



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

“DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

APLICADOS A LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE

CALIDAD EN COMBUSTIBLES BIODIESEL/DIESEL”

Lic. Matías Insausti

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Química, 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 ámbito del INQUISUR y el Departamento de Química durante el periodo comprendido entre abril del 2010 y febrero de 2015, bajo la dirección de la Dr. Beatriz Susana Fernández Band, Profesora Titular de Química Analítica.

Lic. Insausti Matías



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Fernández Band mi más sincero agradecimiento por haber sido la persona que me aconsejó, estimuló y más tarde hizo posible que pudiera concretar esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), por el financiamiento de los trabajos.

A los jurados Dr. Mariano Garrido (UNS) y Dr. Héctor Goicoechea (UNL) por sus valorables críticas y sugerencias para la versión final del manuscrito. Un especial agradecimiento por este privilegio.

A mis compañeros del Área III, Química Analítica, por todo su apoyo.

A mi esposa, padres y mi hermano por el ánimo y por creer siempre en mí.

A todos MUCHAS GRACIAS!!

RESUMEN

La tendencia actual de los Laboratorios de Control de Calidad es la implementación de métodos analíticos versátiles, rápidos, sensibles, precisos, simples, fáciles de operar y de bajo costo. Una de las maneras más efectivas de alcanzar tales características es la automatización y la ayuda de herramientas estadísticas aplicadas a la química. En este trabajo de tesis se presenta el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la caracterización de muestras de combustibles diesel.

En la primera parte del trabajo se realizó la cuantificación de glicerina en biodiesel, basándose en la automatización de la extracción y determinación del analito mediante Fluorescencia Molecular. Comprobamos que la determinación que se lleva a cabo en los laboratorios de análisis de rutina de combustibles usando cromatografía líquida, puede ser realizada de manera sencilla y con resultados similares usando el método propuesto, que posee una cámara de agitación automática y un Espectrofluorímetro.

Continuando con la técnica de Fluorescencia, se hicieron espectros de fluorescencia sincrónica a muestras de biodiesel obtenidas de diferentes aceites comerciales (soja, girasol, etc.) con el objeto de hacer una clasificación de combustibles biodiesel con respecto a la oleaginosa de su procedencia: La información que producen los espectros antes mencionados, fue modelada mediante los algoritmos quimiométricos de clasificación SIMCA y SPA-LDA.

También se utilizaron espectros de fluorescencia sincrónica para la determinación cuantitativa de parámetros de calidad. Se determinaron 4 parámetros de calidad simultáneamente (Porcentaje de Biodiesel, Número de cetanos, Calor de combustión, Color) a partir de un espectro de fluorescencia sincrónica.

En la última parte de la tesis, se trabajó en la determinación cuantitativa de un aditivo presente en combustibles biodiesel/diesel. Se determinó el mejorador del número de cetanos, el 2-nitrato de etilhexilo a partir de espectros de fluorescencia de excitación - emisión. Esta relación entre los valores de fluorescencia y el contenido del aditivo mejorador de cetanos fue realizada mediante algoritmos quimiométricos de calibración multivariada.

ABSTRACT

The current trend of quality control in laboratories is the implement of versatile, fast, sensitive, accurate, simple, easy to operate and inexpensive analytical methods. One of the most effective ways to achieve these features is the automation with the statistical tools applied to chemistry help. In this thesis the development of new analytical methods for the characterization of diesel fuel samples is presented.

In the first part, the quantification of glycerol in biodiesel was performed, based on automating the extraction and determination of analyte by molecular fluorescence. We found that the determination is carried out in the laboratories of routine analysis of fuels using liquid chromatography, can be performed easily and with similar results using the proposed method, which has an automatic stirring chamber adapted in a spectrofluorometer.

Then the technique of synchronous fluorescence was used to obtain spectra from different commercial biodiesel oils (soybean, sunflower, etc.) samples in order to do a biodiesel fuel classification regarding its origin of oilseed: The information produced by the above mention spectra, was modelling using chemometric algorithms of classification, SIMCA and SPA-LDA.

Synchronous fluorescence spectra for quantitative determination of quality parameters were also used. Simultaneously four quality parameters (Biodiesel content, Cetane Number, Heat of combustion, Color) from a synchronous fluorescence spectrum were determined.

In the last part of the thesis, we worked on the quantitative determination of an additive in biodiesel / diesel fuels. The cetane number improver 2-ethylhexyl nitrate was determined from fluorescence excitation - emission spectra. This relationship between the fluorescence values and the content of the cetane improver additive was performed by multivariate chemometric calibration algorithms.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| 1.Introducción..... | 1 |
| 1.1. Contexto energético y crisis actual | 1 |
| 1.2. Control de calidad de combustibles..... | 3 |
| 1.3. Biodiesel | 4 |
| 1.3.1. Reacción de transesterificación..... | 7 |
| 1.3.2. Materias primas | 7 |
| 1.3.2.1. Triacilglicéridos..... | 8 |
| 1.3.2.2. Mono y diacilglicéridos..... | 9 |
| 1.3.2.3. Ácidos grasos | 10 |
| 1.3.2.4. Material insaponificable | 12 |
| 1.3.3. Ventajas del biodiesel..... | 13 |
| 1.3.3.1. Biodegradabilidad..... | 13 |
| 1.3.3.2. Toxicidad..... | 14 |
| 1.3.3.3. Energía renovable. | 14 |
| 1.3.3.4. Balance energético..... | 14 |
| 1.3.3.5. Rendimiento del motor y emisiones contaminantes..... | 14 |
| 1.3.3.6. Autoabastecimiento energético. | 15 |
| 1.3.4. Desventajas del biodiesel | 15 |
| 1.3.4.1. Medioambientales. | 15 |
| 1.3.4.2. Rendimiento del motor y emisiones contaminantes..... | 15 |
| 1.4. Combustibles mezcla de Biodiesel/diesel..... | 16 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.4.1. | Parámetros de calidad del biodiesel/diesel..... | 17 |
| 1.5. | Técnicas luminiscentes..... | 20 |
| 1.6. | Espectrometría de fluorescencia..... | 21 |
| 1.6.1. | Espectrometría de Fluorescencia molecular..... | 22 |
| 1.6.2. | Espectrometría de fluorescencia sincrónica (SFS)..... | 22 |
| 1.6.3. | Espectrometría de fluorescencia aplicada al análisis de biodiesel/diesel y derivados de petróleo..... | 27 |
| 1.7. | Objetivo general..... | 28 |
| 2. | Capítulo 2: Determinación de glicerina en Biodiesel - Automatización..... | 30 |
| 2.1. | Objetivo..... | 30 |
| 2.2. | Introducción..... | 30 |
| 2.2.1. | Automatización..... | 30 |
| 2.2.2. | Problemática actual..... | 33 |
| 2.3. | Sección experimental..... | 35 |
| 2.3.1. | Instrumentación..... | 35 |
| 2.3.2. | Reactivos y muestras..... | 36 |
| 2.3.3. | Sistema <i>Flow-batch (FB)</i> | 36 |
| 2.3.4. | Procedimiento FB..... | 38 |
| 2.3.5. | Procedimiento cromatográfico..... | 40 |
| 2.4. | Resultados y discusión..... | 40 |
| 2.4.1. | Optimización..... | 40 |
| 2.4.2. | Parámetros analíticos..... | 42 |
| 2.5. | Validación..... | 44 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.5.1. | Estudio de recuperación | 44 |
| 2.5.2. | Muestras reales | 45 |
| 2.6. | Conclusiones parciales | 46 |
| 3. | Capítulo 3: Clasificación de muestras de biodiesel - Fluorescencia | 49 |
| 3.1. | Objetivo | 49 |
| 3.2. | Introducción general de quimiometría | 49 |
| 3.2.1. | Análisis Multivariante | 49 |
| 3.2.1.1. | Construcción de modelos | 50 |
| 3.2.2. | Elección de los conjuntos de calibración, validación y predicción | 52 |
| 3.2.3. | Pretratamiento de los datos registrados | 52 |
| 3.2.4. | Métodos inversos de calibración multivariada: Métodos clásico e inverso | 54 |
| 3.2.4.1. | Regresión Lineal Múltiple (MLR) | 54 |
| 3.2.4.2. | Regresión en componentes principales (PCR) | 55 |
| 3.2.4.3. | Regresión parcial por mínimos cuadrados | 58 |
| 3.2.4.4. | Elección del número óptimo de componentes principales o factores | 60 |
| 3.2.5. | Métodos con selección de variables | 61 |
| 3.2.5.1. | Métodos secuenciales o (deterministas) | 62 |
| 3.2.5.1.1. | Stepwise | 62 |
| 3.2.5.1.2. | Algoritmo de las proyecciones sucesivas | 63 |
| 3.2.5.2. | Métodos de optimización estocásticos | 64 |
| 3.2.5.3. | Algoritmos genéticos | 65 |
| 3.2.5.4. | Evaluación de la capacidad predictiva del modelo | 66 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.2.6. | Algoritmos de clasificación..... | 68 |
| 3.2.6.1. | No supervisado | 68 |
| 3.2.6.2. | Supervisado | 69 |
| 3.2.7. | Limitaciones de la calibración multivariante | 70 |
| 3.3. | Introducción a la problemática actual | 71 |
| 3.4. | Experimental | 74 |
| 3.4.1. | Muestras..... | 74 |
| 3.4.2. | Adquisición de espectros | 74 |
| 3.4.3. | Software | 75 |
| 3.5. | Resultados y discusión | 75 |
| 3.5.1. | Elección del $\Delta\lambda$ | 75 |
| 3.5.2. | Análisis exploratorio..... | 78 |
| 3.5.3. | Clasificación..... | 79 |
| 3.6. | Conclusiones | 82 |
| 4. | Capítulo 4: determinación de parámetros de calidad en combustibles diesel - Quimiometría | 85 |
| 4.1. | Objetivo..... | 85 |
| 4.2. | Introducción | 85 |
| 4.2.1. | Parámetros de calidad de las mezclas biodiesel / diesel..... | 88 |
| 4.2.1.1. | Porcentaje de biodiesel | 88 |
| 4.2.1.2. | Número de cetano (CN) | 88 |
| 4.2.1.3. | Calor de combustión Gross | 89 |
| 4.2.1.4. | Color..... | 89 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3. | Experimental | 90 |
| 4.3.1. | Instrumentación | 90 |
| 4.3.2. | Reactivos | 91 |
| 4.3.3. | Muestras..... | 91 |
| 4.4. | Resultados y discusión | 92 |
| 4.4.1. | Adquisición de espectros de fluorescencia sincrónica..... | 92 |
| 4.4.2. | Modelos quimiométricos..... | 93 |
| 4.5. | Calidad de la predicción | 98 |
| 4.6. | Conclusiones | 99 |
| 5. | Capítulo 5: Determinación del aditivo mejorador del número de cetanos en combustibles biodiesel/diesel por medio de un espectro excitación-emisión de fluorescencia. | 101 |
| 5.1. | Objetivo..... | 101 |
| 5.2. | Introducción | 101 |
| 5.3. | Experimental | 104 |
| 5.3.1. | Instrumental | 104 |
| 5.3.2. | Muestras..... | 104 |
| 5.3.3. | Adquisición de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia | 105 |
| 5.3.4. | Quimiometría | 106 |
| 5.4. | Resultados y discusión | 107 |
| 5.4.1. | Modelaje quimiométrico..... | 107 |
| 5.4.2. | Muestras comerciales..... | 109 |
| 5.5. | Conclusiones parciales..... | 111 |
| 6. | CONCLUSIONES FINALES | 112 |

| | |
|--|------------|
| 7. Anexo..... | 115 |
| 7.1. Trabajos publicados..... | 115 |
| 7.1.1. Congresos..... | 115 |
| 7.1.2. Revistas internacionales | 116 |
| 7.2. Enviados para publicación | 116 |

1. Capítulo 1: Introducción General

1.1. Contexto energético y crisis actual

Actualmente, debido a la necesidad de sustitución de importaciones y la diversificación de la matriz energética nacional, los combustibles fósiles son mezclados con biocombustibles. En 2006 se publicó la Ley de Biocombustibles 26.093¹, cuyo enfoque era el desarrollo de un mercado de biocombustibles para consumo interno, estableciéndose cortes obligatorios de 5% de biodiesel. Las importaciones de combustible superarán este año los US\$ 13.000 millones. La secretaría de Energía mediante la resolución 44 publicada en el Boletín Oficial de julio 2010, recurre a los biocombustibles para gastar menos dólares en la importación de los combustibles tradicionales. La medida obliga a las petroleras a elevar del actual 5% de biocombustible por litro de naftas y gasoil, y 7% a partir del 1 de diciembre de 2010. Luego la Resolución 1125 impone que a partir del 1 de febrero de 2014 el corte sea no menor al 10% de biodiesel. Los considerandos de la norma dicen que la medida se toma para diversificar la matriz energética y ampliar la influencia de las llamadas energías renovables, no derivadas de los hidrocarburos más contaminantes. También se está estudiando aumentar al 20% el corte del gasoil con biodiesel para camiones y tractores. Además cabe aclarar que Argentina es el primer exportador mundial de biodiesel.

La producción de biodiesel se ha incrementado sustancialmente en los últimos años en los países miembros de Europa. Brasil y Argentina son actualmente tercer y cuarto país con mayor producción de biodiesel (80% de la producción mundial), después de la Unión Europea y los Estados Unidos. La mayor parte del biodiesel de la Argentina y Brasil es ya destinado a los mercados extranjeros.

Por lo manifestado anteriormente, Argentina es un país que se encuentra en pleno crecimiento en lo que respecta al tema biocombustibles y se estima que el mega yacimiento de gas y petróleo no convencional “Vaca Muerta” podría transformar a la Argentina en el tercer productor mundial de hidrocarburos no convencionales. Es por esto que día a día se crean nuevas problemáticas y desafíos, en busca de mejoras en la producción, calidad del combustible, transporte y comercialización del

¹ Ley Argentina 26.093. REGIMEN DE REGULACION Y PROMOCION PARA LA PRODUCCION Y USO SUSTENTABLES DE BIOCMBUSTIBLES. Promulgada de Hecho: Mayo 12 de 2006.

producto. Este crecimiento acelerado es necesario que se acompañe de nuevas tecnologías y desarrollos en un horizonte de tiempo inmediato.

Dadas las características y dinámica del sistema capitalista actual, crecen cada vez más los interrogantes en torno a la sustentabilidad del planeta y el abastecimiento energético, temas que se encuentran estrechamente vinculados entre sí. La cuestión energética se ubica como uno de los temas más relevantes de la agenda internacional, debido a la incidencia decisiva que tiene en la base del modelo económico vigente. El aumento del precio del petróleo, la caída de las reservas y el mercado en el cual un número reducido de países (pertenecientes a la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP)) ejercen un control sobre el precio y acaparan la venta del crudo, no hicieron más que evidenciar la estrecha dependencia que se tiene de este recurso. Estos hechos pusieron de manifiesto la alta “sensibilidad” experimentada por los países importadores, a partir del aumento del precio del barril de petróleo.

Un informe de la Agencia Internacional de Energía (AIE)² señala que si los gobiernos del mundo mantienen las actuales políticas y tendencia de consumo, las necesidades energéticas mundiales para 2030 superarán en más de un 50% a las hoy existentes. China e India en su conjunto, representarían el 45% de esa nueva demanda. Por lo tanto, debido a la posible extinción a mediano plazo del aprovisionamiento de estas reservas fósiles y la creciente concientización mundial referida a la protección del medio ambiente, hacen que el desarrollo de programas se focalice en investigar, planificar y desarrollar acciones cuyos objetivos es el de contar con combustibles provenientes de recursos renovables. Para ello, el uso de biocarburantes (biodiesel, bioalcohol, etc.) puede ser una fuente prometedora en la reducción de gases contaminantes.

