguimiento para reemplazar el dato atípico, reducirá la contribución del error sistemático. Otro resultado curioso, es el sentido del sesgo experimental en las determinaciones de Ca y Mg, respecto al Sesgo de referencia. Note que los resultados del primero son negativos en contraste con el sesgo positivo reportado por la ASTM. Esta coyuntura permite analizar que, aun siguiendo estrictamente el protocolo, el efecto del error sistemático puede ser diferente (en sentido y magnitud) como es el caso, lo que termina resaltando que el juicio y la decisión

del analista sobre ciertos pasos críticos es autónoma y no depende exclusivamente de la metodología.

3.5. Sesgo en muestras naturales

Una de las principales contribuciones al sesgo en muestras naturales en las metodologías para Fe, Ca y Mg es la necesidad de filtrar la muestra después de la digestión, remitirse a la Tabla 11.

Como se trata de una matriz sumamente heterogénea el material remanente que no se desintegra durante el calentamiento con ácido puede capturar microgranos de analito que no se recuperan en el filtrado, aunque se realicen lavados sucesivos. Esto solo se identifica con la práctica, la observación y la cuantificación global del mensurando. Y si bien se pueden restringir en cierta medida y no en su totalidad ya que algunas de estas situaciones son propias de la muestra y cuentan con una variación aleatoria, las cualidades de la muestra terminarán haciendo parte de lo que se constituye como el desempeño del método.

4. Conclusiones

Con base en el desempeño analítico manifestado por patrones para cada uno de los métodos se puede indicar que: el porcentaje de recuperación de los patrones de Ca, Mg, Fe RA y DQO es superior al 95%, lo que bajo este criterio de aceptación infiere que la exactitud es aceptable; el sesgo de las determinaciones de Ca, Mg, DQO RB y Fe RB no es estadísticamente significativo. El coeficiente de variación de la mayoría de las determinaciones a excepción de DBO cumple con el criterio de Horwitz. El límite de cuantificación determinado en la validación de los métodos de Fe, DQO y Grasas son comparables con los límites reportados por la norma.

El desempeño analítico de las determinaciones en muestras naturales es óptimo en los criterios de exactitud, sesgo y precisión. La naturaleza química de la muestra consiguió un buen indicador en la precisión de la DBO RA y en la exactitud del método para grasas.

La mayor parte de los rangos de concentración validados en cada método están dentro del intervalo de confianza de la concentración promedio experimental, lo que concluye que el método analítico es capaz de responder a rangos de concentración alto y bajo con un nivel de

significancia del 95 %. Estos intervalos de concentración son equivalentes a las concentraciones que se obtuvieron de muestras naturales tomadas del ingenio azucarero piloto, por lo que todos los análisis que surjan de la necesidad de caracterización que se hallen alrededor de estos intervalos podrán reportarse con todos los criterios conseguidos en este proceso de validación.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CENICAÑA y la Universidad del Cauca por los fondos para la realización de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses de ningún tipo en relación a la publicación.

Referencias

- [1] EURACHEM y CO-OPERATION ON INTERNATIONAL TRACEABILITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3 ed. Unión Europea.: S L R Ellison y A Williams, 2012. p. 3-59.
- [2] HUGOT, Emile. Handbook of cane sugar engineering. 3 ed. Amsterdam.: Elsevier, 1964. p. 30-93, 225.
- [3] REIN, Peter. Cane sugar engineering. Berlín.: Verlag Dr. Albert Bartens KG, 2007. p. 67-70
- [4] MORALES, Elton. Métodos de cálculo para evaporadores de efecto múltiple. Chile.: Universidad Austral de Chile (ICYTAL). p. 1.
- [5] INTERNATIONAL RESOURCES GROUP Y CENTRO NACIONAL DE PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA DE HONDURAS. Guía de buenas prácticas ambientales para el procesamiento de caña de azúcar. Tegucigalpa.: AGA & Asociados, 2009. p. 11-15.
- [6] COLOMBIA. MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. Decreto 1575 (9, Mayo, 2007). Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano. Diario Oficial. Bogotá, 2007. no. 46623. p. 1-12.
- [7] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y SALUD. Decreto 1594 (26, junio, 1984). Por el cual se reglamenta parcialmente el título I de la ley 9 de 1979, así como el capítulo II del título IV-parte III- y el título III de la parte III-Libro I- del decreto 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos. Bogotá: El presidente de la república, 1984. p. 1-54.

