



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 99 (2):
1-6; 2022



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150
T4101XAC - Las Talitas.
Tucumán, Argentina.

Validación del método colorimétrico para silicatos en azúcar y jugo de caña

Marcos Sastre Siladji*, Michael Saska**, Silvia Zossi*, Raquel Dellmans*, Evelina Valdivieso*, Gabriela Juárez*.

* Sección Química de Productos Agroindustriales, EEAOC; **Investigador visitante. Email: marcosastre@eeaoc.org.ar

RESUMEN

El trabajo analiza la validación del método colorimétrico para silicatos reactivos (silicatos A) y totales en azúcar y jugos de caña, determinándose los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), la precisión intermedia, el sesgo evaluado como error porcentual de la recuperación y la incertidumbre relativa expandida. Para azúcar refinado, LD y LC resultaron de 1 mg SiO₂/kg y 3 mg SiO₂/kg, respectivamente para silicatos A. La incertidumbre expandida fue 5% para los silicatos A y 9% para silicatos totales. En jugo de caña, la incertidumbre expandida para los silicatos A fue 23% y para silicatos totales 27%. Se compararon estadísticamente los resultados de silicatos totales en azúcar con los obtenidos mediante espectrometría de absorción atómica, determinándose que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los dos métodos. Sin embargo, el método colorimétrico posee LD y LC mucho menores, que lo hace apto para la determinación de silicatos en azúcar, sin necesidad de un equipo y materiales costosos.

Palabras clave: azúcar, jugo de caña, silicatos, límite de detección, límite de cuantificación

ABSTRACT

Validation of a colorimetric method for silicates in sugar and sugarcane juice

The colorimetric method for reactive silicates (silicates A) and total silicates in sugar and cane juices was validated. The limits of detection (LD) and quantification (LQ), the intermediate precision, the bias evaluated as percentage error of the recovery and the expanded relative uncertainty were determined. For silicates A in refined sugar, the LD and LQ were 1 mg SiO₂/kg and 3 mg SiO₂/kg, respectively. The expanded uncertainty was 5% and 9% for silicates A and total silicates, respectively. In cane juice, the expanded uncertainty for silicates A was 23% and for total silicates 27%. The total silicates in sugar determined with the colorimetric method were compared with values determined by atomic absorption spectrometry. There were no statistically significant differences between results obtained by the two methods. However, the colorimetric method has lower LD and LQ, which makes better suited for determination of silicates in sugar, without the need for expensive equipment and materials.

Key words: sugar, sugarcane, juice, silicon, silicate, detection limit, quantification limit.

Fecha de
recepción:
28/12/2020

Fecha de
aceptación:
16/07/2021

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar acumula gran cantidad de silicio en forma de sílica gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), localizada en células específicas que absorbe de los nutrientes del suelo (Meyer and Keeping, 2000). Según Thangavelu and Rao (2002), el silicio protege la actividad fotosintética, preservando los tejidos verdes foliares contra la acción de agentes deshidratantes; suprime la actividad de la amilasa, previniendo la acumulación del almidón y la subsiguiente competición por las reservas de fosfato orgánico; e inhibe la actividad invertasa, evitando la inversión excesiva de la sacarosa en las etapas de pre y post cosecha. Cumple, además, roles de regulador enzimático en la síntesis de azúcar, y su deficiencia en caña disminuye la velocidad de fotosíntesis del tejido de la hoja. El principal efecto negativo del silicio en el proceso de elaboración de azúcar son las incrustaciones en evaporadores y tachos de cocimiento (Walford, 2003), debido a que este compuesto no es totalmente removido durante la clarificación (Walthev *et al.*, 1998; Barker and Davis, 2005).

Estos compuestos también fueron implicados en la formación de flóculos ácidos en bebidas carbonatadas (Clarke, 1974; Godshall *et al.*, 1976); de ahí la importancia de su cuantificación en el proceso de elaboración de azúcar.