El mercado de biocombustibles líquidos se encuentra dentro de un mercado de mayor relevancia que es el de la biomasa. Este pertenece a un grupo más amplio de energías denominadas “energías renovables”, que incluye la energía eólica, solar (térmica y fotovoltaica), hidráulica, mareomotriz y geotérmica. Todas estas fuentes constituyen alternativas a los combustibles fósiles (energías no

² International Energy Agency publications [Internet]
<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Spanish.pdf>

renovables). El mercado de biocombustibles líquidos se presenta de esta manera, como una alternativa viable y sustentable en contextos de incertidumbre económica y ambiental.

1.2. Control de calidad de combustibles

Para asegurar el correcto funcionamiento en los vehículos, el combustible debe cumplir con las especificaciones correspondientes que deben certificarse por parte de su proveedor. Cuando el combustible se obtiene a partir de la mezcla de dos combustibles diferentes, como es el caso de la mezcla diesel biodiesel, existirán especificaciones de calidad para la mezcla y para los combustibles que la componen por separado. Las empresas petroleras que compren el biodiesel para mezclarlo con el diesel que ellas produzcan, deberán exigir al productor de biodiesel que cumpla con las especificaciones de calidad correspondientes.

Los grandes productores de biodiesel generalmente podrán acceder a una certificación de calidad a través de alguna entidad reconocida internacionalmente y, con un contrato de por medio, puede asegurar la calidad del biodiesel producido. Sin embargo, también puede suceder que el gobierno lo exija a las empresas petroleras que compren el biodiesel a productores no certificados (pequeños productores locales). En este caso el comprador debería asegurar la calidad del biodiesel realizando él mismo los controles de calidad en planta.

El análisis y control de combustibles es una actividad fundamental para conseguir y garantizar la calidad de los mismos. A tales fines, es un constante desafío, tanto de las refinerías o plantas de producción, como de los laboratorios que ejercen el respectivo control, la implementación de métodos rápidos, sencillos y confiables para el monitoreo de las distintas etapas que comprende la producción de un combustible, desde la recepción de la materia prima hasta que el mismo se encuentra listo para el expendio y consumo.

Según la norma ISO 9000 “Calidad es la capacidad de un conjunto de características intrínsecas para satisfacer requisitos”³. Debido a la importancia que ha cobrado la calidad en los sectores industrial y de servicios, se han desarrollado una serie de herramientas para tratar lo relacionado con la calidad.

³ Norma internacional de la Organización Internacional de Normalización ISO 9000:2005,

La Gestión de Calidad, entendida como el conjunto de actividades dirigidas a fijar objetivos y responsabilidades, y asegurar que éstos se cumplan mediante un plan estratégico, se ha convertido en una parte muy importante de la gestión general de cualquier organización.

1.3. Biodiesel

El biodiesel es el nombre de un biocombustible alternativo de combustión limpia producida a partir de recursos renovables. En general, se produce a través de un proceso químico llamado "transesterificación", en el que se separa la glicerina de la grasa o aceite vegetal. El proceso genera dos productos mayoritarios: ésteres metílicos (biodiesel) y glicerina⁴. En virtud de la norma ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials)⁵, el biodiesel B100 se define como combustible compuesto por mono-alquil ésteres derivados de aceite vegetal o grasa animal, para su uso en motores diesel. De acuerdo con Knothe, el término biodiesel fue utilizado por primera vez en la literatura científica en un artículo chino del año 1988⁶. Es una alternativa a los combustibles a base de petróleo, lo que implica una menor dependencia de las importaciones extranjeras de petróleo crudo, la reducción en la emisión de gases de efecto invernadero adecuándose a los lineamientos del Protocolo Kyoto⁷ y obtenido de fuentes renovables.

La idea de utilizar combustibles provenientes de la biomasa en motores diesel fue contemplada desde los mismos orígenes de la tecnología de fabricación de dichos motores. Es célebre la referencia histórica sobre la presentación de un motor diesel funcionando con aceite de cacahuete (maní) en la feria de Paris del año 1900. Tal demostración fue llevada a cabo con el patrocinio del gobierno francés que estaba interesado en que sus colonias africanas fueran autosuficientes en el consumo de combustibles⁸. Sin embargo, algunas propiedades inherentes a la naturaleza química de los aceites

⁴ Kinetics of the NaOH-catalyzed transesterification with ethanol to produce biodiesel. Reyero I. Fuel Processing Technology, 129 (2015) 147-155.

⁵ ASTM D6751-12. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels.

⁶ Development of biodiesel fuel. Wang, R. Taiyangneng Xuebao 9 (1998) 434-436.

⁷ Protocolo de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) sobre las emisiones de gases de efecto invernadero, 1997.

⁸ The history of vegetable oil-based fuels. En: The Biodiesel Handbook. AOCS Press, Champaign (Illinois), Knothe, G., pág: 4-16. 2005.

vegetales, principalmente su alta viscosidad y baja volatilidad, conducen a una serie de inconvenientes técnicos que limitan la utilización de estos biocombustibles directamente en el motor, especialmente en aquellos de inyección directa. La elevada viscosidad de los aceites (del orden de 10 veces o más, superior a la del combustible diesel convencional) dificulta el proceso de atomización. El elevado punto final de la curva de destilación, sumado a la pobre atomización del combustible, conduce a que la evaporación no sea completa y a que los procesos de mezclado y combustión sean deficientes (formación de partículas y depósitos carbónicos). Debido a las altas temperaturas que se pueden alcanzar en la cámara de combustión, el aceite puede experimentar descomposición térmica, previa a la combustión, que también contribuye a la formación de depósitos en inyectores, cámara, pistones y válvulas. Adicionalmente, puede pasar aceite sin quemar al cárter del motor diluyendo y deteriorando el aceite lubricante^{9 10 11 12}.

Dado que con la utilización de mezclas aceite vegetal-combustible diesel en motores modernos se pueden presentar dificultades similares a las reportadas para los aceites puros, la opción más recomendada ha sido la transformación del aceite, de tal modo que se obtenga un combustible con propiedades parecidas a las del combustible diesel convencional. En este sentido se han planteado alternativas como la descomposición térmica del aceite o pirolisis¹³, la preparación de microemulsiones¹⁴ y la transformación de los triglicéridos (triésteres) en mezclas de ésteres simples o monoalquilésteres de ácidos grasos (transesterificación)¹⁵¹⁶. La ruta oleoquímica planteada en la

⁹ Performance and emissions characteristics of a naturally aspirated Diesel engine with vegetable oils. SAE paper No. 810262. Barsic, N., Humke, A. 1981.

¹⁰ Los aceites vegetales y sus esteres metílicos como combustibles. Ingeniería Química, 151-157. García, A., Cunill, F., Tejero, J. 1995.

¹¹ Biodiesel production: a review. Ma, F., Hanna, M. Bioresource Technology, 70 (1999) 1-15.,

¹² Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. Shay, E. Biomass and Bioenergy 4 (1993) 227-242.,

¹³ Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil. Schwab, A., Dykstra, G., Selke, E., Sorenson, S., Pryde, E. JAOCS, 65(1988) 1781-1785.

¹⁴ Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion. Ziejewski, M., Kaufman, K., Schwab, A., Pryde, E.. JAOCS 61 (1984) 1620-1626.

¹⁵ Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. Schwab, A., Bagby, M., Freedman, B. Fuel, 66(1987) 1372-1378.

¹⁶ Biodiesel production: a review. Ma, F., Hanna, M., Bioresource Technology, 70 (1999) 1-15.

última alternativa es la vía más simple para obtener el combustible que actualmente se denomina biodiesel.

El concepto de biodiesel hoy en día se restringe exclusivamente a mezclas de monoalquilésteres de ácidos grasos obtenidos a partir de lípidos renovables como aceites y grasas de origen vegetal o animal¹⁷¹⁸. El primer reporte del uso de monoalquilésteres de ácidos grasos como combustible aparece en la patente belga 422.872¹⁹ donde se describen aspectos de la obtención y utilización de etilésteres de aceite de palma¹⁵²⁰²¹. Sin embargo, la patente belga no condujo al desarrollo de la industria del biodiesel en el corto plazo. En 1980 se registraron dos patentes, una brasileña y otra alemana, contemplando la utilización de metilésteres de aceites vegetales como sustitutos del combustible diesel¹⁵. Austria fue el país pionero en la producción de biodiesel y en el desarrollo de estándares de calidad. La primera planta para la producción industrial de biodiesel fue construida en ese país en 1991, utilizando aceite de colza como materia prima, y en ese mismo año el Instituto Austriaco de Estandarización publicó el primer estándar de calidad para metilésteres de ácidos grasos.

¹⁷ Biodiesel: una alternativa al gasóleo mineral. Vicente, G., Martínez, M., Aracil, J. Ingeniería Química, (2001)135-145.

¹⁸ Biodiesel. Mittelbach, M., Remschmidt, C., 2004. The Comprehensive Handbook..

¹⁹ Patente belga 422.872 otorgada el 31 de agosto de 1937 al investigador G. Chavanne de la Universidad de Bruselas.

²⁰ The history of vegetable oil-based fuels. Boersdruck Ges.m.b.H. Viena.; Knothe, G., 2005.

²¹ The Biodiesel Handbook. AOCS Press, Champaign (Illinois) (2009) 4-16.

1.3.1. Reacción de transesterificación

La reacción de transesterificación de un aceite vegetal da como productos ésteres de ácidos grasos o biodiesel.

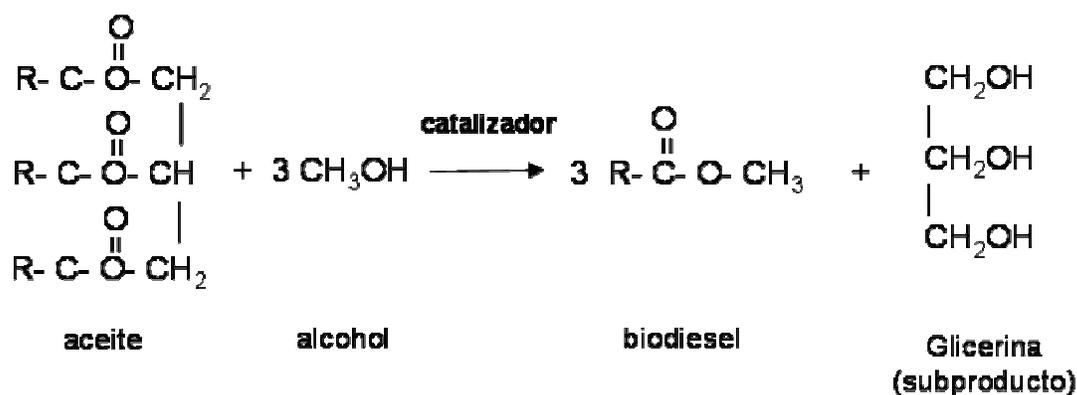


Figura 1A. Reacción de transesterificación

Los catalizadores usados en el proceso son necesarios para que ocurra la reacción de transesterificación y sea posible alcanzar una alta velocidad en la producción de biodiesel. Los catalizadores convencionales utilizados a nivel industrial, suelen ser ácidos o bases fuertes (ácido sulfúrico, KOH, NaOH) que permiten obtener una elevada conversión de biodiesel bajo condiciones moderadas de operación (50-70°C).

1.3.2. Materias primas

Los aceites y grasas constituyen las materias primas esenciales para la producción de biodiesel.

En la [Tabla 1A](#) se presentan los tipos de compuestos que normalmente se encuentran en los aceites y grasas.

Tabla 1A. Componentes típicos de los aceites y grasas

| TIPO DE COMPUESTO | | | NOMBRE |
|-------------------|--------------------------|--------------------------------|--|
| MAYORITARIOS | | | Triacilglicéridos (triglicéridos) |
| MINORITARIOS | Material Saponificable | Glicéridos neutros | Diacilglicéridos Monoacilglicéridos Ácidos grasos libres |
| | | Gomas | Fosfolípidos o fosfoglicéridos |
| | Material Insaponificable | Esteroles | Colesterol, fitosterol |
| | | Terpenos y otros hidrocarburos | Polímeros del isopreno (2-metil-1,3-butadieno) |
| | | Vitaminas | Tocoferoles Tocotrienoles |
| | | Colorantes | Carotenos Xantofilas |
| | | Metales | Hierro, cobre |

1.3.2.1. Triacilglicéridos

Los aceites vegetales están constituidos principalmente (95 a 99% en peso) por triacilglicéridos (triésteres), que son moléculas resultantes de la esterificación de la glicerina o glicerol (trialcohol) con tres moléculas de ácidos grasos (véase [Figura 1A](#)). Los grupos sustituyentes R1, R2 y R3 que se muestran ligados al grupo funcional éster (-COO-) en la [Figura 1B](#), son cadenas hidrocarbonadas correspondientes a los ácidos grasos: R1COOH, R2-COOH y R3-COOH. Los triacilglicéridos o triacilgliceroles (conocidos popularmente como triglicéridos) pueden ser simples o mixtos, según sean iguales o distintos los grupos sustituyentes unidos a la molécula de glicerina, respectivamente. Los aceites naturales suelen ser mezclas complejas de ambos tipos de triacilglicéridos.

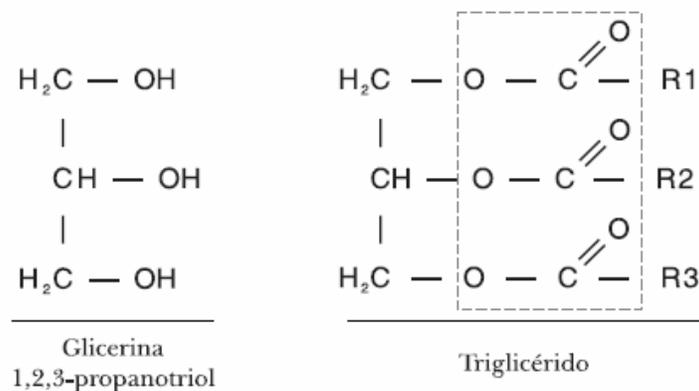


Figura 1B. Estructura química de la glicerina y de un triglicérido típico.

La composición de un aceite o grasa puede expresarse en función de sus triglicéridos constituyentes o de su perfil de ácidos grasos. La primera opción brinda información estructural más detallada ya que permite identificar, además del tipo de ácidos grasos presentes, su forma de distribución en las tres posiciones posibles. Varios aceites pueden tener perfiles similares de ácidos grasos pero diferente contenido de triglicéridos particulares. El tipo de triglicéridos influye directamente en propiedades como el polimorfismo y patrón de cristalización, importantes en la industria de los aceites y grasas. Sin embargo, es más utilizada la composición como ácidos grasos debido a que la identificación de los triglicéridos consume más tiempo experimental y normalmente requiere del uso de varias técnicas analíticas sucesivas. Glicerina o glicerol es el nombre común del compuesto puro 1,2,3-propanodiol, el cual es un líquido incoloro e inodoro de sabor dulce.

1.3.2.2. Mono y diacilglicéridos

La glicerina por poseer tres grupos hidroxilo (OH) puede estar mono, di o triesterificada por los ácidos grasos. El mono y los diacilglicéridos aparecen en la naturaleza en pequeñas cantidades, generalmente como productos intermedios de la síntesis o degradación de los triacilglicéridos. El contenido típico de estos compuestos en los aceites vegetales se encuentra entre 0,3 y 1% en peso²².

²² Química de los alimentos, 4th edición. Salvador Badui Dergal, 2006.

Se suelen usar como emulsionantes en la industria de los alimentos. La Figura 1C muestra ejemplos de su estructura.

