



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis Doctor en Ingeniería

**Estudio, Desarrollo e Implementación de Sistemas
Embebidos Flow-Batch para el Análisis de Muestras
Petroquímicas, Medioambientales y Alimentos**

Gabriel Martín Eggly

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis Doctor en Ingeniería

**Estudio, Desarrollo e Implementación de Sistemas
Embebidos Flow-Batch para el Análisis de Muestras
Petroquímicas, Medioambientales y Alimentos**

Gabriel Martín Eggly

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2018

Prefacio

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Sistemas Digitales dependiente del Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Computadoras, y el Laboratorio de Química Analítica dependiente del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 01 de Junio de 2014 y el 28 de Septiembre de 2018, bajo la dirección de los profesores Dr. Rodrigo M. Santos, profesor adjunto de Introducción a las Computadoras Digitales, Dr. Marcelo F. Pistonesi, profesor adjunto de Química Analítica.

Gabriel M. Eggly



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... ,
mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

Al Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Computadoras, y la Universidad Nacional del Sur por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para desenvolverme en esta profesión.

Al cuerpo docente del Laboratorio de Sistemas Digitales y del Laboratorio de Química Analítica, quienes también dedicaron una porción de su tiempo para colaborar y brindar su apoyo en todo momento.

A mis directores de Tesis, Dr. Rodrigo Santos y Dr. Marcelo Pistonesi, por brindarme esta oportunidad, y dedicarme siempre un pedacito de su tiempo para ayudarme a resolver cada uno de los problemas a los que me he enfrentado a lo largo de estos años de trabajo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio Abierto del DIEC, del cual me siento orgulloso de forma parte, por su dedicación y vocación.

A mis amigos, los que estuvieron desde un principio, y los que fui cosechando durante el transcurso de mi formación.

A mis hermanos, por el compañerismo y el cariño. Por estar presente en todo momento.

A mi hermosa compañera de vida, por tenerme tanta paciencia en esos momento cuando el trabajo me perseguía hasta casa. Te amo!

Y por último, y principalmente, a mis padres, por los valores y la educación inculcada, que es el bien más valioso que me ha sido dado.

Resumen

La presente tesis de doctorado es un trabajo interdisciplinario en el cual la Química Analítica y la Ingeniería de Computación atravesaron sus propios límites y métodos de investigación para alcanzar resultados originales que fueron validados en congresos nacionales e internacionales y en revistas científicas. El objetivo primario fue el desarrollo de sistemas automáticos para evaluar estándares de calidad en diferentes matrices con especial interés en combustibles, alimentos y medio ambiente. En las tres áreas se realizaron aportes importantes que tienen además la potencialidad de convertirse en transferencia de tecnología.

La tesis se desarrolla en 6 partes. En las primeras dos, se enmarca la investigación en cuanto a la metodología y las herramientas de trabajo que fueron desarrolladas y utilizadas a lo largo de las investigaciones. En las siguientes tres partes se presentan los resultados obtenidos en biocombustibles, alimentos y medioambiente respectivamente. En el caso de las primeras dos matrices, las técnicas planteadas fueron contrastadas con los métodos de referencia y se utilizaron para esto muestras provistas por el sector productivo/industrial. Es además importante destacar, que las soluciones alcanzadas no sólo tienen una alta efectividad en el procesamiento de la información sino que además reducen el costo económico de las determinaciones y permiten la portabilidad de los instrumentos debido a su reducido peso y tamaño. En el caso de medioambiente, el estudio refiere a un modelo de comunicación de sensores subacuáticos para la determinación de variables ambientales. Debido a los elevados costos asociados a este tipo de sensores, en este caso la evaluación de la propuesta se realizó por medio de simulaciones y no fue posible la implementación física de la red. Finalmente en la última parte presentan las conclusiones generales y se dejan planteadas las líneas de investigación futuras.

Palabras claves: Interdisciplinario, Analizadores automáticos, Flow-batch, Biocombustibles, Alimentos, Medioambiente.

Abstract

This PhD thesis is an interdisciplinary work in which Analytical Chemistry and Computer Engineering went through their own limits and research methods to achieve original results that were validated in national and international conferences and in scientific journals. The main objective was the development of automatic systems to evaluate quality standards in different matrices with special interest in fuels, food and environment. In the three areas, important contributions were made that also have the potential to become technology transfer.

The thesis is divided in 6 parts. In the first two, research is framed in terms of methodology and work tools that were developed and used throughout the investigations. The results obtained in biofuels, food and environment respectively are presented in the following three parts. In the case of the first two matrices, the techniques proposed were contrasted with the reference methods and samples provided by the productive/industrial sector were used for this. It is also important to emphasize that the solutions achieved not only have a high effectiveness in the processing of information but also reduce the economic cost of the determinations and allow the portability of the instruments since their reduced weight and size. In the case of the environment, the study refers to a communication model of underwater sensors for the determination of environmental variables. Due to the high costs associated with this type of sensors, in this case the evaluation of the proposal was made through simulations and the physical implementation of the network was not possible. Finally, in the last part, the general conclusions and the future research lines are presented.

Keywords: Interdisciplinary, Automatic analyzers, Flow-batch, Biofuels, Food, Environment.

Índice general

ParteI	Introducción	1
1	Marco de Referencia	3
1.1	Motivación	3
1.2	Objetivo General	4
1.2.1	Objetivos Específicos	4
1.3	Estado del Conocimiento en los distintos aspectos a estudiar	5
1.3.1	Biocombustibles	5
1.3.2	Alimentos	7
1.3.3	Medio ambiente	8
1.4	Analizadores Flow Batch	9
1.5	Actividades y metodología	10
1.6	Contribución	13
1.6.1	Revistas ISI	13
1.6.2	Congresos	14
ParteII	Sistemas flow-batch	17
2	Desarrollo de un prototipo de controlador flow-batch	19
2.1	Motivación	19
2.1.1	Objetivo	21
2.2	Desarrollo del hardware	22

2.2.1	Bomba peristáltica	22
2.2.2	Accionador	23
2.2.3	Interfaz HMI	24
2.2.4	Microcontrolador	25
2.3	Desarrollo del software	26
2.3.1	Diagrama de casos de usos	27
2.3.2	Navegación por menús	30
2.4	Ensamblado del sistema	30

ParteIII Biocombustibles _____ 33

3 Introducción general de biocombustibles 35

3.1	Matriz energética	35
3.1.1	Biodiésel	36
3.1.2	Producción de biodiésel en Argentina	38
3.1.3	Estándares de calidad: Glicerol en el biodiésel (B100)	39
3.1.4	Método de referencia	41
3.1.5	Trabajos realizados por el grupo	41

4 Determinación de glicerol libre en biodiésel: Fotómetro lab-made - Efecto Schlieren 43

4.1	Motivación	43
4.1.1	Efecto Schlieren	44
4.2	Descripción del sistema	46
4.2.1	Cámara de extracción - Sistema flow-batch	47
4.2.2	Celda de detección	48
4.2.3	Circuito acondicionador	50
4.3	Experimental	51
4.3.1	Soluciones y muestras	51

4.3.2	Procedimiento flow-batch	51
4.4	Resultados y discusión	53
4.4.1	Optimización del sistema	53
4.4.2	Curva de calibrado	55
4.4.3	Validación del método	56
5	Determinación de glicerol libre en biodiésel: Detector piezoeléctrico	57
5.1	Motivación	57
5.1.1	Tecnología piezoeléctrica	58
5.2	Descripción del analizador flow-batch	58
5.2.1	Cámara de mezcla y detector piezoeléctrico	59
5.3	Experimental	60
5.3.1	Soluciones y muestras	60
5.3.2	Procedimiento flow-batch	60
5.3.3	Procedimiento quimiométrico	62
5.4	Resultados y discusiones	62
5.4.1	Ajustes de los parámetros del sistema	62
5.4.2	Interferencias	63
5.4.3	Determinación de glicerol libre en muestras reales	64
6	Conclusiones de la parte III	69
ParteIV Alimentos		73
7	Determinación de plomo en propóleos: Detector electro-químico	75
7.1	Motivación	75
7.2	Diseño de un potenciostato lab-made	77
7.2.1	Diseño del hardware	78
7.2.2	Firmware del potenciostato	81

7.2.3	Comparación con un potenciostato comercial	82
7.3	Descripción del sistema flow-batch	83
7.3.1	Celda electroquímica	84
7.3.2	Sistema de distribución	85
7.3.3	Unidad de control	85
7.4	Experimental	86
7.4.1	Soluciones y muestras	86
7.4.2	Procedimiento flow-batch	86
7.5	Resultados y discusiones	88
7.5.1	Interferentes	88
7.5.2	Parámetros analíticos	88
7.5.3	Análisis de muestras reales	89
7.6	Conclusiones	90

ParteV Medio ambiente _____ 93

8	Protocolo de comunicación en redes de sensores subacuáticos	95
8.1	Motivación	95
8.2	Trabajos Relacionados	98
8.3	Descripción del Protocolo UWSO-TDMA	100
8.3.1	Modelo de la red	102
8.3.2	Fase de inicialización	103
8.3.2.1	Sincronización de relojes	103
8.3.2.2	Asignación de ranuras	109
8.3.3	Fase de transmisión de datos	112
8.3.4	Mejoras	114
8.4	Ejemplo de Aplicación	115
8.5	Escenario de aplicación	118
8.6	Proceso de Evaluación	122

8.7 Conclusiones	124
ParteVI Conclusiones y Trabajos Futuros _____	125
9 Conclusiones generales	127
9.1 Sobre los sistemas flow-batch	128
9.2 Sobre las matrices analizadas	128
9.3 Sobre los métodos quimiométricos	129
10 Trabajos futuros	131

Parte I

Introducción

Resumen

En esta parte se presentan los ejes principales sobre los que se desarrollará la tesis, su objetivo general como los específicos, la metodología de trabajo y la validación de la misma.

Capítulo 1

Marco de Referencia

1.1. Motivación

Las universidades modernas tal como las conocemos hoy fueron creadas en Europa durante el siglo XVIII con un énfasis en la investigación y la formación académica de calidad de sus estudiantes, la igualdad de desarrollo de la docencia y la investigación, la jerarquización de todas las disciplinas y la libertad académica. Si bien las actividades interdisciplinarias siempre existieron, no fue hasta finales del siglo XX que éstas tomaron fuerza. A partir de ese momento, y a pesar de múltiples obstáculos estructurales, se comenzó a tomar como prioridad en las políticas de desarrollo científico el crecimiento de áreas de colaboración e intercambio entre las distintas ramas de la ciencia hasta transformarse en sí misma en un área. El camino para lograr este objetivo encuentra dificultades en el modo en que están organizadas las universidades e instituciones de ciencia y técnica con procesos de evaluación y acreditación particulares para cada área, y en la que resulta difícil encuadrar un proceso compartido. En el siglo que comienza, la creación de conocimiento y la expansión del mismo así como la generación de nuevas tecnologías obliga a enfocar entre todos los campos aquellos que integran distintas disciplinas. Esto requiere de un esfuerzo económico por un lado, y vencer prejuicios que ven en estas actividades a una disciplina como prestadora de servicios

a otra [1].

Estructuras de pensamiento colaborativas, trabajo de integración de resultados, análisis de causas y consecuencias empujan al investigador a abordar temas desde una visión holística y abarcativa. Esta tendencia es la que asumí al inicio de este trabajo de tesis en el cual dos departamentos académicos diferentes, dos institutos del CONICET distintos y dos investigadores de áreas distantes como la Química Analítica y la Ingeniería de Computación vieron la posibilidad de realizar un trabajo de este tipo. Al momento de comenzar este camino no había experiencia previa de colaboración en este nivel entre los departamentos mencionados ni entre los institutos. Es en si mismo un hecho nuevo la colaboración en trabajos de tesis de doctorado todo el trabajo realizado.

En este capitulo se presenta entonces los ejes principales sobre los que se desarrollará la tesis, su objetivo general como los específicos, la metodología de trabajo y la validación de la misma.

1.2. Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es la formación de recursos humanos en un área donde convergen las disciplinas de la ingeniería de computación y la química analítica, para el diseño y realización de sistemas basados en la metodología flow-batch. A partir de algunos resultados experimentales previos se observa como muy promisorio la idea de desarrollar sistemas automáticos para evaluar estándares de calidad en diferentes matrices. Los análisis pueden provenir de distintas áreas de interés como alimentos, combustibles o efluentes industriales.

1.2.1. Objetivos Específicos

1. Revisión de estado del arte en el campo de estudio y aplicación.
2. Comprender las características y aplicaciones de los diferentes montajes de los sistemas

que emplean la metodología flow-batch.

3. Definir y documentar los diferentes requisitos del sistema a desarrollar según el/los parámetro/s a determinar.
4. Modelar el sistema a partir de los requerimientos funcionales y no funcionales utilizando técnicas de implementación basadas en arquitecturas del tipo SoB (Systems on Board) o embebidos.
5. Diseñar los experimentos necesarios para validar las diferentes propuestas de implementación.
6. Incorporar análisis multivariado por medio del procesamiento digital de las señales obtenidas de las interfaces en los procedimientos flow-batch mejorando de esta manera la capacidad del sistema.
7. Optimizar las variables electrónicas, químicas y flow-batch del sistema.
8. Aplicación del o los métodos propuestos a muestras reales.
9. Validar experimentalmente los desarrollos y contrastar los resultados con métodos de referencia.
10. Extender las especificaciones y requerimientos por sobre los diseños de laboratorio actuales, para alcanzar el grado industrial.

1.3. Estado del Conocimiento en los distintos aspectos a estudiar

1.3.1. Biocombustibles

El incremento en los valores de comercialización de los combustibles fósiles, así como el impacto ecológico que estos causan en el medio ambiente, han motivado estudios relacio-

nados con la obtención de energías limpias que no produzcan emanaciones, o si lo hacen, generen el mínimo posible. Los cuatro principales factores que favorecen el desarrollo de los biocombustibles son: el creciente consumo de petróleo a nivel mundial (100 millones de barriles/día), la disminución en el suministro de combustibles fósiles, el calentamiento global y la intención de reducir la dependencia en importaciones de combustible. Adicionalmente, la mayoría de los biocombustibles son producidos mediante procesos sencillos, son fácilmente biodegradables, no tóxicos, tienen un bajo perfil de emisiones y pueden usarse directamente o mezclados con combustibles convencionales.

En la Argentina, desde el año 2000, debido a la necesidad de sustitución de importaciones y la diversificación de la matriz energética nacional, los combustibles fósiles son mezclados con biocombustibles (ley 26.093). Dado que la calidad del biodiésel producido es un factor fundamental, que define el modo de funcionamiento y el tiempo de vida de un motor, es esencial garantizar la misma. Especificaciones y controles de calidad durante la producción y distribución del biodiésel son de suma importancia para asegurar la confiabilidad y compatibilidad de los combustibles. Para ser aceptado como combustible, el biodiésel debe cumplir con todas las especificaciones impuestas por la normativa vigente. Ésta es independiente de los procesos de producción y del tipo de materia prima utilizado, por lo que el proceso de refinado de los ésteres obtenidos de la transesterificación es extremadamente importante. Los aspectos más importantes en la producción de biodiésel para asegurar una operación libre de problemas en los motores diésel son: reacción completa; ausencia de ácidos grasos libres; remoción de glicerol, catalizadores, metales, fósforo, alcoholes y agua. Si alguno de estos parámetros no se encuadra dentro de las especificaciones que rige la norma, se presentan diferentes tipos de problemas en el motor, tales como formación excesiva de jabones, formación de depósitos en la boquillas de inyección, corrosión, etc.

En Argentina, el organismo que define y establece los parámetros de calidad de este biocombustible es el Instituto de Racionalización Argentino de Materiales (IRAM). El IRAM, en la norma 6515-1 [2] establece los requisitos y métodos de ensayos para el biodiésel, para

ser comercializado y suministrado en nuestro país como combustible para vehículos automotores equipados con motores diésel, al 100 % de concentración, o como aditivo del gasoil para uso automotor. Dicho organismo se basa en las normativas de la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM, American Society for Testing Materials), y el Comité Europeo de Normalización (CEN) [3]. Es importante destacar que las determinaciones de estos parámetros por los métodos de ensayo que establecen la ASTM e IRAM, utilizan equipos sofisticados que suelen ser importados y de precio elevado. Se puede citar, por ejemplo, los métodos de NBR 15341 y NBR 15342, que emplean cromatografía de gases, una técnica que es laboriosa, de alto costo de mantenimiento y operación, y que requiere de reactivos, disolventes y patrones químicos que a veces resultan perjudiciales para el medio ambiente y para la salud humana [4, 5]. En este sentido, es muy importante y necesario el desarrollo de nuevos métodos de análisis que puedan evitar o minimizar estos inconvenientes.

1.3.2. Alimentos

Desde el punto de vista alimenticio, los productos apícolas son valiosos suplementos nutricionales destinados a suplir carencias de la dieta moderna, basada en alimentos refinados e industrializados. El gran contenido de aminoácidos, enzimas, vitaminas, antioxidantes, ácidos orgánicos y minerales, convierte a la colmena en una valiosísima fuente proveedora de salud y vitalidad [6]. Dentro de los productos apícolas, la miel, polen y propóleos merecen especial atención. La actividad apícola Argentina se encuentra desde hace algunos años en franca expansión. En los últimos años en nuestro país se observó el surgimiento de nuevos polos productivos apícolas y el crecimiento de la actividad en distintas provincias generando puestos de trabajo e incrementando las exportaciones debido además, a un aumento de la demanda externa en los diferentes mercados. Algunas de las exigencias que rigen actualmente en los mercados exportadores de productos apícolas son la obtención de productos alimenticios inocuos, genuinos y que preserven el medio ambiente. Esto está relacionado directamente con el concepto de calidad alimentaria.

Actualmente se exige que estos productos cumplan con un mínimo de exigencias higiénico-sanitarias, estén libres o contengan un mínimo de residuos de antibióticos, insecticidas, plaguicidas y/o contaminantes, que posean certificaciones sanitarias para el ingreso a determinados países y que posean calidad diferenciada por su origen (botánico o geográfico), atributos organolépticos (color, sabor, textura, etc.), composición química, etc [7]. Dentro de los posibles contaminantes de los productos apícolas se puede mencionar insecticidas, antibióticos y metales.

El control de la calidad sanitario de los alimentos permitirá proponer soluciones correctivas a problemas recurrentes en la aplicación inadecuada de plaguicidas y de fármacos veterinarios cuyos residuos deterioran la salud humana. Además, en algunos casos pueden contener metales contaminantes. El desarrollo de nuevos métodos analíticos rápidos, sencillos y de bajo costo que se basen en el grado de confianza que se exige a los resultados con la normativa vigente, sería una alternativa adecuada para este fin.

1.3.3. Medio ambiente

El deterioro de la calidad de los ambientes acuáticos es motivo de preocupación a nivel mundial desde hace varias décadas. Este deterioro se incrementa con el crecimiento de la población humana, la expansión de la actividad industrial y agrícola y el cambio climático que causa importantes alteraciones en los ciclos hidrológicos. El emplazamiento de grandes zonas urbanas e industriales (alimentaria, petrolera, petroquímica, entre otras) en las áreas costeras ha ocasionado un aumento de los niveles de contaminantes persistentes (CP) en diferentes cuerpos de agua, como por ejemplo pesticidas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), herbicidas y bifenilos policlorados (PCBs) [8, 9]. Estos xenobióticos reducen la calidad de los ambientes modificando y/o disminuyendo el recurso pesquero e ingresan a los ecosistemas principalmente por tres rutas: a) vertidos accidentales; b) aguas residuales y efluentes industriales; y c) por lixiviación y escorrentías desde suelos agrícolas.

Los ríos y estuarios argentinos reciben los aportes de efluentes urbanos e industriales con

diferentes grados de tratamiento presentando características muy diferentes con respecto a estos contaminantes, dependiendo no solo de las diversas clases de industrias que los generan sino también variando temporalmente incluso dentro de una misma industria [10].

El empleo de biomarcadores ha tomado gran importancia en los últimos años en programas de biovigilancia, una valiosa herramienta específica para evaluar el estado fisiológico y el estrés en los sistemas naturales y promover la comprensión de los mecanismos por los cuales los organismos responden a los cambios ambientales. Las respuestas de los biomarcadores, representa una señal integrada del nivel de contaminación de una determinada zona y, por consiguiente, constituye un indicador del nivel de riesgo toxicológico al que puede ser sometida una determinada población natural [11, 12]. A pesar de su importante contribución para asegurar que los cuerpos de agua sean mantenidos o restaurados y proteger los ecosistemas acuáticos, su inclusión no es aceptada en programas locales por su costo y existe un gran número de preguntas sin resolver acerca de su sensibilidad y reproducibilidad.

Los resultados de esta tesis contribuirán a establecer nuevos métodos automáticos para evaluar la presencia, toxicidad y acumulación de estos contaminantes en ríos y estuarios argentinos.

1.4. Analizadores Flow Batch

Los sistemas automáticos permiten una gran mejoría en el desempeño de los procesos, teniendo un aumento significativo en la frecuencia, precisión y exactitud de los análisis. Estos sistemas permiten la manipulación de sustancias inestables, tóxicas, explosivas y hasta radioactivas, además de posibilitar un monitoreo continuo en cualquier proceso, reduciendo los costos para grandes volúmenes de análisis y control de los equipamientos con una mínima intervención de los operadores.

Un analizador puede definirse como una serie de elementos de los cuales uno como mínimo es un instrumento que opera con diferentes grados de automatización y ha sido diseñado para

la determinación cualitativa o cuantitativa de uno o varios analitos, en una sola muestra o una serie de ellas. Los métodos en flujo continuo desarrollados han permitido la obtención de una elevada frecuencia de muestreo, buena reproducibilidad, la reducción al mínimo de la manipulación por el operador y la no necesidad de que la reacción finalice, lo cual ha generado el nacimiento empírico de una nueva metodología que ha revitalizado la Química Analítica [13, 14]. Hace menos de doce años aparece una nueva modalidad de análisis en flujo llamada Flow Batch, la cual resalta la versatilidad (carácter multitarea) y discrepancia en los fundamentos respecto a los métodos en flujo continuo ya existentes [15]. Este tipo de sistemas pueden considerarse sistemas híbridos, ya que combinan las ventajas intrínsecas de los sistemas de flujo continuo con las ventajas inherentes a los métodos en batch. Desde un punto de vista conceptual, uno de los principales aportes que produce el flow-batch consiste en la sustitución de los volúmenes de inserción por tiempos de inserción, permitiendo desarrollar time-based sampling methods. Esta metodología se caracteriza por ser un sistema activo, versátil y fácil de reconfigurar gracias a la implementación de válvulas solenoides, que convierten al sistema de flujo en una estructura funcional controlada por una computadora. En un sistema flow-batch se introduce la muestra, el medio y el reactivo en una cámara de mezclado, de forma secuencial o bien simultáneamente. La medida de la señal analítica generada puede realizarse en flujo o en cámara abierta, logrando de esta manera la máxima sensibilidad, pues los equilibrios físico-químicos del proceso analítico pueden ser controlados [16].

1.5. Actividades y metodología

La hipótesis sobre la que se desarrolla este plan de trabajo es que la utilización de las técnicas de flow-batch con control automático a partir de sistemas electrónicos y de computación permiten reducir los costos, ampliar la cantidad de variables a estudiar y abreviar tiempo en el control de calidad del elemento analizado.

A continuación se refiere para cada objetivo específico las actividades y metodologías realizadas para alcanzarlo. Sólo se indican cuestiones generales ya que lo importante son los resultados que se detallan en las partes sucesivas.

Revisión de estado del arte en el campo de estudio y aplicación Para el desarrollo de este objetivo se contó con la infraestructura de la Universidad y los Institutos de Investigación con acceso a publicaciones y bibliotecas digitales. Se revisarán las publicaciones más recientes tanto en el campo de las técnicas de flow-batch como en el modelado y diseño de los sistemas embebidos.

Comprender las características y aplicaciones de los diferentes montajes de los sistemas que emplean la metodología flow-batch Este objetivo está relacionado con el área de la química analítica. Para alcanzarlo se trabajó junto con otros estudiantes de grado y postgrado y se tomaron materias básicas y de postgrado en el Departamento de Química. Con esto se adquirió conocimiento sobre la naturaleza de los procesos químicos que se producen en las cámaras y cómo reaccionan los diferentes componentes.

Definir y documentar los diferentes requisitos del sistema a desarrollar según el/los parámetros a determinar Este objetivo es fundamental para documentar el trabajo y permitir avanzar hacia nuevas soluciones.

Modelar el sistema a partir de los requerimientos funcionales y no funcionales utilizando técnicas de implementación basadas en arquitecturas del tipo SoB (Systems on Board) o embebidos La determinación de los requisitos del sistema que son funcionales (qué hace) y los no funcionales (cómo y de qué manera lo hace) es fundamental para el estudio, diseño y evaluación del sistema. Para realizar esto. Los conocimientos para alcanzar estas habilidades se tomaron en cursos de postgrado dictados en el Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Computadoras.

Diseñar los experimentos necesarios para validar las diferentes propuestas de implementación Tan importante como el experimento es poder asegurar que el mismo cubre las posibilidades y que detectará aquellas anomalías que debe detectar. Las técnicas de diseño de experimentos se aprendieron en cursos de postgrado dictados por el Depto. de Química.

Incorporar análisis multivariado por medio del procesamiento digital de las señales obtenidas de las interfaces en los procedimientos flow-batch mejorando de esta manera la capacidad del sistema Entre las técnicas propuestas para alcanzar este objetivo se encuentra el análisis de covarianza o correlación entre distintas variables sensadas o sobre diferentes corridas del sistema que pueden ser útiles para el modelado correcto de la muestra analizada. En todos los trabajos publicados se realizaron aportes en los algoritmos para el análisis de los datos obtenidos.

Optimizar las variables electrónicas, químicas y flow-batch del sistema La realización de este objetivo es complementaria de los anteriores. Un análisis cualitativo y cuantitativo es necesario para lograrlo y se apoyó sobre los cursos de postgrado y la estadía de investigación llevada a cabo en la Universidad Federal de Joao Pessoa.

Aplicación del o los métodos propuestos a muestras comerciales La naturaleza aplicada del plan propuesto requirió el contraste de las propuestas con muestras comerciales para su validación. El proyecto cuenta con la colaboración de Petrobras (Refinería Bahía Blanca) , YPF, Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda, INTA Ascasubi y CORFO.

Validar experimentalmente los desarrollos y contrastar los resultados con métodos de referencia Este objetivo está enlazado con el anterior y se alcanzó gracias a la disponibilidad del INQUISUR para acceder al equipamiento de referencia y poder así validar el trabajo realizado.

Extender las especificaciones y requerimientos por sobre los diseños de laboratorio actuales, para alcanzar el grado industrial El trabajo realizado es de características académicas pues está orientado a la formación de un doctor en ingeniería. Sin embargo, la realización de la tesis requiere una interacción importante con la industria y la posibilidad de realizar un aporte concreto de tecnología en un área prioritaria para el país. En cada matriz de trabajo y en cada caso se logró avanzar sobre prototipos experimentales que fueron adoptados por el INQUISUR para continuar con su uso en otros proyectos.

1.6. Contribución

Este trabajo de tesis encuentra respaldo académico en las siguientes publicaciones en revistas indexadas, congresos y presentaciones a congresos.

1.6.1. Revistas ISI

1. EGGLY, GABRIEL M.; BLACKHALL, MATÍAS; DE ARAÚJO GOMES, ADRIANO; SANTOS, RODRIGO; DE ARAÚJO, MÁRIO CÉSAR UGULINO; PISTONESI, MARCELO F. Emitter/receiver piezoelectric films coupled to flow-batch analyzer for acoustic determination of free glycerol in biodiesel without chemicals/external pretreatment MICROCHEMICAL JOURNAL; Año: 2018 vol. 138 p. 296 - 302
2. GABRIEL M. EGGLY; MARTIN NABAES; MARIA SUSANA DINEZIO; MARÍA EUGENIA CENTURIÓN; RODRIGO SANTOS; MARCELO F. PISTONESI, Embedded flow-batch System with Electrochemical Detection for the Determination of Lead in Propolis Samples INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY; Año: 2017
3. RODRIGO M. SANTOS; JAVIER OROZCO; SERGIO F. OCHOA; ROC MESEGUER; GABRIEL M. EGGLY; MARCELO F. PISTONESI A MAC Protocol to Sup-

port Monitoring of Underwater Spaces SENSORS; Lugar: Basel; Año: 2016 vol. 16 p. 984 - 1003

1.6.2. Congresos

1. GABRIEL M. EGGLY; MATÍAS MICHELETTO; JUAN P. D'AMICO; SANTIAGO J. CROCIANI, Desarrollo de una aplicación móvil para cálculos de pulverizaciones agrícolas, 46 Jornadas Argentinas de Informática, Congreso de AgroInformática, Lugar: Cordoba; Año: 2017;
2. MATÍAS MICHELETTO; ALEJANDRO BORGHERO; GABRIEL M. EGGLY, Planificación Óptima de un Sistema Multiprocesador de Tiempo Real con Restricciones de Precedencia, Comunicación y Energía, XXV Jornadas de Jovenes Investigadores, Lugar: Encarnacion; Año: 2017
3. GABRIEL M. EGGLY; RITA CANELO; LUCAS A. SIQUEIRA; RICARDO A. CAVALCANTI; MARIO UGULINO DE ARAÚJO; RODRIGO M. SANTOS; MARCELO F. PISTONESI; MARIA SUSANA DINEZIO, Desarrollo de un prototipo con sensor capacitivo para la determinación del contenido de humedad en miel, 9º Congreso Argentino de Química Analítica, Lugar: Rio Cuarto; Año: 2017.
4. RODRIGO M. SANTOS; LEONARDO ORDINEZ; GABRIEL M. EGGLY, El Enfoque de Cajas Negra y Blanca para la Enseñanza de Sistemas Embebidos, IEEE ARGENCON 2016, Lugar: Buenos Aires; Año: 2016;
5. RODRIGO M. SANTOS; LEONARDO ORDINEZ; GABRIEL M. EGGLY, Using Open Hardware in a Harsh Environment: A Case Study IEEE ARGENCON 2016, Lugar: Buenos Aires; Año: 2016.
6. MATÍAS MICHELETTO; GABRIEL M. EGGLY; RODRIGO M. SANTOS, Diseño de un registrador de esfuerzos para maquinaria agrícola, 45 Jornadas Argentinas de

- Informática, Congreso de AgroInformática Lugar: Tres de Febrero; Año: 2016.
7. GABRIEL M. EGGLY; MATÍAS BLACKHALL; PAULO H. G. D. DINIZ; ADRIANO A. GOMES; RODRIGO M. SANTOS; MARIO UGULINO DE ARAÚJO; MARCELO F. PISTONESI, Desarrollo de un detector ultrasónico de bajo costo para la determinación de cloruro de potasio y cloruro de sodio en productos farmacéuticos. 8vo Congreso Argentino de Química Analítica, Lugar: La Plata; Año: 2015.
 8. MATÍAS BLACKHALL; GABRIEL M. EGGLY; PABLO NOGUEIRA TELES MOREIRA; RODRIGO M. SANTOS; MARCELO F. PISTONESI; MARIO UGULINO DE ARAÚJO; BEATRIZ S. FERNÁNDEZ BAND, Sistema automático flow-batch para la determinación de glicerol libre en biodiésel utilizando piezoeléctricos, 7° Congreso Argentino de Química Analítica, Lugar: Mendoza; Año: 2013.
 9. GABRIEL M. EGGLY; PAULO H. G. D. DINIZ; RODRIGO M. SANTOS; MARCELO F. PISTONESI; BEATRIZ S. FERNÁNDEZ BAND; MÁRIO M. C. U. DE ARAÚJO, An Embedded System for Determining Free Glycerol Level in Biodiesel, III Brazilian Symposium on Computing Systems Engineering, Lugar: Niteroi, Rio De Janeiro; Año: 2013.
 10. GABRIEL M. EGGLY; PAULO H. G. D. DINIZ; RODRIGO M. SANTOS; MARCELO F. PISTONESI; MÁRIO M. C. U. DE ARAÚJO; BEATRIZ S. FERNÁNDEZ BAND, Sistema Flow-Bach/FIA para determinación del glicerol libre en muestras de biodiésel, 5to Congreso Iberoamericano de Química Analítica, Lugar: Montevideo; Año: 2012;

Parte II

Sistemas flow-batch

Resumen

En esta parte se abordan las etapas de diseño e implementación de un prototipo de equipo de laboratorio pensado para el desarrollo de trabajos donde se requiera implementar metodologías flow-batch.