Por este motivo, en 2013, en la Sección Química de Productos Agroindustriales de la Estación Experimental Obispo Colombes (EEAOC) se modificó una técnica colorimétrica de análisis en agua (SASTA, 2005) para la determinación de silicatos en azúcar y jugo de caña (Saska *et al.*, 2016). El método tiene como fundamento la reacción entre los silicatos solubles y el heptamolibdato de amonio, con formación de un polímero heteropoliácidos de color azul en su forma reducida. Esta técnica permite determinar tanto el contenido de los silicatos solubles reactivos al heptamolibdato -silicatos A- como de los silicatos totales, determinados después del calentamiento en autoclave a 121°C y una atmósfera de sobrepresión. Por diferencia, es posible determinar los silicatos no reactivos al heptamolibdato o silicatos B.

El objetivo de este trabajo fue la validación de esta metodología y, adicionalmente, una comparación de silicatos totales obtenidos por colorimetría con los obtenidos por absorción atómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para validar esta metodología se emplearon dos muestras de azúcar provenientes de dos ingenios diferentes de la provincia de Tucumán, y dos muestras de jugos de caña de dos variedades distintas. Se pesaron 38 g de azúcar y se disolvieron en aproximadamente 150 g de agua desionizada, de conductividad menor a $2 \mu\text{S}/\text{cm}$, para evitar cualquier interferencia en la determinación. Luego, esta solución se separó en dos porciones. En una de ellas se analizó inmediatamente el contenido de los sili-

catos A. La otra se utilizó en la determinación de los silicatos totales después de calentar en una autoclave durante una hora (Saska *et al.*, 2013). Todos los resultados fueron expresados como dióxido de silicio (SiO_2).

Para el análisis de silicatos en jugo de caña se diluyeron aproximadamente 5 g de la muestra en 190 g de solución, utilizando agua desionizada. De la misma forma que en el análisis de silicatos en azúcar, esta solución se preparó en dos porciones para la determinación de los silicatos clase A y los silicatos totales.

Para realizar la fortificación se elaboró una solución patrón de silicatos de 250 mg/l a partir de metasilicato de sodio noahidratado ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$).

Para determinar la absorbancia se empleó un espectrofotómetro UV – Visible Hewlett Packard con arreglo de diodos, modelo 8452A, verificado con referencias trazables al NIST.

Los parámetros estadísticos empleados para validar la metodología colorimétrica son los recomendados por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA, 2019a):

- Límite de detección (LD)
- Límite de cuantificación (LC)
- Precisión intermedia en condiciones de repetibilidad
- Sesgo evaluado como error porcentual de la recuperación
- Incertidumbre relativa expandida

Otra porción de las mismas muestras también fue analizada mediante espectrometría de absorción atómica, para lo cual se realizó una digestión húmeda (ICUMSA GS 2/3-24, 1998) modificada para la determinación de silicio. Para la digestión se usaron 4 g de la solución de azúcar al 50% en digestores de teflón, se agregaron 2 ml de ácido nítrico concentrado y se calentó en baño termostático entre 95°C y 100°C hasta la eliminación de los vapores pardos. Posteriormente, se agregaron 2 ml de HF al 48% (Feng *et al.*, 1999), continuando el calentamiento en el baño termostático por 15 minutos más. Se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó a 25 ml en matraz de plástico. Las absorbancias se leyeron en un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer Analyst 100 con llama acetileno-nitroso y empleando lámpara de cátodo hueco de silicio a la longitud de onda de 251,6 nm (Perkin Elmer Instruments, 2000).

La linealidad de la técnica de absorción atómica estuvo comprendida entre el LC (12,5 mg Si/kg de azúcar) y 1250 mg Si/kg de azúcar. Para la curva de calibración se aceptaron coeficientes de correlación mayores a 0,995 (OAA 2019b), con un límite de detección (LD) de 1,3 mg Si/kg de azúcar (Juárez, 2020)¹.

Se realizaron las equivalencias necesarias para expresar los resultados de ambas metodologías en mg SiO_2/kg de azúcar. Por lo tanto, el rango lineal de la técnica de absorción atómica quedó comprendido entre 25 mg SiO_2/kg y 2500 mg SiO_2/kg de azúcar.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software R (R CoreTeam, 2020) para comparar ambas metodologías mediante el test “t” de Student.