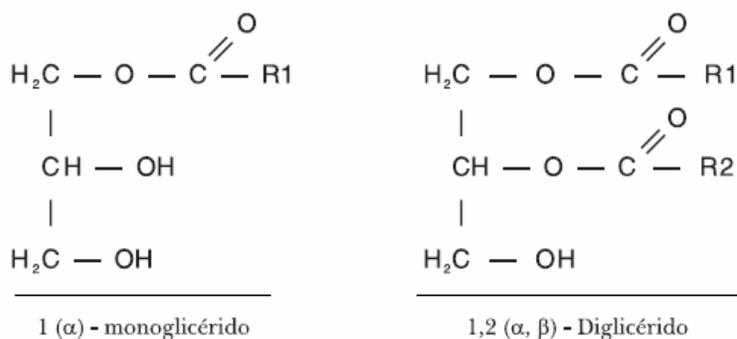


Figura 1C. Estructura química de un monoglicérido y un diglicérido típicos

1.3.2.3. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos que poseen un grupo funcional carboxilo (COOH) y una cadena hidrocarbonada larga que puede tener entre 4 y 36 átomos de carbono. La mayoría de los ácidos grasos naturales son de cadena lineal y tienen número par de átomos de carbono que oscila entre 12 y 24, siendo especialmente abundantes los de 16 y 18. El predominio de los ácidos grasos con número par de átomos de carbono se debe a que su metabolismo se lleva a cabo mediante moléculas de carbono pares, como la acetilcoenzima A²⁰. Se han identificado más de 1.000 ácidos grasos diferentes, pero la mayoría se encuentran en pequeñas proporciones en los productos naturales²³

Las propiedades físicas y químicas de los triacilglicéridos dependen fundamentalmente del tipo, la proporción en que se encuentran y la posición que ocupan los ácidos grasos esterificados. Por cada 100 kg de aceite o grasa se pueden obtener alrededor de 95 kg de ácidos grasos. Los ácidos grasos se

²³ Edible Oil Processing. Hamm, W y Hamilton, H Sheffield: Academic Press(2001)..

pueden liberar naturalmente por la acción de catalizadores biológicos (lipasas) que promueven la hidrólisis de los triacilglicéridos. La presencia de ácidos grasos libres está normalmente asociada con elevadas concentraciones de mono y diglicéridos en el aceite. El contenido de ácidos grasos libres en los aceites y grasas frescos suele variar desde menos de 1% hasta 20% en peso. Para los aceites refinados dicho contenido (acidez) es menor que 0,1%. Los ácidos grasos se diferencian por la longitud de la cadena hidrocarbonada y la presencia de enlaces dobles o de otros grupos funcionales. De acuerdo con la presencia de enlaces dobles se clasifican en dos categorías: saturados que no poseen enlaces dobles, e insaturados que poseen uno (monoinsaturado) o más de estos enlaces (poliinsaturados) a lo largo de su cadena hidrocarbonada. En las [tablas 1B](#) y [1C](#) se presentan los ácidos grasos saturados e insaturados de mayor presencia en los aceites y grasas naturales. Los ácidos grasos insaturados presentan mayor reactividad química que los saturados ya que los dobles enlaces están más propensos a reacciones de oxidación e isomerización.

Tabla 1B. Estructura química de ácidos grasos

| ÁCIDOS GRASOS | ESTRUCTURA | TIPO | FÓRMULA |
|---------------|------------|------|-------------------|
| Caprílico | 8:0 | S | $C_8H_{16}O_2$ |
| Cáprico | 10:0 | S | $C_{10}H_{20}O_2$ |
| Laúrico | 12:0 | S | $C_{12}H_{24}O_2$ |
| Mirístico | 14:0 | S | $C_{14}H_{28}O_2$ |
| Palmítico | 16:0 | S | $C_{16}H_{32}O_2$ |
| Esteárico | 18:0 | S | $C_{18}H_{36}O_2$ |
| Oleico | 18:1 | IS | $C_{18}H_{34}O_2$ |
| Linoleico | 18:2 | IS | $C_{18}H_{32}O_2$ |
| Linolénico | 18:3 | IS | $C_{18}H_{30}O_2$ |
| Araquídico | 20:0 | S | $C_{20}H_{40}O_2$ |
| Behénico | 22:0 | S | $C_{22}H_{44}O_2$ |
| Erúcido | 22:1 | IS | $C_{22}H_{42}O_2$ |
| Lignocérico | 24:0 | S | $C_{24}H_{48}O_2$ |

***S: saturados; IS: insaturados**

Tabla 1C. Composición o peso molecular de ácidos grasos de aceites vegetales.

| Aceites | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 22:1 | Otros |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Maíz | 0,0 | 0,0 | 10,0 | 2,6 | 34,0 | 47,9 | 1,05 | 0,0 | 4,5 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Semilla de algodón | 0,0 | 1,2 | 25,4 | 2,9 | 16,0 | 54,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 |
| Cambre | 0,0 | - | 2,0 | 0,9 | 18,9 | 9,0 | 6,9 | 58,8 | 3,5 |
| Linaza | 0,0 | - | 5,3 | 2,7 | 21,6 | 16,5 | 50,9 | 0,0 | 3,0 |
| Maní | 0,0 | - | 10,2 | 5,1 | 48,0 | 30,6 | 0,8 | 0,2 | 5,1 |
| Cártamo | 0,0 | 0,1 | 7,7 | 2,5 | 12,1 | 77,9 | 0,1 | 0,0 | 0,0 |
| Cártamo alto en oleico | 0,0 | 0,0 | 4,9 | 5,0 | 76,3 | 15,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Sesamo | 0,0 | - | 11,4 | 4,9 | 48,8 | 33,9 | 0,0 | 0,0 | 1,0 |
| Soja | 0,0 | - | 10,2 | 4,1 | 23,5 | 53,7 | 7,0 | 0,0 | 1,5 |
| Girasol | 0,0 | - | 5,7 | 4,1 | 20,5 | 67,3 | 0,6 | 0,0 | 1,8 |
| Babasú | 44,5 | 16,0 | 7,4 | 4,0 | 14,0 | 2,2 | 0,0 | 0,0 | 11,9 |
| Coco | 47,5 | 15,8 | 9,0 | 2,0 | 6,6 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 17,3 |
| Palma | 0,9 | 1,5 | 39,2 | 5,2 | 45,0 | 9,0 | 4,7 | 0,0 | 0,0 |
| Neem | 0,0 | 0,2 | 14,9 | 19,3 | 55,5 | 9,1 | 0,0 | 0,0 | 1,0 |
| Jatropha | 0,0 | - | 10,9 | 3,9 | 45,0 | 37,2 | 0,2 | 0,2 | 2,6 |

1.3.2.4. Material insaponificable

Los lípidos se dividen en saponificables e insaponificables de acuerdo con su capacidad para producir jabones. Los materiales saponificables contienen en su estructura ácidos grasos unidos a otro componente, generalmente, mediante un enlace tipo éster. Los insaponificables no contienen ácidos grasos, aunque pueden incluir en su estructura algunos derivados importantes de éstos. De acuerdo con la [Tabla 1A](#) el material insaponificable que puede estar presente en los aceites vegetales comprende una amplia variedad de compuestos como: terpenos, esteroides, hidrocarburos, vitaminas, colorantes y minerales. Los denominados tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) además de ser fuentes de vitamina E, son las principales sustancias con propiedades antioxidantes presentes de forma natural en los aceites y grasas. Las concentraciones de estos compuestos en aceites y grasas de origen vegetal son del orden de partes por millón (ppm). Los aceites de maíz y soja poseen los más altos niveles de tocoferoles. En las grasas de origen animal no es común detectar la presencia de tocoles. Los carotenos y las xantofilas tienen la propiedad de absorber luz de diferentes longitudes de onda, por lo que pueden actuar como pigmentos o colorantes. Los carotenos varían su color de amarillo a rojo oscuro (entre 500 y 700 ppm). Los carotenos, en particular los β -carotenos, son reconocidos precursores de vitamina A. Los esteroides son compuestos en los cuales se encuentra el grupo químico denominado ciclopentanoperhidrofenantreno ligado a una cadena hidrocarbonada y a un alcohol.

Estos compuestos se encuentran tanto en aceites y grasas vegetales (fitosterol) como animales (colesterol). La mayoría de aceites vegetales contienen entre 1.000 y 5.000 ppm de fitosteroles, ya sean libres o esterificados²¹.

Algunos aceites vegetales contienen azufre haciendo parte de una familia de compuestos denominados genéricamente como glucosinolatos, los cuales se encuentran comúnmente en plantas crucíferas como brócoli, coliflor y nabos. Los glucosinolatos no son tóxicos, sin embargo mediante su hidrólisis enzimática (mirosinas) se pueden generar compuestos de alta toxicidad (isotiocianatos e indoles). Tales compuestos han sido asociados con olores desagradables cuando se calienta el aceite y con envenenamiento de catalizadores en los procesos de hidrogenación²⁴.

1.3.3. Ventajas del biodiesel

1.3.3.1. Biodegradabilidad.

El 98% del combustible es biodegradable²⁵, Peterson y Reece²⁶ comprobaron que el biodiesel de colza europea o de aceite usado es más biodegradable que la dextrosa de referencia (usada como comparativo) y que el gasoil, su biodegradabilidad es 4 – 5 veces superior a la del gasoil. Si se usa el 100% de biodiesel, degrada del 64 al 91% en 14 – 28 días, periodo en el que el gasoil degrada del 15 al 18%. Debido a su rápida biodegradabilidad, su peligrosidad para el agua lo clasifica dentro de la clase 1, según la Normativa de Recursos Acuáticos²⁷ lo que supone una ventaja respecto al transporte y almacenamiento. Por otro lado, su mayor punto de inflamación también contribuye a hacer más seguro el manejo²⁸, ya que es unos 38 °C superior al del gasoil. De este modo, un litro de gasoil puede

²⁴ Effect of vegetable oil oxidation on the hydrogenation reaction process. Faranak K. Manochehr B. Fats and oils 61(2010)4

²⁵ Vegetable oil methyl ester as a diesel substitute. F. Staat and E. Vallet. Chemistry & Industry, 21(1994) 856–863.

²⁶ Biodegradability of Biodiesel in the Aquatic Environment. Peterson, C. L.; Reece. G. ASABE. 41(1998) 1423-1430

²⁷ Sección 19, Párrafo 1 de la Ley de Recursos Acuáticos, Alemania

²⁸ Numerical investigations on the use of waste animal fats as fuel on DI diesel engine. Bousbaa H., Abdelkrim L. Journal of petroleum technology and alternative fuels 4 (2013) 131-142.

contaminar grandes cantidades de agua. En cambio, los aceites vegetales y sus productos también, pero se degradan biológicamente transcurridos varios días.

1.3.3.2. Toxicidad.

No es tóxico²⁹. La toxicidad del biodiesel es, al menos, 15 veces menor que el gasoil o incluso inferior. Además, las técnicas usadas en las plantas transesterificadoras han sido holgadamente probadas, con lo cual los riesgos ambientales son muy bajos³⁰. De hecho, muchos países consideran esencial su uso en zonas protegidas o especialmente sensibles, como los parques naturales, minas (debido a su elevado punto de ignición), mar, etc.

1.3.3.3. Energía renovable.

El biodiesel es un combustible creado a partir de materia orgánica, de este modo, se combate el problema de la extinción de ciertos recursos energéticos.

1.3.3.4. Balance energético.

La energía que produce es más de 2 veces superior a la que se precisa durante el desarrollo del cultivo. Por otro lado, la eficacia de la conversión del biodiesel es de 4:1 mayor a la de los combustibles fósiles en gasoil³¹.

1.3.3.5. Rendimiento del motor y emisiones contaminantes.

En cuanto al motor, proporciona buen rendimiento, disminuye las emisiones de CO, S, humos, partículas, HC sin quemar y compuestos aromáticos. Además, disminuye el ruido y el efecto invernadero, al cerrar el ciclo del dióxido de carbono, ya que el producido es el que consumen las

²⁹ Biodiesel versus diesel exposure: Enhanced pulmonary inflammation, oxidative stress, and differential morphological changes in the mouse lung. Yanamala N, Hatfield M. Shvedova A. Toxicology and Applied Pharmacology 271 (2013) 373-383.

³⁰ Comparison of feedstocks and technologies for biodiesel production: An environmental and techno-economic evaluation. Rincon L. Jaramillos J. Cardona. C. Renewable Energy 69 (2014) 479-487.

³¹ A source of renewable energy in Malaysia, why biodiesel?. Ashnani M. Johari A. Hashim H. Hasani E. Renewable and sustainable energy Reviews 35 (2014) 244-257.

plantas oleaginosas. Con 1 litro de biodiesel se produce el 25% de CO₂ del que emitiría 1 litro de gasoil por lo que su contribución al efecto invernadero es entre 3 y 5 veces menor que el del gasoil. Por otro lado, produce menos CO, posiblemente porque el oxígeno presente en el biodiesel provoca una combustión más eficiente³².

1.3.3.6. Autoabastecimiento energético.

Contribuye a disminuir la dependencia del crudo petrolífero³³, entonces grandes y pequeñas empresas pueden explotar el valor energético del biodiesel en transporte ahorrando hasta un 40 por ciento de dinero anual. El auto-consumo está pensado para empresas de transporte que tienen grandes gastos de gas oil.

1.3.4. Desventajas del biodiesel

1.3.4.1. Medioambientales.

Debido al uso de reactivos como el metanol, se resaltó que el biodiesel no debería ser considerado sin más como un sustituto de los combustibles fósiles, sino que era preciso no olvidar los factores adversos que ocasiona sobre el medio ambiente. En este sentido, se destacó la peligrosidad causada por la inflamabilidad del metanol, tanto en su transporte como en su uso³⁴.

1.3.4.2. Rendimiento del motor y emisiones contaminantes.

Al producir biodiesel aparecen muchos productos de desecho, las emisiones de óxidos de nitrógeno aumentan, el desgaste es mayor, así como la carbonilla en los inyectores. La potencia disminuye en un

³² The effect of additives on properties, performance and emission of biodiesel fuelled compression ignition engine. Raschedul H., Masjuki H., Kalam M., Shahir S.A. Energy conversion and management 88 (2014) 348-364.

³³ Potential non-edible oil feedstock for biodiesel production in Africa: A survey. Yang L., Takase M., Zhang M. Renewable and sustainable energy Reviews 38 (2014) 461-477.

³⁴ Ley Medioambiental y de Seguridad EC, EE.UU., promulgada en 1992.

19%. También se observó que su elevado punto de niebla hace que los motores precisen calentadores para que se mezcle el biodiesel con gasoil o que se añadan supresores del punto de niebla³⁵.

1.4. Combustibles mezcla de Biodiesel/diesel

El biodiésel puede mezclarse con gasóleo procedente de la refinación del petróleo en diferentes cantidades. Se utilizan notaciones abreviadas según el porcentaje por volumen de biodiesel en la mezcla: **B100** en caso de utilizar sólo biodiesel, u otras notaciones como **B5**, **B15**, **B30** o **B50**, donde la numeración indica el porcentaje por volumen de biodiesel en la mezcla.