Capítulo 2

Desarrollo de un prototipo de controlador flow-batch

2.1. Motivación

En los distintos sistemas donde se ha empleado la metodología flow-batch (FB) se han podido observar una serie de componentes comunes. Éstos son esenciales para lograr un proceso completamente automatizado [16]. Entre ellos podemos mencionar la unidad de propulsión, que tiene como misión establecer un flujo de soluciones y/o reactivos lo más constante posible, ausente de pulsos y, principalmente, perfectamente reproducible. Para lograr esto, la opción más acertada es la utilización de una bomba peristáltica con múltiples canales para la propulsión de fluidos en simultáneo. Este tipo de bombas cuenta con una cubierta circular y una serie de rodillos que comprimen un tubo flexible (tubo de bomba) el cual contiene los fluidos (soluciones o reactivos). Mientras que el rotor gira, la sección del tubo bajo compresión se cierra, forzando, de esta manera, a desplazar el fluido a través del tubo en el sentido de rotación. De este modo, controlando las revoluciones del rotor y en función del diámetro del tubo de bomba seleccionado, se puede obtener un caudal preciso y, cuantos más rodillos tenga el rotor, menos pulsante. La figura 1 muestra los pasos del

funcionamiento de una bomba peristáltica con 3 rodillos.

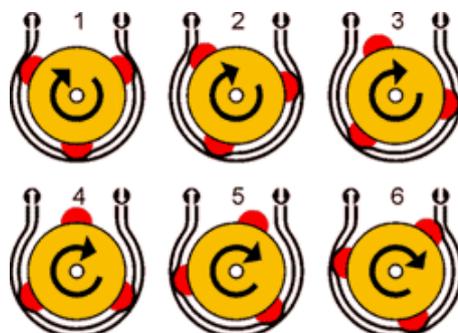


Figura 1: Esquema paso a paso del funcionamiento de una bomba peristáltica

El uso de este tipo de bombas en aplicaciones FB requiere el uso de un sistema de multi-conmutación. Esto brinda un control total de aquellos fluidos que deben ingresar a la cámara de mezclado. Teniendo un control del tiempo y la rotación de la bomba, se puede calcular con precisión el volumen total inyectado. En la mayoría de los casos, la multiconmutación en sistemas FB se logra con el uso de válvulas solenoides de 3 vías como las de la figura 2.

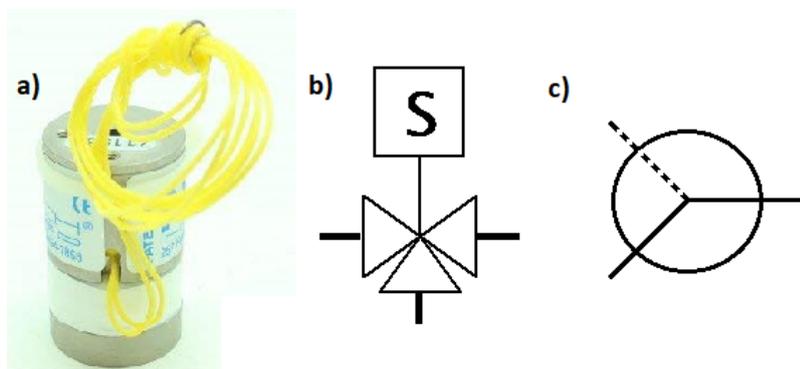


Figura 2: a) Válvula solenoide de 3 vías NRResearch 225T031. b) Símbolo de una válvula solenoide de 3 vías (norma ISA-S5.1). c) Símbolo esquemático utilizado para descripción de sistemas flow-batch

Estas válvulas son accionadas por una interfaz electrónica, la cual es controlada por un programa de PC. Un caso frecuente en la literatura consultada, es el uso de un accionador de válvulas “lab-made” construido con transistores de potencia, el cual es controlado por un software propietario de PC a través de un adquisidor comercial USB (por ejemplo, un adquisidor NI USB6000 y el software NI LabView). Esto le da una gran versatilidad al sistema

FB, ya que la aplicación es fácilmente reprogramable, y con una interfaz muy amigable para el usuario. Sin embargo, el uso de estos elementos conlleva un alto coste en la licencia del programa, y también del dispositivo USB.

En los últimos años el uso de las plataformas de hardware abierto como Arduino permitió el desarrollo de sistemas embebidos de bajo costo que permiten resolver distintos problemas sin necesidad de realizar el diseño completo. Estas plataformas presentan interfaces abiertas en las cuales los desarrolladores de sistemas y aplicaciones pueden conectar sensores y actuadores varios. Habitualmente disponen de una interface de programación sencilla en lenguaje C y una amplia comunidad que publica sus desarrollos tanto en hardware como en software. Este nuevo modo de desarrollar sistemas ha potenciado la realización de proyectos bajo el paradigma commercial off-the-shelf (COTS) que se basa en la implementación de sistemas en base a componentes discretos existentes en el mercado.

2.1.1. Objetivo

En este capítulo se detalla el desarrollo y construcción de un prototipo de controlador flow-batch para diversas aplicaciones en química analítica donde se pueda aplicar esta metodología. Este aparato contará con:

1. Bomba peristáltica con capacidad de variar de 0 a 48 rpm.
2. Salidas digitales de 0/12 V para el sistema de multiconmutación.
3. Interfaz de usuario amigable para poder configurar todos los parámetros de aplicación de un sistema flow-batch.
4. Memorias para almacenar procedimientos flow-batch.

Las siguientes secciones detallan las etapas de construcción tanto en hardware como en software.

2.2. Desarrollo del hardware

Esta sección describe el desarrollo del prototipo siguiendo una metodología de diseño en función de los requerimientos funcionales expuestos anteriormente. Se sigue una secuencia paso a paso de las distintas partes que conforman el prototipo.

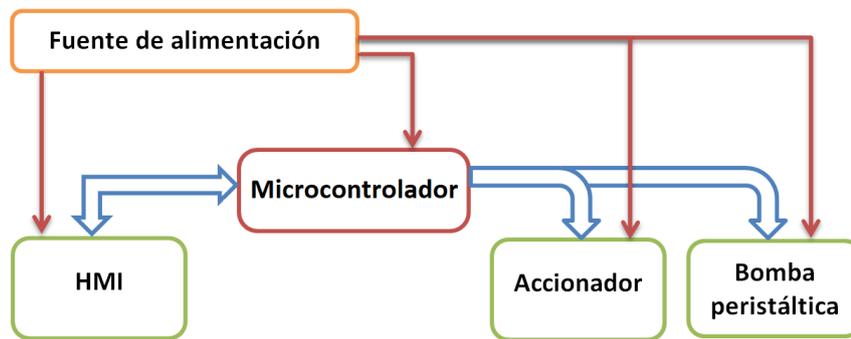


Figura 3: Diagrama esquemático del hardware a desarrollar

2.2.1. Bomba peristáltica

Con el objetivo de lograr un flujo constante y ausente de pulsos, se prosiguió a diseñar un cabezal de bomba con 10 rodillos de acero inoxidable. Este cabezal cuenta con una capacidad de propulsión de hasta 6 canales. Utilizando el software FreeCad se diseñaron las distintas partes que conforman el cabezal.

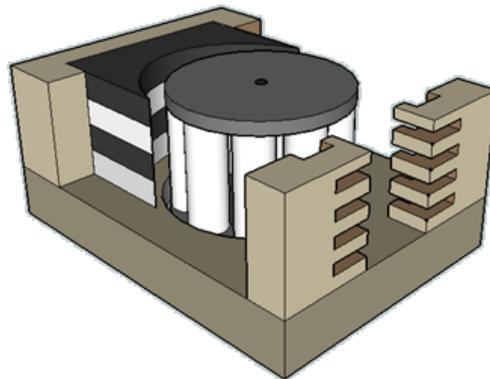


Figura 4: Modelo 3D del cabezal de la bomba peristáltica

Una característica fundamental en las bombas peristálticas es que se puede controlar

la velocidad del motor para que, de este modo, el caudal resultante sea proporcional a ésta velocidad. Un punto a tener en cuenta es que el torque puede variar en función de la velocidad. Los motores paso a paso (PaP) son dispositivos electromecánicos que convierten una secuencia de impulsos eléctricos en desplazamientos angulares discretos. Esto permite un control muy preciso de la rotación sin necesidad de realimentación. Además mantienen su máximo torque en la mayor parte de su rango de velocidad. Para mover el cabezal de la bomba peristáltica se escogió un motor PaP bipolar Nema 17 de alto torque con una reductora de 5:1 acoplada al eje. Ésto permite incrementar aún más el torque, y a su vez, suavizar el movimiento discreto de este tipo de motor. Para poder gobernar de forma eficiente el motor desde la unidad de control, se utilizó un driver Pololu DRV8825. Esta placa cuenta con un controlador de motor paso a paso bipolar DRV8825 con microstepping desarrollado por TI. Cuenta con limitación de corriente ajustable, protección contra sobrecorriente y sobretemperatura, y seis resoluciones de microstep (hasta 1/32-step). Funciona de 8,2 V a 45 V y puede entregar hasta aproximadamente 1,5 A por fase sin un disipador.

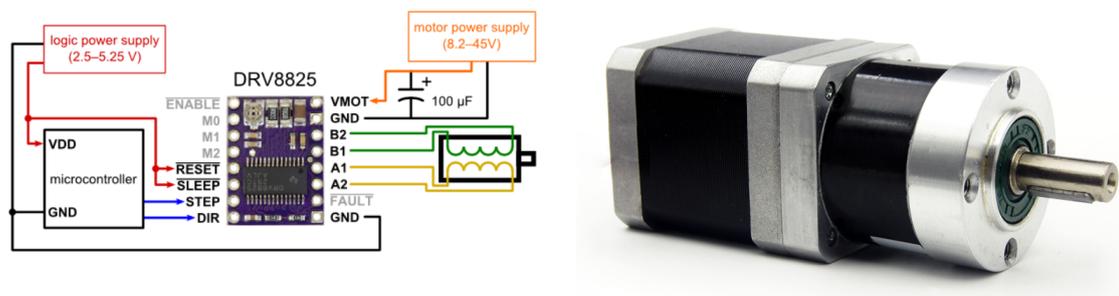


Figura 5: Diagrama de conexionado entre el microcontrolador y el driver de motor paso a paso DRV8825 (modo de paso completo). Motor NEMA 17 con caja reductora con relación 5:1.

2.2.2. Accionador

Los actuadores más comúnmente encontrados en los montajes FB son las válvulas solenoides y agitadores hechos con motores de corriente continua (CC). Para poder comandar desde la unidad de control este tipo de actuadores, se construyó un circuito que consiste en un arreglo de transistores de potencia que acondicionan las señales digitales de baja intensidad

(de las compuertas lógicas CMOS, TTL, etc.). Para simplificar el diseño, se utilizó el circuito integrado ULN2803A, que tiene un arreglo de 8 transistores Darlington con emisor común y diodos damper para cargas inductivas (6). Cada Darlington puede entregar una corriente continua de 500 mA (600 mA de pico) y soporta una tensión de hasta 50 V. Además, las salidas se pueden conectar en paralelo para aumentar la capacidad de corriente.

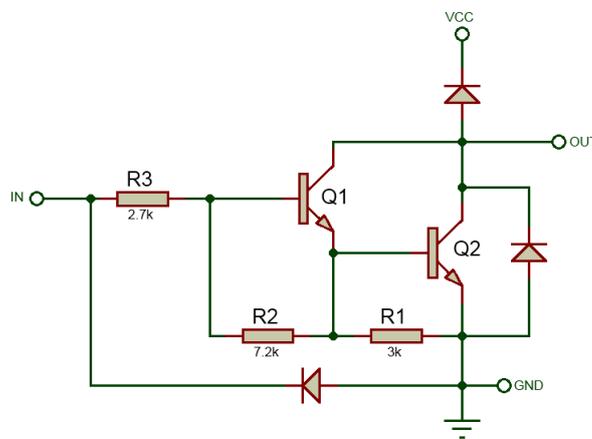


Figura 6: Diagrama esquemático del circuito integrado ULN2803.

La resistencia R3 de 2,7Kohm en la entrada permite que el circuito sea compatible para interfaces TTL y CMOS de 5V. La corriente de entrada típica es de 1mA aproximadamente, con lo cual no se cargan los puertos digitales de la unidad de control.

2.2.3. Interfaz HMI

Para poder interactuar con el sistema, éste cuenta con una interfaz HMI compuesta por un display LCD de 20x4 y 5 botones para navegación entre menús y configuración de parámetros del sistema. El display cuenta con un conversor I2C a paralelo (PCF8574) para reducir la cantidad de pines. La figura 7 muestra el diseño del panel del prototipo con la interfaz gráfica y la disposición de los botones con los cuales el usuario interactúa con el equipo.

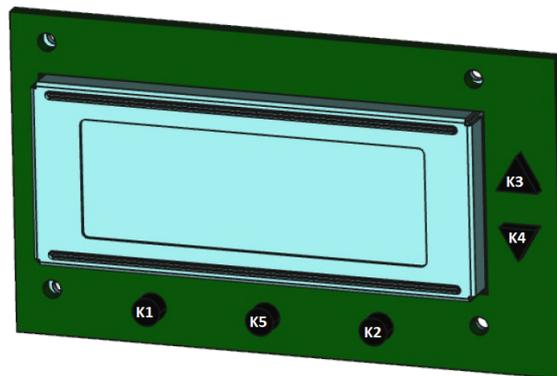


Figura 7: Diseño en 3D del panel frontal con la interfaz HMI. Cuenta con 5 botones cuyas funciones son: K1:Atrás; K2:Selección; K3:Arriba; K4:Abajo; K5:Menú/Especial.

2.2.4. Microcontrolador

En la selección de la plataforma de hardware se tuvieron en cuenta algunos aspectos tales como: disponibilidad en el mercado local, buena relación costo-prestaciones, robustez, y por último, que la cantidad de puertos disponibles de E/S sea suficiente para interactuar con todos los dispositivos del sistema. Bajo estas restricciones hemos elegido una plataforma Arduino Nano, basada en el microcontrolador Atmel ATmega328, que satisface todos los requerimientos mencionados. El ATmega328 cuenta con 6 canales analógicos de 10 bit, 23 puertos digitales de E/S, 3 timers, unidades de comunicación serie, y cuenta con una gran comunidad de desarrollo. La plataforma abierta Arduino cuenta con una interfaz de desarrollo simple y una gran librería de periféricos. Además, es posible obtener diversos kits compatibles para desarrollo de sistemas COTS.

Los puertos de entrada/salida son utilizados por los diferentes periféricos conectados al equipo para relacionarse con el usuario y el sistema flow-batch. La mayoría de los pines del microcontrolador son multipropósito, es decir, que su funcionamiento va a depender de la configuración que el programador le dé. La tabla 1 detalla la asignación de entradas/salidas y la función de los diferentes puertos del microcontrolador.

Tabla 1: Asignación de Entradas/Salidas del microcontrolador ATmega328

N° de pin	Nombre	Función
1	PORTD3	Entrada Botón K4 (Abajo)
2	PORTD4	Entrada Botón K3 (Arriba)
9	PORTD5	Entrada Botón K2 (Selección)
10	PORTD6	Entrada Botón K1 (Atrás)
11	PORTD7	Salida O5 (ULN2803)
12	PORTB0	Salida O6 (ULN2803)
13	PORTB1	Salida STEP (DRV8825)
14	PORTB2	Salida M1 (DRV8825)
15	PORTB3	Salida M2 (DRV8825)
16	PORTB4	Salida O8 (RELE)
17	PORTB5	Salida O7 (RELE)
23	PORTC0	Salida O4 (ULN2803)
24	PORTC1	Salida O3 (ULN2803)
25	PORTC2	Salida O2 (ULN2803)
26	PORTC3	Salida O1 (ULN2803)
27	SDA	Conexión SDA a display LCD
28	SCL	Conexión SCL a display LCD
30	Rx	Línea Rx de comunicación
31	Tx	Línea Tx de comunicación
32	PORTD2	Entrada Botón K5 (Menú/Especial)

2.3. Desarrollo del software

El software fue desarrollado en un entorno de desarrollo (IDE) basado en processing y un lenguaje de programación basado en wiring. El microcontrolador se programa desde la PC, usando comunicación serie mediante un conversor USB a TTL serial, gracias al cargador de

arranque (bootloader).

Debido a las restricciones de confiabilidad, coste y tiempo, se ha adoptado para la metodología de desarrollo una simplificación de UML.

1. Definición de requerimientos: se definen y documentan los diferentes requisitos del sistema a desarrollar.
2. Determinación de los actores.
3. Descripción de los casos de usos en modo gráfico y textual. Identificación de las relaciones, atributos y características principales asociadas.
4. Diagrama de actividades para cada caso de uso.
5. Implementación de clases y funciones. Definición de atributos.
6. Verificación del producto final y contraste respecto de los requerimientos.
7. Test operacional del sistema: se realizan las pruebas y ensayos sobre un escenario real.

2.3.1. Diagrama de casos de usos

Para la realización de este software se definieron 3 actores: el usuario, el Arduino en el rol de interfaz, y el Arduino en el rol de controlador. A continuación describimos un diagrama de casos de uso simplificado.

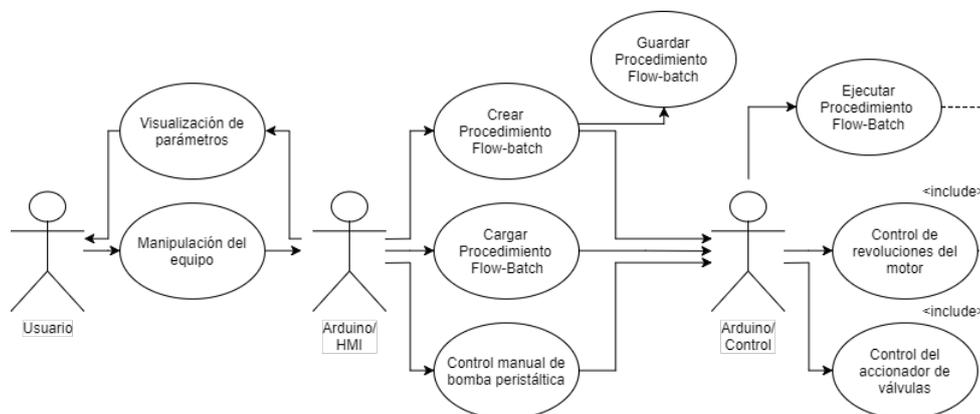


Figura 8: Diagrama de casos de uso simplificado

A continuación se detallan los casos de uso más importantes:

Caso de uso 1: Manipulación del equipo.

- **Actores:** Usuario y Arduino/HMI.
- **Descripción:** El Usuario a través de los botones del panel frontal puede navegar por los distintos menús como también configurar parámetros del sistema.
- **Métodos implementados:** int **getButton**(uint16_t *variable, int lowerLimit, int upperLimit, uint8_t multiplier); void **manageMenu**(int comando).
- **Variables involucradas:** Para capturar las pulsaciones de los botones se utiliza una variable para almacenar el comando ejecutado por el usuario. Además se manipulan variables de estado que indican el menú actual y la posición del cursor en la pantalla.
- **Entradas/Salidas involucradas:** Entradas digitales de los botones K1, K2, K3, K4 y K5.

Caso de uso 2: Visualización de parámetros.

- **Actores:** Usuario y Arduino/HMI.
- **Descripción:** A través del display LCD de 4 líneas y hasta 20 caracteres por línea, el Arduino-HMI imprime las pantallas de cada menú, las cuales se almacenan en la memoria de programa para evitar el consumo excesivo de memoria RAM.
- **Métodos implementados:** void **printMenu**(int menu, int line, int display_mode); **pgm_read_word**(address_short).
- **Variables involucradas:** se reserva una porción de memoria RAM para leer y guardar las constantes Strings almacenadas en la memoria de programa.
- **Entradas/Salidas involucradas:** Salida I2C del Arduino para comandar el display LCD.

Caso de uso 3: Crear/configurar procedimiento flow-batch.

- **Actores:** Usuario y Arduino/HMI.
- **Descripción:** El Usuario a través de la interfaz HMI configura todos los parámetros de ejecución de una secuencia de automatización de un procedimiento flow-batch. Los parámetros más importantes son: La cantidad de pasos, las rpm de la bomba en cada paso, la salida activa en cada paso, y el tiempo en cada paso.
- **Métodos implementados:** bool **createFB()**.
- **Variables involucradas:** Cantidad de pasos (steps), y tres arreglos para almacenar las rpm, salida y tiempo.
- **Entradas/Salidas involucradas:** Se incluyen los casos de uso de manipulación y visualización de datos con sus respectivos métodos y usos de entradas/salidas.

Caso de uso 4: Ejecutar procedimiento flow-batch.

- **Actores:** Arduino/control.
- **Descripción:** El Arduino-control ejecuta las tareas preestablecidas para lograr una secuencia flow-batch. En base a la cantidad de pasos de la secuencia y los tiempos de permanencia en cada uno, el Arduino-control establece las rpm de la bomba y la salida activa en cada caso. Una vez finalizada la secuencia, el sistema vuelve al estado inicial a la espera de una nueva orden.
- **Métodos implementados:** void **executeFB()**; void **setSpeed(uint16_t rpm)**; void **setOutput(int output)**.
- **Variables involucradas:** Están involucradas las mismas variables que en el caso de uso anterior.

- **Entradas/Salidas involucradas:** Se controlan las salidas digitales de las salidas para accionar las válvulas (O1, O2, ..., O8), así como también las salidas que controlan el motor paso a paso (STEP, M1, M2).

2.3.2. Navegación por menús

A continuación se detalla la implementación de la navegación entre menús y configuración de parámetros para la realización de procedimientos flow-batch.

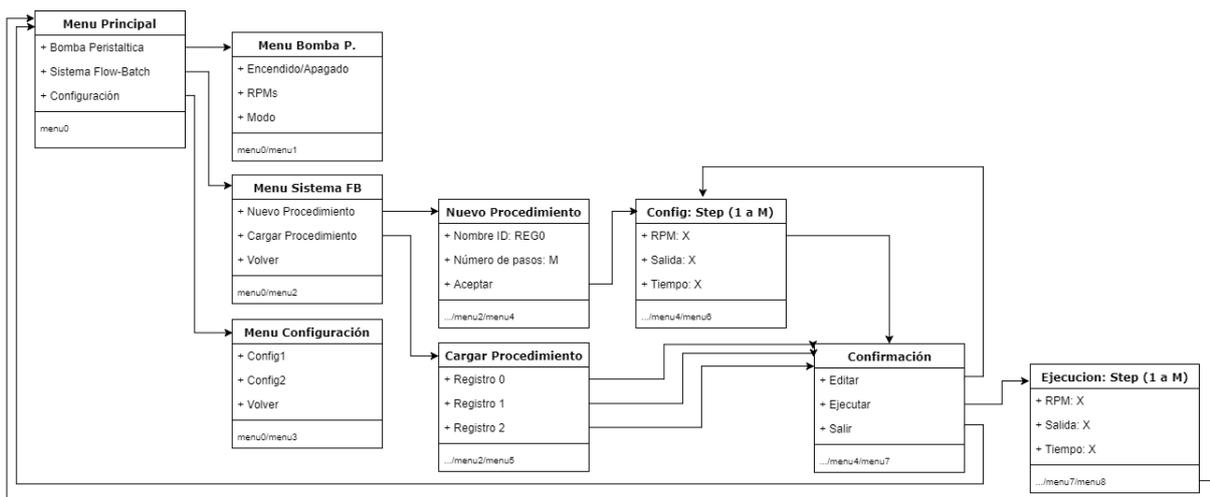


Figura 9: Diagrama de navegación entre menús.

2.4. Ensamblado del sistema

En la figura 10 se muestra el conexionado entre las partes descritas en las secciones anteriores. El sistema cuenta con una placa Arduino Nano basada en el microcontrolador ATmega328p, una interfaz de usuario amigable, y drivers para controlar las válvulas y el motor paso a paso.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE CONTROLADOR FLOW-BATCH

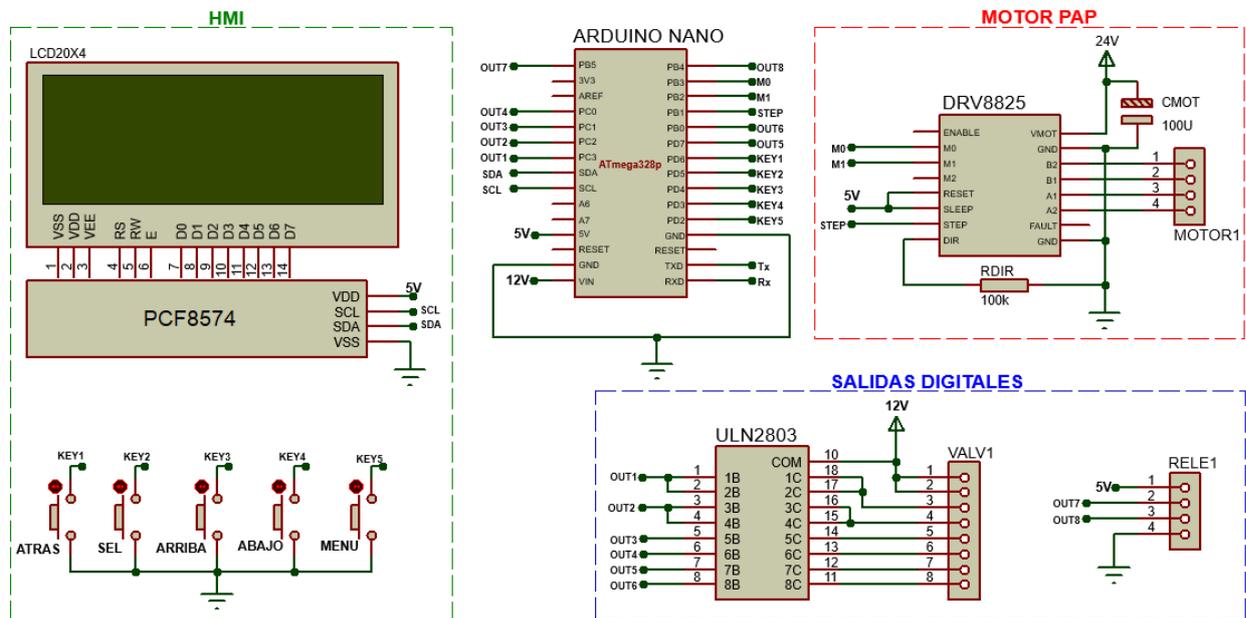


Figura 10: Diagrama esquemático del sistema completo.

El diseño del circuito impreso fue realizado con el software Proteus. En la figura 11 se muestra el resultado del diseño del PCB y una vista 3D virtualizada del diseño final.

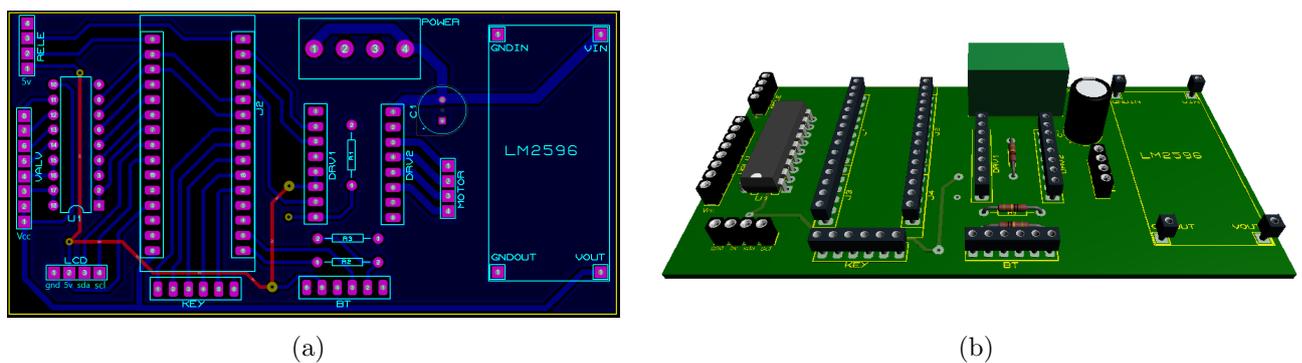


Figura 11: Diseño de la placa controladora del sistema flow-batch. a)Diseño del PCB del sistema. b)Vista 3D de la placa.

El gabinete del sistema fue realizado en plástico PLA en una impresora 3D.

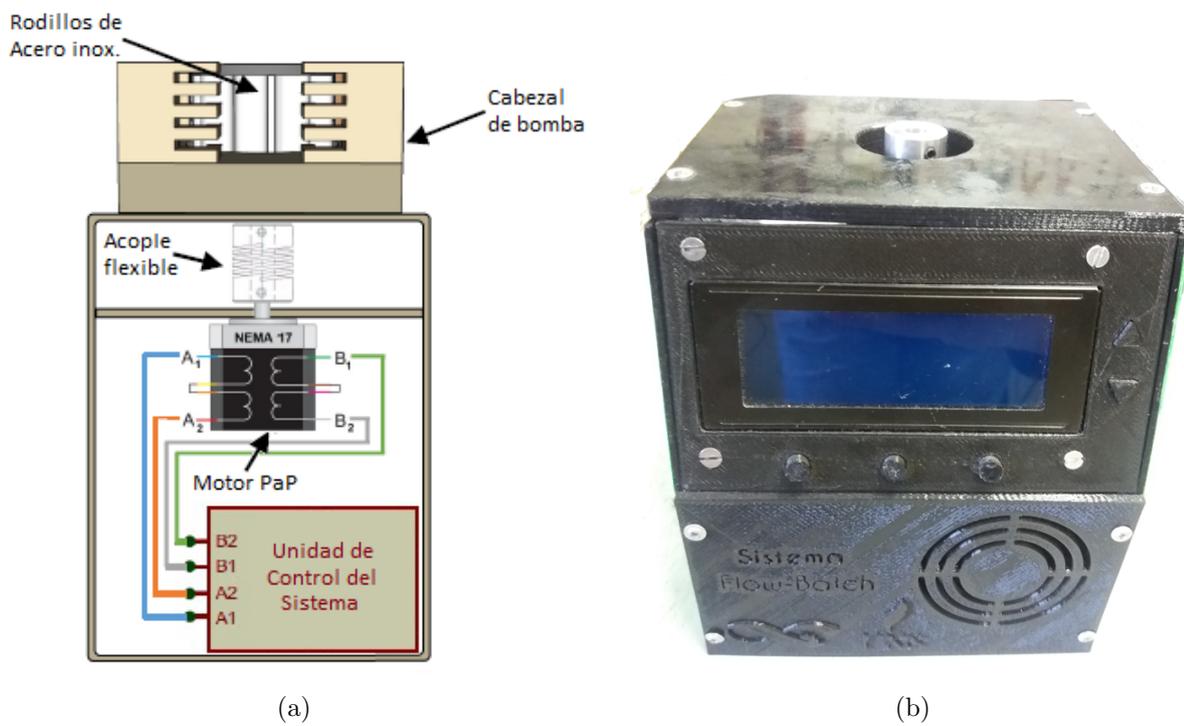


Figura 12: Controlador flow-batch. a)Diagrama de ensamblaje. b)Foto del equipo.

Parte III

Biocombustibles

Resumen

En esta parte se presentan dos trabajos que aportan soluciones originales aplicadas al campo de instrumentación para el control de calidad de biocombustibles. La disposición de los capítulos se debe a un orden cronológico del desarrollo de los trabajos. En el capítulo final, se realiza una comparación entre los métodos desarrollados, y otros relacionados, resaltando las fortalezas y debilidades de cada uno.

Capítulo 3

Introducción general de biocombustibles

3.1. Matriz energética

Desde hace algunas décadas se vienen buscando sustancias alternativas a los combustibles derivados del petróleo, ya que estos recursos no son renovables y se prevé que se agoten en un futuro no muy lejano. Como resultado de estas investigaciones se han desarrollado biocombustibles, que presentan la ventaja de ser menos contaminantes, renovables y sustentables comparados con los derivados del petróleo.