- [8] STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WASTE AND WASTEWATER. Respirometric Method (Proposed). 5210D. 22 ed. Estados Unidos.: Andrew D. Heaton, Eugene W. Rice y Rodger B. Baird, 2005. p. 18-25.
- [9] RODRIGUEZ, Milena. Validación metodologías analíticas MOL LABS. *En*: meq. Octubre, 2007. no. 10. p.9-11.
- [10] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Specification for Reagent Water. D1193-06. Pennsylvania: ASTM International, 2011. p. 1-5.
- [11] NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Directrices para la preservación y manejo de las muestras. NTC-ISO 5667-3. Bogotá.: El Instituto, 2003. p. 7-35.
- [12] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Practices for Sampling Water from Closed Conduits. D3370. Pennsylvania: ASTM International, 2010. p. 1-3, 5-10.
- [13] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Methods for Chemical Oxygen Demand (Dichromate Oxygen Demand) of Water. D1252-06. Pennsylvania: ASTM International, 2012.p. 1-12.
- [14] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Methods for Calcium and Magnesium in Water. D511-09. Pennsylvania: ASTM International, 2009. p.1-9.
- [15] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Methods for Iron in Water. D1068-10. Pennsylvania: ASTM International, 2010. p.1-12.
- [16] ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry. 1664. Washington D.C.: El Instituto, 1999. p. 4-25.
- [17] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Practice for Preparation of Sediment Samples for Chemical Analysis. D3976-92. Pennsylvania: ASTM International, 2010. p.1-3
- [18] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Methods for Filterable Matter (Total Dissolved Solids) and Nonfilterable Matter (Total Suspended Solids) in Water. D5907-10. Pennsylvania: ASTM International, 2010. p.1-9.
- [19] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Methods for pH of Water. D1293-12. Pennsylvania: ASTM International, 2012. p.1-10.
- [20] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Methos for Electrical Conductivity and Resistivity of Water. D1125-95. Pennsylvania: ASTM International, 2009. p.1-8.
- [21] RIAÑO, Nestor. Fundamentos de química analítica básica. 2 ed. Manizales.: Universidad de Caldas, 2007. p. 101-161.
- [22] HARRIS, Daniel. Análisis químico Cuantitativo. 3 ed. Barcelona.: Reverté, 2007. p. 680-682.
- [23] CURIE, Lloyd. Detection and quantification limits: origins and historical review. *En*: Analytica Chimica Acta. Febrero, 1998. Acta 391, p. 1-8.
- [24] THOMPSON, Michael; ELLISON, Sthephen., y WOOD Roger. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *En*: Pure and Applied Chemistry, 2002. vol. 74, no. 5, p. 837-844.
- [25] LOPEZ, P, *et al*. Current approaches to determine limit of detection and limit quantification. [Diapositivas]. Geel: Institute for Reference Materials and Measurements, 2009. 26 diapositivas.
- [26] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Practice for Use of the Terms Precisión and Bias in ASTM Test Methods. E177-13. Pennsylvania: ASTM International, 2013. p. 1-7.
- [27] MILLER, James N. y MILLER Jane C. Estadística y Quimiometría para Química analítica. 4 ed. Madrid.: Prentice Hall, 2002. Madrid.
- [28] SUAREZ, Raibel, et al. Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *En*: Avances en Química. Mayo, 2009, vol. 2, no. 4, p. 53-62.