Las mezclas con 80 por ciento de biodiesel y 20 por ciento de diesel de petróleo (B80) se pueden utilizar en general en motores diesel sin modificar. El biodiesel también puede ser utilizado en su forma pura (B100), pero puede requerir algunas modificaciones del motor para evitar problemas de mantenimiento y rendimiento. Las mezclas de biodiesel (B100) con diesel de petróleo se pueden realizar por diferentes métodos:

- 1) **Mezclado en los depósitos.** Tanto el biodiesel como el diesel de petróleo se llevan a un depósito en la terminal de almacenamiento donde se mezclan y desde donde se distribuye la mezcla realizada.
- 2) **En línea de mezcla.** Los dos componentes provienen de depósitos diferentes en la terminal de almacenamiento y llegan al camión cisterna de forma simultánea: La mezcla final del biodiesel con el diesel de petróleo en la proporción deseada se realiza en la terminal de almacenamiento, en el brazo de carga del camión cisterna, lo que se conoce como “mezcla splash”.
- 3) **Parquímetro bomba de mezcla.** Tanto el biodiesel como diesel de petróleo están en depósitos diferentes en la estación de servicio o el punto de consumo. En el surtidor de

³⁵ A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Atabani A. Silitonga A. Badruddin I. Mahlia T.M.I. Masjuki H.H. Renewable and sustainable energy Reviews 16 (2012) 2070-2093.

combustible marca la mezcla deseada y es el surtidor el que realiza la mezcla solicitada en el momento de servirla. Desde el punto de vista logístico la mejor opción es ésta³⁶.

1.4.1. Parámetros de calidad del biodiesel/diesel

Los parámetros básicos relacionados con la calidad del biodiesel, diesel y sus mezclas binarias BX, así como sus métodos de análisis son regulados en Argentina por el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM). Este organismo se basa en las normativas de la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM), Organización Internacional de Estandarización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN). Un resumen de los parámetros de calidad del biodiesel y diesel se presentan en las **Tabla 1D y 1E** respectivamente.

³⁶ Manual didáctico de biocombustibles. Perez J.F. Intelligent Use of Energy at school (IUSES) 2010.

Tabla 1D. Parámetros físicos y químicos de calidad del **biodiesel**

| PARAMETROS | UNIDADES | LIMITE | MÉTODOS | |
|--|--------------------|---------|------------------|----------------------------------|
| | | | 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 Água, máx. | mg/kg | 500 | D 6304 | EN/ISO 12937 |
| Contaminación Total, máx. | mg/kg | 24 | - | EN ISO 12662 |
| 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 |
| Sodio + Potasio, máx. | mg/kg | 5 | - | EN 14108 EN 14109 EN 14538 |
| Calcio + Magnesio, máx. | mg/kg | 5 | - | EN 14538 |
| Fósforo, máx. | mg/kg | 10 | D 4951 | EN 14107 |
| Corrosividad con lamina de cobre, 3h a 50 °C, máx. | - | 1 | D 130 | EN ISO 2160 |
| Número de Cetanos | - | Anotar | D 613 D 6890 | EN ISO 5165 |
| Punto de obstrucción de filtro en frío, máx. | °C | 19 | 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 EN 14106 |
| Glicerol total, máx. | % masa | 0,25 | D 6584 - | - EN 14105 |
| Mono, di, triglicéridos | % masa | | D 6584 | - EN 14105 |
| Metanol o Etanol, máx. | % masa | 0,20 | - | EN 14110 |
| Índice de Yodo | g/100g | Anotar | - | EN 14111 |

| | | | | |
|---|----------|----------|----------|-----------------|
| Estabilidad a la oxidación a 110°C, mín. | H | 6 | - | EN 14112 |
|---|----------|----------|----------|-----------------|

Tabla 1E. Parámetros físicos y químicos de calidad del **diesel**

| Propiedad | Especificaciones Diesel | ASTM | EM |
|--|--|------------------|-----------|
| Viscosidad | 1,3 a 2,4 centistokes a 40°C | D 445 | ISO 3104 |
| Número de Cetanos | 43 mín. a 0°C | D 613 | ISO 5165 |
| Contenido de Azufre | 0,05 % m/m | D 2622 | ISO 4260 |
| Corrosividad al cobre, máx. | No. 3ª (3hs a 50°C) | D 130 | ISO 2160 |
| Densidad | 0,806 a 0,825 Kg/L a 15 °C . | D 287 D 4052 | ISO 3675 |
| Punto nube | 6°C por debajo de la temperatura mínima del lugar donde se va a usar | D 97 | ISO 3015 |
| Cenizas, máx. | 0,01 % m/m | D 482 | ISO 6245 |
| Destilado | Destilado del 10% típico 221 °C Destilado del 90% máx. 335 °C | D 86 | ISO 3405 |
| Residuos de Carbón del destilado al 10%, máx. | 0,15 % m/m | D 524 | ISO 10370 |
| Agua, máx. | 0,02 % m/m | D 2709 | ... |
| Sedimentos > 1µm, máx. | 10 mg/L | D 2276 D 5452 | ... |
| Punto de inflamación, mín. | 38 – 52 °C | D 93 | ISO 2719 |
| Lubricidad (Wear Scar), máx. | Diámetro de ralladura (WSD) menos de 520 µm a 60°C | D 6079 | ... |

Es importante destacar que las determinaciones de estos parámetros por los métodos de ensayo IRAM utilizan equipos sofisticados que suelen ser importados y de precio elevado. Podemos citar, por ejemplo, los métodos de ASTM D 6584 en el [Tabla 1D](#), que emplean cromatografía de gases, una

técnica que es laboriosa, de alto costo de manutención 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. En este sentido, es muy importante y necesario el desarrollo de nuevos métodos de análisis que puedan evitar y minimizar estos inconvenientes.

La tendencia a utilizar técnicas más simples se ve reflejada en literatura reciente donde se pueden encontrar trabajos que utilizan técnicas luminiscentes para determinar parámetros en combustibles, por fluorescencia³⁷³⁸³⁹ por espectrometría IR y UV-Vis⁴⁰⁴¹⁴²⁴³, y por electroquímica⁴⁴.

1.5. Técnicas luminiscentes

Las técnicas de fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, constituyen los métodos luminiscentes⁴⁵. La fluorescencia y fosforescencia son procesos en los que la excitación consiste en la absorción de fotones de una fuente de radiación externa. Debido a las características intrínsecas de estos mecanismos luminiscentes, los procesos de emisión por fluorescencia molecular poseen tiempos de vida de magnitud de nanosegundos, en cuanto a la fosforescencia, los procedimientos similares son más lentos, pues involucra un cambio de su multiplicidad en estados electrónico, pudiéndose observar emisión

³⁷ Endogenous fluorescence of biodiesel and products thereof: Investigation of the molecules responsible for this effect. Magalhães K.F., Caires A.R.L., Silva M.S., Alcantara G.B., Oliveira S.L. *Fuel* 119 (2014) 120-128.

³⁸ Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis. Corgozinho C.N.C., Pasa V.M.D., Barbeira P.J.S.. *Talanta* 76 (2008) 479-484.

³⁹ The role of viscosity in the fluorescence behavior of the diesel/biodiesel blends. Caires A.R.L., Scherer M.D., De Souza J.E., Oliveira S.L., M'Peko J.C. *Renewable Energy* 63 (2014) 388-391.

⁴⁰ Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. Zhang W. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 16 (2012) 6048-6058.

⁴¹ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) method to monitor soy biodiesel and soybean oil in transesterification reactions, petrodiesel–biodiesel blends, and blend adulteration with soy oil. Mahamuni N.N., Adewuyi Y.G.. *Energy Fuels*, 23 (2009) 3773–3782.

⁴² Determination of the oxidation stability of biodiesel and oils by spectrofluorimetry and multivariate calibration. Meira M., Quintella C.M., Tanajura A.S., Silva H.R.G. *Talanta*, 85 (2011) 430–434.

⁴³ Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel. Dantas M.B., Albuquerque A.R., Barros A.K., Rodrigues Filho M.G., Souza A.G. *Fuel* 90 (2011) 773-778.

⁴⁴ Electrochemical detection of free glycerol in biodiesel using electrodes with single gold particles in highly ordered SiO₂ cavities. Li N., Zhou Q., Chu W., Zheng J. *Sensors and Actuators B: Chemical* 196 (2014) 314-320.

⁴⁵ *Fundamentos de Química Analítica*. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. Editorial Reverté (2000).

luminiscente con tiempos de hasta algunos segundos de duración. Por otra parte, en el caso de quimioluminiscencia, la emisión es promovida a través de reacciones químicas, aprovechando la energía que liberan dichas reacciones para excitar una especie. Para la electroquimioluminiscencia, se genera la excitación de la especie de interés por medio de un campo eléctrico.

En estas técnicas, las medidas de intensidad de las radiaciones emitidas varían proporcionalmente con la concentración de las especies luminiscentes y los espectros de emisión molecular cubren la región UV-visible y podría extenderse a la región NIR (Espectrometría de Infrarrojo Cercano). Estos métodos tienen límites de detección bajos, alta selectividad y versatilidad y permiten aplicaciones automatizadas utilizando métodos sencillos para el desarrollo del análisis de sistemas en flujo.

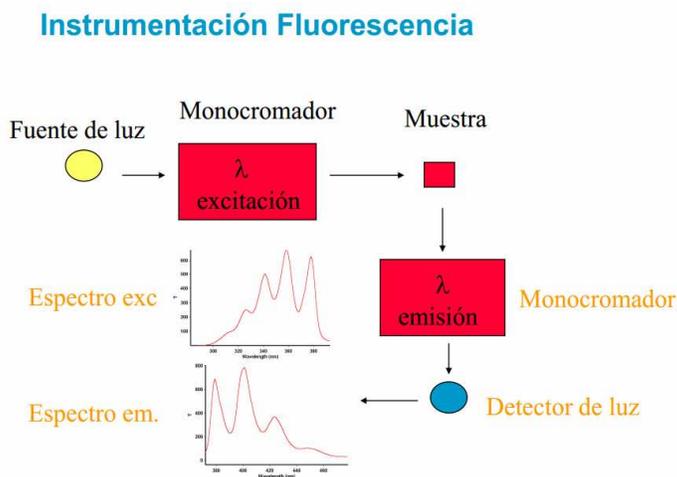
Los métodos luminiscentes han sido ampliamente aplicados a diferentes tipos de muestras empleando principalmente calibración univariada. Este tipo de calibración se puede usar en análisis multicomponente. Convencionalmente la mayoría de las determinaciones que pretenden cuantificar más de un analito en una muestra con bajos niveles de concentración, generalmente utilizan técnicas de separación y metodologías univariadas que requieren instrumentación tales como, HPLC (“High-Performance Liquid Chromatography” – Cromatografía Líquida de alta eficiencia) o GCMS (“Chromatography Gas by Mass Spectrometric” – Cromatografía Gaseosa con detección espectrométrica de masas).

1.6. Espectrometría de fluorescencia

La espectrofluorimetría es una técnica analítica que consiste en la obtención de un espectro de emisión molecular, que es el producto de desactivación de un estado singulete excitado. La característica de esta técnica es que emite radiación a una longitud de onda mayor que la de excitación.

La [Figura 1D](#) esquematiza los componentes de un espectrofluorímetro.

Figura 1D. Esquema de espectrofluorímetro⁴⁶.



1.6.1. Espectrometría de Fluorescencia molecular

En la espectrofluorimetría molecular, un espectro de emisión se obtiene haciendo un barrido espectral con monocromador secundario, mientras la muestra es excitada a una dada longitud de onda, permaneciendo fijo el monocromador primario.

Esta técnica analítica tiene muchas ventajas, tales como su alta sensibilidad, pero cuando la matriz es muy compleja, como lo es en el caso de combustibles, los espectros obtenidos presentan una superposición de bandas que dificultan las determinaciones.

1.6.2. Espectrometría de fluorescencia sincrónica (SFS)

La espectrofluorimetría sincrónica es una modificación de la fluorescencia convencional, consistente en un barrido simultáneo de los monocromadores de emisión y excitación, manteniendo una diferencia de longitudes de onda fija entre ellos.

⁴⁶ Librería de Agilent[Internet] www.chem.agilent.com/Library.

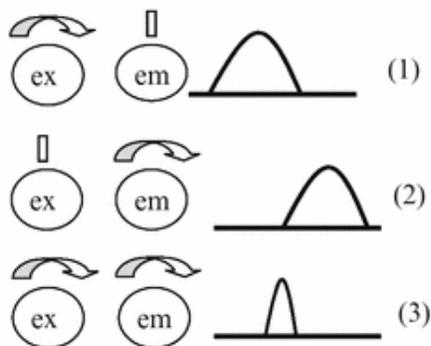
Las principales ventajas de la SFS son la formación de bandas más finas y definidas, produciendo mayor selectividad gracias al estrechamiento de las bandas espectrales y la simplificación del espectro.

Dependiendo del tipo de barrido hay tres tipos de SFS⁴⁷:

- Si la velocidad de barrido es constante para ambos monocromadores, se mantiene constante la diferencia entre excitación y emisión $\Delta\lambda$, la técnica es conocida como SFS de longitud de onda constante. Esta técnica es muy simple y es la más utilizada dentro de la SFS.
- La longitud de onda de emisión y excitación varía simultáneamente pero a diferentes velocidades. Estas diferentes velocidades permiten la construcción de planos a 45° y 90° entre el eje x de excitación a través de todo el espectro. Conocido como fluorimetría sincrónica de ángulo variable, esta técnica tampoco es muy utilizada.

Las ventajas principales de la SFS:

- Estrechamiento de las bandas espectrales, ver Figura 1E y 1F.



⁴⁷ Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. Patra D., Mishra A.K. Trends in analytical chemistry 21(2002) 787-798.

Figura 1E. Espectros de fluorescencia hipotéticos (1) Espectros de excitación, (2) Espectros de emisión, (3) Espectros de fluorescencia sincrónica. El rectángulo representa un monocromador estático y la flecha un monocromador en movimiento.