Los biocombustibles se identifican con aquellos obtenidos a partir de biomasa (Figura 13) mediante su procesamiento químico, térmico o biotecnológico [17]. Entre ellos se pueden mencionar el biodiésel, bioetanol, biogás y biohidrógeno [18]. Se obtienen a partir de materias primas de origen agrícola, ganadero y desechos orgánicos, los cuales pueden ser substitutos de forma parcial o total de los combustibles de origen fósil, y en algunos casos, sin necesidad de modificar los motores o el diseño de los vehículos [19].

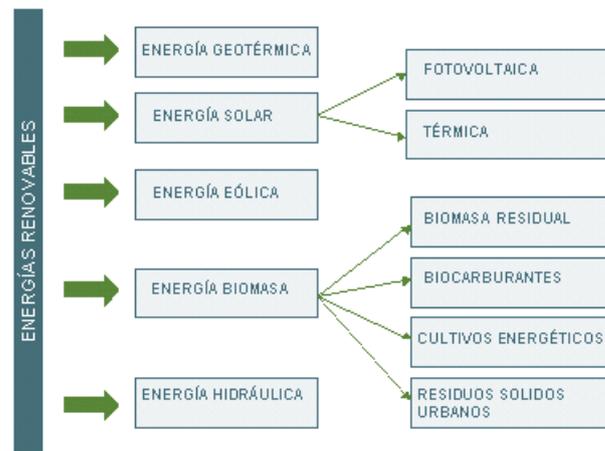


Figura 13: Energías renovables. Fuente: Agencia Valenciana de Energía <http://www.aven.es/energia/renovables.html>

En este momento, el biodiésel y el bioetanol son los principales combustibles alternativos, impulsados por regulaciones recientes como el Programa Federal de Bioproductos de Procura Prioritaria (FB4P, sigla en inglés), del Departamento de Energía de los Estados Unidos, y la Directiva 2003/30/EC de la Unión Europea.

3.1.1. Biodiésel

El término biodiésel se refiere a ésteres monoalquílicos de ácidos grasos, generalmente ésteres de ácido metílico grasos, que se producen a partir de aceite vegetal, grasa animal o restos de aceite de cocina en una reacción química conocida como transesterificación empleando un catalizador que puede ser alcalino, ácido o enzimático [20].

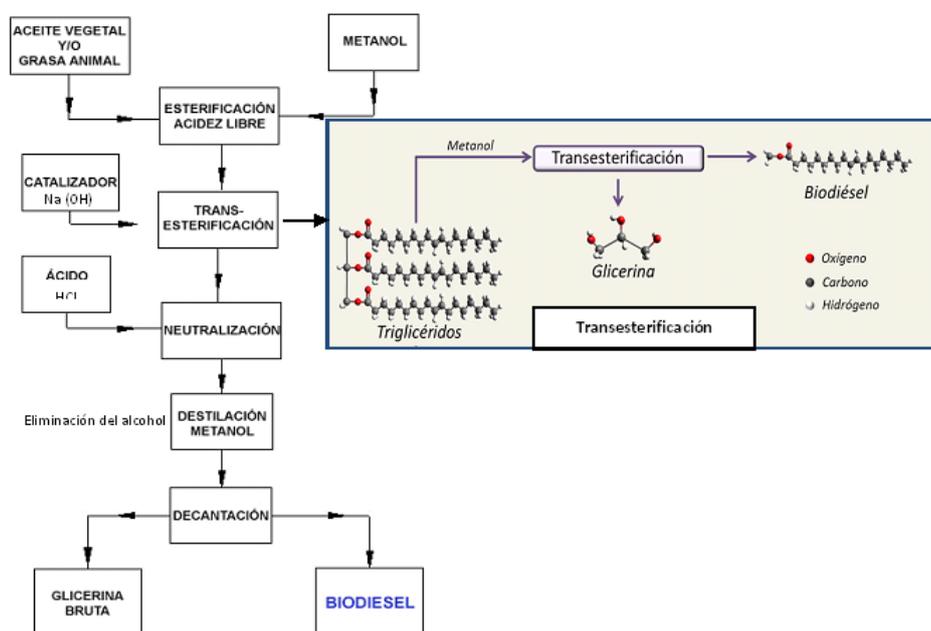


Figura 14: Proceso de obtención del biodiésel.

De los principales beneficios de este biocombustible se pueden destacar que es 100% biodegradable, ecológico, bajo contenido de azufre y que, debido a la presencia de oxígeno en su composición química, su combustión es más completa respecto a los derivados del petróleo, reduciendo así la emisión de partículas, monóxido de carbono e hidrocarburos no quemados, entre otros contaminantes. Cabe destacar además que el uso de biodiésel puede extender la vida útil de motores porque posee un alto poder lubricante y protege el motor reduciendo su desgaste así como sus gastos de mantenimiento. También es importante destacar el poder detergente del biodiésel, que mantiene limpios los sistemas de conducción e inyección del circuito de combustible de los motores [21]. Las emisiones de dióxido de carbono son entre un 20% y un 80% menos que las producidas por los combustibles derivados del petróleo tanto en el ciclo biológico, en su producción como en el uso [22]. La Agencia de Protección del Medio Ambiente (Environment Protection Agency, EPA) contempla al biodiésel como combustible puro con las siglas B100, y cuando es mezclado con gasoil fósil y como aditivo se lo representa como BX, donde X representa la cantidad porcentual de biodiésel [23, 24].

3.1.2. Producción de biodiésel en Argentina

A partir del auge global de biocombustibles, se fundó en nuestro país en el año 2006 la Cámara Argentina de Energías Renovables (CADER), con el objetivo de organizar la industria nacional en materia de recursos renovables y brindarle una proyección global lo suficientemente sólida como para posicionar a la Argentina como referente en el escenario de las grandes potencias mundiales. En la Figura 15 se observa el crecimiento en la producción de biodiésel en la Argentina.

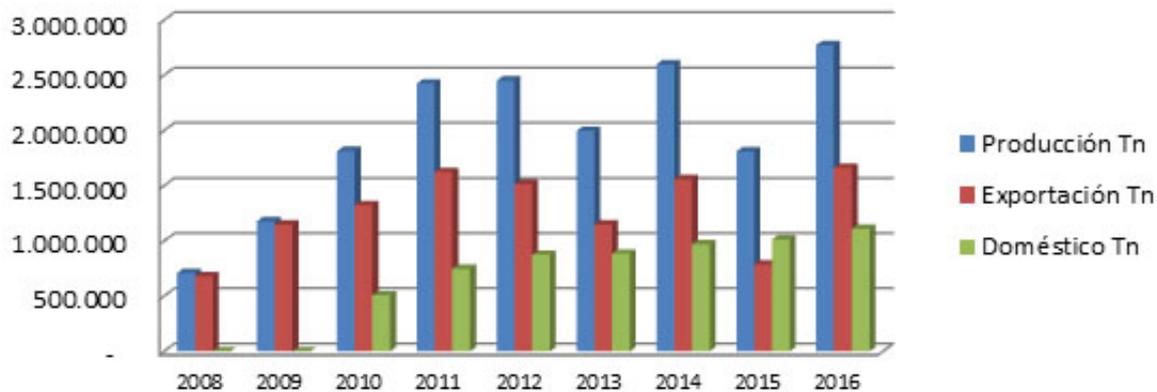


Figura 15: Evolución de la producción, consumo domestico y exportaciones de biodiésel de 2008 a 2016. Fuente: CARBIO

De acuerdo a registros de la Secretaría de Energía cerca del 25 % del diésel que se consume en nuestro país es importado. Desde el año 2006, cuando el parlamento sancionó la ley 26.093 de promoción a los biocombustibles, se determinó incorporar biodiésel a la matriz energética, no sólo por su pureza frente al medio ambiente, sino también como una opción para compensar la escasa capacidad de producción que presenta la industria petrolera.

La industria de los biocombustibles tuvo un gran desarrollo en los últimos años en Argentina, siendo hoy el principal exportador mundial y el tercer productor mundial de biodiésel. Se estima que hay alrededor de 38 plantas de biodiésel con una capacidad instalada de 4.518.000 tn/año. De las 38 plantas instaladas, sólo 12 poseen una capacidad igual o mayor a 100.000 tn/año.

La entrada en vigencia de la ley de biocombustibles estableció el corte (mezcla) obligatorio del biodiésel con el gasoil para el mercado argentino. Los porcentajes de corte teórico de gasoil con biodiésel fueron los siguientes: a) Desde marzo/abril de 2010: 5 % (B5), b) Desde agosto de 2010: 7 % (B7), c) Desde agosto de 2013: 8 % (B8), d) Desde Enero de 2014: 9 % (B9), e) Desde febrero de 2014: 10 % (B10). Al día de hoy, el corte aún continúa siendo del 10 %.

3.1.3. Estándares de calidad: Glicerol en el biodiésel (B100)

El glicerol es el principal subproducto, cuya producción es equivalente a aproximadamente el 10 % en peso del total de biodiésel producido [25, 26]. La glicerina representa un co-producto muy valioso que, de ser refinada a grado puro o farmacológico, puede llegar a cubrir algunos costos operativos de una planta productora de biodiésel [27]. El glicerol es soluble en agua y alcohol pero no en hidrocarburos y ésteres, presenta gran estabilidad bajo condiciones normales de almacenamiento, no es tóxico y es biodegradable.

La presencia de altos residuos de glicerina libre en el biodiésel se debe principalmente a una separación incompleta de la fase de glicerina/biodiésel o una inadecuada purificación del biocombustible en el proceso de lavado. Niveles altos pueden causar problemas de depósitos en el inyector, así como colmatación de filtros. Pueden dañar los sistemas de inyección y producir corrosión en los tanques de los vehículos, debido a los compuestos inorgánicos y jabones que se acumulan en la glicerina. Si la cantidad de glicerina es superior al 0,5 %, ésta puede afectar al contenido de residuo carbonoso [28, 29, 30].

El desarrollo de las especificaciones para los biocombustibles empezó en 2001 luego de la publicación de la norma D6751 de la ASTM (American Society for Testing and Materials), especificación para las existencias de mezclas binarias de combustible biodiésel (B100) y diésel (Tabla 2). En Argentina, el organismo que define los parámetros de control de biocombustibles es el Instituto de Racionalización Argentino de Materiales (IRAM).

CAPÍTULO 3. INTRODUCCIÓN GENERAL DE BIOCOMBUSTIBLES

Tabla 2: Parámetros de referencia para el biodiésel (B100). ASTM D6751

PARÁMETROS	UNIDAD	LIMITE	ASTM	CEN/ISO
Masa específica a 20°C	kg/m ³	850-900	D 1298 D 4052	EN/ISO 3675 EN/ISO 12185
Viscosidad Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	D 445	EN/ISO 3104
Contenido de Agua, máx.	mg/kg	500	D 6304	EN/ISO 12937
Punto de inflamación, mín.	°C	100,0	D 93	EN/ISO 3679
Contenido de estér, mín.	% masa	96,5	-	EN 14103
Residuo de carbono	% masa	0,050	D 4530	-
Cenizas sulfatadas, máx.	% masa	0,020	D 874	EN/ISO 3987
Azufre total, máx.	mg/kg	50	D 5453	EN/ISO 20846 EN/ISO 20884
Fósforo, máx.	mg/kg	10	D 4951	EN 14107
Corrosividad con lámina de cobre, 3h a 50°C, máx.	-	1	D 130	EN/ISO 2160
Número de Cetano	min	47	D 613 D 6890	EN/ISO 5165
Punto de obstrucción de filtro en frio, máx.	°C	19	D 6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	D 664	EN 14104
Glicerol libre, máx.	% masa	0,02	D 6584	EN 14105
Glicerol total, máx.	% masa	0,25	D 6584	EN 14105
Metanol o Etanol, máx.	% masa	0,20	-	EN 14110

Como se muestra en la tabla 2, la norma ASTM D6751 establece que el máximo permitido de glicerol libre en biodiésel sea del 0,02% [m/m] [3].

3.1.4. Método de referencia

Como se observó en la tabla anterior, se desarrollaron dos métodos de cromatografía de gases, EN14105 y D6584, para la determinación de glicerol libre en biodiésel [17, 18]. Ambos métodos son casi idénticos en la preparación de la muestra, la configuración del instrumento, las condiciones de operación y la generación de informes. Dado que la glicerina y los glicéridos son polares y de alto punto de ebullición, primero deben derivatizarse para mejorar la volatilidad y reducir la actividad antes de la inyección en el cromatógrafo gaseoso CG. Se utilizan una entrada de columna fría (COC) y una columna capilar de alta temperatura para facilitar el análisis de estos compuestos. Otra consideración importante al usar estos métodos es la fuente del biodiésel. Ambos métodos se desarrollaron para B100 derivado de aceites vegetales como colza, soja, girasol y palma. Estos métodos no son adecuados para B100 derivado de aceites de ácido láurico, tales como aceites de coco y de almendra de palma.

3.1.5. Trabajos realizados por el grupo

En la bibliografía se pueden encontrar varios métodos para la determinación de glicerol libre en biodiésel, empleando técnicas cromatográficas (con diferentes detectores), amperométricas, y espectrofotométricas [31, 32, 33, 34, 35].

En [36] Lima propone un sistema flow-batch para la determinación de glicerol libre en muestras de biodiésel mediante una reacción de derivatización en donde se obtiene un producto fluorescente. En este sistema se puede observar por primera vez un método de extracción online líquido-líquido del glicerol del biodiésel. Este procedimiento es lo que permite que el sistema sea totalmente automatizado, desde la toma de muestra hasta la determinación no hay manipulación de la muestra por el usuario.

En [37] Diniz propuso un método flow-batch sonoluminiscente para la determinación de glicerol libre en biodiésel. En este trabajo, se utilizó la solución acuosa proveniente de la etapa de extracción como medio para generar una cavitación y producir señales sonoluminiscentes,

las cuales son moduladas por el efecto quenching asociado al glicerol presente. El método requiere el uso de un luminómetro construido con un tubo fotomultiplicador (PMT) como detector. Este detector debe estar provisto de una fuente estabilizada de alto voltaje para lograr una razonable sensibilidad e inmunidad al ruido. La generación de cavitación se logra mediante la aplicación de una onda ultrasónica generada por un dispositivo piezoeléctrico.

Capítulo 4

Determinación de glicerol libre en biodiésel: Fotómetro lab-made - Efecto Schlieren

4.1. Motivación

En esta sección, se propone un sistema embebido que combina las metodologías flow-batch (FB), y análisis por inyección en flujo (FIA), para el pre tratamiento de la muestra y para la determinación de glicerol libre en biodiésel respectivamente. El tratamiento de la muestra se basa en la técnica desarrollada propuesto por Lima en [36] donde se realiza una extracción online liquido-liquido del glicerol libre presenta en la muestra de biodiésel. La cuantificación del analito se realiza en flujo usando la técnica FIA y utilizando detección fotométrica sobre la celda de flujo explotando el efecto Schlieren producido en los límites interfaciales.

4.1.1. Efecto Schlieren

En los sistemas FIA con detección espectrofotométrica, los perfiles analíticos de las señales producidas por las muestras son generalmente reproducibles y ausentes de ruido. Sin embargo, cuando la zona de la muestra presenta gradientes de concentración y estas se asocian a gradientes de índice de refracción, las señales analíticas se tornan ruidosas, disminuyendo así la sensibilidad analítica. A este fenómeno se lo conoce como “Efecto Schlieren”. Este efecto puede ser un factor limitante para las medidas espectrofotométricas en sistemas FIA, acarreando serios efectos sobre la exactitud, la precisión y los límites de detección. Esto ocurre porque cualquier cambio en el índice de refracción entre la solución portadora o “carrier”, y la muestra inyectada provoca un cambio en la transmisión de la luz a través de la celda de flujo [38]. A pesar de que el efecto Schlieren está asociado normalmente a ruidos en los sistemas de análisis en flujo, en situaciones en las cuales las condiciones de flujo y la configuración óptica del sistema de detección son adecuadas, los gradientes de índice de refracción de las soluciones incoloras generan señales Schlieren reproducibles. El primer efecto, que es reproducible, ocurre cuando el índice de refracción de un líquido inyectado difiere del índice del líquido portador. Bajo condiciones de flujo laminar, los límites interfaciales del volumen inyectado pueden formar lentes líquidas parabólicas en el frente y el final de la zona de la muestra inyectada. La luz que pasa a lo largo del eje óptico de una celda de flujo es refractada por esas lentes. Dependiendo de la intensidad relativa de los índices de refracción de la muestra y la solución portadora, puede haber dispersión o convergencia de los rayos de luz desde fuente en dirección al detector o fuera de éste, dando origen a las señales o picos Schlieren (Figura 16).

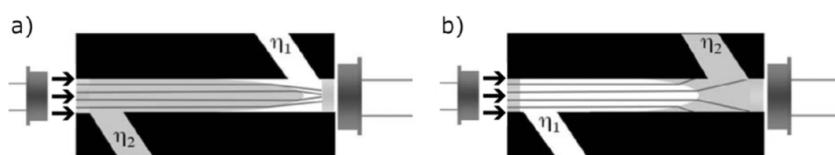


Figura 16: Efecto Schlieren: a) convergencia y b) dispersión de los haces de luz.

El segundo efecto está asociado a variaciones localizadas en los índices de refracción de elementos de la muestra inyectada y la solución portadora que surgen debido a diferencias de temperatura, viscosidad o concentración, lo que es agravado por las pulsaciones de la bomba y una mezcla ineficiente de las zonas de los flujos confluentes. Este efecto produce una mezcla estriada dentro de la celda de flujo y genera ruido aleatorio de línea de base (Figura 17).



Figura 17: Efecto Schlieren: variaciones localizadas de los índices de refracción.

En 1978, Betteridge construyó un fotómetro a base de LED y fototransistor con un camino óptico axial al flujo, para la determinación de salinidad [39]. Se observó que la inyección de muestras incoloras utilizando agua como carrier, generaba una señal analítica caracterizada por un pico positivo seguido de un pico invertido (Figura 18), los cuales fueron atribuidos a la formación de un gradiente de concentración dependiente del índice de refracción de las muestras inyectadas. La celda empleada favoreció la obtención de señales reproducibles independientemente del tipo de sustancia analizada. Se verificó también que estas medidas dependían del tipo de sustancia analizada y que los picos presentaban perfiles reproducibles.

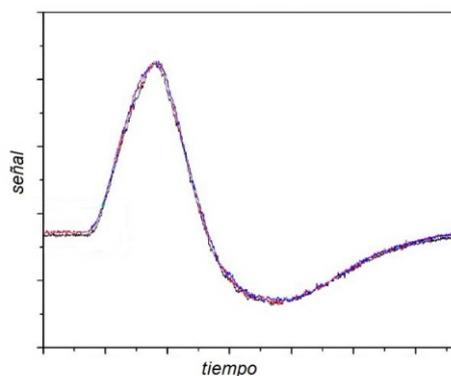


Figura 18: Señal analítica obtenida por efecto Schlieren.

La concentración del analito se relaciona con los datos primarios de altura o área de pico

que se obtienen en el diagrama.

4.2. Descripción del sistema

En la Figura 19 se presenta el esquema del sistema propuesto. Este sistema está compuesto por dos cámaras para el pre-tratamiento de la muestra (CM) y la cuantificación del analito (CD). Además se muestran los aparatos y materiales necesarios para la implementación del prototipo experimental.

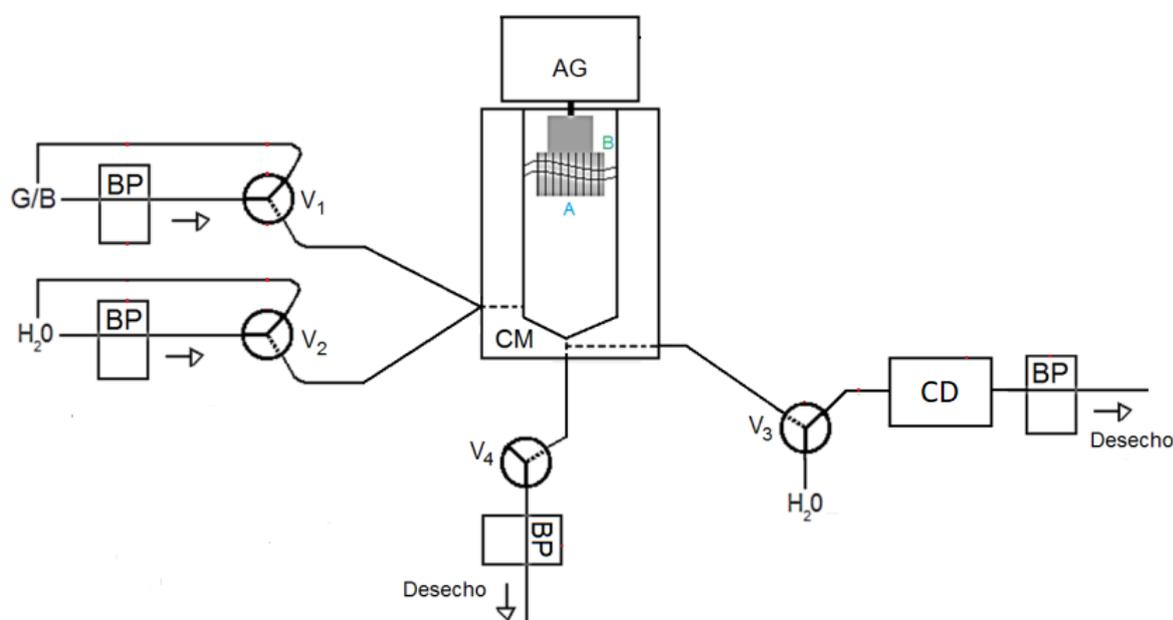


Figura 19: Sistema propuesto: BP: bomba peristáltica; Vi: válvulas solenoides; CM: cámara de extracción (sistema FB); B: base biodiésel; A: fase extractiva (agua); G/B: Solución patrón de glicerol/Muestra de biodiésel; AG: agitador (sistema FB); CD: celda de detección (Sistema FIA)

Los componentes necesarios para la implementación del sistema son:

- Controlador flow-batch.
- Válvulas solenoides de tres vías.
- Conexiones de teflón de 0,8 mm, y tubos de bomba de 1,29 mm y 2,06 mm de diámetro interno.

- Cámara de extracción.
- Celda de detección (fotómetro "lab-made" en celda FIA).

4.2.1. Cámara de extracción - Sistema flow-batch

Se utilizó teflón para su fabricación debido a la propiedad hidrofóbica del mismo. La cámara está construida sobre una pieza cilíndrica de 25 mm de altura, 40 mm de diámetro externo, 12 mm de diámetro interno, 14 mm de profundidad y volumen interno de 1,5 mL. Para la entrada/salida de fluidos la cámara dispone de cuatro canales (Figura 20).



Figura 20: Cámara de extracción.

Para extraer el glicerol presente en el biodiésel a la fase acuosa se utiliza un motor de corriente continua de imán permanente y de baja potencia. Este motor es ensamblado en la parte superior de la cámara de flow-batch. Como se observa en la Figura 21, el motor tiene unido al eje para generar la agitación/extracción entre las dos fases (biodiésel/agua).

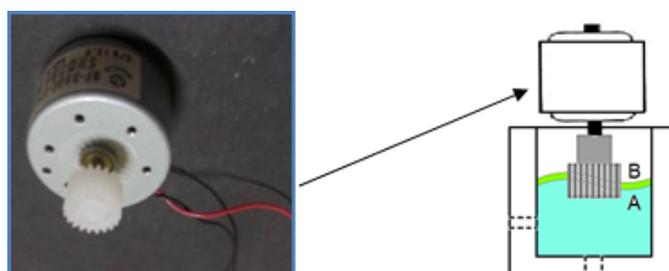


Figura 21: Agitador y ensamblaje del mismo en la cámara de extracción.

El control de la velocidad se realiza por medio de una señal PWM regulada desde la unidad de control.

4.2.2. Celda de detección

La celda de flujo está construida a partir de una pieza cilíndrica de teflón, con una longitud de 40 mm y un diámetro de 15 mm. El formato de la celda es de tipo Z, con la entrada y la salida de fluidos de forma perpendicular al camino óptico. Ésta tiene en sus extremos el LED y el fototransistor (Figura 22). Sus encapsulados fueron cortados en forma plana y pulidos para evitar que las burbujas de aire queden atrapadas a su alrededor e influyan negativamente en la propagación de la radiación, lo que implicaría una pérdida de sensibilidad del detector.

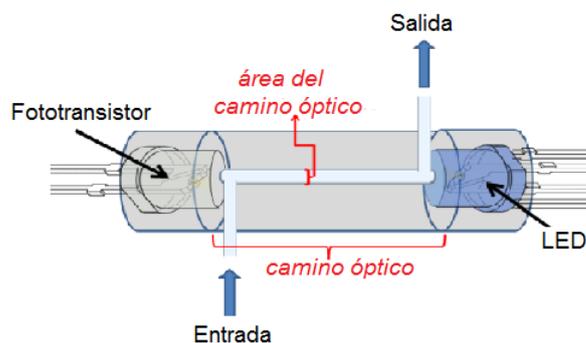


Figura 22: Fotómetro acoplado a la celda de flujo.

Los principales variables a optimizar para el diseño de la celda de flujo son la longitud y la sección del camino óptico. Estos valores se seleccionaron tomando como referencia un trabajo de determinación de glucosa, NaCl y KCl en sueros inyectables [40] donde se utilizó el efecto Schlieren en sistemas FIA. La longitud del camino óptico es el parámetro a optimizar para incrementar la sensibilidad del método y la reproducibilidad de la señal analítica registrada en el diagrama. En la figura 23 se observan las dimensiones de la celda de flujo construida en teflón.



Figura 23: Dimensiones de la celda de flujo.

Como las refracciones de los haces de luz provenientes del LED ocurren con mayor intensidad para longitudes de onda más cortas, se utilizó un LED de alta luminosidad azul con pico de emisión máxima en 470 nm. El sensor óptico está implementado con un fototransistor con la juntura Base-Colector polarizada inversamente y expuesta a la radiación del LED. Una lente clara enfoca la luz sobre la juntura para incrementar la sensibilidad. El fototransistor opera de la misma forma que un fotodiodo a excepción de que puede proporcionar una mayor corriente y su sensibilidad es de 50 a 100 veces mayor que un fotodiodo estándar. La figura 24 muestra el circuito que compone el fotómetro.

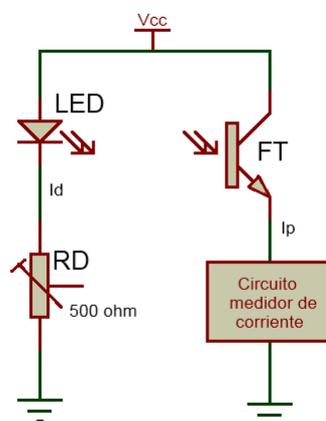


Figura 24: Circuito esquemático del fotómetro.

Todo el circuito se encuentra alimentado a V_{cc} . La caída de tensión de un LED de alta luminosidad es de aproximadamente V_d , por lo que, para polarizarlo a una corriente I_d se ajusta el valor de R_d a:

$$R_d = \frac{V_{cc} - V_d}{I_d} \quad (4.2.1)$$

La corriente de polarización del LED debe ajustarse para obtener el mejor resultado y para asegurar que no se produzca un embalaje térmico, y por ende, un desplazamiento en la línea de base del registro. El fototransistor se conecta en configuración colector común. La corriente en el emisor está determinada por la cantidad de luz incidente en la base multiplicada por un factor de amplificación.

$$I_{pe} = I_{pb} * (h_{FE} + 1) \quad (4.2.2)$$

4.2.3. Circuito acondicionador

El circuito acoplado al emisor del fototransistor tiene la función de detectar cambios en la señal y realizar un acondicionamiento antes de ser muestreada por el conversor analógico-digital. Esta etapa de acondicionamiento está confeccionada con un circuito integrado OPA2350 que contiene dos amplificadores operacionales de precisión, bajo ruido y baja potencia. El circuito de acondicionamiento de la señal consta de dos etapas de amplificación (Figura 25).

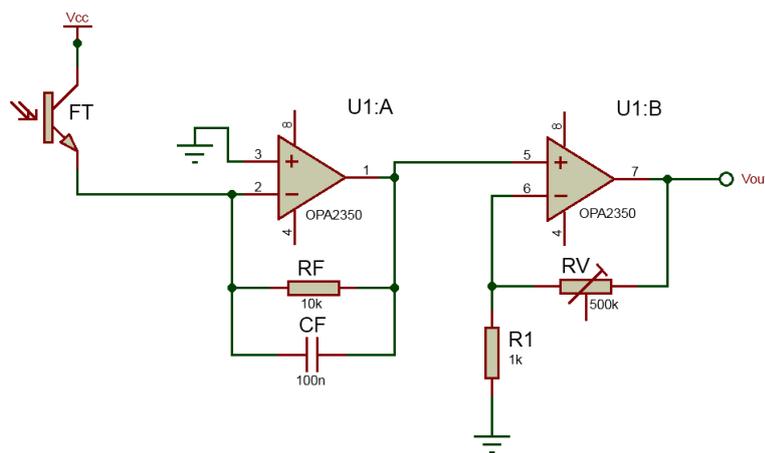


Figura 25: Circuito esquemático del acondicionador de señales.

En la primera etapa se implementó un amplificador de transimpedancia para convertir la corriente fotoinducida a un valor de voltaje. La tensión de salida (V_p) queda determinada por:

$$V_p = I_p * R_f \quad (4.2.3)$$

El capacitor Cf se utiliza para evitar la oscilaciones y para ajustar el ancho de banda de la señal ($1/2 * \pi * R_f * C_f$). En la segunda etapa se implementó un amplificador no inversor con realimentación serie-paralelo. Esta configuración es la más común para amplificar tensiones, donde la ganancia está definida por las resistencias RV y R1, y la tensión de salida queda determinada por:

$$V_{out} = \left(\frac{R_v}{R_1} + 1 \right) * V_p \quad (4.2.4)$$

La resistencia RV es un preset multivuelta para ajustar el valor de la ganancia según la necesidad de amplitud de la señal de salida.

4.3. Experimental

4.3.1. Soluciones y muestras

La solución patrón se preparó disolviendo 67,3 mg de glicerol (99,5%, Mallinckrodt) en 250 ml de agua. Las muestras de biodiésel se obtuvieron de la refinería de Petrobras ubicada en la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Se utilizó exclusivamente agua desionizada-destilada (18 MOhm / cm) a lo largo de todo el estudio.

4.3.2. Procedimiento flow-batch

Antes del análisis, se accionan las válvulas V1 (biodiésel/glicerol) y V2 (agua) durante 2 s para que las respectivas soluciones ingresen a los canales que se acoplan a la cámara de extracción. Luego, la solución en la cámara es descartada al recipiente de desecho accionando la válvula V4 (descarte) durante 4 s.

La preparación de las soluciones testigos ($39 - 330 \text{ mgL}^{-1}$ de glicerol libre equivalente

CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE GLICEROL LIBRE EN BIODIÉSEL: FOTÓMETRO LAB-MADE - EFECTO SCHLIEREN

a $200 - 1692 \text{ mgKg}^{-1}$ en biodiésel) se realiza en línea en la cámara FB usando diferentes relaciones volumétricas de glicerol/agua cambiando el tiempo de activación/desactivación de las válvulas V1 y V2.

La tabla 3 muestra el procedimiento para el análisis de muestras reales. Mediante la activación secuencial de las válvulas V1 y V2, el biodiésel y el agua ingresan a la cámara FB (paso 1 y 2). Luego, el agitador comienza a girar, produciendo un vórtice en la mezcla (paso 3). Esto permite la extracción del glicerol del biodiésel a la fase acuosa. Luego de transcurrido el tiempo de extracción (240 s), el agitador se detiene.

Finalizada la etapa de extracción, se activa la válvula V3 (fase acuosa) durante 10 s para llenar el canal entre la cámara y la celda. La línea de base se registra a partir del agua que fluye por la celda (carrier) mientras la válvula V3 se encuentra desactivada. Luego, cuando se activa nuevamente la válvula V3 durante 3 s, un volumen constante de la fase acuosa es inyectado en la celda, y se registra la señal analítica. Este procedimiento se realiza dos veces para luego promediar los datos primarios individuales.