¹ Juárez, Gabriela (2020). Comunicación personal

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se determinaron para silicatos clases A de acuerdo a los criterios establecidos por el OAA (2019b), para lo cual se utilizó una muestra de azúcar refinada de alta calidad con muy bajo contenido de silicatos. El análisis se repitió seis veces (Tabla 1).

Tabla 1. Repetición del análisis de silicatos A en una muestra de azúcar refinada, para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Repetición	Silicatos A (mg SiO ₂ /kg)
1	4,6
2	4,2
3	4,0
4	4,7
5	4,4
6	4,3
Promedio	4,4
Desviación Estándar (s ₀)	0,3

Los LD y LC se calcularon según las ecuaciones 1 y 2.

Ecuación 1

$$LD = 2t_{1-\alpha, \nu} s_0$$

Ecuación 2

$$LC = 10s_0$$

Donde $t_{1-\alpha, \nu}$ es el estadístico de Student para una probabilidad de α y ν grados de libertad (OAA 2019b). Con $\alpha = 0,05$, $\nu = 5$ y $t = 2,015$ se obtuvieron LD y LC de 1mg SiO₂/kg y 3 mg SiO₂/kg, respectivamente.

Incertidumbre en la determinación de silicatos en azúcar

En el cálculo de la incertidumbre se consideraron los errores debidos al sesgo o error sistemático y la precisión, que considera la repetibilidad y la precisión intermedia y la reproducibilidad. La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas en condiciones establecidas.

Para la determinación de la incertidumbre se analizaron por triplicado dos muestras de azúcar refinada sin fortificar y dos muestras fortificadas con 33 mg de silicatos por kg de azúcar (Tabla 2). Este estudio se realizó tanto para el caso de los silicatos clase A como para los silicatos totales.

Para la determinación de la incertidumbre debida al sesgo (u_{sesgo}) se tomó el promedio de la totalidad de los sesgos obtenidos en el análisis de ambas muestras, resultando un sesgo promedio de 6% con una desviación

Tabla 2. Contenido de silicatos A (mg SiO₂/kg) en muestras de azúcar refinada sin fortificar y fortificada con 33 mg SiO₂/kg de azúcar, la recuperación y sesgo.

Muestra	Sin fortificar (mg SiO ₂ /kg)	Fortificado (mg SiO ₂ /kg)	Recuperación (%)	Sesgo (%)
1	5	36	95	5
	4	40	110	10
	4	38	104	4
2	5	40	106	6
	4	40	108	8
	4	36	98	2

estándar de 3%. Con estos resultados, se calculó la $u_{sesgo} = 6\%$ de acuerdo a la Ecuación 3.

Ecuación 3

$$u_{sesgo} = \sqrt{Sesgo^2 + \left(\frac{S_{sesgo}}{\sqrt{n}}\right)^2}$$

Donde S_{sesgo} es la desviación estándar de los sesgos y n es el número de repeticiones.

Para la incertidumbre debida a la precisión intermedia (u_{pl}) fue necesario diferenciar los coeficientes de variación porcentuales de las repeticiones (CV) según la muestra, considerando fortificadas y sin fortificar (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficiente de variación (CV) del contenido de silicatos A en las muestras de azúcar refinada, fortificadas y sin fortificar (mg SiO₂/kg).

Muestra	sin fortificar	fortificada
1	5	36
	4	40
	4	38
CV %	7	6
2	5	40
	4	40
	4	36
CV %	5	5

Con estos datos, se calculó según la ecuación 4 el u_{pl} total del método de 6%.

Ecuación 4

$$u_{pl} = \sqrt{\frac{CV_{f1}^2 + CV_{sf1}^2 + CV_{f2}^2 + CV_{sf2}^2}{4}}$$

De esta manera, con la u_{sesgo} y con la u_{pl} se pudo calcular una incertidumbre total expandida (U) de acuerdo a la ecuación 5:

Ecuación 5

$$U = k \sqrt{u_{sesgo}^2 + u_{pl}^2}$$

Donde k es el factor de cobertura igual a 2. Con esta ecuación, U es 17%.