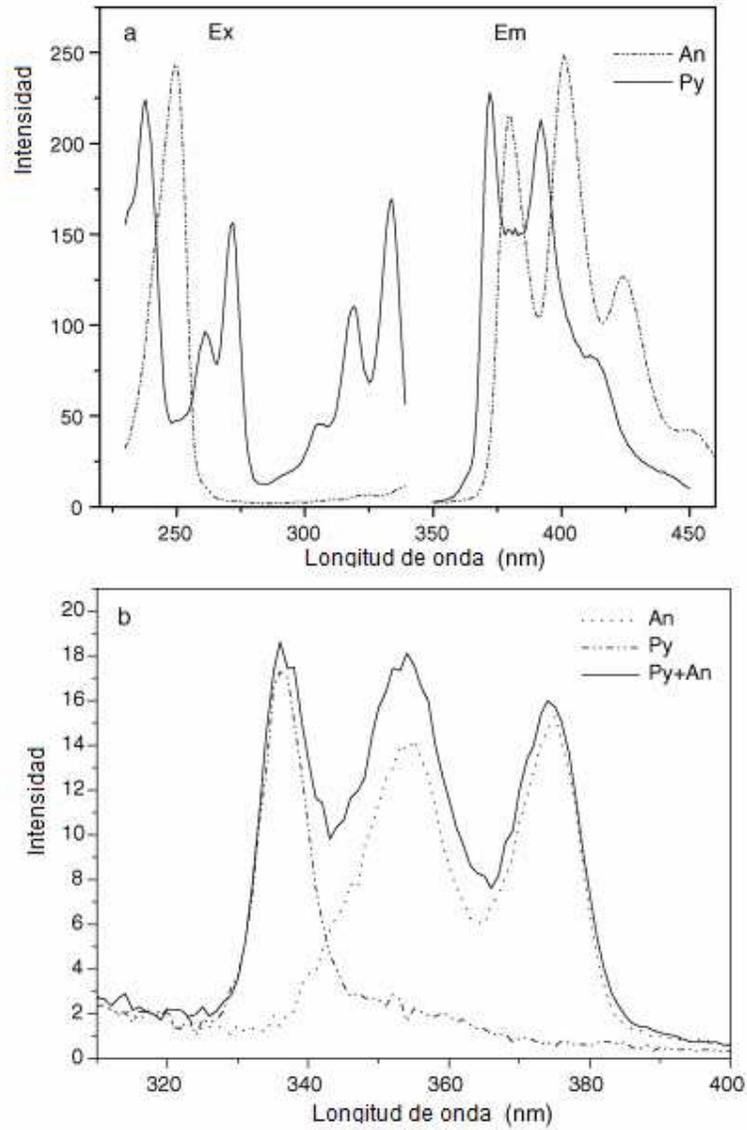
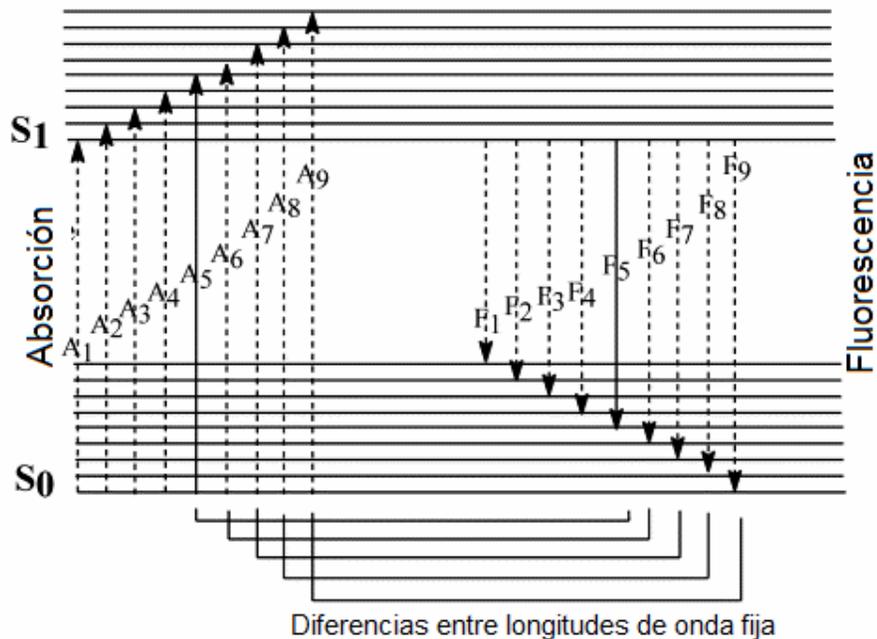


Figura 1F. Estrechamiento de bandas espectrales gracias a la fluorescencia sincrónica. Ejemplo de espectros de fluorescencia de antraceno y pireno. (a) Espectros de emisión y excitación (b) Espectros de fluorescencia sincrónica.

- Simplificación del espectro de emisión. En la fluorescencia convencional, solo es posible el incremento de la intensidad de todas las bandas de emisión al mismo tiempo, pero la SFS permite aumentar la intensidad de las bandas selectivamente, dependiendo de la $\Delta\lambda$ usada.
- Contracción del rango espectral. Desde un punto de vista analítico, la totalidad del espectro puede no ser de interés, y mucho de los detalles no deberían ser considerados para no dar resultados confusos o errados.

La forma y estrechamiento de las bandas de un espectro de SFS, comparadas con los espectros de fluorescencia convencional, pueden ser explicados con el diagrama de Jablonski, ver [Figura 1G](#). Una molécula puede ser excitada a un estado energético de mayor energía empezando por A1, A2, ..., A9 y pueden dar fluorescencia a F1, F2, ..., F9. En general, los espectros de emisión de un fluoróforo se mantienen sin cambios, independientemente de la longitud de onda de excitación, a excepción de una variación en la intensidad de fluorescencia, que depende de la probabilidad de la transición electrónica de la molécula.

Figura 1G. Diagrama de Jablonski.



Para obtener un espectro de emisión de fluorescencia, se excita la molécula en el máximo de absorción (A5) y se registra la emisión a las diferentes longitudes de onda F1, F2, F3,F9.

Ahora, para tener un espectro de excitación fluorescente, la molécula es excitada en las longitudes de onda A1, A2,.....A9, y registrada solo al máximo de fluorescencia (F5).

Pero, en el caso de SFS se elije un intervalo de longitud de onda particular de modo que una señal se observa sólo cuando $\Delta\lambda$ coincide con el intervalo de banda de absorción entre ésta y una banda de emisión. Por lo tanto, inicialmente, por ejemplo teniendo $\Delta\lambda = A5 \sim F5$, no veremos ninguna fluorescencia hasta que el monocromador de excitación esté en A5 y el de emisión en la longitud de onda F5. Un momento siguiente, la molécula se excita a A6, A7, A8 y su fluorescencia correspondiente se registran a F6, F7, F8, respectivamente. Este proceso continúa hasta que se registra un espectro completo.

Como la intensidad de emisión es una función de la longitud de onda de excitación (que está relacionada con la probabilidad / población de transición), y $\Delta\lambda$ define la correspondencia entre la

absorción y la banda de emisión, se obtiene una banda más aguda en SFS en comparación con un espectro convencional.

Lloyd introdujo la técnica en 1971⁴⁸. Luego Vo-Dinh^{49,50} formuló las bases teóricas y sugerencias para los procedimientos experimentales que permitieron el análisis de muestras complejas.

Desde el punto de vista práctico, el análisis de muestras complejas sin ningún pretratamiento es extremadamente útil. La fluorescencia provee una alta sensibilidad, simplicidad y selectividad, que es muy importante para el análisis químico. Pero por la naturaleza misma fluorescencia, un espectro de fluorescencia convencional dificulta el análisis multicomponente. Esto puede ser sobrellevado usando la SFS que estrecha las bandas espectrales. La alta selectividad de la SFS puede ser mejorada con la combinación de técnicas, como análisis multivariado, apagamiento selectivo de fluorescencia o fluorescencia tridimensional.

1.6.3. Espectrometría de fluorescencia aplicada al análisis de biodiesel/diesel y derivados de petróleo.

La aplicabilidad de la espectrofluorimetría en el análisis de derivados de petróleo se debe a la presencia de productos como HPAs (Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos) que son altamente fluorescentes. Esta técnica analítica puede ser utilizada no solo en la caracterización de mezclas, sino también en la detección compuestos indeseables. De los espectros de emisión molecular es extraída información cualitativa y cuantitativa, la intensidad de radiación emitida por la muestra es proporcional a la concentración del fluoróforo.

⁴⁸ Synchronyzed excitation of fluorescence emission spectra. Lloyd J.B.F. Nature (London) Phys. Sci. 231 (1971) 64.

⁴⁹ Vo-Dinh T. Anal. Chem. 50 (1978) 396.

⁵⁰ Vo-Dinh T. Appl. Spectrosc. 36 (1982) 576.

Las técnicas espectrofluorimétricas son ampliamente utilizadas para la caracterización⁵¹ y detección de contaminantes en diesel⁵²; identificación y clasificación de petróleo^{53,54}; y para la clasificación y caracterización de aceites^{55,56}.

1.7. Objetivo general

El objetivo principal de la investigación realizada en este trabajo de tesis ha sido desarrollar e implementar métodos analíticos para la determinación de parámetros calidad en combustibles biodiesel/diesel.

Este objetivo general se ha logrado con los siguientes objetivos específicos:

- Contribuir al desarrollo multicomponente y su posterior correlación con parámetros de calidad a partir de medidas de fluorescencia.
- Desarrollar técnicas fluorescentes aplicadas a combustibles.
- Solucionar las actuales inquietudes y problemáticas de la Refinería PETROBRAS Bahía Blanca, ya que esta tesis ha comenzado en el mismo momento que la implementación del biodiesel en la Argentina.
- Mantener la tendencia de la química analítica de obtener nuevos métodos de menor impacto ambiental.

⁵¹ Patra D., Mishra A.K. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 787-798.

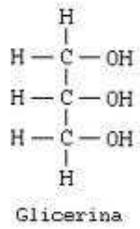
⁵² Prakash J., Mishra A.K. *Fuel* 108 (2013) 351-355.

⁵³ Liu K., Eadington P., Middleton H., Fenton S., Cable T. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 57 (2007) 139-151.

⁵⁴ Portet-Koltalo F., Preterre D., Dionnet F. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 981-989.

⁵⁵ Zougagh M., Redigolo H., Ríos A., Valcárcel M. *Analytica Chimica Acta* 525 (2004) 265-271.

⁵⁶ Nikokavoura A., Christodouleas D., Yannakopoulou E., Papadopoulos K., Calokerinos A.C. *Talanta* 84 (2011) 874-880.



Capítulo 2



Determinación de glicerina en BODIESEL

Automatización

2. Capítulo 2: Determinación de glicerina en Biodiesel - Automatización

2.1. Objetivo

El objetivo del trabajo expuesto en este capítulo es diseñar y optimizar un sistema automático para la determinación de la glicerina libre en muestras de biodiesel. Además se propone realizar la automatización por medio de válvulas solenoides y cámaras de mezclado construidas en Politetrafluoroetileno (Teflón ®) donde el nuevo sistema permitirá la extracción de la glicerina en línea y su posterior cuantificación.

2.2. Introducción

2.2.1. Automatización

Desde un punto de vista intrínseco, la finalidad de la Química Analítica es alcanzar la calidad metrológica. Esto significa, asegurar un alto nivel de exactitud en los resultados obtenidos, para el nivel de incertidumbre deseado. Sin embargo, el cumplimiento de esto implica una disminución en las propiedades complementarias, como lo son la rapidez, el bajo costo y los factores personales. Por lo tanto, el compromiso entre ellas obliga a definir la calidad metrológica como la deseada o suficiente para el usuario. Por otra parte, la finalidad extrínseca principal de la Química Analítica es resolver problemas analíticos generados por problemas económico-sociales o científico-técnicos. Ambas finalidades no son independientes, sino que están relacionadas entre sí. De forma general, pueden definirse los objetivos de la Química Analítica como la obtención de la mayor cantidad de información química posible y de la mejor calidad utilizando cada vez menos material, tiempo, esfuerzo, costos y riesgos para el operador y el medio ambiente (Figura 2A).

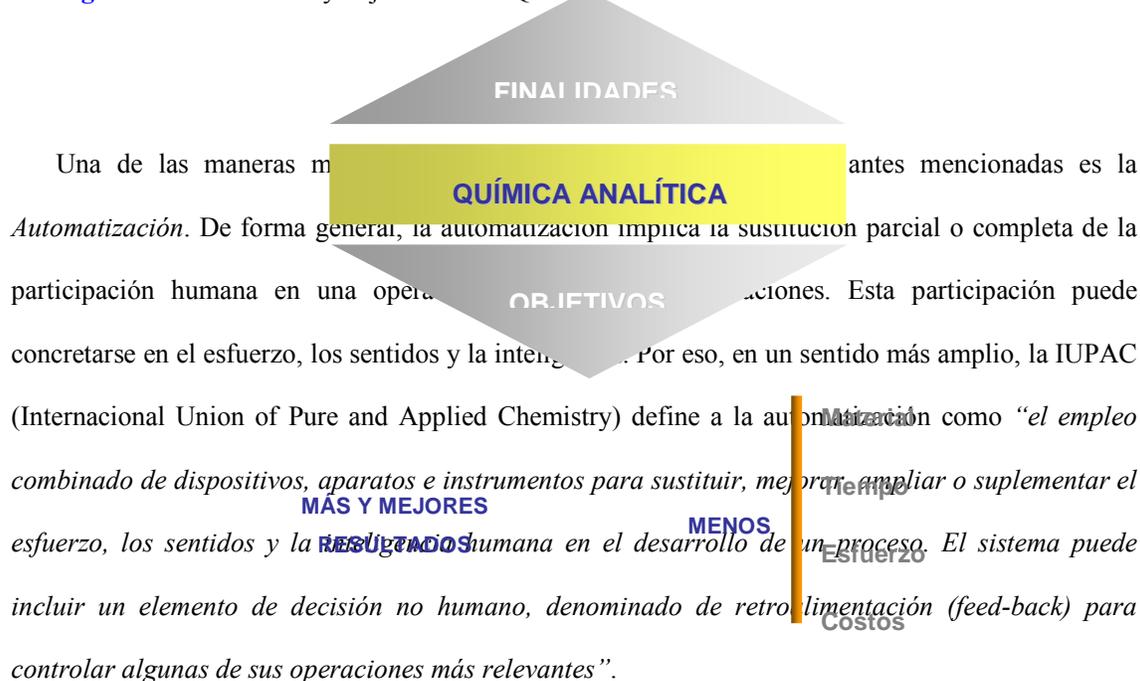
De esta manera, tanto la sociedad como los laboratorios de rutina demandan la presencia de métodos que se caractericen por:

- ✓ Ser rápidos, permitiendo el análisis de un gran número de muestras.
- ✓ Ser automáticos, requiriendo ninguna o una mínima participación humana.

- ✓ Requerir volúmenes pequeños, tanto de reactivos como de muestra.
- ✓ Ser simples, puesto que la simplicidad es una de las tendencias más importantes de la Química Analítica.
- ✓ Permitir efectuar medidas in-situ.



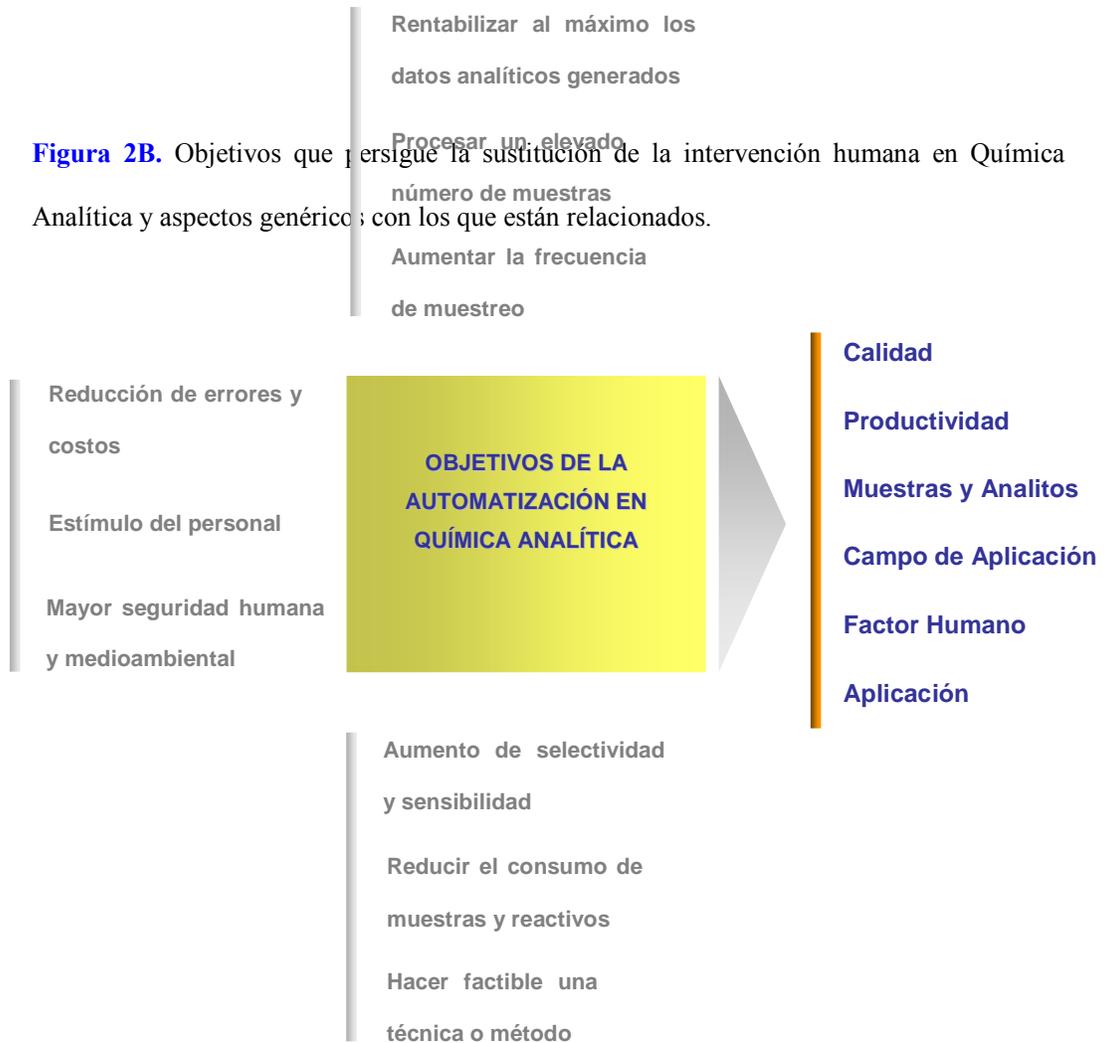
Figura 2A. Finalidades y objetivos de la Química Analítica.