Para limpiar la cámara de extracción, al terminar la medición se activan simultáneamente la válvula V1, V4 y el agitador. Este procedimiento es llevado a cabo durante 30 s para asegurar la limpieza de la cámara.

Tabla 3: Procedimiento flow-batch para el análisis de muestras reales de biodiésel

Paso	Evento	Tiempo [s]	PP [rpm]	Volumen [uL]
1	Agua (V1)	3,8	48	970,6
2	Biodiésel (V2)	1,0	10	17,5
3	Agitación	240	0	0
4	Detección (V3)	4	0	0
5	Desecho (V4)	4,2	48	0
6	Agua (V1)	3,9	48	1,000
7	Agitación	30	0	0
8	Desecho (V4)	4,2	48	0

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Optimización del sistema

Antes de integrar todas las partes del sistema, se definieron ciertos parámetros para poder realizar los ajustes necesarios para que el sistema realice mediciones confiables. Estos ajustes fueron realizados sobre los sistemas de pre-tratamiento y de detección.

Etapas de pre-tratamiento de la muestra

En la cámara de flow-batch se realizaron las extracciones del glicerol presente en las muestras de biodiésel. Las condiciones operacionales para realizar el tratamiento de la muestra fueron basadas en el sistema desarrollado por Lima y colaboradores [36].

Para lograr la extracción completa del analito presente en la muestra se necesita que el agitador se encuentre encendido como mínimo por 240 s. Para mayores tiempos no se observa una mejor respuesta [36]. Las revoluciones del agitador no deben superar las 200 rpm para evitar la formación de burbujas y emulsiones en la mezcla. Esta velocidad se logra ajustando la señal PWM a un 10 %.

Etapa de detección

Se realizaron estudios acerca del caudal y tamaño de muestra adecuada para que las señales sean reproducibles, y para obtener la mayor relación señal-ruido. Adicionalmente, se ajustaron los parámetros de intensidad lumínica del LED y ganancia del amplificador para ajustar el rango de la señal adquirida. A continuación, se presentan las hipótesis de las elecciones tomadas:

Los caudales altos provocan dispersión axial y radial de la zona de la muestra dentro del fluido portador, imposibilitando la formación de lentes en las regiones frontal y trasera de la zona de la muestra. Eso favorece a la refracción irregular de la radiación proveniente del LED dentro de la celda de flujo, adicionando ruido al detector. Por lo tanto, se escogió un caudal bajo de inferior a 0,5 mL/min, ya que se mantiene una condición de flujo laminar. Seleccionando un tubo de bomba de 1,29 mm de diámetro interno y una velocidad de la bomba de 3 rpm se logra un caudal de aproximadamente 0,4 mL/min, el cual es óptimo para el desarrollo del experimento.

En cuanto al tamaño de la muestra, se puede decir que a mayor volumen inyectado los picos de las señales serán mayores, llegando a su máximo valor cuando la muestra ocupa todo el volumen de la zona entre el LED y el fototransistor. El volumen contenido en la zona del camino óptico (co) es de:

$$Vol = \pi * a_{co}^2 * l_{co} = 15 \text{ mm}^3 = 15 \mu L \quad (4.4.1)$$

Este volumen se logra con un tiempo de activación de la válvula durante 3 s. Para tener una referencia estable, el circuito del fotómetro se alimentó a una tensión de 5 V mediante un regulador LM7805. Para una corriente de 10 mA en el LED se calculó la resistencia:

$$R_d = \frac{V_{cc} - V_d}{I_d} = 100\Omega \quad (4.4.2)$$

Esta corriente de polarización del LED asegura que no se produzca un embalaje térmico,

y por ende, un desplazamiento en la línea de base del registro. Debido a la baja concentración de analito en la muestra, las variaciones en la señal producida en el fototransistor eran muy débiles, por lo que se escogió una ganancia de 200 V/V ajustando el valor de Rv.

4.4.2. Curva de calibrado

Para la calibración se prepararon 8 soluciones testigo con concentraciones por debajo y por encima del valor establecido por la norma ASTM, realizando diluciones de una solución patrón. La solución patrón fue de 330 ppm. Para la determinación de glicerol se midió la altura del pico de la señal analítica (efecto Schlieren) para cada medición. Los resultados de la calibración se muestran en la Figura 26:

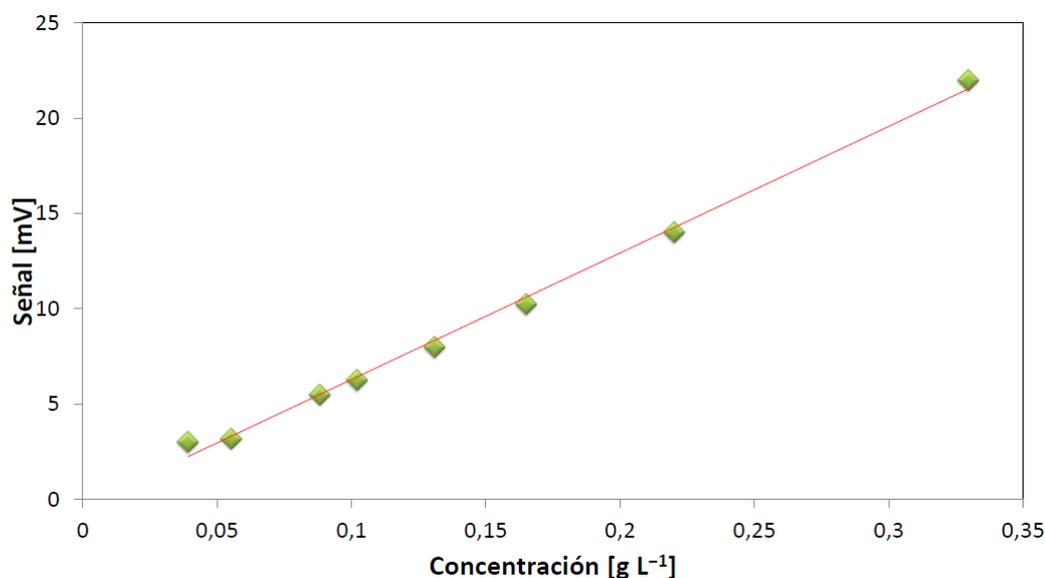


Figura 26: Curva de calibrado del sistema FIA.

El sistema presenta las siguientes características: intervalo lineal 39 – 330 mgL^{-1} de glicerol libre equivalente a 200 – 1692 $mgKg^{-1}$ en biodiésel con un límite de detección 0,20 mgL^{-1} (80 $mgKg^{-1}$) de glicerol libre. Basado en los valores de las mediciones, se realizó una regresión de mínimos cuadrados para determinar la función de predicción de la concentración de glicerol en las muestras de biodiésel. La ecuación de la recta es la siguiente:

$$y = 66,416 * x - 0,3589 \quad (4.4.3)$$

Donde y es la diferencia entre el valor máximo de la señal y la línea de base en [mV], y x es la concentración de glicerol en biodiésel en [gL⁻¹]. El coeficiente de la regresión fue $R^2 = 0,996$.

4.4.3. Validación del método

Las muestras comerciales seleccionadas fueron analizadas por el método propuesto y por el método de referencia (ASTM D6584-07). Aplicando el método propuesto a las muestras se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4:

Tabla 4: Análisis de muestras comerciales de biodiésel (B100)

Muestra	Señal obtenida [mV]	Predicción [gL ⁻¹]	Referencia [gL ⁻¹]	Error [%]
M11	25,25	0,3856	0,3895	-1,00
M12	26,00	0,3969	0,3895	+1,90
M13	28,50	0,4345	0,4285	+1,40
M21	15,30	0,2358	0,2372	-0,59
M22	14,33	0,2212	0,2215	-0,14
M23	15,00	0,2313	0,2358	-1,91
M41	7,25	0,1146	0,1140	+0,53
M42	6,66	0,1057	0,1045	+1,15
M43	7,00	0,1108	0,1094	+1,28

Capítulo 5

Determinación de glicerol libre en biodiésel: Detector piezoeléctrico

5.1. Motivación

El trabajo realizado por Diniz et al. en [37] utiliza la solución acuosa proveniente de la etapa de extracción como medio para generar, mediante un dispositivo piezoeléctrico, una cavitación que produce señales sonoluminiscentes. El éxito de este trabajo guió al grupo de investigación a buscar nuevas aplicaciones en base a dispositivos piezoeléctricos y su utilización como sensor, con el objetivo de reducir el costo de instrumentación utilizada en trabajos previos.

En este trabajo se describe la utilización de un detector compuesto por un piezoeléctrico emisor (PZTE) y un piezoeléctrico receptor (PZTR) para la determinación de glicerol libre en biodiésel, sin necesidad de usar reactivos o tratamiento externo. Mientras PZTE sonica la solución, PZTR traduce la señal acústica recibida en una señal eléctrica, la cual es registrada por un osciloscopio digital. Los modelos de calibración multivariados se construyeron relacionando la concentración de glicerol libre y la señal multivariada registrada en PZTR. Para fines de comparación, se utilizó la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), PLS con

selección de intervalo (iPLS), y PLS junto con el algoritmo de proyecciones sucesivas para la selección de intervalos (iSPA-PLS) [41, 42].

5.1.1. Tecnología piezoeléctrica

El uso de dispositivos piezoeléctricos ha tenido un incremento significativo en los últimos años ya que pueden ser usados tanto como sensor o actuador debido a su capacidad transductora [43, 44, 45]. Como todo transductor, éstos convierten una forma de energía en otra (en este caso, mecánica en eléctrica, y vice versa). Producen un voltaje o carga proporcional a la deformación dinámica aplicada, tanto en amplitud como en frecuencia.

En 1969, Kawai descubrió actividad piezoeléctrica en fluoropolímeros polarizados (fluoruro de polivinilideno o PVDF por sus siglas en inglés) [46]. Desde entonces se han ido desarrollando nuevos co-polímeros de PVDF lo que ha expandido la aplicación de sensores a base de estos materiales. Una de las mayores ventajas de estos piezoeléctricos sobre los cerámicos es su baja impedancia acústica, la cual es cercana a la del agua, tejido humano y otros materiales orgánicos. Esto permite una transducción más eficiente de la señal acústica que atraviesa una solución acuosa. Además, estas láminas piezoeléctricas tienen baja densidad y una excelente sensibilidad, y son mecánicamente resistentes, lo cual permite que puedan unirse directamente a una estructura rígida sin alterar su movimiento mecánico [47, 48].

5.2. Descripción del analizador flow-batch

La figura 27 muestra un diagrama esquemático del analizador flow-batch (FBA) desarrollado para la determinación de glicerol libre en biodiésel.

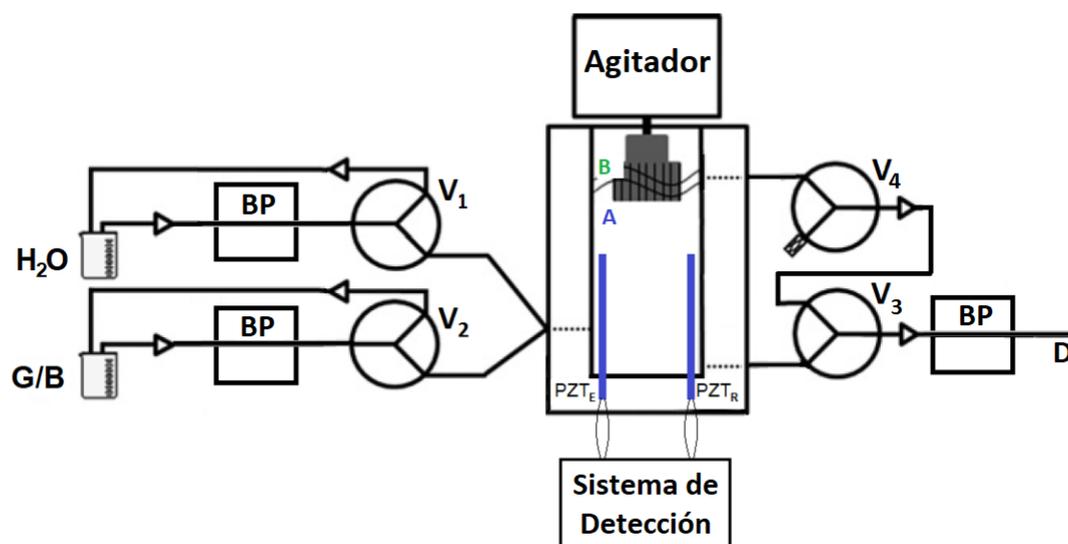


Figura 27: Diagrama esquemático del analizador flow-batch. G/B: solución estándar de glicerol o muestra de biodiésel; Vi: Válvulas solenoide de tres vías (V1: agua, V2: biodiésel, V3: descarte inferior, V4 descarte superior); BP: bomba peristáltica lab-made; B: fase biodiésel; A: fase extractiva (agua); PZTE: piezoeléctrico emisor; PZTR: piezoeléctrico receptor; D: desecho.

El sistema FBA cuenta con los siguientes componentes:

- Controlador flow-batch.
- Válvulas solenoide de tres vías NResearch modelo 161T031.
- Conexiones de teflón de 0,8 mm, y tubos de bomba de Tygon (1,29 y 2,06 mm d.i.).
- Cámara de mezcla y detección.
- Osciloscopio Digital OWON DS7072.

5.2.1. Cámara de mezcla y detector piezoeléctrico

La cámara donde se produce la extracción del glicerol del biodiésel está construida en teflón con un volumen total de 2,5 mL. Sobre la parte superior de la cámara de flow-batch se encuentra un agitador, el cual es accionado por un motor de CC (MDN3 de 12VCC). Esta cámara cuenta con un sistema de detección acústica/ultrasónica basado en láminas piezoeléctricas. Estas láminas flexibles se encuentran colocadas sobre las paredes interiores de la

cámara, y cumplen la función de emisor y receptor de una señal acústica o ultrasónica. Como se ve en la figura 27, las láminas se encuentran enfrentadas una a otra para así capturar en el piezoeléctrico receptor de manera más eficiente la señal producida por el piezoeléctrico emisor. La señal eléctrica generada en el piezoeléctrico receptor es registrada por el osciloscopio digital. Esta señal será posteriormente procesada para obtener la información analítica.

5.3. Experimental

5.3.1. Soluciones y muestras

La solución patrón se preparó disolviendo 83,9 mg de glicerol (99,5 %, Mallinckrodt) en 250 ml de agua. Las muestras de biodiésel se obtuvieron de la refinería Petrobras ubicada en la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Se utilizó exclusivamente agua desionizada-destilada (18 MOhm / cm) a lo largo de todo el estudio.

5.3.2. Procedimiento flow-batch

Al inicio, se llenan los canales con las soluciones desde sus respectivos recipientes hasta la cámara activando en simultaneo las válvulas V1 (agua) y V2 (glicerol/biodiésel) durante 5 s. Luego, se desecha el contenido de la cámara de mezcla activando la válvula V3 (desecho inferior) durante 20 s, y se procede a un ciclo de lavado.

La preparación de las soluciones de calibración ($18 - 93 \text{ mgL}^{-1}$ de glicerol, equivalentes a $72 - 372 \text{ mgkg}^{-1}$ de glicerol libre en biodiésel) se realiza en línea en la cámara FB usando diferentes relaciones volumétricas de glicerol/agua. Esto se logra cambiando el tiempo de activación/desactivación de las válvulas V1 y V2 para insertar diferentes cantidades de solución estándar de glicerol y agua en la cámara FB. Una vez llenada la cámara, el agitador se enciende durante 240 s. Al finalizar este paso, el agitador se detiene y comienza la etapa de detección. Para ello, se aplica una onda cuadrada sobre la lámina piezoeléctrica emisora

*CAPÍTULO 5. DETERMINACIÓN DE GLICEROL LIBRE EN BIODIÉSEL:
DETECTOR PIEZOELÉCTRICO*

(PZTE) durante 5 s, y la señal acústica recibida en la lámina PZTR es traducida a una señal eléctrica y medida con un osciloscopio. Solo el último milisegundo se registra para el análisis. Los datos generados se descargan en archivos con formato de hojas de calculo utilizando el software Oscilloscope PC Suite de Lilliput[®]. Vale la pena destacar que se observa una disminución en la amplitud de la señal con una mayor concentración de glicerol.

A continuación, en la tabla 5, se muestran los pasos a realizar por el sistema para la determinación de glicerol libre en muestras de biodiésel.

Tabla 5: Procedimiento flow-batch

Paso	Evento	Tiempo [s]	Bomba P. [rpm]	Volumen [mL]
1	Agua (V1)	15,2	20	1,600
2	Biodiésel (V2)	30,7	10	0,455
3	Agitación	240	0	0
4	Desecho (V4)	10	20	0
5	Detección	5	0	0
6	Desecho (V3) ^a	20	20	0
7	Agua (V1) ^a	15,2	20	1,600
8	Agitación ^a	30	0	0
9	Desecho (V3) ^a	20	20	0

^aLimpieza.

La extracción de glicerol libre de las muestras de biodiésel se lleva a cabo dentro de cámara FB según lo descrito por Lima et al. [36]. Después de la extracción, la válvula V4 (desecho superior) se activa durante 10 s para eliminar la fase de biodiésel (BP). A partir de entonces, el registro de la señal de la muestra se obtiene de igual manera que la de los testigos.

Se realiza un ciclo de lavado después de cada medición. Para este propósito, se agrega agua en la CM activando válvula V1 durante 15,2 s, y luego, agitando durante 30 s. Al

finalizar, el contenido de la CM se vacía activando la válvula V3 durante 20 s. El proceso de lavado se realiza por triplicado.

5.3.3. Procedimiento quimiométrico

Para este trabajo se escogieron modelos multivariados basados en regresión de cuadrado mínimos parciales (PLS, por sus siglas en inglés de Partial Least Squares). El enfoque en variables latentes hace que estos modelos sean menos sensibles al ruido instrumental. Además, se investigaron los beneficios de descartar variables no informativas mediante los modelos de selección de intervalo: iPLS e iSPA-PLS. Todos los modelos se realizaron en MatLab utilizando las herramientas MCV1 [49] e iPLSToolbox [50].

5.4. Resultados y discusiones

5.4.1. Ajustes de los parámetros del sistema

Al establecer la velocidad de rotación del agitador a 200 rpm (cambiando la magnitud de PWM), el sistema no necesita de un tiempo para la separación de fases, y se evitan también emulsiones, según Lima y colaboradores [36].

Se realizó un barrido de frecuencia en el rango de 200 Hz a 100 KHz, y se observó que la mejor sensibilidad se logró con una onda cuadrada a bajas frecuencias. Sin embargo, la mejor reproducibilidad se logró con una frecuencia de 1 KHz.

El osciloscopio registró 5000 valores de voltaje durante 1 ms de cada señal recibida (todas las mediciones se realizaron con la misma señal emitida). Los datos brutos se suavizaron utilizando un filtro de Savitzky-Golay con una ventana de 33 puntos y un polinomio de segundo orden para eliminar el ruido sistemático. La figura 28 muestra curvas a partir de la señal emitida y la señal recibida preprocesada de diferentes concentraciones de glicerol en solución acuosa (soluciones de calibración).

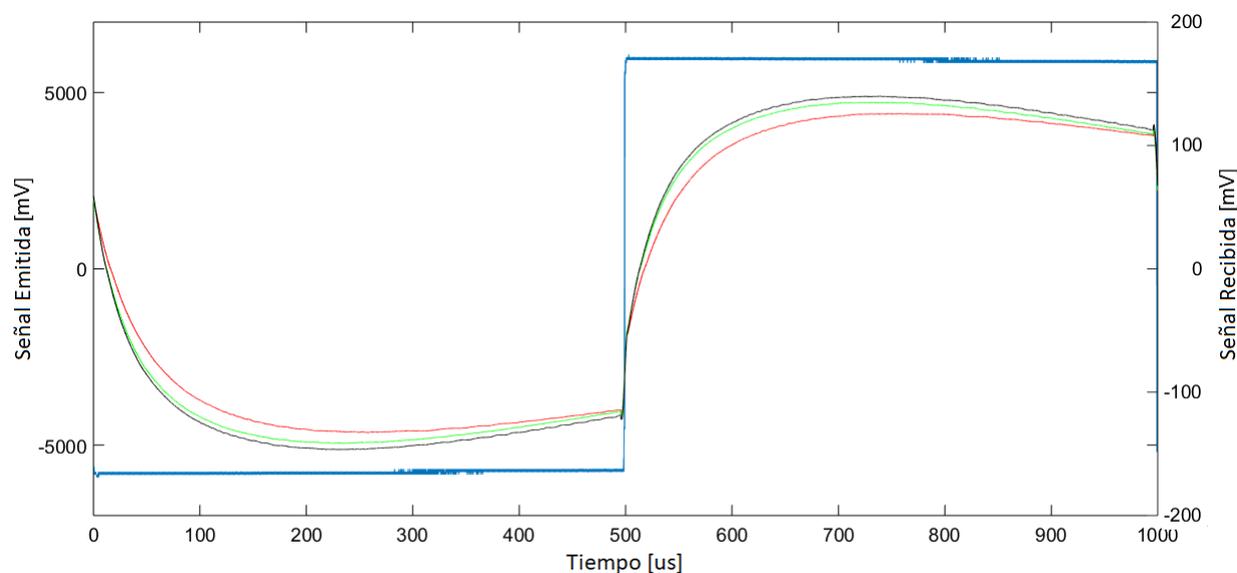


Figura 28: Curvas de la señal emitida (línea azul) y las señales recibidas preprocesadas de $18,736 \text{ mgL}^{-1}$ (línea roja), $84,312 \text{ mgL}^{-1}$ (línea verde) y $93,680 \text{ mgL}^{-1}$ (línea negra) de glicerol en solución acuosa.

5.4.2. Interferencias

Se llevó a cabo un estudio de posibles variaciones de temperatura causadas por los piezoeléctricos en las soluciones y muestras. Como el tiempo de sonicación fue de corta duración (5 s), y la frecuencia y amplitud aplicadas al piezoeléctrico fueron bajas, no se observó una variación de temperatura significativa.

Después de la producción, el biodiésel se lava exhaustivamente con agua para minimizar los residuos no deseados de reactivos y coproductos antes de la comercialización. Sin embargo, el glicerol permanece como la mayor impureza. Después de la extracción, los efectos de otras posibles interferencias como alcoholes (metanol o etanol), monoglicéridos y diglicéridos son insignificantes. La selectividad del método propuesto fue confirmada por CG comparando la forma y el tiempo de retención de las muestras de biodiésel con los cromatogramas de las soluciones estándar, y no se observaron otros picos aparte del glicerol.

5.4.3. Determinación de glicerol libre en muestras reales

Los datos multivariados registrados por el sensor piezoeléctrico se organizaron en dos matrices: X_{cal} (18×2500) y X_{pred} (6×2500), correspondientes a las soluciones estándar de calibración y un conjunto externo de predicción (muestras de biodiésel). Con el propósito de construir modelos PLS, X_{cal} se evaluó mediante validación cruzada dejando uno fuera (cross-validation leave-one-out) para seleccionar el número de factores PLS (variables latentes). Para todos los modelos PLS (Fig 29), el punto mínimo se obtiene utilizando tres variables latentes, y esta información se confirmó mediante la realización de un test F con un nivel de confianza del 75 %, el mismo criterio utilizado por Haaland y Thomas [51].

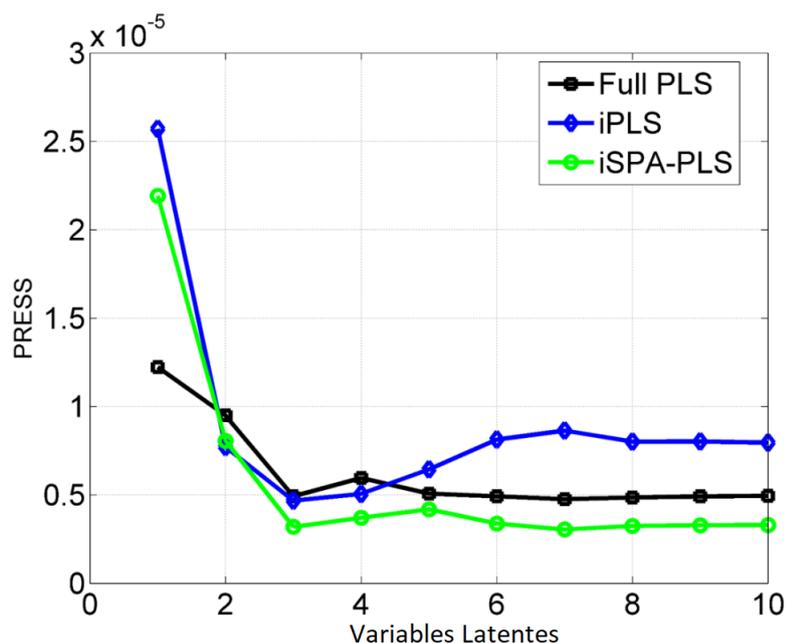


Figura 29: Curvas Press versus variables latentes para modelos PLS construidos con validación cruzada.

Se construyeron utilizando tres factores, los modelos full PLS, iPLS e iSPA-PLS. El rendimiento de estos modelos se demostró en la cuantificación de glicerol libre en seis muestras de biodiésel. El resumen estadístico de ajuste y predicción se muestra en la Tabla 6.

CAPÍTULO 5. DETERMINACIÓN DE GLICEROL LIBRE EN BIODIÉSEL:
DETECTOR PIEZOELÉCTRICO

Tabla 6: Resumen estadístico de aptitud y predicción para todos los modelos PLS

Modelo *	PLS	iPLS	iSPA-PLS
RMSEC (mg/Kg)	0,419	0,354	0,346
RPD	6,150	7,270	7,440
R^2	0,978	0,959	0,985
Valor de referencia	Valor predicho		
5,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1	5,8 ± 0,1	5,9 ± 0,1
6,1 ± 0,1	6,5 ± 0,2	5,3 ± 0,4	5,8 ± 0,2
7,5 ± 0,2	7,9 ± 0,2	7,1 ± 0,3	7,4 ± 0,2
4,8 ± 0,1	5,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2	5,0 ± 0,1
7,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,9 ± 0,1
11,8 ± 0,2	12,4 ± 0,4	12,5 ± 0,3	11,9 ± 0,4
8,5 ± 0,2	9,2 ± 0,3	7,9 ± 0,4	8,4 ± 0,3
REMSP(mg/Kg)	0,498	0,522	0,210
REP(%)	6,57	7,01	2,82
RPD	4,58	4,37	10,87
R^2	0,946	0,981	0,991
LD (min/max) [mg/Kg]	0,64/0,95	0,59/0,89	0,54/0,79
LC (min/max) [mg/Kg]	1,94/2,84	1,77/2,67	1,62/2,38

*Todos los modelos PLS fueron construidos usando 3 variables latentes.

RMSEC: Error de Calibración de la Media Cuadrática.

RMSEP: Error de Predicción de la Media Cuadrática (Root Mean Square Error Prediction).

REP: Error Relativo de Predicción (Relative Error Prediction).

LD: Límite de Detección, y LC: Límite de Cuantificación.

RPD = SD/RMSE: Tasa de Performance (Ratio of Performance to Deviation); SD = Desviación estándar de la muestra.

Como puede observarse en la tabla 6, se obtuvieron valores bajos de error de calibración (RMSEC) para todos los modelos, y valores altos de R^2 . Además, el valor RPD refuerza la idea de modelos bien ajustados.

En la predicción de un conjunto de prueba independiente, la mejor precisión se logró cuando el modelo PLS se utilizó en conjunto con SPA para la selección de intervalos (iSPA-

PLS). La predicción del error relativo (REP) obtenida por el modelo iSPA-PLS fue un 57,1 % menor en comparación con el modelo PLS completo. Por otro lado, el modelo iPLS presentó una precisión ligeramente menor que el modelo PLS completo. Como se discutió en otros trabajos [52, 53], un valor de RPD mayor o igual a 5 se puede usar para control de calidad.

Para justificar el rendimiento obtenido por iSPA PLS, se examinó el intervalo seleccionado (ver Fig. 30) para cada modelo (iPLS e iSPA PLS) teniendo en cuenta el modelo PLS completo.

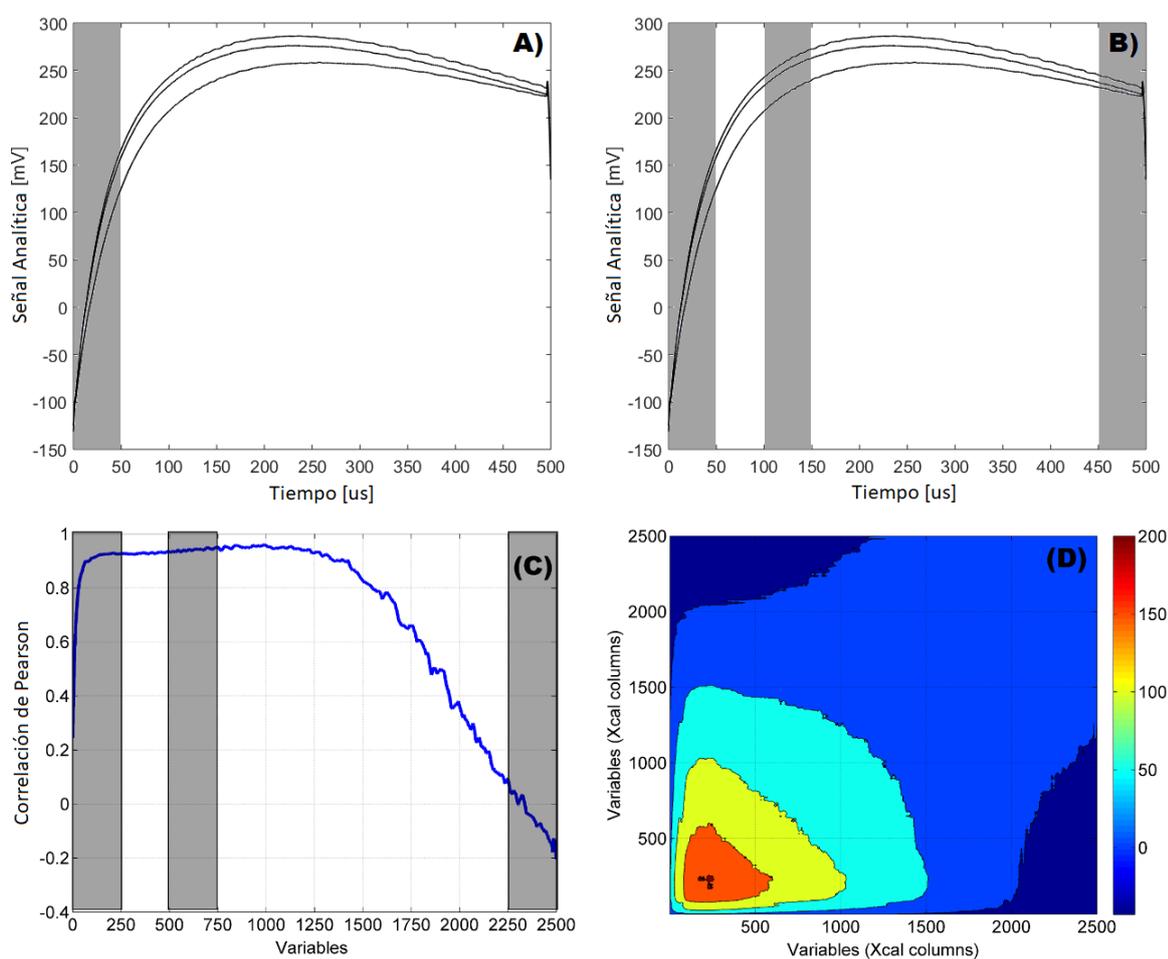


Figura 30: Intervalos seleccionados por modelos iPLS (A) e iSPA-PLS (B). Coeficiente de correlación de Pearson de cada variable con respecto al contenido de glicerol libre para el conjunto de calibración (C). Superficie de contorno para la covarianza de los datos de calibración (D).

Se puede observar que el modelo iPLS selecciona solo el primer intervalo en el que la intensidad de la señal analítica es más pronunciada (véase la Fig. 30A). Sin embargo, el

modelo PLS basado solo en este intervalo condujo a resultados con menor precisión en comparación con el modelo PLS completo. Por otro lado, iSPA-PLS selecciona tres intervalos (primero, tercero y décimo, ver Fig. 30B).