Se realizaron los mismos análisis para establecer la incertidumbre en el método de determinación de silicatos totales; en la Tabla 4 se muestran los resultados del azúcar fortificado y sin fortificar junto a la recuperación y el sesgo.

Tabla 4. Silicatos totales (mg SiO₂/kg) en muestras de azúcar refinada sin fortificar y fortificada con 33 mg SiO₂/kg. Recuperación (%) y Sesgo (%).

Muestra	Sin fortificar (mg SiO ₂ /kg)	Fortificado (mg SiO ₂ /kg)	Recuperación (%)	Sesgo (%)
1	35	68	100	0
	34	69	105	5
	33	69	109	9
2	61	96	108	8
	77	112	104	4
	62	93	96	4

En la Tabla 5 se muestran los CV obtenidos en el análisis de silicatos totales.

Tabla 5. Coeficiente de variación (CV) de silicatos totales (mg SiO₂/kg) en dos muestras de azúcar refinada, fortificadas y sin fortificar

Muestra	Sin fortificar (mg SiO ₂ /kg)	Fortificada (mg SiO ₂ /kg)
1	35	68
	34	69
	33	69
CV %	3	1
2	61	96
	67	112
	72	93
CV %	14	10

La diferencia encontrada entre los CV% de las muestras fortificadas y sin fortificar podría deberse a las diferentes concentraciones analizadas. A mayor concentración, menor CV%.

Con los datos en las Tablas 4 y 5, mediante las ecuaciones 3 y 4 se determinaron $u_{sesgo} = 5\%$ y $u_{pl} = 9\%$. Finalmente, con la ecuación 5 se determinó $U = 20\%$.

Incertidumbre en la determinación de silicatos en jugo de caña

El análisis se realizó por triplicado sobre muestras sin fortificar y fortificadas con 5 ml de una solución patrón de silicatos de 250 mg/l que, corregido en base a los grados Brix de cada jugo, corresponden a un agregado de 1200 mg/kg Bx para el jugo 1 mg/kg Bx y 1353 mg/kg Bx para el jugo 2.

La Tabla 6 presenta los resultados obtenidos del contenido de silicatos A y totales, junto con el porcentaje de recuperación y sesgo.

Tabla 6. Contenido de silicatos A y totales (mg SiO₂/kg Bx) en dos muestras de jugo de caña sin fortificar y fortificadas, recuperación y sesgo.

Muestra	Sin fortificar (mg SiO ₂ /kg)	Fortificado (mg SiO ₂ /kg)	Recuperación (%)	Sesgo (%)	
Silicatos A	Jugo 1	1099	2324	102	2
		1015	2132	93	7
		1026	2435	117	17
	Jugo 2	1281	2753	109	9
		1307	2876	116	16
		1222	2708	110	10
Silicatos Totales	Jugo 1	1248	2504	105	5
		1261	2363	92	8
		1293	2658	114	14
	Jugo 2	1658	3159	111	11
		1803	3413	119	19
		1693	3304	119	19

Con estos resultados, se calcularon los valores de u_{sesgo} , u_{pl} y U de acuerdo a las ecuaciones 3, 4 y 5, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de las incertidumbres (%) de silicatos A y totales en jugo de caña.

	Silicatos A (%)	Silicatos Totales (%)
u_{sesgo}	10	13
u_{pl}	5	4
U	23	27

Comparación con la metodología de determinación de silicio total por espectrometría de absorción atómica

Esta comparación se realizó analizando muestras de azúcar de distintas calidades por ambos métodos, de tal forma que pueda cubrir un amplio rango del contenido de silicatos totales.

En la Tabla 8 se presentan los resultados superiores a los LC de ambas metodologías.

Se realizó un test "t" con el software R para determinar si el coeficiente de Pearson (R) era distinto a 0, y se encontró un valor de significancia de la muestra de $8,6 \times 10^{-10} < \alpha = 0,05$, lo que indica que existe una correlación con un nivel de confianza del 95%.

Como se puede apreciar en la Figura 1, un $R = 0,916$ (correspondiente a un $R^2 = 0,84$) indica una fuerte correlación entre ambas metodologías para el número de pares de valores analizados.