A partir de esta definición podemos establecer una clara diferencia entre dos sistemas: *Sistemas Automáticos* y *Sistemas Automatizados*. Los *Sistemas Automáticos* son aquellos que originan acciones previamente programadas por un operador, para ser llevadas a cabo en momentos determinados del proceso sin la intervención humana. En este caso, el sistema no toma decisiones por sí mismo, siguiendo siempre la misma secuencia de operación. Los *Sistemas Automatizados* son sistemas automáticos que tienen incorporado un elemento de retroalimentación que toma decisiones en

determinados momentos de la operación sin la intervención humana. Estos sistemas se autocontrolan y autoajustan, pudiendo la secuencia de operaciones ser diferente según la ocasión.

Los objetivos de la automatización en Química Analítica deben ser coherentes, por una parte, con sus fines y objetivos, y por otra, con las ventajas estratégicas generales que implica la sustitución de la participación humana en los procesos de una organización. En la **Figura 2B** se esquematizan los objetivos que persigue la Automatización en Química Analítica.



2.2.2. Problemática actual

El biodiesel se produce a través de una reacción química de transesterificación, la cual es una serie de tres reacciones reversibles para convertir un triglicérido en diglicérido, monoglicérido y glicerina⁵⁷. En consecuencia se obtienen dos fases, la superior con mayor proporción de biodiesel y una inferior de glicerina y trazas de otros compuestos químicos⁵⁸.

Luego del proceso de transesterificación, el glicerol libre puede ser removido fácilmente del biodiesel con sucesivos lavados con agua destilada. Por otra parte, para retirar el bajo contenido de glicéridos remanente en el biodiesel, deben seleccionarse reactivos y condiciones de reacción apropiados, o realizar una posterior destilación del producto⁵⁹.

El biodiesel comercial tiene un contenido residual de glicerina, que puede causar obstrucción de los filtros de combustible, residuos en los tanques de combustibles y liberación de acroleína a la atmósfera. Esto tiene lugar cuando el combustible es quemado a más de 180°C^{60 61 62}. El límite de glicerina libre en B100 es de 0,020g (m/m)⁶³.

En la bibliografía se pueden encontrar varios métodos alternativos al cromatográfico establecido por las normas, para determinar el contenido de glicerol libre en biodiesel, un ejemplo de ellos son los métodos cromatográficos desarrollados por Plank⁶⁴ y Mittelbach⁶⁵. Darnoko⁶⁶ realizó un estudio

⁵⁷ M. Johnston, T. Holloway, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7967–7973.

⁵⁸ M. Mittelbach, C. Remschmidt, *Bioresource Technol.* 100 (2009) 261–268.

⁵⁹ M. Hájek, F. Skopal, *Bioresource Technol.* 101 (2010) 3242–3245.

⁶⁰ L.M. Lourenço, N.R. Stradiotto, *Talanta* 79 (2009) 92–96.

⁶¹ L. Wu, C. Cheng, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 234–240.

⁶² M. Lapuerta, O. Armas, R. Garcia-Contreras, *Energy Fuels* 23 (2009) 4343–4354.

⁶³ ASTM D 6751, Test method for determination of free and total glycerin in B 100 biodiesel methyl esters by gas chromatography, ASTM International, Available: www.astm.org.

⁶⁴ C. Plank, E. Lorbeer, *J. Chromatogr. A.* 697 (1995) 461–468.

⁶⁵ M. Mittelbach, *Chromatogr.* 37 (1993) 623–626.

⁶⁶ D. Darnoko; M. Cheryan; E.G. Perkins, *J. of Liq. Chrom. Rel. Technol.* 23 (2000) 2327–2335.

simultáneo de los productos de transesterificación (triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, metil ésteres y glicerol) usando cromatografía de permeación en gel. Arzamendi ⁶⁷ desarrolló un método cromatográfico por exclusión de tamaño para monitorear glicerol y FAME en biodiesel. Santori ⁶⁸ publicó la determinación de mono, di y triglicéridos, metil ésteres, metanol y glicerina en una de las fases de equilibrio líquido-líquido, usando cromatografía líquida en fase reversa trabajando en modo isocrático, y un gradiente de elución con detección UV.

También se han encontrado métodos espectroscópicos propuesto por Dorado y colaboradores ⁶⁹ donde utiliza NIR como una tecnología confiable y de bajo costo para determinar la presencia indeseable de metanol y glicerol. Gonçalves y Micke ⁷⁰ desarrollaron una metodología que utiliza electroforesis capilar donde determinan glicerol libre a partir de un clivaje oxidativo con periodato. Pinzi ⁷¹ utilizó un sistema automático online con ultrasonido para la determinación de glicerol total y libre, donde la determinación se hacía por espectrofotometría a 410 nm. Bondioli y Della Bella ⁷² propusieron una determinación espectrométrica del glicerol a 410 nm, basada en la oxidación con periodato, y el formaldehído resultante reacciona con acetilacetona (reacción de Hantzsch). Silva y colaboradores ^{73 74} usaron este método analítico en un sistema de multiconmutación con detección espectrofotométrica y fluorescente de glicerol total y libre. También propusieron un proceso de extracción alternativo donde se evita el uso de solventes orgánicos. Es una extracción con agua seguida de 30 minutos de agitación en una plataforma orbital, luego una centrifugación por 5 minutos, donde la fase del biodiesel es removida con una pipeta Pasteur y el contenido de glicerol libre es determinado en la fase acuosa.

⁶⁷ G. Arzamendi, E. Arguinarena, I. Campo, L. Gandia, *Chem. Eng. J.* 122 (2006) 31–40.

⁶⁸ G. Santori, A. Arteconi, G. Di Nicola, M. Moglie, R. Stryjek, *Energy Fuels* 23 (2009) 3783–3789.

⁶⁹ M. Hájek, F. Skopal, J. Kwiecien, M. Černoch, *Talanta* 82 (2010) 283–285.

⁷⁰ M.P. Dorado, S. Pinzi, A. de Haro, R. Font, J. Garcia-Olmo, *Fuel* 90 (2011) 2321–2325.

⁷¹ L.C. Gonçalves-Filho, G.A. Micke, *J. of Chromatogr. A*, 1154 (2007) 477–480.

⁷² S. Pinzi, F. Priego Capote, J. Ruiz Jiménez, M. Dorado, M. Luque de Castro, *Bioresour Technol.* 100 (2009) 421–427.

⁷³ L. Wu, C. Cheng, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 234–240.

⁷⁴ P. Bondioli, L. Della Bella, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 107 (2005) 153–157.

El presente trabajo presenta el uso de la metodología FB que combina las ventajas de las metodologías en flujo, en batch y multiconmutación. Los sistemas FB mantienen la confiabilidad y simplicidad de un trabajo clásico en batch, con un moderno y miniaturizado sistema computarizado, evitándose así el uso de grandes volúmenes de reactivos y muestras como es común en los sistemas en flujo. Estos sistemas FB difieren en que no se utiliza un fluido portador para transportar la muestra al detector⁷⁵⁷⁶⁷⁷⁷⁸⁷⁹⁸⁰⁸¹⁸²⁸³. Además la selección de tiempos de lavado, caudales, diámetros de tubos y largo de los mismos no es un factor crucial. El método desarrollado se propone en tres etapas: una extracción líquido-líquido de glicerol del biodiesel a una fase acuosa, una reacción de derivatización para obtener un producto fluorescente y la detección fluorescente dentro de la cámara de FB. Para hacer esta determinación en el sistema FB, se construyó una cámara de PTFE con ventanas de cuarzo.

2.3. Sección experimental

2.3.1. Instrumentación

Se usó un espectrofluorímetro JASCO modelo FP6500, equipado con una lámpara de descarga de xenón (150W). Las ranuras del montaje de los monocromadores pueden variarse de 1 a 20 nm, siendo seleccionados 5 nm para el de excitación y 10 nm para el de emisión. También se utilizó una bomba peristáltica Gilson Minipulse 3 M312, con cabezal de 8 canales. El método de referencia se llevó a

⁷⁵ M.C. Souza, V.L. Martins, L.F. Almeida, O.D. Pessoa Neto, E.N. Gaião, M.C.U. Araujo, *Talanta* 82 (2010) 1027–1032.

⁷⁶ C. C. Acebal, M. Insausti, M. F. Pistonesi, A. G. Lista, B. S. Fernández Band, *Talanta* 81 (2010) 116–119.

⁷⁷ R.S. Honorato, M.C.U. Araújo, R.A.C. Lima, E.A.G. Zagatto, R.A.S. Lapa, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 91–97.

⁷⁸ V.B. Nascimento, T. Selva, E.C.S. Coelho, F.P. Santos, J.L.S. Antônio, J.R. Silva, E.N. Gaião, M. C. U Araujo, *Talanta* 81 (2010) 609–613.

⁷⁹ M. Grünhut, M.E. Centurión, W.D. Fragoso, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo, B.S. Fernández Band, *Talanta* 75 (2008) 950–958.

⁸⁰ M. Grünhut, V. Martins, M. Centurion, M.C.U. Araújo, B. Fernandez Band, *Analytical Letters* 44 (2011) 67–81.

⁸¹ L.F. Almeida, V.L. Martins, E.C. Silva, P.N.T. Moreira, M.C.U. Araújo, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 143–148.

⁸² J.M.T. Carneiro, R.S. Honorato, E.A.G. Zagatto, Fresenius, *J. Anal. Chem.* 368 (2000) 496–500.

⁸³ ASTM D 6584-07, Test method for the determination of free and total glycerin in B 100 biodiesel methyl esters by gas chromatography, ASTM International, Available: www.gerstel.com.

cabo con un cromatógrafo de gases Agilen Technologies 6890 con detector de ionización en llama (FID) y control de temperatura de vaporización⁸⁴.

2.3.2. Reactivos y muestras

Todos los reactivos que se usaron en el presente trabajo fueron de grado analítico, y el agua bidestilada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Isoctano (Anedra) para lavar la cámara. Una solución de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ftalato ácido de potasio (Sigma) fue preparada ajustando el pH entre 2,2 y 3,2 con ácido clorhídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Anedra).

Se usó una solución reguladora de 0,2 a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amonio (Sigma) ajustando el pH entre 3,2 -7,0 con $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (Anedra).

La solución de $1,50 \text{ mol L}^{-1}$ de acetilacetona (2, 4-pentanodiona, Hopkin & Williams) y la de 15 mmol L^{-1} de periodato de potasio (Analar) fueron preparadas diariamente en $0,80 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amonio (pH 4,5). Una solución de $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ de glicerol fue preparada diluyendo glicerol (Mallinckrodt) en agua.

Las muestras de biodiesel de soja fueron adquiridas en la Refinería Petrobras (Dr. Ricardo Eliçabe) situada en la ciudad de Bahía Blanca.

2.3.3. Sistema *Flow-batch* (FB)

Un esquema del sistema propuesto se muestra en la [Figura 2C](#). La cámara de mezclado fue construida en nuestro laboratorio, en PTFE. Se colocó un agitador en la parte superior, que gira mediante un motor de 9V y 200 rpm, el cual es controlado a través de la computadora. La cámara también tiene un agitador magnético en la base. El objetivo de ambos agitadores es lograr la mezcla y su posterior separación de dos fases. El glicerol es soluble en agua y será separado en dicha fase.

En la cámara se montaron 2 ventanas de cuarzo, que fueron colocadas a 90° una de otra, con un paso óptico de 1cm. La posición de estas ventanas ha sido calculada de manera que en el momento de

⁸⁴ T. Nash, Biochem. J. 55 (1953) 416–421.

hacer la medición fluorimétrica, la radiación pasa a través de la fase acuosa, que es la que contiene el glicerol extraído. Para todos los estudios se utilizó un volumen de 1,0 ml. Esta cámara fue colocada en lugar del portacelda en el espectrofluorímetro.

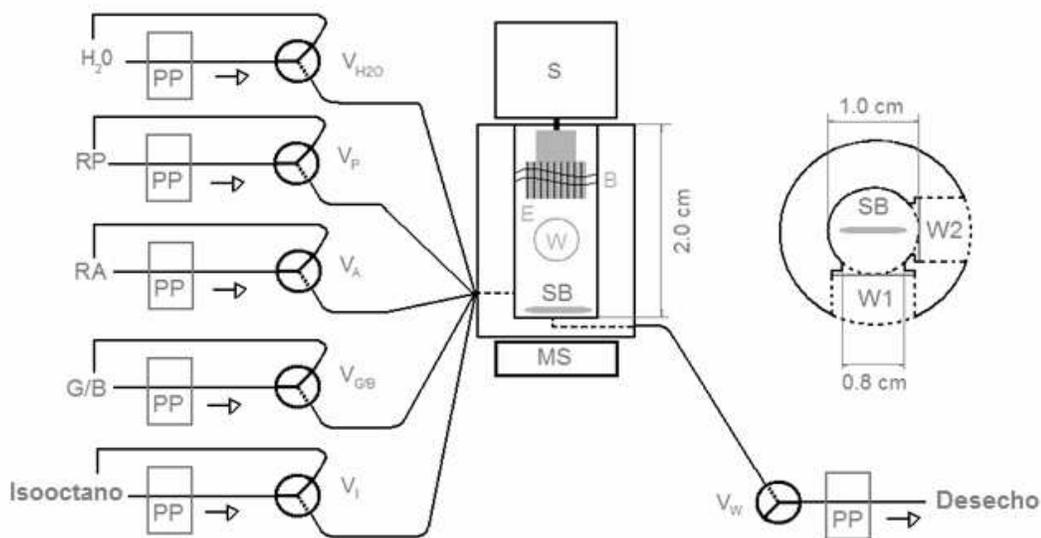


Figura 2C. Esquema del sistema flow-batch. PP, bomba peristáltica; RP, solución de periodato de potasio; RA, solución de acetilacetona; G/B, solución de glicerina o muestra; S, agitador de paletas; SB, barra magnética; MS, agitador magnético; W, ventana de cuarzo.

El sistema de flujo consiste en 6 válvulas solenoides ($V_{G/B}$, V_P , V_A , V_{H_2O} , V_W , V_I) modelo 161 T031 de NResearch, conectores y tubos de polietileno de 0,8 mm de diámetro interno, y una bomba peristáltica Gilson M312. Los tiempos de activación de las válvulas solenoides aseguran la reproducibilidad de los volúmenes añadidos con una desviación estándar no mayor al 0,03%.

Una computadora portátil con una interface USB 6009 de National Instruments fue usada para controlar el sistema FB. El software de control fue desarrollado en LabVIEW 7.1 de National Instruments.

Para asegurar el buen funcionamiento de las válvulas, se pesó en balanza analítica el volumen desalojado a diferentes tiempos. En la [Figura 2D](#) se observan los valores obtenidos para agua y biodiesel, a diferentes tiempos de activación, obteniéndose una linealidad entre el tiempo accionado y la masa desalojada.