En la Fig. 30C se muestra el coeficiente de correlación de Pearson de cada variable con respecto al contenido de glicerol libre para el conjunto de calibración. Como se puede ver, una parte de las variables seleccionadas por el iPLS tiene una baja correlación con el contenido de glicerol libre. Además, la correlación de las variables entre sí es pronunciada, es decir, una gran cantidad de información redundante (ver la figura 30d) que presenta una superficie de contorno para la covarianza de los datos de calibración, obtenida como $X^T X$. Los elementos diagonales de $X^T X$ corresponden a la varianza de cada vector de columna en X , y los valores fuera de la diagonal son la covarianza de una variable en relación con la otra. Los valores de alta covarianza implican información redundante para el modelo, lo que puede afectar la calidad del modelo en mayor o menor medida.

A diferencia del modelo iPLS, iSPA-PLS selecciona el primer intervalo, pero también selecciona el tercero (alta correlación, ver Fig. 30c) y el décimo (región con menos variables redundantes, ver Fig. 30d). Por lo tanto, se cree que las mejoras en los ajustes del modelo PLS están asociadas a la eliminación de variables redundantes y no informativas.

El rendimiento de los modelos PLS puede examinarse utilizando curvas mostradas en la Fig. 31. En la Fig. 31a, el contenido de glicerol libre previsto se muestra como una función de los valores obtenidos por el método de referencia (representado como contenido de glicerol libre real). Tenga en cuenta que los valores predichos por iSPA-PLS se ajustan mejor a la línea ideal (línea gris) de acuerdo con el bajo valor de REP encontrado. No menos importante, la ausencia de sesgo significativo (con un nivel de confianza del 95 %) en el modelo iSPA-PLS se puede contemplar en la figura 31b. Tenga en cuenta que las regiones de confianza de unión elíptica (EJCR) para el modelo iSPA-PLS contienen el punto ideal para la pendiente (1) y la intersección (0).

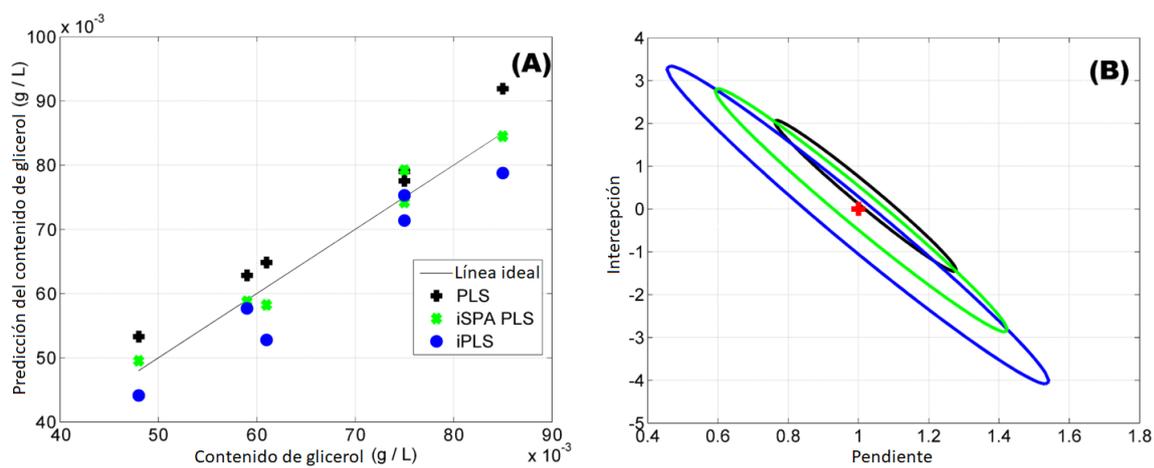


Figura 31: Predicción versus Referencia (A), y regiones de confianza de la unión elíptica (B) para los modelos PLS.

Capítulo 6

Conclusiones de la parte III

Los métodos desarrollado en este trabajo fueron validados contrastando los resultados obtenidos con el método de referencia de la cromatografía de gases (ASTM D6584-07).

Los sistemas desarrollados tienen las siguientes características:

1. Sistema automático simple, requiriendo una mínima participación humana.
2. Rápido, permitiendo el análisis de un gran número de muestras.
3. Bajo consumo de muestra.
4. Buena precisión en el análisis a un bajo costo.
5. Evitar el uso de reactivos y la generación de residuos, cumpliendo con uno de los principales requisitos de la Química Verde.

En la siguiente tabla se comparan las características analíticas del sistema propuesto con otros procedimientos descritos en la bibliografía.

Tabla 7: Comparación de métodos de determinación de glicerol

	FBF [36]	FBS [37]	Sistema I	Sistema II
Límite de Detección [mgKg ⁻¹]	0,144	$4,0 \times 10^{-6}$	80,0	0,54
Frecuencia de muestreo [h ⁻¹]	14	14	14	8
Reactivos	Agua, ácido acético, acetato de amonio, periodato de potasio, acetilacetona, isoctano	Agua	Agua	Agua
Muestra [mg]	15,4	15,4	15,4	400
Instrumento	Espectrofluorimetro	Luminometro “lab-made”	fotómetro “lab-made”	Sensor piezoeléctrico

Los métodos propuestos no emplean reactivos químicos en ninguna de las fases de análisis, y sólo se utiliza agua como solvente para la extracción en línea del glicerol del biodiésel. La misma solución es usada también para la detección, donde se desarrollaron instrumentos de bajo costo, en comparación con los otros trabajos.

El primer sistema presenta una opción más económica de implementación y resultados muy buenos que podrían considerarse para un método de screening. A pesar de que el rango dinámico es acotado, el instrumento puede detectar con precisión concentraciones de glicerol por debajo y por encima de lo establecido por la norma ASTM. La sencillez del método y la utilización de componentes de bajo costo, hacen que el equipo tenga una proyección industrial y sea capaz de instalarse en el proceso de producción sin necesidad de realizar grandes cambios. Sin embargo, la detección en FIA puede presentar algunos problemas asociados a

la generación de burbujas en la celda de flujo, afectado a veces a las medidas realizadas.

El segundo sistema tuvo como propósito reducir el costo y la complejidad de instrumentación utilizada en el trabajo de sono-quimioluminiscencia, y obtener una mejor sensibilidad que en el caso del primer sistema desarrollado. Está implementado completamente bajo la metodología flow-batch, y utiliza una sola cámara donde se realiza la extracción y la detección. En base al análisis sobre los resultados obtenidos se pudo observar que ambos objetivos fueron cumplidos, gracias en gran parte al aporte de la quimiometría. El equipo se ve encarecido por el uso de un osciloscopio digital, aunque para un trabajo futuro se puede pensar en sustituir este instrumento por un microcontrolador con un conversor AD de alta velocidad y aceptable resolución, que además debe ser capaz de procesar el algoritmo quimiométrico para la estimación del glicerol presente en el biodiésel.

Parte IV

Alimentos

Resumen

Esta parte está orientada al desarrollo de nuevos métodos analíticos, aplicados a productos apícolas de la región de Bahía Blanca y su zona de influencia. Estos métodos deben evaluar la calidad comercial y diferenciada de estos productos con el objeto de asegurar su inocuidad, y que sean aptos para el consumo humano. El aporte en esta parte se basa en el desarrollo de instrumentación de bajo costo basado en COTS, y la automatización de técnicas electroanalíticas mediante sistemas flow-batch para monitorear la presencia de metales tóxicos en propóleos.

Capítulo 7

Determinación de plomo en propóleos: Detector electro-químico

7.1. Motivación

Las actividades antropogénicas, como la industrial y la urbana, son las principales responsables de la contaminación en alimentos y en el medio ambiente, convirtiéndose en un tema de gran interés y preocupación social debido a los efectos adversos sobre la salud humana [54].

La abeja y sus productos (miel, propóleos, cera, etc.) son excelentes (bio)indicadores de la contaminación medioambiental [55]. En la literatura hay estudios que indican que la contaminación del medioambiente produce un aumento de residuos sobre el cuerpo de las abejas y de su mortalidad. Esto trae como consecuencia daños en la colmena y la contaminación de sus productos [56]. Entre los productos apícolas se encuentra el propóleos, compuesto de sustancias resinosas elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de ciertas especies vegetales, que son transportadas al interior de la colmena y modificadas parcialmente con sus secreciones salivares [57]. La composición del propóleos es muy compleja y variada en función de la diversidad fitogeográfica de las zonas de recolección y época del año. El propóleos,

según han demostrado varios estudios científicos, posee destacadas propiedades medicinales, entre las que se le reconocen: antibióticas (fungicida y bacteriana), cicatrizantes, antiinflamatorias, analgésicas, antialérgicas, epitelizantes y anestésicas, entre otras [58]. Uno de los principales metales contaminantes del propóleo es el plomo, un metal tóxico que puede provenir de diferentes fuentes antropogénicas y naturales. La OMS ha incluido el plomo dentro de una lista de diez productos químicos causantes de graves problemas de salud pública que exigen la intervención de los Estados Miembros para proteger la salud de los trabajadores, los niños y las mujeres en edad fecunda. El Código Alimentario de Argentina establece que la concentración máxima de plomo en el propóleo bruto debe ser de $2mgKg^{-1}$ [59].

Actualmente, los procedimientos de análisis para determinar la presencia y/o cuantificación de contaminantes en las muestras de alimentos requieren altos tiempos de análisis, analista altamente capacitado, equipos sofisticados y costosos, y a veces, el consumo de reactivos tóxicos y de alto costo. Bezerra dos Santos et al. determinan zinc y plomo usando un electrodo de diamante dopado con boro y una celda de flujo electroquímico [60], y en otro trabajo se determina plomo y cadmio con un analizador electroquímico con transmisión de datos en línea y un sistema de posicionamiento global [61]. Los mismos autores emplearon una celda de flujo electroquímico termostatazada con un electrodo de película de bismuto para determinar cadmio y plomo [62]. Pierini et al. determina metales en muestras de propóleo bruto con un electrodo de película de bismuto y un potencióstato comercial [63, 64].

Los nuevos procesos analíticos requieren el uso de prototipos ligeros y automatizados que implican un desafío para los grupos de investigación multidisciplinarios. La ingeniería de sistemas computacionales juega un papel importante en este proceso. Los sistemas informáticos integrados (ECS) se han convertido en una disciplina de ingeniería importante con principios arraigados en la electrónica, los sistemas operativos en tiempo real y la ingeniería de software. Están presentes en la vida cotidiana, desde plantas industriales hasta electrodomésticos. La mayoría de ellos se implementan con tecnología de sistema en un chip (SoC) que integra interfaces de entrada/salida, memoria y CPU en un solo chip. Por lo general, interactúan

con el entorno midiendo ciertas variables y controlando otras. En la actualidad es frecuente el uso de ECS para instrumentación portátil.

Varios grupos han diseñado y fabricado potenciostatos miniaturizados de un solo chip a partir de silicio que pueden integrarse [65, 66]. La ventaja de este enfoque es que los potenciostatos pueden hacerse muy pequeños, lo que los hace ideales para aplicaciones tales como el monitoreo de neurotransmisores in vivo [67, 68]. Sin embargo, los costos de instalación y fabricación hacen que este enfoque sea demasiado costoso para una producción de pocos dispositivos de análisis.

La elección de componentes bajo el paradigma Commercial-Off-The-Shelf (COTS) ayuda a reducir el tiempo y los costos de diseño, y al mismo tiempo simplifica la implementación. Con este paradigma, muchos investigadores han desarrollado sus propios dispositivos para diversas aplicaciones [69, 70, 71]. Sin embargo, en todos los trabajos antes mencionados siempre está presente el problema de manejar las muestras y las soluciones de forma manual, lo que puede acarrear errores humanos y riesgos para la salud al manipular sustancias tóxicas.

En este trabajo se propuso desarrollar en primer lugar un potenciostato lab-made utilizando plataformas de hardware libre de bajo costo basada en microcontroladores (Arduino UNO) y un diseño personalizado con amplificadores operacionales para lograr la miniaturización de instrumentación a bajo costo. Luego, el prototipo se integró a un sistema flow-batch para evaluar la concentración de plomo en muestras de propóleos empleando un electrodo de film de bismuto y voltametría de redisolución anódica de onda cuadrada (VRAOC) [63].

7.2. Diseño de un potenciostato lab-made

En las técnicas voltamétricas, el potenciostato es responsable de establecer un potencial controlado entre los electrodos de trabajo y de referencia para generar una reacción redox y, por lo tanto, para medir la corriente obtenida. Sobre esta base, se implementó un sistema integrado capaz de establecer un potencial controlado y registrar la corriente generada. Este

potenciostato se conecta a tres electrodos: el electrodo de trabajo (ET), el electrodo de referencia (ER) y el contra electrodo (CE). El primero es la plataforma en la que tiene lugar la reacción electroquímica, el ER, se utiliza como punto de referencia en la celda electroquímica para el control y la medición de potenciales. El CE se encarga de cerrar el lazo actual con el ET.

Para este trabajo, el potenciostato a desarrollar debe ser capaz de implementar las técnicas de barrido lineal, cíclica y voltamperometría de onda cuadrada. Asimismo, debe permitir aplicar un potencial constante durante un tiempo preestablecido. El intervalo de potenciales del potenciostato es de -2,0 a 2,0 V. La mínima corriente a ser medida por el potenciostato debe ser de 1 μ A. Con estos requerimientos se llegó al circuito esquemático del potenciostato mostrado en la figura 32.

7.2.1. Diseño del hardware

La Figura 32 muestra el circuito esquemático con la topología elegida para el potenciostato.

Para evitar variaciones en el potencial del electrodo de referencia por el flujo de corriente, éste se conecta al terminal no inversor de un amplificador operacional (Op-Amp) con una alta impedancia de entrada. Para el dispositivo denotado U2 en la figura, se eligió el amplificador operacional LMP7721 que tiene una impedancia de entrada muy alta. Estas características aseguran un buen rendimiento para la aplicación propuesta.

En esta topología, el ET se fijó a un voltaje constante por el potencial aplicado al terminal positivo del amplificador operacional denominado U3. Como el sistema tiene una única fuente de voltaje de 5 V, se decidió establecer el potencial de ET en 2,048 V a través del circuito integrado de referencia de voltaje REF5020. Por lo tanto, la diferencia de potencial de voltaje entre el ET y el ER se considera negativa o positiva dependiendo de si el potencial de ER es superior a 2,048 V o no, respectivamente.

En la etapa de amplificación (amplificador operacional U1), la diferencia de potencial

es un amplificador de transimpedancia con una ganancia variable de hasta 100.000 V/A; y en la segunda un amplificador de voltaje con una ganancia variable de hasta 100 V/V. En ambas etapas, las resistencias de realimentación, RWA y RWB, se implementaron con un potenciómetro digital dual TPL0102 conectado al bus I2C del microcontrolador. Para el amplificador de transimpedancia, se eligió un op-amp LMP7721 debido a su muy alta impedancia de entrada. El amplificador de voltaje se implementó con un amplificador operacional OPA320. La salida de la etapa amplificadora está conectada a un conversor analógico a digital (ADC) ADS1014 con 12 bits de precisión, interfaz de comunicación I2C y referencia externa. La Figura 33 muestra la placa de circuito desarrollada.

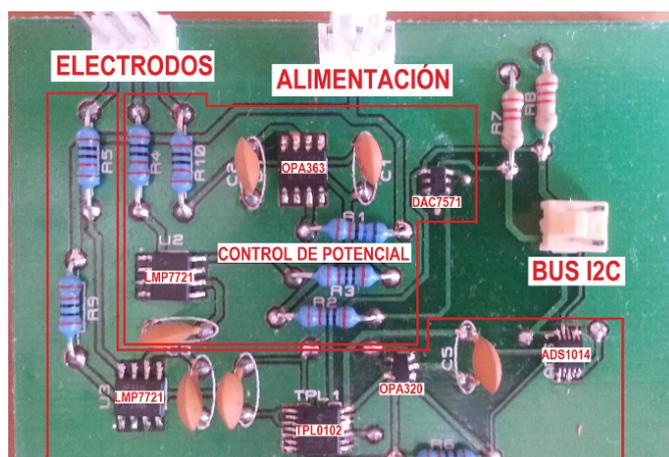


Figura 33: Placa del potenciómetro lab-made.

Ambos conversores y el potenciómetro digital descrito anteriormente deben ser controlados por un microcontrolador. Los registros de medidas se guardan en una memoria SD o se transmiten a una computadora para su posterior procesamiento y análisis. La selección del hardware del microcontrolador se realizó siguiendo los principios del paradigma COTS. Se usó un módulo de memoria TF microSD con interfaz SPI para almacenar los datos. Este módulo tiene un circuito de conversión de nivel que puede interconectar los puertos de entrada/salida TTL 5 V de la placa Arduino con el TTL 3.3 V de la tarjeta de memoria.

7.2.2. Firmware del potenciostato

El software del sistema embebido generalmente se denomina firmware ya que incluye tanto la aplicación como los controladores de los diferentes dispositivos de entrada/salida. En el caso de la plataforma Arduino, existe un entorno de desarrollo integrado abierto que simplifica el desarrollo del firmware. El firmware del potenciostato debe ser capaz de implementar las técnicas electroanalíticas requeridas para la etapa de determinación. El software tiene seis bloques principales que se enumeran a continuación:

1. Administrar el puerto serie para el intercambio de paquetes con otros dispositivos.
2. Ajustar la ganancia de la etapa de medición actual.
3. Cargar la función que se realizará (Pretratamiento, barrido lineal, onda cuadrada).
4. Cargar los parámetros de la función seleccionada.
5. Ejecutar el proceso, que se detiene automáticamente al final de la tarea programada.
6. Grabar los datos en la tarjeta de memoria SD.

El sistema está configurado para muestrear la corriente cada 10 ms en el caso del pretratamiento o dos veces por período en el caso de la onda cuadrada en la que el usuario preconfigura la frecuencia. Siguiendo las pautas definidas en el punto anterior, el código de firmware se escribió usando el siguiente esquema:

Inicialización

En esta parte, los parámetros de comunicación de UART, SPI, I2C deben ser configurados. Las variables que luego utilizará el sistema se inicializan y se establece una diferencia de potencial de 0 V entre el CE y ET.

Función principal

En esta parte, se realizan las tareas periódicas de controlar, medir y guardar los datos. Una vez seleccionada la función para realizar y los parámetros, comienza a ejecutarse y solo se detiene cuando el proceso se completa.

Comunicación

Para controlar el potencióstato, se desarrolló un protocolo de comunicación para interactuar con él desde otros dispositivos. La comunicación se realiza a través del puerto serie y se lleva a cabo intercambiando paquetes de información. El dispositivo que interactúa con el potencióstato envía un carácter especial (comando), que es interpretado por el MCU de Arduino, y luego envía los valores de las variables involucradas en el proceso seleccionado (parámetros). La Tabla 8 muestra los comandos disponibles y la información detallada de cada uno.

Tabla 8: Set de comandos con información detallada

Comando:	g
Función:	Establece la ganancia de la etapa amplificadora de corriente
Parámetros:	<i>Gain</i> : desde 10 a 100000000
Comando:	\$
Función:	Setea la función de barrido lineal
Parámetros:	$E_i, E_f, \Delta E$:
Comando:	%
Función:	Setea la función de onda cuadrada
Parámetros:	$E_i, E_f, \Delta E_s, f, \Delta E_{sw}$:
Comando:	#
Función:	Setea la función de pre-tratamiento
Parámetros:	E, t :
Comando:	&
Función:	Habilita el modo cíclico
Parámetros:	<i>none</i>

7.2.3. Comparación con un potencióstato comercial

Para estudiar el rendimiento del prototipo, se analizó la respuesta de $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ de hexacianoferrato de potasio (II) trihidrato (Sigma-Aldrich) en cloruro de potasio $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ (Merck) como electrolito de soporte, usando la técnica de voltametría de barrido lineal (LSV).

La respuesta electroquímica de este prototipo se comparó con un potenciostato comercial (BASi-Bioanalytical System, EE. UU.). En ambos casos, se empleó una configuración de tres electrodos con: un electrodo de trabajo de carbono vítreo, un electrodo de referencia Ag/AgCl (NaCl 3 M), y un cable de platino como contraelectrodo. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno.

La respuesta electroquímica se llevó a cabo de 0 a 800 mV a diferentes velocidades de barrido de 10 a 100 mVs^{-1} . La Figura 34 muestra los voltamogramas obtenidos por el prototipo y el potenciostato comercial. Se puede observar que muestran un comportamiento similar, en términos de forma, pico de corriente y potencial.

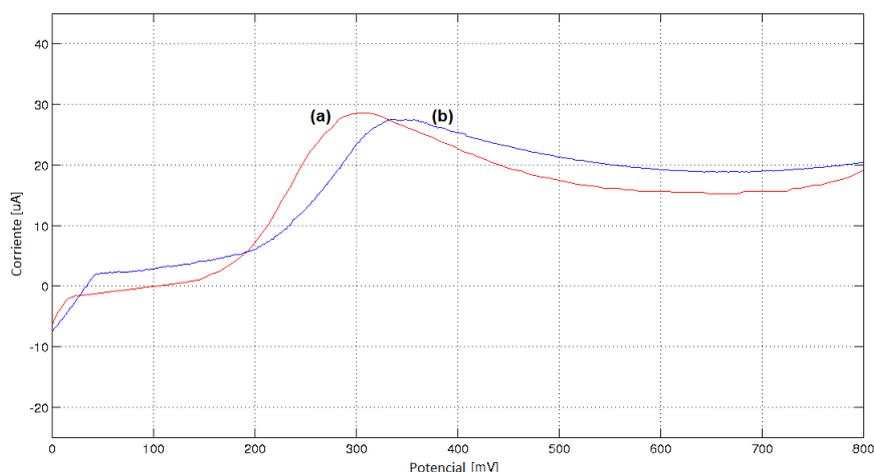


Figura 34: La comparación entre el sistema BASi-Bioanalytical (a) y el potenciostato propuesto (b) LSV se llevó a cabo en una solución de ferrocianuro de potasio 2,5 mM en cloruro de potasio 0,1 M. El LSV se llevó a cabo con los siguientes parámetros: $E_i = 0 \text{ V}$, $E_f = 0,8 \text{ V}$, scanRate = 100 mVs^{-1} .

7.3. Descripción del sistema flow-batch

En esta sección, discutimos el diseño y la implementación del hardware del sistema de control y medición. La Figura 35 muestra el sistema propuesto y sus diferentes partes.

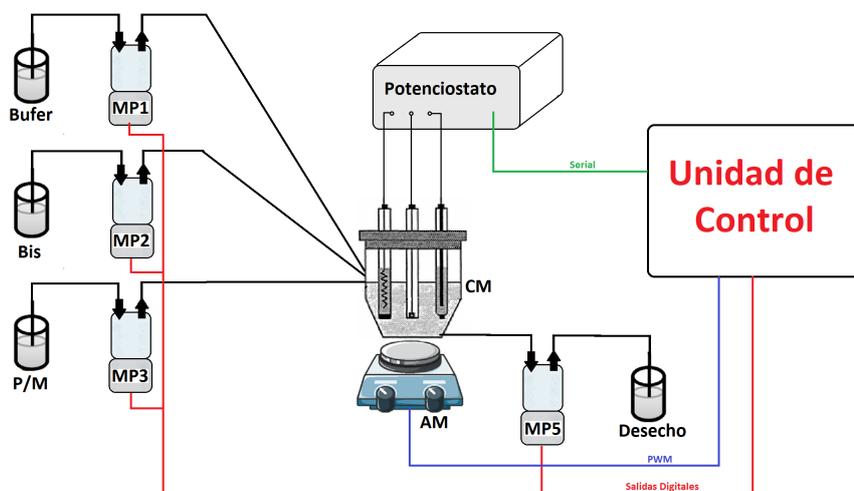


Figura 35: Sistema embebido flow-batch con detección electroquímica. MP: bomba de diafragma; CM: celda electroquímica; AM: agitador magnético; Bufer: solución Bufer de 0,1 M de acetato de sodio; Bis: solución de bismuto; P/M: solución estándar de plomo o muestra.

Los componentes necesarios para la implementación del sistema son:

- Potenciostato lab-made.
- Celda electroquímica.
- Sistema de distribución.
- Unidad de control.

7.3.1. Celda electroquímica

La reacción electroquímica tiene lugar en una cámara de vidrio (CM). Esta cámara ofrece las siguientes características: volumen interno de 20 mL, cuatro orificios que permiten la admisión de los diferentes fluidos y, en la parte inferior, un orificio para eliminar el desecho. Además, contiene una tapa de teflón (PTFE) con tres orificios para conectar los electrodos. Un agitador magnético (AM) se coloca en la parte inferior de la CM para homogeneizar las soluciones.

7.3.2. Sistema de distribución

El sistema de distribución está conformado por bombas dosificadoras de diafragma MLP-200 con un desplazamiento de $200 \mu L$ por ciclo. Para el transporte de fluidos entre las partes del sistema, se utilizan tubos flexibles de 2,06 mm de diámetro. Una bomba colocada en la salida descarga los fluidos no utilizados, para limpiar y descargar la CM.

7.3.3. Unidad de control

Al igual que en el caso del potencióstato, la automatización del sistema se realizó con un MCU ATmega328 (plataforma de hardware abierto Arduino UNO). Se diseñó un shield con los componentes electrónicos necesarios para poder controlar a través de los puertos digitales los diversos componentes del sistema flow-batch. La figura 36 muestra la placa desarrollada en formato de Shield de Arduino.

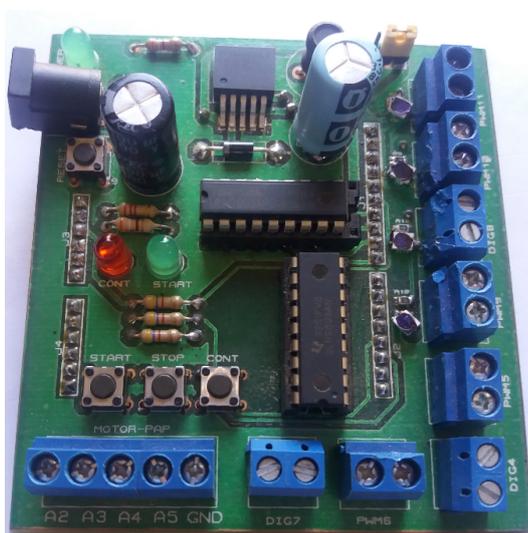


Figura 36: Shield de Arduino para controlar los componentes del sistema flow-batch.

El shield cuenta con una fuente DC-DC implementada con el circuito integrado LM2596 para regular el voltaje a 5V. El controlador para las bombas de diafragma se implementó con el circuito integrado ULN2803. La unidad UART del microcontrolador se usó para enviar los comandos al MCU del potencióstato, y para descargar los datos almacenados en la tarjeta

de memoria SD para su posterior procesamiento.

7.4. Experimental

7.4.1. Soluciones y muestras

Para los experimentos se utilizó agua ultra pura ($> 18\text{ m}\Omega$), y reactivos de calidad analítica.

1. Electrolito soporte: empleado para eliminar la corriente de migración fue una solución reguladora de acetato de sodio-ácido acético 0,1 M (pH 4,50). Esta solución se preparó empleando acetato de sodio trihidratado y ácido acético (Cicarelli).
2. Solución patrón de bismuto: se preparó a partir de su sal, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99,999 % Sigma-Aldrich). Para evitar que el bismuto se hidrolice, la solución patrón se acidificó con 5 mL de ácido nítrico (20 % v/v).
3. Solución patrón de plomo de $0,504\text{mgPb}/100\text{mL}$: se preparó a partir de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Merck) acidificada con ácido nítrico.

Las muestras de propóleos en bruto se obtuvieron de diferentes apiarios en la provincia de Buenos Aires (Tornquist, Bahía Blanca e Hilario Ascasubi). Estas muestras se acondicionaron y se realizó un tratamiento de mineralización: las muestras de propóleo bruto se pesaron y se calcinaron en horno a $400\text{ }^\circ\text{C}$ a cenizas blancas, se retomaron con una solución de ácido nítrico al 20 % (v / v), se filtraron y completaron hasta 25,0 ml con agua [63].

7.4.2. Procedimiento flow-batch

Se utilizó una configuración de tres electrodos: un film de bismuto preparado “in situ” en un electrodo de carbono vítreo [63], Ag/AgCl (NaCl 3 M) y un espiral de platino como

electrodos de trabajo, referencia y contraelectrodo, respectivamente. La superficie del electrodo de carbono vítreo se pulió manualmente con diferentes tamaños de partícula ($0,3 \mu m$ y $0,05 \mu m$) de alúminas y se sonicó en agua durante 30 s. Este procedimiento se realizó antes de comenzar a trabajar y no es necesario repetirlo.

La Tabla 9 muestra los parámetros flow-batch (tiempo y configuración de la bomba) seleccionados para la determinación del plomo en las muestras de propóleos.

Tabla 9: Procedimiento flow-batch

Paso	Evento	Tiempo	rpm	Volumen
		[s]	$[\mu L]@1Hz$	[mL]
1	Bufer (MP1)	75	200	15
2	Bismuto (MP2)	25	200	5
3	Muestra (MP3)	5	20	0,1
4	Electrodeposición	120	0	0
5	Espera	10	0	0
6	Detección (VOC)	32	0	0
7	Limpieza	30	0	0

Las medidas de Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada (VRAOC), se llevaron a cabo depositando el film de bismuto sobre el electrodo de trabajo aplicando un potencial de deposición de $-1,4$ V durante 120 s, bajo condiciones de convección forzada (agitación). Luego de este tiempo la agitación se detiene, se esperan 10 s para realizar el paso determinativo. Las medidas de Voltamperometría de la Onda Cuadrada (VOC) se llevaron a cabo en el intervalo de potenciales entre $-1,4$ V hasta $0,2$ V, salto de potencial (ΔE_s) 2 mV, frecuencia (f) 25 Hz y amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{sw}) 50 mV. Luego de transcurrida la medida, se realiza un paso de limpieza para asegurar que no quede depositado bismuto o el analito. Para ello, se aplica un potencial de $0,2$ V durante 30 s en condiciones de agitación mecánica. Todas las medidas se realizaron en presencia de oxígeno.

7.5. Resultados y discusiones

7.5.1. Interferentes

El propóleo en bruto contiene en su composición zinc y cobre que pueden interferir en la determinación del plomo. En [63] los autores demostraron que la concentración de zinc no influye en la determinación cuantitativa del plomo. Para enmascarar completamente el cobre en estas muestras, usaron pequeñas cantidades de solución de hexacianoferrato (II) (1 mmolL^{-1}).

7.5.2. Parámetros analíticos

Para determinar el plomo en las muestras de propóleos, las mediciones de VRAOC se llevaron a cabo con una solución búfer de acetato de sodio-ácido acético con un pH de 4,50 que contenía 1000 gL^{-1} de bismuto. El rango de concentraciones de plomo estaba entre 30 y $150 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$. La Figura 37 muestra los voltamogramas obtenidos y se observaron picos muy bien definidos a un potencial de -450 mV .

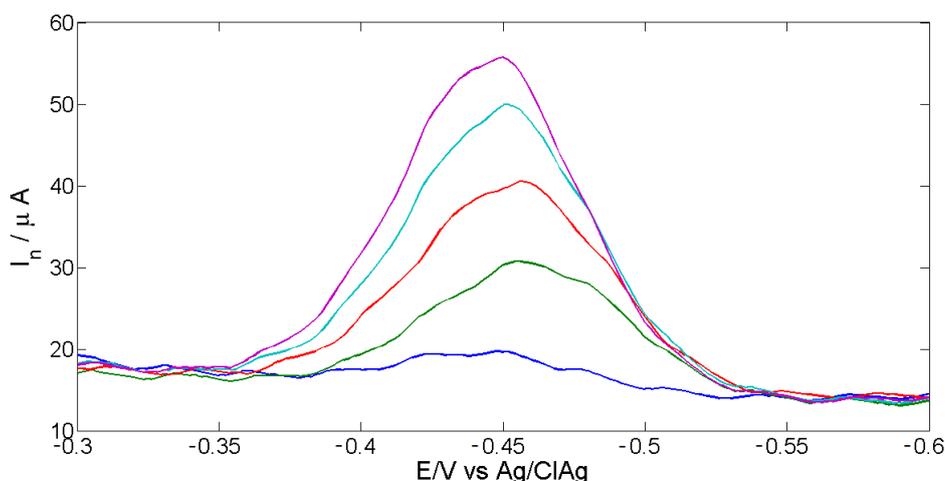


Figura 37: Mediciones de VRAOC para diferentes concentraciones de plomo. Electrodo de carbono vitrio, Ag / AgCl (NaCl 3M) y una lámina de platino se usaron como trabajo, referencia y contador, respectivamente. El potenciostato se configuró con los siguientes parámetros: $E_i = -1,4 \text{ V}$, $E_f = 0,2 \text{ V}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_{sw} = 50 \text{ mV}$.