En el gráfico de residuos (Figura 2) puede observarse una simetría en torno a la media. Además, el promedio de los datos residuales es 0. Estas dos observaciones también son indicadores de una correlación fuerte entre las metodologías.

Por último, se realizó un test "t" para muestras pareadas con el objetivo de comparar las medias de las metodologías. Mediante este análisis se encontró un va-

Tabla 8. Comparación entre las metodologías de determinación de SiO₂ (mg SiO₂/kg) por espectrometría de absorción atómica y por colorimetría.

Tipo de muestra	Absorción Atómica (mg SiO ₂ /kg)	Método Colorimétrico (mg SiO ₂ /kg)
Azúcar Común Tipo A	21	21
	36	35
	39	17
	19	17
	16	19
	49	55
	55	40
Azúcar Crudo	70	61
	81	64
	69	76
	51	77
	54	78
	49	96
	138	147
	114	121
	84	84
	76	71
Azúcar Refinado	93	92
	78	78
	101	101
	5	20
	9	13
	30	35

lor de significancia de 0,2640, mayor al valor del nivel de significancia ($\alpha = 0,05$) correspondiente a un nivel de confianza del 95%, lo que significa que no hay diferencias significativas entre las medias de los datos obtenidos por ambas metodologías.

A pesar de que las dos metodologías no presentan diferencias estadísticamente significativas, es necesario aclarar que el método por espectrometría de absorción atómica con llama de óxido nítrico – acetileno determina silicio en todas sus formas, que podrían estar presentes en las muestras como arena, cuarzo, suelo, etc. En el caso del azúcar, si estas impurezas estuviesen presentes, su concentración estaría a nivel de trazas. Además, este método no permite cuantificar pequeñas concentraciones de silicatos ya que no es sensible para los valores encontrados usualmente en azúcar.

CONCLUSIONES

Se completaron los análisis necesarios para el cálculo de los límites en silicatos A en azúcar y la incertidumbre de los métodos de silicato A y silicatos totales en muestras de azúcar y jugo de caña. Los resultados fueron aceptables para el laboratorio de la EEOC y se resumen en la Tabla 9.

Además, se realizaron ensayos para comparar los silicatos totales determinados co-

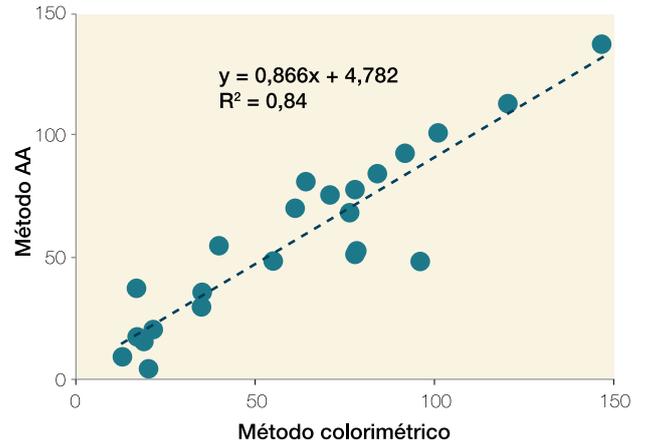


Figura 1. Correlación entre la metodología de silicatos totales (mg SiO₂/kg) por absorción atómica y por colorimetría.

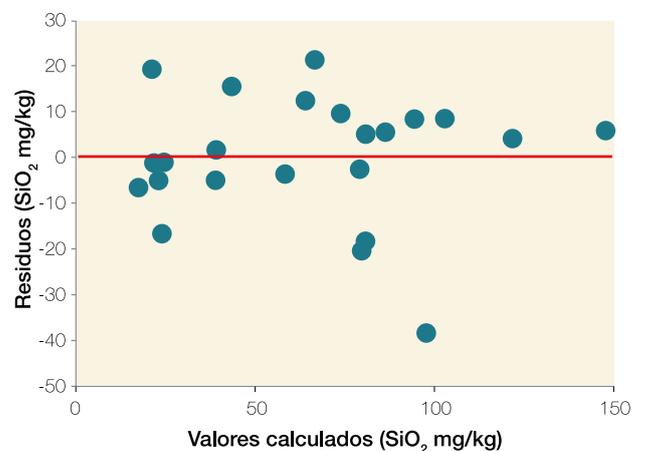


Figura 2. Grafico de residuos (mg SiO₂/kg).

lorimétricamente y por espectrometría de absorción atómica. Entre ambas metodologías existe una correlación fuerte. Utilizando el software R, se obtuvo un coeficiente de Pearsson de 0,916, y para reforzar esta conclusión se realizó un test “t” para muestras pareadas, que establece que ambas metodologías son iguales.