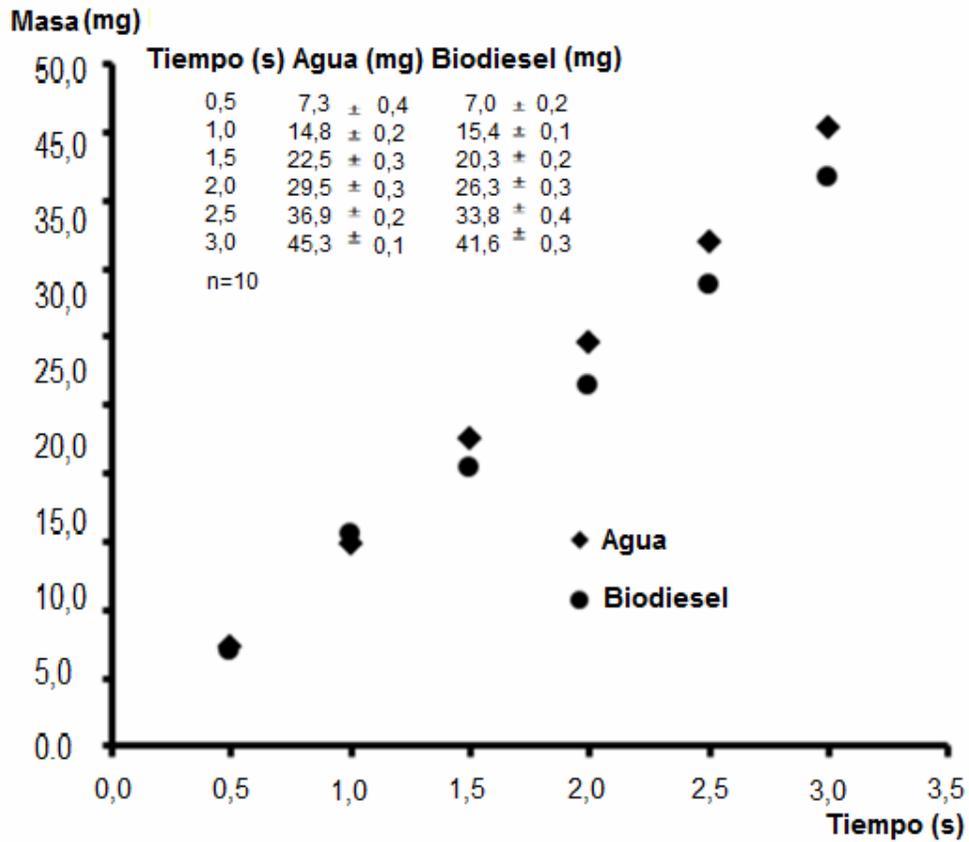


Figura 2D. Masa desalojada en los diferentes tiempos de activación.

2.3.4. Procedimiento FB

El proceso que se llevó a cabo en el sistema FB se muestra en la [Tabla 2A](#). Para obtener la curva de calibrado, diferentes soluciones estándar fueron preparadas dentro de la cámara. Para ese propósito fueron bombeadas dentro de la cámara y en simultáneo las soluciones de glicerina, periodato de

potasio y acetilacetona, a 10 rpm cada una y agua a 48 rpm. El volumen final para cada solución estándar se mantuvo constante en la cámara controlando los tiempos de activación.

Tabla 2A. Procedimiento FB para la extracción y determinación de glicerol en muestras de biodiesel.

| Paso | Evento | Tiempo (s) | Volumen (μL) | Velocidad de rotación de bomba (rpm) | Tubo de bomba (mm i.d.) |
|----------------------|--------------------------------|------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 1 | Biodiesel ($V_{G/B}$) | 1,0 | 14,8 | 10,0 | 1,29 |
| | Periodato de potasio (V_P) | 0,5 | 7,3 | 10,0 | 1,29 |
| | Acetilacetona (V_A) | 0,5 | 7,3 | 10,0 | 1,29 |
| | Agua (V_{H_2O}) | 3,8 | 970,6 | 48,0 | 2,06 |
| 2^a | Tiempo de agitación | 240 | - | 0,0 | - |
| 3 | Detección | 1,0 | - | 0,0 | - |
| 4 | Desecho (V_W) | 4,2 | - | 48,0 | 2,06 |
| 5^b | Isooctano (V_I) | 1,0 | 238,1 | 48,0 | 2,06 |
| 6^b | Agua (V_{H_2O}) | 2,9 | 690,5 | 48,0 | 2,06 |
| 7^b | Desecho (V_W) | 4,2 | - | 48,0 | 2,06 |
| 8^b | Agua (V_{H_2O}) | 3,9 | 1000,0 | 48,0 | 2,06 |
| 9^b | Desecho (V_W) | 4,2 | - | 48,0 | 2,06 |

^a Tiempo de extracción del glicerol en biodiesel. ^b Limpieza de cámara.

La extracción del glicerol de las muestras de biodiesel, previamente homogeneizadas, se lleva a cabo con 0,0154 g de biodiesel en 0,985 ml de agua dentro de la cámara FB. El consumo de reactivos es de 1,10 mg de acetilacetona y 25,20 μg de periodato de potasio, generando 1,00 ml de residuos por determinación.

Mientras las soluciones ingresan a la cámara, ambos agitadores están girando y generan un vórtice dentro de la cámara. Esto ayuda a remover el glicerol del biodiesel.

Es importante destacar que la velocidad es de 200 rpm y no mayor durante los 4 minutos de extracción para evitar la formación de una emulsión con el biodiesel. Luego los agitadores se detienen para medir la señal fluorescente $\lambda_{\text{ex}}= 417 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=514 \text{ nm}$. Un ciclo de lavado con isooctano sobreviene después de cada medida

2.3.5. Procedimiento cromatográfico.

Las medidas cromatográficas se hicieron de acuerdo al método de referencia (D6584-07 “Standard Test Method for the Determination of Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography”). El pico del glicerina libre está bien resuelto, con un tiempo de retención de 4,1 minutos. Cada muestra se inyectó por triplicado y las concentración fue calculada a partir de una curva de calibrado.

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Optimización

El método de determinación está basado en la oxidación del glicerol ⁸⁵ con periodato de potasio. El formaldehído producido reacciona con acetilacetona, en un pH adecuado de 4,5, para obtener el compuesto fluorescente con emisión a 514 nm.

La optimización del sistema FB fue llevada a cabo de manera univariado. Las variables a optimizar se muestran en la [Tabla 2A](#). Los mejores valores fueron seleccionados tomando en cuenta el compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad de la señal analítica. Para corroborar que la extracción del glicerol fue efectiva se utilizó una muestra de biodiesel con 10,32 mg kg⁻¹ de glicerol libre medido por el método de referencia. Se realizó el estudio con diferentes tiempos de extracción, y el tiempo óptimo fue de 240 segundos ya que a mayor tiempo ya no se encuentran mejores resultados, [Figura 2E](#).

Para verificar la correcta extracción del glicerol, se preparó una solución en línea de la misma concentración que la muestra (10,32 mg kg⁻¹). Se encontró la misma señal fluorescente.

⁸⁵ J. Miller, J. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, fourth ed., Pearson Educación, Madrid, 2000.

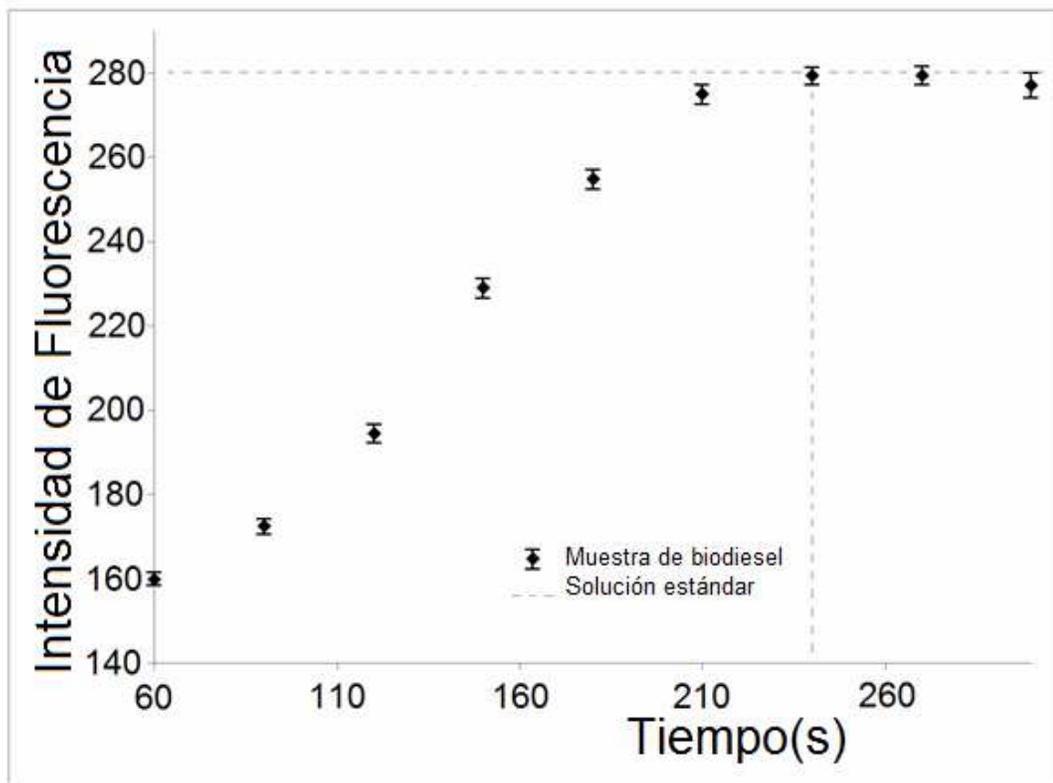


Figura 2E. Intensidad de fluorescencia en función del tiempo, tiempo óptimo de extracción de glicerol.

La **Tabla 2B** muestra los resultados encontrados en la literatura de los diferentes métodos de extracción y análisis del glicerol libre en muestras de biodiesel. Los métodos de extracción con agua fueron estudiados por Silva usando determinaciones espectrométricas ⁸⁶ y fluorimétricas ⁸⁷. Si comparamos estos resultados con los presentados en este trabajo, se puede observar que nuestros resultados no son significativamente diferentes a los encontrados en extracciones con solventes orgánicos. Las mejoras que se plantean en este trabajo son la extracción en línea y la reducción de los tiempos de extracción.

Tabla 2B. Comparación de procesos de extracción.

⁸⁶ M. Lapuerta, O. Armas, R. Garcia-Contreras, *Energy Fuels* 23 (2009) 4343–4354.

⁸⁷ E.L. Nascimento, M.C.U. Araújo, R.H. Galvão, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1061–1067.

| Paso | Extracción de glicerol libre | Tiempo de extracción | Recuperación (%) | Ref. |
|------|--|----------------------|----------------------|----------------|
| 1 | 1 g de biodiesel (4 mL hexano y 4 mL 50% v/v etanol, vortex) | 5 min | 91 - 100 | 88 |
| 2 | Centrífuga (2000 rpm) | 15 min | | |
| 3 | Remover la mayor parte de la fase superior usando una pipeta Pasteur | ----- | | |
| 4 | Tomar 0,5 mL de solución de la fase acuosa, 1,5 mL de solución de trabajo y 1,2 mL de una solución 0,2 M acetilacetona (Baño termostatzado a 70° C) | 1min | | |
| 1 | 200 mg de biodiesel (800 mg de agua and 200 µL cloroformo, agitación vigorosa) | 10 min | 95 - 102 | 89 |
| 2 | Centrifugación (2000 rpm) | 15 min | | |
| 3 | Tomar 300 µL de la fase acuosa y 300 µL de periodato de sodio 900 mgL ⁻¹ ya adicionado un estdar interno | ----- | | |
| 1 | Oxido-reducción simultanea con meta periodato in fase aceptora. La fase acuosa con meta periodato de sodio y etanol es usada como solución extractora. | ----- | 78 -112 | 90 |
| 1 | 1 g de biodiesel (4 mL de agua desionizada) (vortex) o (plataforma orbital) | 5 o 30 min | 97 - 115 98 - 117 | 91 92 |
| 2 | Centrifugación (3000 rpm) | 5 min | | |
| 3 | Remover usando una pipeta Pasteur | ----- | | |
| 1 | 15,4 mg de biodiesel (0,97 mL de agua desionizada (agitación)) | 4 min | 98 -102 | Nuestro método |

2.4.2. Parámetros analíticos

Usando el método propuesto FB, la curva de calibrado fue de $I = 105,410 (\pm 0,822) + 67,687 (\pm 1,522) C$ (mg L⁻¹), $r = 0,998$. Bajo las condiciones seleccionadas, la respuesta lineal se encontró en el rango de 0,10 – 5,00 mg L⁻¹ de glicerol, que es equivalente a 0,40 – 20,00 mg kg⁻¹ de glicerol libre en biodiesel. El límite de detección fue estimado en 0,036 mg L⁻¹ con 95,0% de nivel de confianza, y el

⁸⁸ P. Bondioli, L. Della Bella, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107 (2005) 153–157.

⁸⁹ S. Pinzi, F. Priego Capote, J. Ruiz Jiménez, M. Dorado, M. Luque de Castro, Bioresour. Technol. 100 (2009) 421–427

⁹⁰ G. Santori, A. Arteconi, G. Di Nicola, M. Moglie, R. Stryjek, Energy Fuels 23 (2009)3783–3789.

⁹¹ S.G. Silva, F.R.P. Rocha, Talanta 83 (2010) 559–564.

⁹² S.G. Silva, A. Morales-Rubio, M. La Guardia, F.R.P. Rocha, Anal. Bioanal. Chem. 401 (2011) 365–371

límite de cuantificación en $0,121 \text{ mg L}^{-1}$ para el mismo nivel de confianza, calculado a partir de la curva de calibrado⁹³. El límite de detección es 1389 veces (equivalente a $0,144 \text{ mg kg}^{-1}$ en biodiesel) más bajo que el valor límite establecido por las normas Europeas, Americanas y Brasileñas⁹⁴. La desviación estándar relativa (RSD%) es de 1,5%, obtenida para 5 réplicas de muestras reales de 3 mg L^{-1} glicerol libre. La velocidad de muestreo está estimada en 14 muestras por hora.

La [Tabla 2C](#) compara las ventajas analíticas del método propuesto y los antecedentes en bibliografía. Nuestro método FB tiene las siguientes ventajas: incluye una extracción líquido-líquido en línea, y posee un límite de detección (LOD) de $0,036 \text{ mg L}^{-1}$. Este LOD es 28 y 14 veces más bajo que los reportados previamente en sistemas automáticos^{95 96}, respectivamente. Además, el consumo de muestra es de 15,4 mg, que es 30,5 y 65 veces menor que el consumo de biodiesel en sistemas FIA⁹⁷ y multiconmutación^{98 99}, respectivamente.

Las posibilidades de los sistemas FB dan la opción de tomar una menor cantidad de muestra. Otras 2 ventajas son los residuos generados (1,0 mL), y finalmente la frecuencia de muestreo (14 h^{-1}) que es cercano a la establecida por el procedimiento FIA.

⁹³ D.J. Massart, B.M.G. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, first ed., Elsevier, Amsterdam, 1997.

⁹⁴ C. Plank, E. Lorbeer, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 461–468.

⁹⁵ M. Lapuerta, O. Armas, R. Garcia-Contreras, *Energy Fuels* 23 (2009) 4343–4354.