La Figura 38 muestra la curva de calibración. Considerando que el contenido de plomo es diferente en las muestras analizadas, se seleccionaron dos volúmenes de solución calcinada.

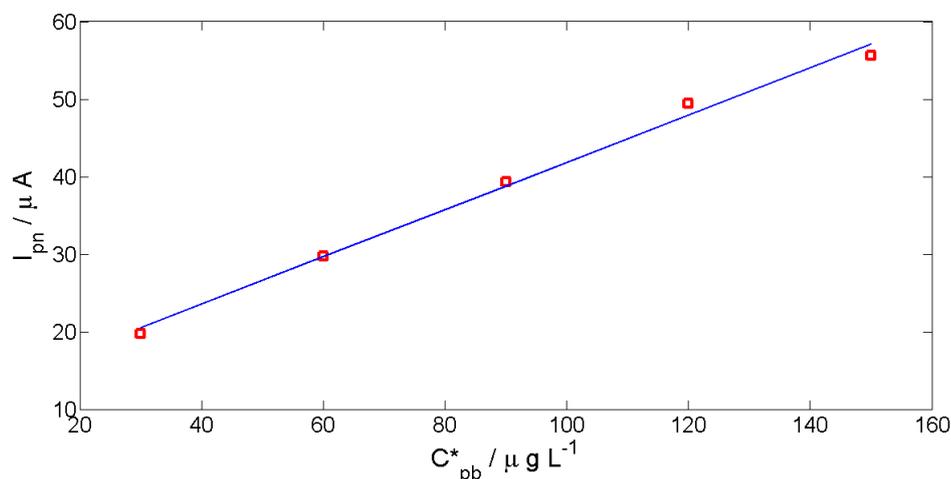


Figura 38: Curva de calibración para la concentración de plomo en el rango de 30 a 150 $\mu g L^{-1}$.

En el caso de las muestras de Tornquist y Bahía Blanca, el volumen fue de 0,100 mL proporcionando un rango de concentración de 7,50 – 37,50 $mg Kg^{-1}$ de Pb en propóleos bruto y un límite de detección (LD) de 3,33 $mg Kg^{-1}$. Además, se analizaron 0,400 mL para la muestra de Hilario Ascasubi y el rango lineal fue de 1,88 – 9,38 $mg Kg^{-1}$ de Pb en propóleos puros con un LD de 0,83 $mg Kg^{-1}$. El límite de detección se calculó en ambos casos, como 3 veces Sy/x /pendiente [72]. La repetibilidad y la reproducibilidad se calcularon como el porcentaje de la desviación estándar relativa de diez mediciones utilizando una solución estándar de 50 $g L^{-1}$. Los valores obtenidos fueron 6,38 % y 7,45 % respectivamente.

7.5.3. Análisis de muestras reales

El contenido de plomo en las muestras analizadas se muestra en la Tabla 10. Se puede observar que el contenido de plomo en las muestras analizadas fue superior al máximo establecido por el Código Alimentario Argentino en el propóleos bruto (2 $mg Kg^{-1}$). Este hecho puede deberse a que las muestras fueron recolectadas en apiarios ubicados en zonas de tránsito industrial y vehicular: Bahía Blanca (zona industrial), Tornquist (cerca de la ruta

nacional 33, RN33) e Hilario Ascasubi (cerca de la ruta 3 (RN3)).

Para validar el método, las concentraciones de plomo obtenidas con el método propuesto se compararon con las obtenidas por espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES, Shimadzu 9000). Los resultados detallados en la Tabla 10 muestran un buen acuerdo entre ambas técnicas. Además, la aplicación de una prueba *t* de Student confirmó que no hay diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos ($t_{estimated} = -0,49$, $t_{tabulated} = 4,30$, $n = 3$ y $\alpha = 0,05$).

Tabla 10: Resultados de la determinación de plomo en muestras de propóleos bruto con el método propuesto y la técnica ICP-AES

Muestra	$Pb[mgKg^{-1}]$		Error
	Método propuesto	ICP-EAS	
Tornquist	$11,00 \pm 0,08$	$9,94 \pm 0,03$	+10,6
Bahía Blanca	$7,15 \pm 0,10$	$7,69 \pm 0,02$	-7,0
H. Ascasubi	$3,18 \pm 0,05$	$2,94 \pm 0,01$	+8,1

7.6. Conclusiones

Se diseñó un prototipo portable lab-made que consiste en un potencióstato con un sistema automatizado utilizando el paradigma de COTS. Este enfoque facilita una implementación rápida con componentes ya probados que están disponibles en el mercado con una mínima personalización, y permite la creación rápida de prototipos al concentrar el esfuerzo en la función del dispositivo y no en detalles de hardware.

El potencióstato permite mediciones electroanalíticas, como la voltamperometría cíclica y de onda cuadrada. La etapa de automatización se llevó a cabo mediante la metodología flow-batch empleando una cámara vítrea con tres electrodos. Los datos de medición se almacenan en la memoria integrada del dispositivo y se pueden transferir a una PC para un procesamiento posterior. Esta es una característica bastante importante del sistema desa-

rollado ya que la información puede analizarse y compararse fuera de línea con resultados previos o incluso datos obtenidos con dispositivos complementarios.

El sistema flow-batch con detección electroquímica es simple, de bajo costo, bajo consumo de reactivos y proporciona resultados en considerablemente menos tiempo. Además, como está automatizado, puede repetirse con ajustes idénticos tantas veces como sea necesario, proporcionando datos obtenidos bajo las mismas estrictas condiciones.

El prototipo diseñado se evaluó mediante voltametría de barrido lineal (LSV) del par redox ferroanio potásico/ferricianuro. Los resultados se compararon con los obtenidos con el equipo BASi-Bioanalytical. Ambos instrumentos proporcionan información similar que muestra el buen rendimiento de nuestro prototipo hecho en laboratorio de bajo costo. Además, se utilizó la voltametría de redisolución anódica de onda cuadrada y un electrodo de bismuto para determinar el plomo en el propóleos. El contenido de plomo se comparó con los obtenidos con espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y los resultados fueron satisfactorios.

Parte V

Medio ambiente

Resumen

En esta parte se abordan aspectos relacionados al monitoreo medioambiental. En el planteo del desarrollo del trabajo de tesis, éste aspecto resultaba de interés tanto al área de química analítica en cuanto a la posibilidad de desarrollar nuevas tecnologías e instrumentos de medición que pudieran evaluar el impacto de las actividades humanas sobre el medio ambiente como también al área de ingeniería y en particular la de ingeniería de computación ya que las mediciones en campo requieren en la mayoría de las situaciones del transporte de datos por medio de una red de comunicaciones. En esta parte entonces se presentan tanto avances en la instrumentación para la determinación de parámetros como así también en las propuestas de comunicación.

Capítulo 8

Protocolo de comunicación en redes de sensores subacuáticos

8.1. Motivación

El planeta tierra está cubierto en el 71 % por el océano y éste a su vez contiene el 97 % del agua. A pesar de esto, el 95 % del mundo submarino permanece inexplorado. Al respecto la UNESCO indica que el 90 % del espacio habitable del planeta se encuentra en el mar y que cerca del 80 % de los seres vivos se encuentran en él. Las predicciones sobre la evolución de las especies y la contaminación son bastante malas ya que se espera que en el próximo siglo, la mitad de las especies marinas se hayan extinguido o estén por hacerlo [73]. Esto muestra sólo algunas de las razones por las que estudiar lo que ocurre bajo la superficie del agua es importante para nuestra vida en particular y para la subsistencia del planeta tal como lo conocemos hoy.

En este escenario, las redes de sensores subacuáticas permiten obtener información valiosa para abordar estos desafíos [74]. Sin embargo, tener sensores subacuáticos implica también comunicarlos unos con otros y es aquí donde surgen los primeros inconvenientes si el enlace entre ellos no será cableado. En ese caso, las comunicaciones con portadoras de radiofrecuen-

cia no son factibles debido a que el agua atenúa la propagación de las mismas de una manera tan importante que obliga a la utilización de grandes potencias lo que resulta imposible de mantener desde el punto de vista energético. Otro tipo de tecnología como el láser permiten un alta ancho de banda y alcanzar grandes distancias, sin embargo cualquier interferencia en el agua, cambio de densidad o incluso de temperatura ocasiona una dispersión y/o difracción del haz imposibilitando la comunicación. Ante todo esto, el medio más adecuado resulta la transmisión inalámbrica utilizando una portadora acústica. Éstas pueden viajar grandes distancias y alcanzan anchos de banda que pueden ser razonables. En el caso de las señales acústicas, la transmisión se puede ver afectada por la presencia de corrientes, olas en superficie, tipos de fondos y la presencia de eventuales obstáculos como animales o embarcaciones. A pesar de todos estas posibles interferencias, este tipo de tecnología es el único que en la actualidad es factible de ser desarrollado bajo el agua para la comunicación [75].

Las redes de sensores subacuáticas acústicas inalámbricas (UWASN, por sus iniciales en inglés), tienen varios desafíos a resolver para una implementación exitosa. El primero de ellos se refiere a la natural atenuación del medio sobre el cuál se transmite. A pesar de que las señales acústicas se propagan adecuadamente en el agua, tienen una atenuación importante por la absorción que se produce en cada reflexión ya sea en el fondo o en la superficie. La amplitud de la señal se ve afectada entonces por este fenómenos. Por otro lado, el movimiento del agua en la superficie genera una reverberación que puede enmascarar el mensaje que se transmite debido al ruido que se genera un punto de reflexión móvil. Por su parte la presencia de corrientes por un lado y de embarcaciones pueden introducir efecto Doppler sobre la señal modificando sus propiedades. Hay además que considerar el modo en que se transmite ya que se puede seguir un modelo esférico en el cual se emite en todas las direcciones o uno cilíndrico que orienta la señal en una dirección predeterminada [76].

El segundo desafío está relacionado con la naturaleza de las señales utilizadas para la transmisión de la información. Hay muchas fuentes de ruido generadas por el hombre, en

especial en las zonas costeras (puertos, playas y ciudades), que interfieren. La presencia de embarcaciones, actividades recreativas y deportivas y el ruido propio generado en las ciudades. Hay a su vez ruidos naturales que también interfieren como la presencia de olas, viento, lluvias y animales que son fuentes de sonidos. Finalmente y quizás no presente en todos los sitios, hay ruido sísmico, que en lugares específicos pueden interferir también.

El tercer desafío está relacionado con el modo en que se propagan las señales en el agua. En esencia, éstas van reflejándose en la superficie y el fondo. Como la fuente del sonido transmite en un arco, se generan múltiples caminos en la propagación. Así el receptor, puede escuchar muchas veces el mismo mensaje proveniente de una fuente simplemente porque hicieron distinto recorrido.

El cuarto desafío refiere al consumo de energía. Una red de sensores de este tipo es de difícil mantenimiento por lo que no es posible estar reemplazando las baterías. Por este motivo es preciso que el consumo sea acotado y bajo para poder permitir una vida útil del sensor mayor. En los equipos de transmisión comerciales, el consumo del sensor en reposo es bajo pero aumenta mucho cuando transmite o recibe y es proporcional al cuadrado de la distancia a la cual se pretende transmitir. Para reducir el consumo es preferible utilizar una tasa de transferencia alta durante períodos cortos de tiempo. Por otro lado, la transmisión a largas distancias requiere de alta potencia y baja tasa de transferencia. Por este motivo, transmitir a grandes distancias a tasa alta es impracticable. Para solucionar esto es posible intercalar nodos repetidores de señal. Finalmente, para garantizar un buen “throughput” de la red, se toman valores relativamente bajos de volumen de datos, la portadora varía entre 20 y 70 KHz, la velocidad de propagación del sonido es de aproximadamente 1.5 km/s, la distancia máxima que se maneja entre dos sensores es de 2km para un enlace punto a punto. Las variaciones en los tiempos de transmisión introduce un nivel de incerteza que se refleja en un bajo ancho de banda o velocidad efectiva de transmisión, asumiendo así una posición pesimista para considerar el peor caso[75]. La tecnología más utilizada para la transmisión subacuática en cuando a modulación es la basada en un cambio de frecuencia (frequency-shift

keying with frequency-hopping (FH-FSK)) [77].

Hay un componente transversal que abarca casi todos los problemas mencionados y es el mecanismo de control de acceso al medio (MAC en inglés). El protocolo que se defina para esto es importante ya que ordena el modo en que los distintos sensores acceden al medio. En esta tesis se desarrolla entonces una aproximación al problema de los sensores subacuáticos para monitoreo ambiental y el modo en que la información puede ser transmitida de nodo en nodo hasta alcanzar un punto que permita pasar a una red de datos estandar. Para esto se presenta un protocolo basado en la multiplexación por tiempo al que llamamos UWSO-TDMA por sus iniciales en inglés. El mecanismo es jerárquico y sincroniza los nodos desde el nodo que conecta con la red estable hacia los nodos terminales. La asignación de tiempos para transmisión en la trama se realiza siguiendo un algoritmo distribuido. En cada salto, hay un único que actúa como sincronizador de los nodos que lo siguen y concentra los mensajes para transferirlos hacia las capas superiores. Una vez que todos los nodos tienen asignados sus instantes de transmisión la trama se revierte de modo tal que en sólo una trama se puedan transmitir todos los mensajes desde los extremos del árbol hacia la raíz. En el resto del capítulo se realiza una breve reseña bibliográfica, la descripción del algoritmo, una evaluación del mismo y las conclusiones.

8.2. Trabajos Relacionados

Las redes acústicas de sensores subacuáticas (UWASN) tienen diversos aspectos a considerar que hasta el momento no fueron definidas. Entre ellos podemos mencionar los protocolos utilizados en cada una de las capas del modelo de comunicación ISO/OSI: física, enlace, red y transporte [78, 79, 80, 81]. En la bibliografía se mencionan tres aproximaciones principales para implementar el control de acceso al medio en la capa de enlace (MAC): multiplexado de frecuencia para múltiples accesos (FDMA), detección de portadora con prevención de colisiones (CSMA/CA) y multiplexado de tiempo (TDMA), [82]. La primera no se puede

implementar en transmisiones subacuáticas debido a que los anchos de banda en torno de las frecuencias no son suficientes y su vulnerabilidad a la interferencia por ejemplo proveniente de los múltiples caminos. La segunda opción fue propuesta en trabajos previos [83, 84, 85], pero tiene problemas con las estaciones ocultas y expuestas por un lado y la propagación lenta de las señales por otro. Finalmente, TDMA tiene problemas de sincronización y una subutilización del ancho de banda disponible.

En [86], los autores proponen un sistema de múltiple acceso con prevención de colisiones (MACA), un protocolo basado en el uso de mensajes cortos para la reserva del canal de comunicación, RTS para el requerimiento del canal y CTS para el otorgamiento del mismo, seguidos por mensajes con datos que son reconocidos con mensajes ACK. Este mecanismo se implementó con éxito en el proyecto Seaweb [87]. Antes de enviar datos, el nodo debe reservar el canal con un RTS y luego esperar el CTS para acceder. Los nodos vecinos escuchan la reserva también y si escuchan el CTS no intentan utilizar el canal hasta que no quede liberado. Si hay una colisión en mensajes RTS, entonces los nodos que los generaron corren un algoritmo de retroceso aleatorio hasta que alguno de los involucrados gane el acceso al canal.

En [88], los autores extienden el protocolo MACA y lo nombran MACA para inalámbrico (MACAW). Proponen un algoritmo menos agresivo para el retroceso e introduce la secuencia RTS-CTS-DATA-ACK. En situaciones de baja carga en la red, esta propuesta tiene un performance menor pero cuando hay sobrecarga en la red se comporta más eficiente que el anterior.

En [89], los autores introducen el UW-MAC para sensores acústicos subacuáticos. El acceso al medio se hace por medio de un CDMA con un sistema de lazo cerrado en un algoritmo distribuido para controlar la potencia y el tipo de codificación para minimizar los problemas de cercanía-lejanía. El algoritmo compensaba el efecto de caminos múltiples explotando las características del canal subacuático. Con esto se logra un alto porcentaje de utilización del canal. El protocolo funciona para nodos móviles o estáticos en aguas profundas

o no.

SO-TDMA [90] y ASO-TDMA [82] usan un TDMA que se auto-organiza. Sin embargo, estos protocolos fueron pensados para las frecuencias de radio de VHF y son utilizados para la geolocalización de embarcaciones en el océano.

Finalmente, el uso de TDMA en ambientes subacuáticos requiere de protocolos de sincronización de relojes. Estos tienen variaciones naturales que se ven afectadas además por las características del medio en el que se encuentran. Las variaciones de temperatura, las variaciones de voltaje en la alimentación o los movimientos y el envejecimiento son entre otros factores los que colaboran con los corrimientos. La precisión de un reloj basado en un cristal de cuarzo está dada en partes por millón ppm. La precisión típica encontrada en simulaciones en métodos de sincronización es de 40 ppm. [91], distintos protocolos de sincronización son analizados.

El UWSO-TDMA propuesto en este capítulo permite ser utilizado en redes de sensores con requerimientos de tiempo real dado que acota el retardo en la red de los mensajes brindando predictibilidad.

8.3. Descripción del Protocolo UWSO-TDMA

Las redes de sensores como la propuesta aquí están orientadas a la recolección de información y/o datos. Esto implica que mientras hay numerosas fuentes de datos (nodos sensores), los mismos viajan hacia unos pocos nodos receptores. Este hecho simplifica el modelo de propagación de la información dado que no se precisa establecer caminos entre cualquier par de nodos en la red. En la Sección 8.3.1 se presenta el modelo utilizado para esta red con detalle. Por el momento, es suficiente con decir que a medida que la información es retransmitida por nodos intermedios hacia el receptor, éstos realizan una composición de los datos de modo tal que en un mismo mensaje se incorporan todos los datos provenientes de capas inferiores del árbol más los propios generados en ese nodo intermedio.

El protocolo se basa en la predictibilidad que brinda TDMA frente a la aleatoriedad de CSMA/CA. Cada nodo usa una ranura de tiempo dentro de una trama que se asigna por medio de un algoritmo parcialmente distribuido que se explica más adelante. Este esquema descentralizado en el que los nodos son responsables de compartir el único canal de comunicación (acústico subacuático) y la sincronización de los relojes. En el caso de UWASN, el tiempo universal coordinado (UTC) no se encuentra disponible para todos los nodos ya que éstos están sumergidos sin posibilidad de adquirir señales satelitales. Por este motivo, se utiliza un nodo especial al que llamaremos *sonoboya* (SB) que se encontrará fondeado en un lugar conveniente y que estando en la superficie si tiene acceso al UTC. Este nodo será el encargado por un lado de brindar la señal de sincronización adecuada al resto de los nodos de la red y por el otro será el receptor final de toda la información. Asumimos que los nodos generan información de manera periódica de modo que la misma puede ser empaquetada en una trama que se transmite del mismo modo hacia la SB. El periodo de la trama es notado T_f . También se supone que todos los mensajes tienen la misma duración en tiempo aún cuando haya nodos que agrupan datos provenientes de capas inferiores. Es posible también utilizar sólo nodos subacuáticos sin la presencia de una SB sincronizada con el UTC; en ese caso uno de los nodos con su reloj tomaría el control de la sincronización. Sin embargo, preferimos la utilización de la SB ya que esto brinda una sincronización no sólo interna de la red sino que también lo hace con la red exterior.

Debido a la atenuación de las señales acústicas, no todos los nodos escuchan la sincronización generada por la SB. En el caso de que un nodo no se encuentre en el rango de transmisión de la SB, se sincroniza en fases subsiguientes a partir de otros nodos que si hayan sincronizado con ella. Para lograr esto, la trama se divide en m sub-tramas (SF). En la primera sub-trama, SF_0 , únicamente la SB transmite. En la siguiente sub-trama, SF_1 , los nodos escuchando a la SB pueden transmitir y son utilizados para sincronizar un nodo que se encuentran a dos saltos. En SF_2 , los nodos a dos saltos de la SB pueden transmitir y sincronizan a los nodos que se encuentran a tres y de ese modo jerárquicamente se van

sincronizando todos los nodos de la red. Así en forma genérica, los nodos en SF_j son sincronizados por los nodos en SF_{j-1} . Cada sub-trama tiene sólo un nodo sincronizador que es seleccionado siguiendo el procedimiento descrito en la sección 8.3.2.1. Como los nodos a dos saltos de distancia no interfieren, pueden compartir las ranuras de tiempo en sub-tramas generadas por nodos sincronizadores diferentes, transmitiendo de este modo en simultáneo. La longitud de las sub-tramas depende del número de nodos que son sincronizados. Como la SB no conoce la estructura de la red a priori, la longitud final de la trama no se define sino hasta que todos los nodos fueron sincronizados. La sub-trama SF_0 sólo tiene una ranura.

Es posible pensar en una red con más de una SB, sin embargo no hay un beneficio directo en hacer esto y la complejidad de la red aumentaría mucho. El tema queda abierto para posteriores investigaciones.

8.3.1. Modelo de la red

La red se modela como un grafo dirigido $G = (V, E)$, en el que V es el conjunto de nodos de la red y E es el conjunto de aristas. Si dos nodos u y v se encuentran dentro del rango de transmisión, hay una arista que los conecta, $e = (u, v)$. La asignación de ranuras para la transmisión es una extensión del problema de coloreo de grafos [92], en el cual el objetivo es pintar cada nodo con un color diferente al de sus vecinos (nodos conectados y nodos a dos saltos) minimizando el número de colores. El problema es similar al etiquetados de grafos $L(2,1)$ y la asignación de frecuencias [93].

La asignación de ranuras en una trama es un problema clásico de optimización que puede ser resuelta por programación lineal entera o alguna heurística especial. Sin embargo, esta aproximación supone un conocimiento completo de la red con un procedimiento de asignación centralizado que es difícil de adaptar cuando hay cambios en los nodos. La latencia asociada a la trama es mínima dado que la trama en si es mínima. En esta tesis, proponemos el uso de una heurística de asignación que distribuye las ranuras en base a conocimiento local y se realiza de manera jerárquica en cada nodo sincronizador. Presentamos el uso de sub-tramas

para las distintas capas y con esto se simplifica el procedimiento de asignación. Sin embargo, el uso de sub-tramas puede incrementar la latencia del TDMA, dado que no resulta mínima. De todos modos, se prefiere esta estructura porque además de ser distribuida, permite una re-organización periódica de la red actualizando la lista de nodos activos.

Durante la fase de inicialización, en el cual los nodos sincronizan sus relojes y siguen la asignación de ranuras, el grafo que representa la topología de la red es construido. Más aún, cada nodo reconoce a sus vecinos, el camino al siguiente concentrador y eventualmente, caminos alternativos para el caso de enlaces caídos o fallas en los nodos.

8.3.2. Fase de inicialización

8.3.2.1. Sincronización de relojes

La sincronización de los relojes es de suma importancia en los protocolos de acceso al medio basados en TDMA [94, 91]. A pesar que los nodos cuentan con relojes de tiempo real asociados (RTC), estos usualmente tienen derivas que obligan a sincronizarlos. Las señales acústicas subacuáticas se propagan a un promedio de 1,5 km/s. Con esta velocidad, nodos en el rango de transmisión pero suficientemente distantes, reciben la misma señal en instantes diferentes. Más aún, usualmente, la longitud de una ranura es menor al tiempo de propagación; entonces, el mismo mensaje puede ser escuchado por un nodo en un momento y más tarde por otro. La Tabla 11 presenta la demora en la propagación para distintas distancias. Si la transmisión se realiza a 9600 b/s, que es estándar para transmisiones acústicas subacuáticas, el tiempo requerido para transmitir 256 bytes es 0,213 s. Por lo tanto, nodos que se encuentran a más de 500 metros reciben el mensaje luego de que este fue transmitido completamente por el nodo transmisor. Por este motivo, se puede producir una colisión sin ser notado por los nodos involucrados.

El protocolo de sincronización es jerárquico. Primero los nodos en el rango de la SB son sincronizados, luego éstos lo hacen con los nodos que tienen en su rango de transmisión. A

continuación se describe el proceso respecto de la SB.

Distancia [m]	Prop. Demora [s]
50	0.0333
100	0.0667
200	0.1333
500	0.3333
1000	0.6666

Tabla 11: Demora en propagación

En el caso de las señales acústicas subacuáticas, el rango de la transmisión no es fácilmente determinable dado que depende de la potencia del transmisor, la sensibilidad del receptor, la frecuencia de la portadora, el nivel de señal-ruido y otros factores como la temperatura y la salinidad del agua y la profundidad en la que se encuentran los sensores y las corrientes presentes en el lugar. En efecto, un nodo puede descubrir a sus vecinos en el rango de transmisión, pero no la distancia que los separa. Para esta primer etapa, consideramos parámetros estándar para calcular el alcance de las comunicaciones en la zona en la que se instalan los nodos.

En el inicio del sistema, durante la fase de inicialización, la red utiliza un protocolo CSMA para la sincronización de los relojes y la selección de ranuras. Como más de un nodo puede intentar transmitir simultáneamente, puede haber colisiones. Los nodos no conocen la presencia de los vecinos y de la SB, por lo que no saben en que momento llegará el mensaje de sincronización o la cantidad de respuestas que recibirán.

La SB envía un mensaje *synch*. Este tiene un campo de identificación (ID) del nodo y una etiqueta de tiempo obtenida del UTC. Los nodos en el rango de transmisión de la SB recibirán este mensaje en distintos instantes dependiendo del retardo que es básicamente una función de la distancia entre ellos como se muestra en la Tabla 11. Luego de que el nodo recibe el mensaje *synch*, responde con un mensaje *asynch*. Este mensaje tiene también un campo de identificación (ID), el instante en que fue recibido el mensaje *synch* y el momento en que finalmente el mensaje *asynch* fue transmitido. Antes de transmitir, el nodo verifica el canal para detectar actividad, si escucha que otro nodo está transmitiendo, espera y corre un

algoritmo de retroceso aleatorio para determinar el momento en que intentará nuevamente transmitir. Dado que el retardo de propagación es importante, transmisiones superpuestas pueden ser detectadas por los nodos o la SB. Si un nodo encuentra el canal libre y transmite, el mensaje puede colisionar más tarde sin que el transmisor lo note. Por esta razón, todos los mensajes deben ser reconocidos por el receptor, en este caso la SB. Si no hay reconocimiento, entonces el nodo debe asumir que el mensaje no llegó a destino y debe re-enviarlo utilizando el algoritmo de retroceso.

El algoritmo de retroceso es similar al básico utilizado en las redes de CSMA. Luego de la primera colisión, los nodos involucran sucesivamente y aleatoriamente el retardo que varia desde ninguna a dieciséis ranuras. En la primera ronda, se elige entre cero y una, en la segunda entre cero y tres, en la tercera ronda entre cero y siete y finalmente entre cero y quince. Estos números pueden variar si la densidad de nodos es particularmente alta.

Durante la fase de sincronización, la SB no conoce la cantidad de nodos en su rango de transmisión ni el retardo que existe entre ellos. Por este motivo, la SB debe esperar un tiempo bastante largo para permitir la transmisión de todos los nodos con sus eventuales procedimientos de retroceso. Dado el máximo rango de transmisión, la SB espera por un tiempo equivalente a $2(c + 2)$ del tiempo máximo de propagación, en el que c es el número esperado de nodos en contacto directo con la SB. La duración de este tiempo puede ser variada en función del conocimiento previo que se tenga de la red. Por ejemplo, si suponemos un rango máximo de 500 metros y tres nodos en contacto directo, el tiempo de espera sería 3.33 s de acuerdo a la Tabla 11. Luego de este periodo, la SB enviará un mensaje *synch*. Este segundo mensaje tendrá ID, etiqueta de tiempo y los IDs de los nodos sincronizados sucesivamente con el tiempo ajustado para cada uno de ellos. Un nodo que respondió al primer mensaje *synch*, pero que no fue reconocido en el segundo deberá enviar nuevamente un mensaje *asynch*.

La figure 39 muestra el intercambio de mensajes y la evolución temporal para el proceso cuando no hay colisiones.

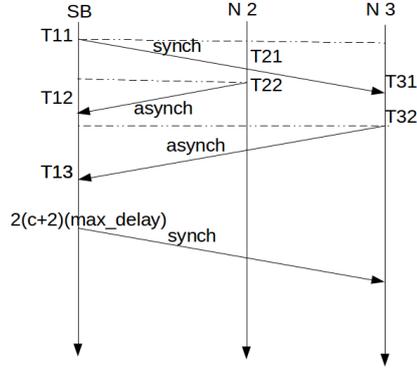


Figura 39: Protocolo de Sincronización

En la Figura 39, cuando el nodo 2 recibe el mensaje *synch* de la SB, debe incluir su propia etiqueta de tiempo T_{21} . Luego, en T_{22} está en condiciones de enviar el mensaje *asynch* a la SB. El nodo 3 que está más lejos repite las acciones del nodo 2. En T_{12} la SB recibe el mensaje *asynch* del nodo 2 y toma su propio tiempo. El mensaje *asynch* contiene T_{11} , T_{21} y T_{22} . Con esta información la sincronización se puede realizar en la SB:

$$\Delta t_1^1 = T_{21} - T_{11}$$

$$\Delta t_1^2 = T_{12} - T_{22}$$

Las correcciones requeridas se obtienen de:

$$\Delta = \frac{\Delta t_1^1 - \Delta t_1^2}{2} \quad (8.3.1)$$

Este protocolo es similar al propuesto por el protocolo de sincronización propuesto en Internet, Network Time Protocol (NTP, RFC 5905) [95].

El proceso descrito se sigue desde la raíz (SB) hacia las bases del grafo. Si un nodo tiene más de un “padre” tiene posibilidad de sincronizar con todos ellos. En este caso, el nodo “sincronizado” elige al “padre” con menor demora. Si hubiera dos o más nodos con el mismo retardo elige al primero que recibió.