El método colorimétrico es un método sencillo y de bajo costo que puede analizar, en distintas etapas, silicatos reactivos y silicatos totales.

El método de absorción atómica requiere un equipo de alto costo y personal entrenado para su manejo que solo determina silicio total.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método colorimétrico posee un LC de 3 mg SiO₂/kg de azúcar, menor al obtenido por absorción atómica con llama de óxido nítrico - acetileno. Para estos niveles de silicatos

Tabla 9. Resumen de los parámetros estadísticos según los criterios del OAA.

Matriz	Metodología	LD (mg SiO ₂ /kg)	LC (mg SiO ₂ /kg)	u _{sesgo} (%)	u _{PI} (%)	U (%)
Azúcar	Silicatos A	1	3	6	6	17
	Silicatos totales	---	---	5	9	20
Jugo de caña	Silicatos A	1	3	10	5	23
	Silicatos totales	---	---	13	4	27

en azúcar se debería usar un equipo de espectrometría de absorción atómica con horno de grafito, una técnica de atomización diferente, mucho más sensible (2000 veces más que el de llama de óxido nítrico – acetileno) que el empleado en este trabajo, pero con costos de reactivos e insumos elevados.

Debido a esto, el método colorimétrico es muy apropiado para ser utilizado en la industria azucarera.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Barker, B. and S. B. Davis. 2005. Characterization of cane varieties based on sugar processing parameters. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* 79: 76-88.

Clarke, M. A. 1974. Cane sugar and silicon compounds. *Proc. Tech. Sess. Canesugar Refining Res.*, pp. 66 – 75.

Feng, W.; S. Wu; A. Wharmby and A. Wittmeier. 1999. Microwave digestion of plant and grain standard reference materials in nitric and hydrofluoric acid for multi-elemental determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* (14): 939 – 946.

Godshall, M. A.; M. A. Clarke; E. J. Roberts and F. G. Carpenter. 1976. Soluble silicates in refinery processes. *Proc. 35th Ann. Meeting Sugar Ind. Tech.*, pp. 58 – 67.

International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). 2017. Method GS2/3-23 (2005). The determination of arsenic in white sugar by atomic absorption spectroscopy – Tentative. Bartens, Berlin, Germany.

Meyer, J. H. and M. G. Keeping. 2000. Review of research

into the role of silicon for sugarcane production. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* (74): 29 – 36.

Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2019a. CE-LE-05. Criterios específicos para evaluar la incertidumbre de un proceso de medición en laboratorios químicos.

Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2019b. GUI-LE-03. Guía para la validación de métodos de ensayos.

Perkin Elmer instruments. 2000. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry. Norwalk, USA.

R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Consultado 10/11/2020.

Saska, M.; M. Ruiz; S. Zossi y M. Sastre. 2016. Some comments on the colorimetric determination of silicate in cane sugar. *Int. Sugar J.*, 115 (1380): 852 – 857.

South African Sugar Technologist Association (SASTA). 2005. Laboratory manual including the official methods. 4 ed. [CD ROM]. SASTA, Durban, South Africa.

Thangavelu, S. and C. Rao. 2002. Silicon content in juice of sugarcane clones and its association with other characters at different stages of maturity. *SugarTech.* 4 (1-2): 57–60.

Walford, S. N. 2003. A review of analytical procedures for the determination of silica. Technical Report N° 1925, Sugar Milling Research Institute.

Walthew, D. C.; F. Khan and R. Whitelaw. 1998. Some factors affecting the concentration of silica in cane juice evaporators. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* 72: 223-227.