La Figura 40 muestra el proceso de sincronización. Primero la SB envía el mensaje *synch*

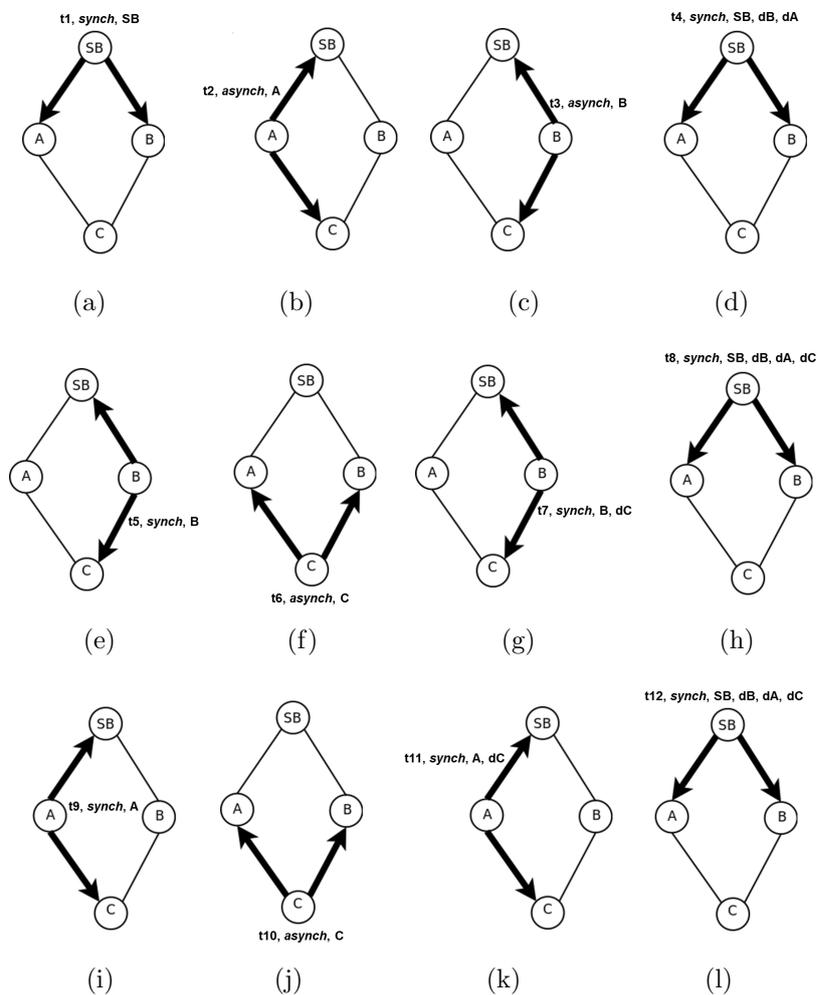


Figura 40: Ejemplo del Proceso de Sincronización

(Figura 8.40(a)). Ambos nodos A y B escuchan este mensaje. Ellos desconocen la presencia del otro respectivamente, de modo tal que responden con un mensaje *asynch* siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Supongamos que no hay colisión y que responden de modo sucesivo (Figuras 8.40(b) y 8.40(c)). La SB reconoce ambos mensajes con un nuevo *synch* indicando la corrección en el reloj de cada uno de los nodos y la distancia calculada a la SB (Figura 8.40(d)). Con este mensaje, ambos nodos A y B toman conocimiento de la presencia del otro. Como ambos conocen la demora a la SB y este es un parámetro usado para establecer el orden en la sincronización, el nodo B envía primero el mensaje *synch* (Figura 8.40(e)), y el nodo C lo reconoce con un *asynch* (Figura 8.40(f)). Luego, el nodo B envía

un nuevo mensaje *synch* con la corrección del reloj para el nodo C y la demora al nodo B (Figura 8.40(g)). La SB recibe este mensaje también y envía un nuevo *synch* reconociendo la presencia de C (Figura 8.40(h)). El nodo A aprende de este modo sobre C por escuchar el intercambio entre la SB y B. Ahora es el turno de A de enviar un mensaje *synch* (Figura 8.40(i)). El nodo C lo escucha y detecta que A tiene menos demora que B, por lo que cambia el nodo sincronizador y responde con un *asynch* (Figura 8.40(j)). Este mensaje es también recibido por el nodo B que aprende de este modo que C trabajará con A. A, entonces envía un mensaje *synch* indicando la nueva corrección de reloj y la demora (Figura 8.40(k)). Este mensaje también es recibido por la SB que actualiza la topología de la red, envía un último *synch* en el que indica la corrección de reloj para cada nodo y las demoras a la SB (Figura 8.40(l)). Una vez finalizado este proceso se continúa con la asignación de ranuras.

El proceso de sincronización es utilizado por los nodos que van escuchando el conjunto de nodos vecinos de modo de ir encaminando la selección de ranuras. Aún si los nodos no se encuentran en el rango de transmisión entre si, los mensajes *synch* de los nodos sincronizadores van revelando la estructura de la red. El proceso de sincronización es similar al de selección de un líder [96]. Para cada sub-trama, únicamente un nodo actúa como fuente de sincronización. El conjunto de nodos de sincronización se almacenan en $S = \{s_i\}$. El conjunto de nodos sincronizados por s_i se nota $V_i = \{v_{i1}, v_{i2}, \dots, v_{in}\}$; y están ordenados por retardo ascendente a s_i . Si cualquier v_{ij} escucha a más de un nodo de sincronización como se muestra en la Figura 40, sólo uno de ellos es seleccionado y el resto queda como resguardo en caso de una interrupción de la comunicación. En el mensaje *asynch* el nodo indica cual de los nodos fue sincronizado y esta información se pasa hacia los niveles superiores hasta alcanzar a la SB. El conjunto de nodos compartidos que pueden ser sincronizados por más de un nodo se nota $Sh_i = \{v_{ij}\}$. Los nodos con esta condición indican la presencia de todas los posibles nodos que pudieran sincronizarlos hacia el nivel superior. Esta información es utilizada luego en el algoritmo de selección de ranuras como se explica en la sección 8.3.2.2. La información se confirma en el siguiente mensaje *synch*.

Una vez que los nodos sincronizadores fueron seleccionados, la información fluye entre la SB y los nodos terminales siguiendo un camino fijo que se mantiene hasta el siguiente proceso de inicialización.

8.3.2.2. Asignación de ranuras

Finalizada la sincronización, el proceso de selección de las ranuras por parte de los nodos puede comenzar. Esta fase también se realiza de manera jerárquica comenzando por la SB. Los nodos sincronizadores ya fueron seleccionados para cada sub-trama en la etapa anterior, resta elegir la longitud de la trama y la posición o ranura en que cada nodo transmitirá dentro de ella. Los nodos sincronizadores conocen la cantidad de nodos que se encuentran bajo su dominio por lo que pueden definir la cantidad de ranuras que tendrá la sub-trama. Con esta información se puede entonces realizar la asignación. Los mensajes que envían los nodos sincronizadores, son escuchados tanto por los nodos aguas arriba como los de agua abajo de modo tal que la topología de la red y la estructura de las sub-tramas es propagada hacia ambos extremos durante el proceso de inicialización.

En este punto es preciso definir el concepto de transmisión simultánea. Dos nodos transmiten en forma simultánea, si sus mensajes colisionan en algún otro nodo de la red en escucha. Para evitar esto, la distancia al nodo sincronizador medida como la demora en la propagación del mensaje entre los nodos, ya medida durante el proceso de sincronización, se utiliza para ordenar la asignación de ranuras dentro de la trama. La primera ranura entonces es para el nodo más cercano mientras que la última para el más lejano. En el caso de la Figura 40, los nodos B y A deberían usar la primera y la segunda ranura respectivamente. Aunque esta asignación evita el problema de la estación oculta cuando transmiten nodos de la sub-trama i hacia el nodo sincronizador en la sub-trama $i - 1$, pueden existir colisiones entre nodos en la misma sub-trama pero con diferente nodo sincronizador como cuando en el caso del nodo C, tiene más de un nodo sincronizador en alcance. En la Figura 41 este caso se presenta extendiendo el ejemplo anterior. En rojo, marcamos una de las ramas de

sincronización y en azul la otra. En este caso, a pesar de que C está sincronizado por A y por lo tanto la asignación de ranuras es decidida por A, el problema de la estación oculta debe ser considerado en B, dado que los nodos F y G pueden transmitir en simultáneo con C.

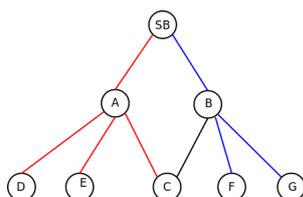


Figura 41: Asignación de ranuras - Situación I

La situación descrita debe ser resuelta por los nodos A y B. Ambos conocen que C está dentro del rango de transmisión y por lo tanto deben resolver la asignación de su ranura de modo tal que no produzca colisiones. En este caso, el criterio de asignación cambia. Para cada nivel de sub-trama, un conjunto de ranuras es reservado para aquellos nodos que pueden conectarse con mas de un nodo sincronizador (nodos compartidos). La cantidad de ranuras reservadas para estos es el doble de los nodos en esta condición. El resto de los nodos se asignan luego de la reserva de estas ranuras siguiendo el criterio de distancia. Entre las ranuras reservadas, cada nodo sincronizador asigna los nodos con posibles conflictos siguiendo el mismo criterio y dejando libres las ranuras reservadas sucesivas. El procedimiento es repetido en el resto de los nodos sincronizadores. Si se encontrara una colisión, los nodos informan esto al nivel anterior y se reordena la asignación.

En el caso descrito en la Figura 41, los nodos sincronizadores comparten la misma sub-trama dado que ambos son sincronizados por el mismo nodo. En la Figura 42, la situación se repite pero en este caso, los dos posibles nodos sincronizadores se encuentran en sub-tramas diferentes, dado que no son sincronizados por la SB sino por los nodos 1 y 2 respectivamente. En este caso, como se explica en la sección 8.3.2.1, los nodos A y B conocen la existencia del otro, dado que C les informa a ambos en el mensaje *asynch*. Dado que no están bajo el mismo nodo sincronizador, saben que están en sub-tramas diferentes también. Esta información se

pasa a los nodos 1 y 2 de modo que ellos incorporen tantas ranuras de reserva vacías como nodos compartidos. De este modo, A y B deben utilizar diferentes ranuras para evitar la colisión en el nodo C.

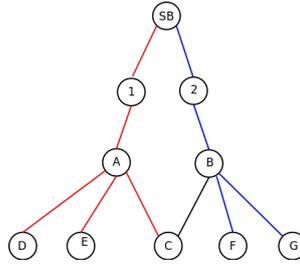


Figura 42: Asignación de ranuras - Situación II

Luego de varias iteraciones la asignación debe converger a una solución estable dado que hay más ranuras que nodo disponibles para su utilización. El número de ranuras libres en las sub-tramas ayuda en el proceso de inicialización pero agrega una latencia mayor en la transmisión de datos en la red.

Una sub-trama sincronizada por el nodo $s_i \in S$ se nota $SF_{ji} = \{t_1, t_2, \dots, t_{sfl_{ji}}\}$, donde el subíndice j indica la cantidad de saltos y el número i el nodo sincronizador; sfl_{ji} indica la cantidad de ranuras dentro de la sub-trama. La Figura 43 presenta el algoritmo para el proceso de selección de las ranuras. En este punto, podemos asegurar que el problema de la estación expuesta no sucede con esta configuración ya que nodos dentro del rango de transmisión siempre tienen asignadas ranuras diferentes.

Para la red mostrada en la Figura 44, en [92] los autores muestran como su algoritmo resulta óptimo para la asignación de ranuras. La Figura 45 muestra la asignación que realizan. Como se puede ver, únicamente con sólo 4 ranuras todos los nodos pueden transmitir sus mensajes a la raíz del árbol. Con nuestra propuesta distribuida, el SO-UWSN asigna las ranuras de acuerdo a la Figura 46. Requiere algunas ranuras más con lo cual se incrementa la latencia. Sin embargo, el método es distribuido y no se necesita conocer la cantidad de nodos ni su ubicación para realizar la asignación. Como el protocolo además prevee una re-inicialización periódica, nodos que dejen de funcionar pueden ser desactivados mientras

Asignación de ranuras Dados S, Sh_i, V_i {

1. Para cada $s_i \in S$ {
 - a) Si $(Sh_i \neq \Phi)$ {
 - 1) $sfl_i = \leftarrow 2size(Sh_i) + size(V_i - Sh_i)$
 - 2) Para cada $v_{ij} \in Sh_i$ {
 - a' Si retardo de v_{ij} a s_i es el menor, entonces asignar v_{ij} a t_i
 - b' Sino dejar libre t_i y asignar v_{ij} a t_{i+1}
 - 3) Para cada $v_{ij} \in V_i - Sh_i$ {
 - a' Asignar v_{ij} a t_i
- b) Sino{
 - 1) $sfl_i = \leftarrow size(V_i)$
 - 2) Para cada $v_{ij} \in V_i$ {
 - a' Asignar v_{ij} to t_i

Figura 43: Algoritmo de asignación de ranuras

que otros pueden incorporarse dinámicamente.

8.3.3. Fase de transmisión de datos

La Figura 47 muestra la fase de transmisión de datos. En esta fase, los nodos transmiten sus datos en las ranuras seleccionadas junto con la demora a la SB y la profundidad. Como todo los nodos dentro del alcance escuchan esta información, pueden mantener actualizada la topología de la red actual. Como la transmisión subacuática es susceptible a tener corrupción de datos, cada mensajes tiene un reconocimiento de parte del nodo sincronizador en las

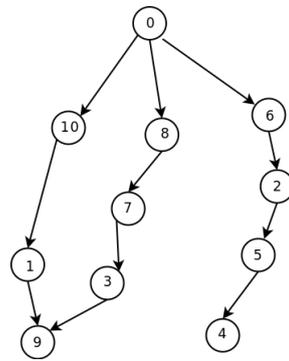


Figura 44: Modelo ejemplo de red

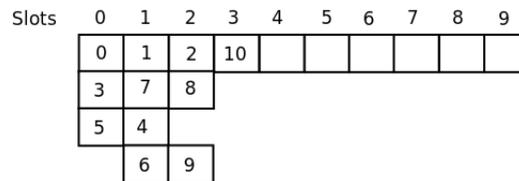


Figura 45: Trama

sub-tramas anteriores. Si un mensaje no fue reconocido, el transmisor lo retransmite en la siguiente trama. En el caso de que un nuevo mensaje fuera generado en ese periodo, los dos mensajes se agregan o si el mensaje anterior se venció se descarta, pero en cualquier caso esta situación se indica para que los nodos de capas superiores lo conozcan. Al comienzo de cada trama/sub-trama, los nodos esperan por el mensaje de sincronización con el reconocimiento de los mensajes previos. Si este mensaje no se recibe con los reconocimientos, los nodos en la sub-trama deben asumir que el nodo sincronizador no está operativo y si hubiera un nodo de sincronización de resguardo deberán cambiarse a éste. Si no hubiera nodo de resguardo,

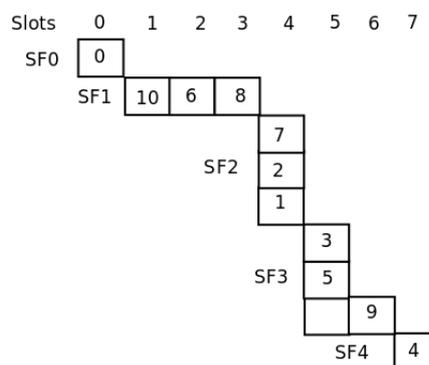


Figura 46: SO-UWSN Trama

los nodos pasan al modo de inicialización y esperan al próximo ciclo.

Los mensajes de datos difieren de los mensajes de sincronización. Los primeros únicamente contienen información sobre el proceso mientras que los segundos son utilizados durante la fase de sincronización y asignación.

8.3.4. Mejoras

El mecanismo básico de asignación contempla únicamente una ranura por nodo. Sin embargo, algunos nodos pueden tener más información para transmitir dado que actúan como intermediarios entre distintos niveles. En efecto los nodos sincronizadores integran los mensajes provenientes de los nodos en su sub-trama. En el caso de redes grandes con muchos nodos, los nodos sincronizadores próximos a la SB tendrán una gran cantidad de información para transmitir pero sólo una ranura. Para solucionar esto, una vez finalizada la etapa de

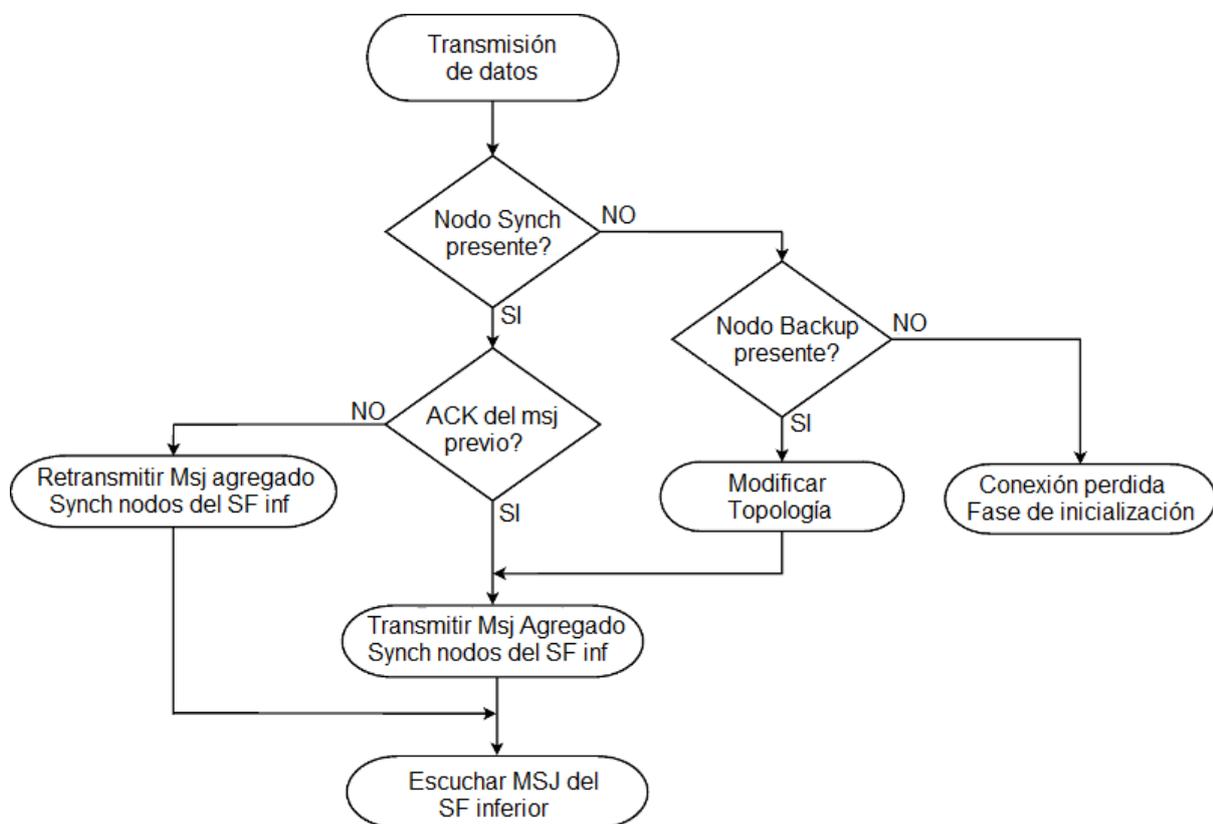


Figura 47: Diagrama de flujo de transmisión de datos

sincronización algunos nodos pueden recibir más de una ranura para la transmisión.

Los protocolos de control de acceso al medio por TDMA suelen introducir demoras importantes dado que los mensajes requieren de varios saltos para alcanzar el destino. En casos como el propuesto aquí, es útil invertir el orden de la trama. De este modo, el mensaje del nodo más alejado de la SB inicia la transmisión. En la propagación hacia la SB, en cada salto se va integrado la información que luego llega a destino en la duración de una única trama.

Las mejoras anteriores facilitan otra adicional que es la posibilidad de realizar *streaming* en esta clase de redes. En el estado actual el TDMA supone que hay un corto periodo de transmisión en el cual todos los nodo están listos para transmitir y recibir información seguido de un periodo más largo en silencio en el cual los nodos pueden *dormir* ahorrando energía. Sin embargo, en algunos casos o en ciertos escenarios particulares, la transmisión en orden inverso de la trama permite una transmisión casi continua de información. De hecho, como la asignación de ranuras garantiza que no hay colisiones, una nueva trama puede iniciarse a dos ranuras de distancia. Esta alternativa puede ser usada en los casos en que una ranura es insuficiente para transmitir toda la información requerida, por ejemplo en los casos de *streaming* de audio o video. Más aún, la red puede operar en diferentes modos según sean las condiciones, de acuerdo al consumo de energía deseado.

8.4. Ejemplo de Aplicación

La Figura 48 presenta un ejemplo con una distribución de nodos en una UWASN. La SB es el centro del círculo rojo que marca el rango de comunicación de la misma que se fijó en 500 m. Como se puede ver, dos nodos están en contacto directo con ella pero no se ven mutuamente (e.g. nodos 1 y 2). Ambos, sincronizan con la SB. Como tiene prácticamente la misma demora a la SN, se les asignan las ranuras 1 y 2 respectivamente en la SF_1 . En el área asociado al siguiente salto hay tres nodos. Como en el caso previo, aún estando

aproximadamente a la misma distancia de la SB, tienen nodos de sincronización diferentes y por lo tanto caminos distintos también. El nodo 2 sincroniza al 3 y al 4 en SF_2 , y el nodo 4 sincroniza al nodo 5 SF_3 .

La asignación de ranuras es trivial para este ejemplo. Un mensaje que se inicia en el nodo 5 debe atravesar los nodos 4 y 2 antes de alcanzar la SB. En cambio, el nodo 3 está en el rango del 2, los mensajes que se inician en él pasan por el nodo 2 antes de llegar a la SB. Este ejemplo muestra que aún cuando los nodos 3, 4 y 5 están en la zona de dos rangos de transmisión, de la SB, la cantidad de saltos necesarios para alcanzarla son diferentes en cada caso.

Durante esta etapa los nodos construyen la topología de la red para determinar los caminos a la SB. Cada nodo en el sistema tiene asignada una ranura en la trama, informa su profundidad, demora a la SB (si se encuentra a un salto), la demora acumulada y el camino hacia la SB. En el ejemplo mostrado en la Figura 48, el nodo 4 informa el retardo a la SB y el camino por medio del nodo 2. En este modo, el nodo 5 puede determinar su propia demora a la SB y su camino.

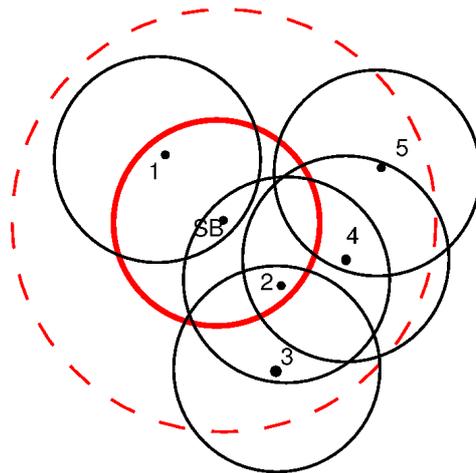


Figura 48: Caso 1: Disposición de la red y rangos de transmisión

En la Figura 48, el nodo 5 es el último y sus mensajes deben atravesar los nodos 4 y 2 para alcanzar la SB. En este caso el nodo 4, integra la información del nodo 5 con la propia, lo mismo hace el nodo 2 con los mensajes de 4 y 5. La Figura 49 extiende el ejemplo

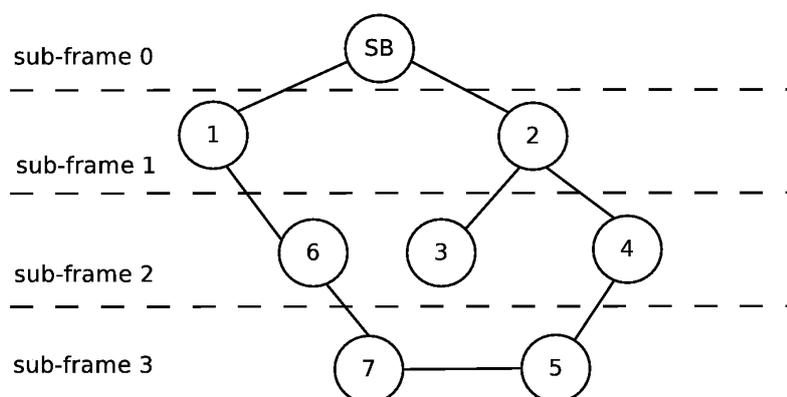


Figura 50: Topología de la red en el caso 2

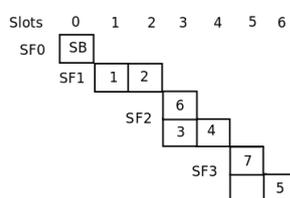


Figura 51: Asignación de ranuras en la trama del ejemplo

8.5. Escenario de aplicación

Las UWSN pueden ser usadas en distintas aplicaciones de vigilancia desde el área militar hasta escenarios relacionados con el medio-ambiente. Como se explicó anteriormente, más del 70% de la tierra está cubierta por el océano y todavía permanece sin explorar. Uno de los tópicos de investigación con más interés en los últimos años es la interacción entre el mar y los ríos con sus costas en la presencia de actividades desarrolladas por el hombre. En este sentido, el diseño de una red subacuática resulta útil para el estudio de diversas cuestiones ambientales en la región del estuario de Bahía Blanca y su zona de influencia.

La ciudad de Bahía Blanca tiene una de las terminales portuarias más importantes de la Argentina, el puerto de Ingeniero White. En un principio éste estuvo diseñado para la exportación de granos y frutas provenientes del Valle de Río Negro y la región pampeana. En los últimos 30 años, el puerto además se transformó en un polo industrial petroquímico (polietileno, fertilizantes, refinerías entre otros) y expandió sus actividades hacia el transporte de combustibles líquidos y gaseosos. Además recientemente, a fin de permitir el ingreso

de barcos de mayor porte, el canal de acceso y sus sitios se dragaron hasta lograr una profundidad de 50 pies aún con la marea en bajamar. Hay por lo tanto un movimiento importante de buques en la zona portuaria. Hay que agregar además que los residuos cloacales se drenan prácticamente sin tratamiento al estuario y la presencia más cerca del ingreso al canal de acceso al puerto de otra ciudad como es Punta Alta con la Base Naval Puerto Belgrano y una terminal adicional para el intercambio de combustibles. A todo lo anterior se suma como es habitual en todos los puertos actividad pesquera artesanal y la realización de múltiples actividades deportivas.

El impacto ambiental que todas estas cuestiones implican sobre el estuario han sido motivo de estudio a lo largo del tiempo, sobre todo en su parte interior por ser la que se encuentra expuesta principalmente a las fuentes de contaminación de manera directa. Hay por lo tanto series grandes de datos físico químicos que reflejan la evolución de la calidad del agua y el suelo submarino. Las series reflejan valores en las desembocaduras de los cursos de agua dulce sobre el estuario y en los residuos eliminados por las ciudades así como también el valor en diversos puntos. El estuario consiste en si mismo en un ecosistema muy particular que se corresponde con una planicie de marea en el cual hay un intercambio continuo entre la tierra y el mar que la cubre periódicamente con las mareas. En este ecosistema se encuentra una rica vida silvestre que abarca desde crustáceos, peces y aves migratorias a mamíferos marinos y especies migratorias. Las actividades humanas en torno de las ciudades y los puertos en el estuario han modificado este ecosistema.

En este momento, la influencia del puerto, las actividades industriales y las ciudades mismas está siendo analizado en la parte exterior del estuario y en su zona de influencia. En ciudades cercanas a Bahía Blanca, en general de características turísticas, se está realizando muestreo y análisis de datos para evaluar como el puerto las afecta. De este modo, Pehuen-Co, Monte Hermoso y Reta son tres conocidos balnearios ubicados a 50, 80 y 170 km respectivamente del Puerto. En el caso de Pehuen-Co, ya se demostró que el ecosistema propio se ha acoplado al estuario de manera completa de modo que la influencia de las activi-

dades en el puerto lo afecta directamente. El estuario tiene una fuerte corriente de marea que en subiente ingresa desde el mar abierto y en bajante desagota en el mismo. Monte Hermoso y Reta se consideran fuera del estuario a diferencia de Pehuen-Co que se encuentra en la “desembocadura” del mismo. La Figura 52 muestra una captura de una imagen satelital que muestra parte del estuario con la ciudad de Bahía Blanca y el Puerto en el extremo izquierdo y las ciudades balnearias en la costa. Los círculos negros marcan las posibles localizaciones de los sensores.

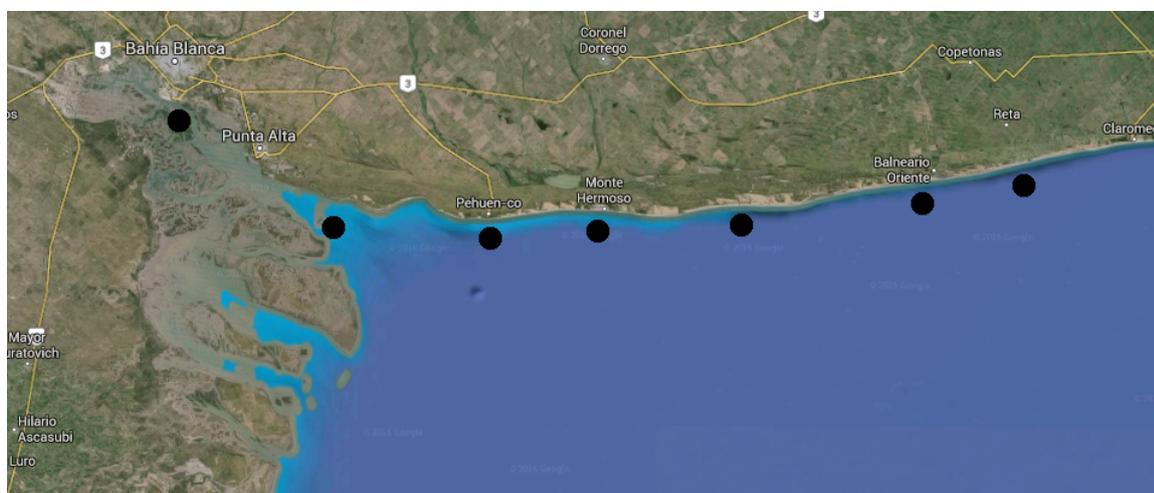


Figura 52: Fotografía satelital del estuario de Bahía Blanca

El proyecto intenta determinar si el Puerto modifica el ecosistema de las playas vecinas. Para esto, se intenta sembrar una red de sensores en el área que permita medir diferentes parámetros como la turbidez del agua, la radiación de temperatura, densidad, salinidad, materia orgánica volátil y compuestos inorgánicos. Estos parámetros deben ser medidos en diferentes profundidades y a distintas distancias de la playa a lo largo de varios meses para poder recoger las variaciones estacionales propias. A pesar de que es posible instrumentar una red cableada, en la zona de la rompiente con la presencia de olas, presenta algunos problemas a los que se podría sumar la intervención no deseada de curiosos que pudieran dañar la red.

Distintos grupos de sensores pueden ser sembrados a lo largo de la costa para determinar los contaminantes y sus variaciones en consonancia con las corrientes de marea y el efecto

del viento. El primer grupo debería colocarse en las proximidades del puerto. Un segundo grupo debería ubicarse en proximidades de la boca del puerto y un tercero frente a Pehuen-Co. Entre este balneario y Monte Hermoso hay 25 km de playa sin desembocaduras de cursos de agua dulce ni actividades desarrolladas por el hombre. Por lo tanto el cuarto grupo de sensores debería instalarse en Monte Hermoso. Para llegar al último punto de interés, Reta, hay que pasar dos desembocaduras de cursos de agua dulce, el más importante el río Sauce Grande que se origina en Sierra de la Ventana, se endica en Paso de las Piedras para proveer agua potable a la región, recorre los partidos de Bahía Blanca, Coronel Rosales, Coronel Dorrego, forma la Laguna Sauce Grande y finalmente desemboca al este de Monte Hermoso. El otro curso de agua es el Quequén Salado. En estos puntos es importante medir ya que los ríos acarrean desechos orgánicos y agroquímicos provenientes de los campos que recorren. Finalmente en Reta también se plantea sembrar grupos de sensores tanto en la desembocadura del arroyo el Gaucho como en el mar.

Cada grupo está compuesto por varios nodos subacuáticos y una SB que actúa como interface con la red. Anclados a diferentes profundidades, los nodos cubren un área cercana a los 500 m comenzando de la línea de bajamar con una profundidad de 2 metros y tomando información hasta los 10 metros de profundidad si los hubiera. Los nodos se encontrarían a 1, 2, 5 y 10 m de profundidad. El primer grupo en el puerto sirve de referencia al resto. Evaluar el tiempo de propagación de un hecho que suceda en el puerto hacia afuera, y como los parámetros físico químicos van variando a medida que nos alejamos del núcleo. La Figura 53 muestra una distribución aproximada de la red. Específicamente los sensores medirán: temperatura, salinidad, pH, turbidez, oxígeno y nitrógeno disueltos, nutrientes disueltos (nitratos, nitritos y fosfatos) y clorofila. Todos estos sensores funcionarán a demanda basados en los principios del análisis químico por inyección de flujo.

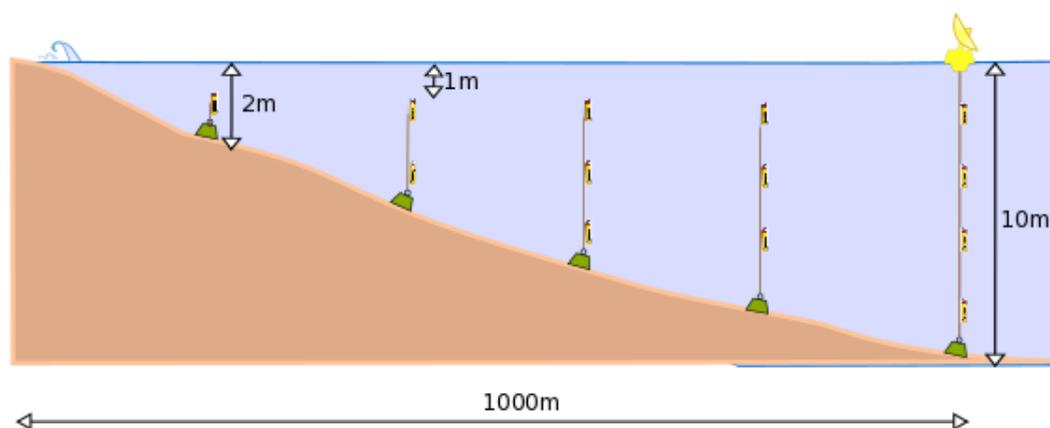


Figura 53: Disposición de la red en la costa

8.6. Proceso de Evaluación

En esta sección evaluamos la performance de la propuesta de MAC utilizando el escenario descrito antes. Comparamos el comportamiento general de nuestra propuesta con el de MACA-U [97]. Para este proceso de evaluación suponemos que cada nodo tiene un rango de transmisión acústica de 500 m, la portadora se elige en 40KHz [98] y la tasa de transferencia en 9600 b/s. Cada ranura tendrá una duración de 167 ms para 160 bytes. La Figura 51 muestra la estructura de la trama luego de la fase de inicialización para la topología de red mostrada en la Figura 50. Como se puede ver, hay 7 ranuras usadas. La trama completa se transmite en 1.167 s.

Las tramas pueden comenzar con diferente periodicidad, por ejemplo cada 10 s. En este caso, la demanda de potencia (e.g. consumo de energía) del sistema de comunicación en el nodo será ligeramente superior al 10%. Luego de la fase de inicialización, un mensaje del nodo más alejado (en este caso el nodo 7), requeriría tres tramas para alcanzar la SB o lo que es lo mismo 30 s. El reconocimiento, mensaje ACK se efectúa en tres pasos. Primero el nodo 6 reconoce la recepción del mensaje del nodo 7, en la siguiente trama, el nodo 1 reconoce el mensaje del 6 compuesto por el mensaje de 7 y el propio del 6 y finalmente la SB reconoce el

mensaje compuesto de los nodos 7, 6 y 1 provenientes. Si el mecanismo de invertir la trama es implementado, el mensaje alcanza a la SB en sólo 10 s y el reconocimiento llegará en los siguientes 10 y el factor de utilización general de la red será muy cercano al 10%.

En el caso del protocolo MACA-U, los nodos pueden transmitir en cualquier momento que tengan información disponible y logren acceso al canal acústico por medio de los mensajes RTS-CTS hacia el siguiente nodo en la red. Para establecer el protocolo se precisa controlar el tiempo de transmisión y el retardo para alcanzar el destino. Considerando que la señal acústica en el agua se propaga un promedio de 1,5 km/s, el tiempo para alcanzar un nodo en el límite del rango establecido será de 0.333 s; por lo tanto la máxima demora en ida y vuelta de un mensaje es $\tau_{\text{máx}} = 0,667s$. Mantenemos la misma duración de ranuras para el propósito de comparar, 0,167 s. En el caso del nodo 7 cuando tiene un mensaje para enviar, envía un RTS y espera por $\tau_{\text{máx}} + t_{\text{slot}} = 0,834s$. Si en este tiempo, el nodo recibe el mensaje CTS, entonces adquiere el control del canal y puede transmitir su mensaje. En ese caso el tiempo total requerido por el nodo 7 para enviar su mensaje a la SB será de cerca de 3 s sin colisiones. Sin embargo, el nodo 7 puede ser demorado por colisiones con el nodo 5 y 6. En este caso, si suponemos una única colisión con cada uno de ellos, tardará en alcanzar el nodo 6 cerca de 3 s. Con la misma consideración en cuanto a las colisiones, el mensaje del nodo 6 requerirá de otros 3 s para llegar al nodo 1 y de este otros más para alcanzar la SB. En total, considerando una sola colisión con cada vecino por salto, la propagación requerirá de 10 s para recorrer de extremo a extremo la red.

Este simple ejemplo muestra como la complejidad de los mecanismos de prevención de colisiones en medios con demoras tan importantes pueden comprometer la performance de la red de modo considerable aún cuando se trate de pocos nodos. En cambio, el mecanismo de acceso al medio por TDMA garantiza una latencia constante que hace a la red al menos desde el punto de vista temporal en predecible. Esto es importante cuando debemos acotar el tiempo de propagación por restricciones temporales en los mensajes.

8.7. Conclusiones

En este capítulo propusimos una red acústica inalámbrica subacuática con control de acceso al medio administrado por TDMA. La sincronización de relojes y la asignación de ranuras se realiza de modo distribuido y esto permite prescindir de un nodo central administrador con conocimiento completo de la red. El protocolo propuesto permite computar la demora de un mensaje entre extremos de la red.

La propuesta se evaluó mediando simulaciones en una arquitectura de sensores a sembrar en la costa del mar entre el Puerto de Ingeniero White y el balneario Reta a fin de evaluar la influencia del polo industrial-portuario en estas localidades próximas.

Parte VI

Conclusiones y Trabajos Futuros

Resumen

En esta parte se presentan las conclusiones generales resaltando los aspectos más importantes del trabajo de esta tesis, el carácter interdisciplinario de la misma y algunos temas transversales a cada uno de los prototipos desarrollados.

Capítulo 9

Conclusiones generales

En el año 2012, se desarrolló el primer prototipo denominado “Sistema Flow-Batch/FIA para la determinación de Glicerol Libre en Biodiésel”. Este hecho marcó un hito importante para los grupos de investigación del área de Sistemas Digitales del DIEC, y del área de Química analítica del DQ. Desde entonces, ambos grupos han fortalecido su vínculo para trabajar de forma interdisciplinaria logrando desarrollos tecnológicos innovadores.

Durante los trabajos de investigación de esta tesis se han desarrollado y finalizado cinco proyectos finales de carrera de Ing. Electrónica, como es el caso del Ing. Martín Nabaes con su proyecto “Desarrollo de un Potenciostato portátil para control de calidad en productos apícolas” en el 2015, y el de los Ing. Fermín Fueyo y Federico Fuentes quienes desarrollaron un “Driver piezoeléctrico aplicado a la degradación de propóleos” también en el mismo año. En 2016, el Ing. Matías Blackhall desarrolló un “Detector ultrasónico de bajo costo para la determinación de glicerol en biodiésel”, y en el año 2017, los Ing. Guillermo Schneider y Carlos Grassi desarrollaron un “Dispositivo de Medición Multiparamétrico para Medición de Cursos y Espejos de Agua”, y el Ing. Esteban Binsak un “Analizador espectrofotométrico con procesamiento de imágenes”.

Algunos resultados obtenidos de esta investigación han sido transferidos al sector productivo, logrando generar un fuerte impacto en el sector social y productivo.

9.1. Sobre los sistemas flow-batch

Los analizadores basados en la metodología flow-batch (FBA) se destacan de otros tipos de analizadores de flujo debido a su versatilidad. Dada su flexibilidad y disponibilidad de variables a controlar, se pueden realizar procedimientos analíticos diferentes sin cambiar significativamente la configuración física del sistema. Esto se debe a que los parámetros operacionales en FBA se cambian y se especifican para diferentes sistemas analíticos simplemente en función de la temporización y conmutación de las válvulas.

Los sistemas FBA estudiados en la literatura integran una serie de componentes de laboratorios tales como bombas peristálticas, accionadores de válvulas y adquisidores USB para el control del sistema por Software de PC. Durante el desarrollo de la tesis, se diseñó e implementó un prototipo de controlador FB que integra todos los componentes comunes utilizados en dichos sistemas. Este equipo cuenta con una bomba peristáltica y un accionador de válvulas. El sistema descrito en el capítulo 2, se diseñó bajo el paradigma COTS. La interfaz de usuario es amigable e intuitiva para el primer uso. Permite al usuario rápidamente configurar un nuevo procedimiento FB, y guardarlo en uno de sus tres registros para posteriormente cargarlo y/o editarlo.

9.2. Sobre las matrices analizadas

Se desarrollaron diferentes sistemas de automatización y medición para determinación de compuestos en diversas matrices relacionadas con biocombustibles, alimentos y medio ambiente. Estas matrices estudiadas y analizadas son consideradas muy importantes tanto en el contexto nacional como internacional.

En la parte III se describieron dos trabajos orientados al control de calidad del biodiésel. Dado que nuestro país es uno de los mayores productores de biodiésel en el mundo, contar con instrumentos de bajo costo y portables, es de mucho interés para los pequeños y medianos

productores de biodiésel. Con éstos podrían analizar rápidamente el producto generado y realizar correcciones inmediatas en el proceso productivo en caso de que el dispositivo indique niveles altos de glicerina.

En la parte IV, se trabajó sobre el análisis en matrices de alimentos, específicamente productos apícolas. Estos productos, destinados al consumo humano y a la exportación, deben ser inocuos y cumplir con las disposiciones legales y regulaciones vigentes. Por ello, se desarrolló un sistema automático y de bajo costo que permitió evaluar la calidad comercial y diferenciada de estos alimentos.

En la parte V se diseñó un protocolo de control de acceso al medio para una red de sensores subacuáticos para aplicación directa sobre estudios de medio ambiente. En este caso, el cumplimiento de restricciones temporales obligó a extender algunas soluciones existentes. Para este escenario se planteó un análisis técnico específico que incluyó el alcance, la potencia, el costo por byte, el mantenimiento, y el consumo de energía, entre otros. La disponibilidad de este tipo de red permite augurar que en un futuro cercano se dispondrá de un ecosistema de sensores autónomos capaz de monitorear adecuadamente distintas variables. En el caso de un curso o espejo de agua podrían ser caudal, temperatura, turbidez, pH, conductividad, etc, en el caso del aire podría ser presencia de compuestos como amoníaco, CO₂, CO, etc. En el caso de suelos podría ser conductividad, dureza, nitrógeno, materia orgánica, etc.

9.3. Sobre los métodos quimiométricos

En el trabajo sobre la determinación de glicerol libre del capítulo 5, se construyeron varios modelos PLS que relacionan la concentración de glicerol libre y la señal multivariada registrada con el osciloscopio. La mejor precisión se logró cuando el método PLS se acopló con SPA para la selección de intervalos. Los resultados obtenidos mostraron que con equipos más simples y económicos que en los trabajos anteriores, la presencia de glicerol libre en biodiésel puede predecirse con precisión gracias a la adecuada utilización de métodos quimiométricos.

Capítulo 10

Trabajos futuros

El análisis quimiométrico arroja resultados sobre una muestra, es decir, que en la práctica analiza una situación del pasado. Sin embargo, hay una gran cantidad de procesos dinámicos, en especial todos los asociados a la contaminación del medio ambiente, en el que el muestreo es puntual y asociado a un conjunto determinado de parámetros. La ciencia de la computación, y en particular, las técnicas de análisis de grandes datos pueden proveer nuevos enfoques a las tradicionales.

La propuesta de un trabajo futuro supone la generación de nuevas herramientas que permitan combinar los algoritmos aplicados en quimiometría con aquellos propios del procesamiento y análisis de grandes series de datos. Por ejemplo, en la parte IV se desarrolló un sistema que puede determinar la presencia de un contaminante como plomo a partir de su detección en un producto apícola como el propóleo. Sin embargo, esto requiere un procedimiento específico sobre una muestra que es analizada por medio de una técnica electroquímica implementada con un instrumento como el potenciómetro. Para el análisis de la señal eléctrica nuevamente se utilizaron técnicas de filtrado y regresiones que permitieron determinar la presencia de plomo. El desarrollo de este objetivo entonces pretende introducir nuevas variables en el análisis que puedan ser incorporadas durante todo el proceso de producción de propóleo en la colmena. La contaminación con plomo proviene del medio am-

biente debido fundamentalmente al tráfico vehicular (autos, camiones, trenes). Por lo tanto, se podrían incluir sensores en el suelo y aire ubicados a diferentes distancias de las vías de comunicación. Todos estos parámetros pueden ser contrastados luego con la presencia o no de contaminantes en productos apícolas, y de esta forma poder inferir la mejor ubicación de la colmena.

Referencias

- [1] Didier Wernli; Frédéric Darbellay. Interdisciplinarity and the 21st century research-intensive university. League of European Research Universities, nov 2016.
- [2] IRAM. IRAM 6515-1: calidad de combustibles. Combustibles líquidos para uso en automotores. B100. 1 edition, 2013.
- [3] Astm d6751, test method for determination of free and total glycerin in b100 biodiesel methyl esters by gas chromatography.
- [4] Nbr 15341 biodiesel - determinação de glicerina livre em biodiesel de mamona por cromatografia em fase gasosa.
- [5] Nbr 15342 biodiesel - determinação de monoacilgliceróis e diacilgliceróis em biodiesel de mamona por cromatografia gasosa.
- [6] Mónica S. Finola, Mirta C. Lasagno, and Juan M. Marioli. Microbiological and chemical characterization of honeys from central argentina. Food Chemistry, 100(4):1649 – 1653, 2007.
- [7] Nina Bilandzic, Maja Dokic, Marija Sedak, Bozica Solomun Kolanovic, Ivana Varenina, Ana Koncurat, and Nevenka Rudan. Determination of trace elements in croatian floral honey originating from different regions. Food Chemistry, 128(4):1160 – 1164, 2011.
- [8] ONU-Agua. Policy brief on water quality., mar 2011.

- [9] United Nations Environment Programme. Water Quality for Ecosystem and Human Health. UNEP GEMS/Water Programme, second edition, 2008.
- [10] R. Alcalde, J.E. Perl, and F. Andrés. Evaluación de la calidad del agua en la cuenca del río colorado (argentina). In XX Congreso Nacional del Agua, 2005.
- [11] Wayne G. Landis and Ming-Ho Yu. Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems. Lewis Publishers, third edition, 2004.
- [12] John A. Timbrell. Principles of Biochemical Toxicology. CRC Press, fourth edition, 2008.
- [13] M.S. Cárdenas M. Valcárcel. Automatización y miniaturización en química analítica. Springer-Verlag Ibérica, 2000.
- [14] M. Valcárcel M.D. Luque de Castro. Automatic Methods of Analysis, volume 9. Elsevier Science, first edition, 1988.
- [15] Ricardo S. Honorato, Mário César U. Araújo, Ricardo A.C. Lima, Elias A.G. Zagatto, Rui A.S. Lapa, and José L.F. Costa Lima. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. Analytica Chimica Acta, 396(1):91 – 97, 1999.
- [16] Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, Luciano Farias de Almeida, David Peter Harding, and Mário César Ugulino de Araújo. Flow-batch analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 35:39 – 49, 2012.
- [17] R. L. Bain and R. P. Overend. Biomass for heat and power. Forest Products Journal, 52(2):12–19, 2002.
- [18] Haroon S. Khashgi, Roger C. Prince, and Gregg Marland. The potential of biomass fuels in the context of global climate change: Focus on transportation fuels. Annual Review of Energy and the Environment, 25(1):199–244, 2000.

REFERENCIAS

- [19] M.H. Jayed, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, T.M.I. Mahlia, M. Husnawan, and A.M. Liaquat. Prospects of dedicated biodiesel engine vehicles in Malaysia and Indonesia. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15(1):220–235, January 2011.
- [20] R. Larosa. Proceso para la producción de biodiesel (metilester o esteres metílicos de ácidos grasos). Refinación de glicerina, 2001.
- [21] Magin Lapuerta, Octavio Armas, and Jose Rodriguez-Fernandez. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. Progress in Energy and Combustion Science, 34(2):198 – 223, 2008.
- [22] M. BALLESTEROS. Fuentes, cultivos y PAC, volume 15. Producciones aspectos legislativos, 2003.
- [23] Gabriella P.A.G. Pousa, André L.F. Santos, and Paulo A.Z. Suarez. History and policy of biodiesel in brazil. Energy Policy, 35(11):5393 – 5398, 2007.
- [24] Roseli Aparecida Ferrari, Vanessa da Silva Oliveira, and Ardalla Scabio. Biodiesel de soja : taxa de converção em esteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energía. Quimica Nova, 28:19 – 23, 02 2005.
- [25] Divya BAJPAI and V.K. TYAGI. Biodiesel: Source, production, composition, properties and its benefits. Journal of Oleo Science, 55(10):487–502, 2006.
- [26] Ulf Schuchardt, Ricardo Sercheli, and Rogerio Matheus Vargas. Transesterification of vegetable oils: a review. Journal of the Brazilian Chemical Society, 9:199 – 210, 05 1998.
- [27] Walter Morales, Natalia Polich, Alfredo Sequeira, Ester Chamorro, and Eduardo Herre-ro. Purificación de glicerol obtenido a partir de síntesis de biodiesel de aceite crudo de algodón. Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente, 14:25–30, 09 2010.
- [28] Ivon Pinheiro Lobo, Sergio Luis Costa Ferreira, and Rosenira Serpa da Cruz. quality parameters and analytical methods. Química Nova, 32:1596 – 1608, 2009.

- [29] Sidnei G. Silva and Fábio R.P. Rocha. A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel. *Talanta*, 83(2):559 – 564, 2010.
- [30] Magín Lapuerta, Octavio Armas, and Reyes García-Contreras. Effect of ethanol on blending stability and diesel engine emissions. *Energy Fuels*, 23:4343 – 4354, 2009.
- [31] Carolina P. Prados, Daniela R. Rezende, Lilian R. Batista, Maria I.R. Alves, and Nelson R. Antoniosi Filho. Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. *Fuel*, 96:476 – 481, 2012.
- [32] Adriana Neves Dias, Maristela Barnes Rodrigues Cerqueira, Renata Rodrigues de Moura, Márcia Helena Scherer Kurz, Rosilene Maria Clementin, Marcelo Gonçalves Montes De Oca, and Ednei Gilberto Primel. Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel*, 94:178 – 183, 2012.
- [33] Aleksander H. Maruta and Thiago R.L.C. Paixão. Flow injection analysis of free glycerol in biodiesel using a copper electrode as an amperometric detector. *Fuel*, 91(1):187 – 191, 2012.
- [34] Sidnei G. Silva; Ángel Morales-Rubio; Miguel de La Guardia; Fábio R. P. Rocha. Sequential spectrofluorimetric determination of free and total glycerol in biodiesel in a multicommuted flow system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401:365–371, 2011.
- [35] Mauricio S. Ribeiro and Fábio R.P. Rocha. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. *Microchemical Journal*, 106:23 – 26, 2013.
- [36] Marcelo B. Lima, Matías Insausti, Claudia E. Domini, Marcelo F. Pistonesi, Mário C. Ugulino de Araújo, and Beatriz S. Fernández Band. Automated flow-batch method

- for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. *Talanta*, 89:21 – 26, 2012.
- [37] Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, Marcelo Fabián Pistonesi, Mário César Ugulino de Araújo, and Beatriz Susana Fernández Band. Eco-friendly sonoluminescent determination of free glycerol in biodiesel samples. *Talanta*, 114:38 – 42, 2013.
- [38] Hubert Schardin. Toepler’s schlieren method: Basic principles for its use and quantitative evaluation. Technical report, David Taylor Model Basin Reports - United States Navy, jul 1947.
- [39] D. Betteridge, E. L. Dagless, B. Fields, and N. F. Graves. A highly sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuous-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per 10⁹ level and a new method of refractometric determinations. *Analyst*, 103:897–908, 1978.
- [40] Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz. Determinação do teor de nacl, glicose e kcl em medicamentos injetáveis por fotometria usando exploração do efeito schlieren em sistemas fia e pls1. Master’s thesis, Universidade Federal da Paraíba, 2010.
- [41] P. H. G. D. Diniz, M. F. Pistonesi, and M. C. U. Araújo. Using ispa-pls and nir spectroscopy for the determination of total polyphenols and moisture in commercial tea samples. *Anal. Methods*, 7:3379–3384, 2015.
- [42] Adriano de Araújo Gomes, Roberto Kawakami Harrop Galv ao, Mário Cesar Ugulino de Araújo, Germano Vêras, and Edvan Cirino da Silva. The successive projections algorithm for interval selection in pls. *Microchemical Journal*, 110:202 – 208, 2013.
- [43] Jiagang Wu, Dingquan Xiao, and Jianguo Zhu. Potassium-sodium niobate lead-free piezoelectric materials: Past, present, and future of phase boundaries. *Chemical Reviews*, 115(7):2559–2595, 2015.

- [44] B.D. Zaitsev, A.A. Teplykh, I.A. Borodina, I.E. Kuznetsova, and E. Verona. Gasoline sensor based on piezoelectric lateral electric field excited resonator. Ultrasonics, 80:96 – 100, 2017.
- [45] Baowei Wang, Xiangcheng Chu, Enzhu Li, and Longtu Li. Simulations and analysis of a piezoelectric micropump. Ultrasonics, 44:e643 – e646, 2006.
- [46] Heiji Kawai. The piezoelectricity of poly (vinylidene fluoride). Japanese Journal of Applied Physics, 8(7):975, 1969.
- [47] Pierre Ueberschlag. Pvdv piezoelectric polymer. Sensor review, 21(2):118–126, 2001.
- [48] Inki Jung, Youn-Hwan Shin, Sangtae Kim, Ji young Choi, and Chong-Yun Kang. Flexible piezoelectric polymer-based energy harvesting system for roadway applications. Applied Energy, 197:222 – 229, 2017.
- [49] Instituto de Química de Rosario. Mvcl: programa para calibración multivariada de primer orden en matlab.
- [50] MathWorks. ipstoolbox.
- [51] David M. Haaland and Edward V. Thomas. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. Analytical Chemistry, 60(11):1193–1202, 1988.
- [52] Cheng-Wen Chang, David A. Laird, Maurice J. Mausbach, and Charles R. Hurburgh. Near-infrared reflectance spectroscopy-principal components regression analyses of soil properties. Soil Science Society of America Journal, 65:480–490, 2001.
- [53] P.C. Williams. Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. Implementation of near-infrared technology., pages 143–167, 1987.

REFERENCIAS

- [54] R.E. Green and D.J. Pain. Potential health risks to adults and children in the {UK} from exposure to dietary lead in gamebirds shot with lead ammunition. Food and Chemical Toxicology, 50(11):4180 – 4190, 2012.
- [55] Marcelo Enrique Conti and Francesco Botrè. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. Environmental Monitoring and Assessment, 69(3):267–282, 2001.
- [56] A. Badiou-Bénéteau, A. Benneveau, F. Gèret, H. Delatte, N. Becker, J.L. Brunet, B. Reynaud, and L.P. Belzunces. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. Environment International, 60:31 – 41, 2013.
- [57] Maria I.Nieva Moreno, Maria I. Isla, Antonio R. Sampietro, and Marta A. Vattuone. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of argentina. Journal of Ethnopharmacology, 71(1):109 – 114, 2000.
- [58] Rajibul Arif Laskar, Ismail Sk, Nayan Roy, and Naznin Ara Begum. Antioxidant activity of indian propolis and its chemical constituents. Food Chemistry, 122(1):233 – 237, 2010.
- [59] Juan J. De la Canal. Código Alimentario Argentino. De La Canal, 3rd edition, 2008.
- [60] Vagner Bezerra dos Santos, Elson Luiz Fava, Osmundo Dantas Pessoa-Neto, Silmara Rossana Bianchi, Ronaldo Censi Faria, and Orlando Fatibello-Filho. A versatile and robust electrochemical flow cell with a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of zn^{2+} and pb^{2+} ions in water samples. Anal. Methods, 6:8526–8534, 2014.
- [61] Vagner Bezerra dos Santos, Elson Luiz Fava, Newton Sa de Miranda Curi, Ronaldo Censi Faria, Thiago Brito Guerreiro, and Orlando Fatibello-Filho. An electrochemical analyzer for in situ flow determination of $pb(ii)$ and $cd(ii)$ in lake water with on-line data transmission and a global positioning system. Anal. Methods, 7:3105–3112, 2015.

- [62] Vagner B. dos Santos, Elson L. Fava, Newton S. de Miranda Curi, Ronaldo C. Faria, and Orlando Fatibello-Filho. A thermostated electrochemical flow cell with a coupled bismuth film electrode for square-wave anodic stripping voltammetric determination of cadmium(ii) and lead(ii) in natural, wastewater and tap water samples. Talanta, 126:82 – 90, 2014.
- [63] Gastón Darío Pierini, Adrian Marcelo Granero, María Susana Di Nezio, María Eugenia Centurión, María Alicia Zon, and Héctor Fernández. Development of an electroanalytical method for the determination of lead in argentina raw propolis based on bismuth electrodes. Microchemical Journal, 106:102 – 106, 2013.
- [64] Gastón D. Pierini, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio, and María E. Centurión. A pencil-lead bismuth film electrode and chemometric tools for simultaneous determination of heavy metals in propolis samples. Microchemical Journal, 125:266 – 272, 2016.
- [65] Wei-Song Wang, Wei-Ting Kuo, Hong-Yi Huang, and Ching-Hsing Luo. Wide dynamic range cmos potentiostat for amperometric chemical sensor. Sensors, 10(3):1782, 2010.
- [66] Yun-Tao Liu, Min Chen, Zhi-Chao Li, Ying Wang, and Jie Chen. A high dynamic range analog-front-end {IC} for electrochemical amperometric and voltammetric sensors. Microelectronics Journal, 46(8):716 – 722, 2015.
- [67] C. Mc Caffrey, K. Twomey, and V.I. Ogurtsov. Development of a wireless swallowable capsule with potentiostatic electrochemical sensor for gastrointestinal track investigation. Sensors and Actuators B: Chemical, 218:8 – 15, 2015.
- [68] Si Qin, Miranda Van der Zeyden, Weite H. Oldenziel, Thomas I.F.H. Cremers, and Ben H.C. Westerink. Microsensors for in vivo measurement of glutamate in brain tissue. Sensors, 8(11):6860, 2008.

REFERENCIAS

- [69] Elias M. Avdikos, Mamas I. Prodromidis, and Constantinos E. Efstathiou. Construction and analytical applications of a palm-sized microcontroller-based amperometric analyzer. Sensors and Actuators B: Chemical, 107(1):372 – 378, 2005.
- [70] Yan Shi, Huifang Dou, Anhong Zhou, and YangQuan Chen. Design and fabrication of a miniaturized electrochemical instrument and its preliminary evaluation. Sensors and Actuators B: Chemical, 131(2):516 – 524, 2008.
- [71] Sylvia Kwakye and Antje Baeumner. An embedded system for portable electrochemical detection. Sensors and Actuators B: Chemical, 123(1):336 – 343, 2007.
- [72] J.C. Miller and J.N. Miller. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Education, fourth edition, 2002.
- [73] UNESCO, 2016. Blueprint for The Future We Want, Facts and figures on marine biodiversity.
- [74] Salvador Climent, Juan Vicente Capella, Nirvana Meratnia, and Juan José Serrano. Underwater sensor networks: A new energy efficient and robust architecture. Sensors, 12(1):704–731, 2012.
- [75] Milica Stojanovic. Acoustic (underwater) communications. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [76] Milica Stojanovic and James Preisig. Underwater acoustic communication channels: Propagation models and statistical characterization. Communications Magazine, IEEE, 47(1):84–89, 2009.
- [77] L. Freitag, M. Grund, S. Singh, J. Partan, P. Koski, and K. Ball. The whoi micro-modem: an acoustic communications and navigation system for multiple platforms. In Proceedings of OCEANS 2005 MTS/IEEE, pages 1086–1092 Vol. 2, Sept 2005.
- [78] Paul C Etter. Underwater acoustic modeling and simulation. CRC Press, 2013.

- [79] Youngtae Noh, Uichin Lee, Seongwon Han, Peng Wang, David Torres, Jinwhan Kim, and Mario Gerla. Dots: A propagation delay-aware opportunistic mac protocol for mobile underwater networks. Mobile Computing, IEEE Transactions on, 13(4):766–782, 2014.
- [80] Tadashi Ebihara and Keiichi Mizutani. Underwater acoustic communication with an orthogonal signal division multiplexing scheme in doubly spread channels. Oceanic Engineering, IEEE Journal of, 39(1):47–58, 2014.
- [81] Ning Li, José-Fernán Martínez, Juan Manuel Meneses Chaus, and Martina Eckert. A survey on underwater acoustic sensor network routing protocols. Sensors, 16(3):414, 2016.
- [82] Changho Yun and Yong-kon Lim. Aso-tdma: ad-hoc self-organizing tdma protocol for shipborne ad-hoc networks. EURASIP Journal on Wireless Communications and Networking, 2012(1):1–13, 2012.
- [83] Nitthita Chirdchoo, Wee-Seng Soh, and Kee Chaing Chua. Aloha-based mac protocols with collision avoidance for underwater acoustic networks. In INFOCOM 2007. 26th IEEE International Conference on Computer Communications. IEEE, pages 2271–2275. IEEE, 2007.
- [84] Xiaoxing Guo, Michael R Frater, and Michael J Ryan. A propagation-delay-tolerant collision avoidance protocol for underwater acoustic sensor networks. In OCEANS 2006-Asia Pacific, pages 1–6. IEEE, 2007.
- [85] Dong Fang, Yu Li, Haining Huang, and Li Yin. A csma/ca-based mac protocol for underwater acoustic networks. In Wireless Communications Networking and Mobile Computing (WiCOM), 2010 6th International Conference on, pages 1–4. IEEE, 2010.
- [86] Phil Karn. Maca-a new channel access method for packet radio. In ARRL/CRRL Amateur radio 9th computer networking conference, pages 134–140, 1990.

- [87] Joe Rice, Bob Creber, Chris Fletcher, Paul Baxley, Ken Rogers, Keyko McDonald, Dave Rees, Michael Wolf, Steve Merriam, Rami Mehio, et al. Evolution of seaweb underwater acoustic networking. In Oceans 2000 MTS/IEEE Conference and Exhibition, volume 3, pages 2007–2017. IEEE, 2000.
- [88] Vaduvur Bharghavan, Alan Demers, Scott Shenker, and Lixia Zhang. Macaw: a media access protocol for wireless lan’s. ACM SIGCOMM Computer Communication Review, 24(4):212–225, 1994.
- [89] Dario Pompili, Tommaso Melodia, and Ian F Akyildiz. A cdma-based medium access control for underwater acoustic sensor networks. Wireless Communications, IEEE Transactions on, 8(4):1899–1909, 2009.
- [90] ITU, 2016. M.1371 : Technical characteristics for an automatic identification system using time-division multiple access in the VHF maritime mobile band.
- [91] Affan A Syed, John S Heidemann, et al. Time synchronization for high latency acoustic networks. In Proceedings IEEE INFOCOM 2006. 25TH IEEE International Conference on Computer Communications, pages 1–12, 2006.
- [92] Chao Lv, Shuo Wang, Min Tan, and Lan Chen. Ua-mac: an underwater acoustic channel access method for dense mobile underwater sensor networks. International Journal of Distributed Sensor Networks, 2014.
- [93] Zhendong Shao, Roger K Yeh, and David Zhang. The $l(2, 1)$ -labeling on graphs and the frequency assignment problem. Applied Mathematics Letters, 21(1):37–41, 2008.
- [94] Roald Otnes, Alfred Asterjadhi, Paolo Casari, Michael Goetz, Thor Husoy, Ivor Nissen, Knut Rimstad, Paul Van Walree, and Michele Zorzi. Underwater acoustic networking techniques. Springer, 2012.

- [95] Jack Burbank, David Mills, and William Kasch. Network time protocol version 4: Protocol and algorithms specification. RFC 5905, Internet Requests for Comments, 2010.
- [96] Sudarshan Vasudevan, Jim Kurose, and Don Towsley. Design and analysis of a leader election algorithm for mobile ad hoc networks. In Network Protocols. ICNP 2004. Proceedings of the 12th IEEE International Conference on, pages 350–360. IEEE, 2004.
- [97] Hai-Heng Ng, Wee-Seng Soh, and Mehul Motani. Maca-u: A media access protocol for underwater acoustic networks. In Global Telecommunications Conference, 2008. IEEE GLOBECOM 2008. IEEE, pages 1–5. IEEE, 2008.
- [98] EvoLogic. S2CM Modem Series.