⁹⁶ E.L. Nascimento, M.C.U. Araújo, R.H. Galvão, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1061–1067.

⁹⁷ M. Hájek, F. Skopal, J. Kwiecien, M. Černoch, *Talanta* 82 (2010) 283–285.

⁹⁸ M. Lapuerta, O. Armas, R. Garcia-Contreras, *Energy Fuels* 23 (2009) 4343–4354.

⁹⁹ E.L. Nascimento, M.C.U. Araújo, R.H. Galvão, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1061–1067.

Table 2C. Comparación de parámetros de diferentes metodologías.

| | BATCH | FIA | MC1 | MC2 | FB |
|--|---------|---------|---------|---------|--------|
| Limite de detección [mg L⁻¹] | - | 7 | 1 | 0,5 | 0,036 |
| Velocidad de muestreo (h⁻¹) | - | 9 | 34 | 35 | 14 |
| Volumen de desechos (ml)^a | 8,0 | 6,0 | 3,5 | - | 1,0 |
| Extracción | Offline | Offline | Offline | Offline | Online |
| Volumen de extracción (ml) | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 0,9850 |
| Muestra (mg) | 1000 | 470 | 1000 | 1000 | 15,4 |

^a Cantidad por determinación.

FIA (Análisis por Inyección en Flujo), MC1 y 2 (Multiconmutación), FB (nuestra propuesta de Flow-Batch).

2.5. Validación

2.5.1. Estudio de recuperación

Para realizar el estudio de recuperación, cantidades apropiadas de muestras fueron pesadas, enriquecidas con diferentes cantidades de glicerol, y analizadas con la metodología FB. La [Tabla 2D](#) muestra los resultados obtenidos. Se obtuvieron valores muy satisfactorios de recuperación en este tipo de combustible.

Tabla 2D. Estudio de recuperación

| Adicionado [mg L ⁻¹] | Encontrado [mg L ⁻¹] | Recuperado (%) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 0* | 1,01 | - |
| | 0,99 | |
| 0,25 | 1,25 | 100±3 |
| | 1,24 | |
| | 1,24 | |
| 0,75 | 1,75 | 102±1 |
| | 1,75 | |
| | 1,77 | |
| 1,25 | 2,26 | 101±1 |
| | 2,25 | |
| | 2,27 | |
| 2,5 | 3,54 | 103±0,4 |
| | 3,56 | |
| | 3,57 | |
| 3,75 | 4,78 | 101±1 |
| | 4,76 | |
| | 4,80 | |
| *Muestra 1 | | |

2.5.2. Muestras reales

La exactitud del método se investiga contrastando los valores obtenidos con el método propuesto, con aquellos obtenidos con el método de referencia previamente validado (cromatografía gaseosa)¹⁰⁰. Los resultados se muestran en la [Tabla 2E](#). Notablemente, para todas las muestras, las concentraciones de glicerol libre en biodiesel obtenidas por la metodología presentada están en concordancia con aquellas medidas por el método de referencia. Los valores de recuperación se encuentran entre 100 - 103% para el método propuesto. En todos los casos, la desviación estándar fue menor a 0,04%.

¹⁰⁰ T. Nash, Biochem. J. 55 (1953) 416–421.

Tabla 2E. Muestras comerciales para la validación veracidad.

| Muestra | Método de referencia | | | Método propuesto | | | %Error (ppm) |
|---------|------------------------------|------|-----------------|------------------------------|------|-----------------|--------------|
| | mg Kg ⁻¹ glicerol | ppm | Desv. Estándar* | mg Kg ⁻¹ glicerol | ppm | Desv. Estándar* | |
| 1 | 3,9 | 0,98 | 0,04 | 4,0 | 1,00 | 0,02 | 2 |
| 2 | 15,4 | 3,84 | 0,02 | 15,2 | 3,80 | 0,04 | 4 |
| 3 | 8,0 | 2,00 | 0,02 | 7,9 | 1,98 | 0,01 | 2 |
| 4 | 10,2 | 2,54 | 0,03 | 10,3 | 2,58 | 0,02 | 4 |
| 5 | 5,0 | 1,25 | 0,01 | 4,9 | 1,23 | 0,01 | 2 |

*Las muestras fueron analizadas en triplicado.

2.6. Conclusiones parciales.

El método propuesto está totalmente automatizado, es posible hacer la extracción del glicerol en fase acuosa, realizar una derivatización del glicerol a un producto fluorescente y realizar las medidas dentro de la cámara. Además de la adición de reactivos y las diferentes muestras, la agitación y el registro de las medidas son totalmente controlados por la computadora a través del programa LabVIEW.

Los resultados obtenidos por este nuevo sistema son mejores que los encontrados en la bibliografía. Las ventajas de la automatización son varias, como la disminución en el consumo de reactivos, el volumen de residuos (amigable para el ambiente), como así también el límite de detección encontrado.

La automatización facilitó la determinación analítica, permitiendo obtener métodos más rápidos y simples, lo que es muy importante en los trabajos de rutina.

Capítulo 3



Clasificación de muestras de biodiesel

Fluorescencia

3. Capítulo 3: Clasificación de muestras de biodiesel - Fluorescencia

3.1. Objetivo

Clasificación de biodiesel a partir según el aceite de origen, empleando espectroscopia de fluorescencia sincrónica y análisis discriminante lineal.

Este trabajo propone el uso de la fluorescencia sincrónica (SFS) y herramientas quimiométricas de clasificación, para determinar el origen de las muestras de biodiesel con respecto al aceite usado como materia prima. Esta determinación es importante para el control de calidad del combustible, porque ciertos tipos de aceites conducen a biocombustibles que pueden provocar fallas en los motores.

El presente estudio involucra 60 muestras de biodiesel producidas a partir de aceites de soja, maíz y girasol. Se registraron los espectros SFS de todas las muestras. Con el objeto de seleccionar las longitudes de onda adecuadas, es decir aquellas menos correlacionadas entre sí, se usó el algoritmo de las proyecciones sucesivas (APS) y luego, calcular los modelos de análisis discriminante lineal (LDA). Como resultado, todas las muestras fueron correctamente clasificadas con respecto a su aceite de origen, usando solo 8 longitudes de onda. En particular, se logró una correcta separación para las muestras obtenidas del aceite de maíz, lo que resulta un gran aporte con respecto a trabajos anteriores donde se usaron técnicas de infrarrojo cercano (NIR). Esta ventaja podría ser atribuida a la mayor sensibilidad que aporta la fluorescencia con respecto a la espectroscopia de infrarrojo.

3.2. Introducción general de quimiometría

3.2.1. Análisis Multivariante

La quimiometría es una subdisciplina de la química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar experimentos de forma optimizada y para proveer el máximo de información a partir de los datos obtenidos de medidas químicas. La Quimiometría es de gran utilidad en el área de la química, nacida aproximadamente al final de los años 70, y que, actualmente, es utilizada en diversos campos, especialmente en química analítica. El desarrollo rápido de la quimiometría en química analítica se debe fundamentalmente a la utilización masiva de los

ordenadores acoplados a la moderna instrumentación. Se ha pasado de hacer medidas puntuales a una longitud de onda (univariantes), a medidas espectrales (multivariantes) con gran contenido de información y, por tanto, los métodos tradicionales de análisis y procesado de datos resultan totalmente insuficientes. Por tanto, uno de los campos de trabajo fundamentales de la quimiometría es el desarrollo y aplicación de los nuevos métodos de calibración multivariante, que permiten extraer la máxima información química del análisis de muestras a partir de señales o respuestas instrumentales con muy poca selectividad. En este capítulo se van a describir algunos métodos de calibración multivariante, con especial énfasis en aquellos que han sido utilizados en esta tesis.

El análisis de muestras que contienen mezclas de compuestos químicos constituye uno de los retos más importantes de la química analítica. La dificultad aumenta cuando se pretende determinar simultáneamente estos compuestos a bajas concentraciones o en presencia de otras sustancias que tienen estructuras y propiedades similares, las cuales pueden interferir en su determinación. El análisis cuantitativo de muestras complejas requiere utilizar un conjunto de muestras de referencia que tenga las mismas características que las muestras a analizar y de algún método instrumental que mida alguna propiedad característica de los analitos. En la utilización de un sistema de detección para las especies a analizar nos podemos encontrar con problemas debido a interferencias, a efectos de matriz, ruido de fondo, etc., que precisan una especial atención.

El método tradicionalmente utilizado para resolver la falta de selectividad en muestras complejas, consiste en la separación previa de los compuestos químicos puros antes de analizarlos. Si la separación ha sido completa (ej. mediante cromatografía) tan solo es necesaria una medida univariante para tener la información cuantitativa deseada. No obstante, ésta presenta un coste elevado, ya que se necesita disponer de una instrumentación analítica sofisticada, de los reactivos estándares individuales e invertir bastante tiempo para optimizar las condiciones de separación. Como alternativa, se han desarrollado métodos quimiométricos, los cuales permiten extraer la información requerida sobre los componentes de interés de las muestras a partir del tratamiento de datos, sin necesidad de su separación previa.

3.2.1.1. Construcción de modelos

El objetivo de los métodos de calibración y clasificación multivariante es establecer modelos que sean capaces de predecir el valor de la propiedad estudiada o agrupar nuevas muestras, a las que se les ha registrado alguna señal analítica. Para que estas predicciones sean fiables, los modelos obtenidos han de ser robustos y, para ello, se deben seguir las etapas que se describen a continuación:

1) *Definición de un conjunto de calibración o conjunto de entrenamiento (training set)*. Se debe conocer la propiedad a determinar o el grupo al que pertenece, debe ser representativa del sistema en estudio y permitir hacer predicciones futuras sobre un conjunto nuevo de muestras.

El conjunto de entrenamiento para realizar el análisis debe ser representativo de todo el intervalo de concentraciones, así como, de las posibles interferencias y otros componentes presentes en las muestras, aunque no vayan a ser determinados (siempre que no se aproveche la “ventaja de segundo orden” de las calibraciones de segundo orden). Se deben considerar tanto las fuentes de variación químicas como las físicas (origen de las muestras, tratamientos recibidos, etc), las cuales pueden afectar al vector registrado.

2) *Registro de la información analítica*. La información fue obtenida a partir de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia, espectros de absorción molecular dentro de la región del UV-Vis y de infrarrojo.

3) *Pretratamiento de los datos*. En esta etapa, se minimizan las contribuciones no deseadas presentes en la señal analítica que disminuyen la reproducibilidad y pueden provocar que el sistema presente comportamientos que darían lugar a estimaciones erróneas de los parámetros deseados. Los pretratamientos utilizados en los trabajos de esta tesis se detallan en la [sección 3.2.3](#).

4) *Creación del modelo*. Establece la relación más simple posible entre la propiedad a determinar o grupo perteneciente y la señal analítica. Esto, en muchas situaciones, implica un estudio complejo de la matriz de datos analíticos obtenidos, ya que no siempre es necesaria la utilización de toda la información registrada.

5) *Validación del modelo*. La elección del modelo más apropiado implica su aplicación a un número de muestras de las que se conoce la propiedad a determinar o grupo perteneciente y que no han sido

utilizadas en la etapa de construcción del modelo. De esta forma se verifica que el modelo construido constituye una correcta descripción del sistema en estudio.

6) *Predicción de nuevas muestras.* Con el modelo construido y validado, se calcula la propiedad estudiada o se clasifica a qué grupo pertenecen nuevas muestras a las que, previamente, se ha registrado la señal analítica.

3.2.2. Elección de los conjuntos de calibración, validación y predicción

En esta tesis se han utilizado los algoritmos de Kennard-Stone¹⁰¹ y su variante de SPXY¹⁰² que tiene en cuenta las distancias $X - Y$ de las muestras. Este método selecciona subgrupos de muestras que provean una representación uniforme en todo el rango estudiado. El procedimiento empieza encontrando las muestras con mayor distancia entre ellas, y se añade un próximo individuo al grupo eligiendo el de mayor distancia al grupo de ya seleccionados.

3.2.3. Pretratamiento de los datos registrados

Junto a la señal del analito, se encuentran otros componentes o efectos no deseados que se suman a dicha señal y que son denominados ruidos. Éstos puede ser: ruido no estructurado, aleatorio, o bien un ruido estructurado provocado por interferencias químicas, físicas, o ambas. Además, no siempre el instrumento responde linealmente a los cambios de concentración del analito por lo que la calidad de la señal puede ser deficiente. Existen numerosos tratamientos matemáticos que se pueden aplicar antes de intentar hallar la relación “señal-propiedad a determinar” para mejorar la calidad de los datos. En esta tesis se han utilizado:

- *centrado de los datos.* Se calcula el valor medio de cada variable de la matriz y se resta a cada punto de la columna. El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables están ahora referidos a dicho centro.

¹⁰¹ Kennard R. W., Stone L. A. *Technometrics* 11 (1969) 137-148.

¹⁰² Saptoro A., Tadó M.O., Vuthaluru H. *Chemical Product and Process Modelling* 7 (2012) 13.

$$X_{ik} - \bar{X}_k$$

Este tratamiento permite mantener las unidades originales y equivale a tratar la matriz de varianza-covarianza de las variables originales. Si las variables originales están expresadas en unidades distintas, o cuando sus varianzas son muy diferentes, se aplica el:

- *autoescalado de los datos*. Después de centrar cada columna, se divide el resultado por la desviación estándar de la misma, s_k , de forma que la varianza de cada variable equivale a la unidad.

$$\frac{X_{ik} - \bar{X}_k}{s_k}$$

Equivale a tratar la matriz de correlación de las variables originales. Geométricamente es cambiar la longitud de los ejes de coordenadas. De esta forma, todos los ejes tienen la misma longitud y cada variable tiene la misma influencia en el cálculo.

Promedio de señales. El ruido instrumental es aleatorio, por lo que promediando n señales analíticas obtenidas a partir de una misma muestra, la relación señal/ruido aumenta en un factor $n^{1/2}$. El promediado de los espectros es una operación que casi siempre acompaña al registro del espectro de una muestra, siendo el espectro final obtenido el resultado del promedio de un número n , definido por el operador.

Suavizado espectral. Promediar espectros puede no ser suficiente para disminuir el ruido de alta frecuencia en aquellos casos en que la relación señal/ruido es pequeña, por lo que es necesario aplicar algoritmos sobre los espectros que minimicen o eliminen este efecto. Para suavizar los espectros se pueden encontrar diferentes algoritmos, entre los que podemos destacar el de Savitzky-Golay¹⁰³ o el filtrado utilizando la transformada de Fourier¹⁰⁴.

Derivadas. La derivada es uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopia por su capacidad de disminuir variaciones en la línea de base. La utilización de la primera derivada elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir, desplazamientos de la línea de base.

¹⁰³ Savitzky, M. J. E. Golay. Anal. Chem. , 36 (1964) 1627–1639.

¹⁰⁴ Horlick, G. Anal. Chem 943 (1972). 44- 47.

La segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda. No es común el uso de derivadas de orden superior. Uno de los métodos más utilizados para el cálculo de las derivadas es el propuesto por Savitzky-Golay. Debido a que el uso de este pretratamiento espectral disminuye siempre la relación señal/ruido, se tiene que ser cauteloso en su utilización.

3.2.4. Métodos de calibración multivariada: Métodos clásico e inverso

Si el sistema es simple y todos los analitos son perfectamente conocidos la regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS – Classical Least Squares) es la mejor elección, sino la regresión inversa (ILS - Inverse Least Squares) es el mejor camino, pues no necesita de espectros puros.

Para usar un método clásico se necesitan los espectros puros de todos los analitos esperados en las muestras desconocidas y además, es necesario modelar simultáneamente todos los componentes del sistema.

En el caso de los métodos inversos se necesita menor conocimiento explícito del sistema y es posible predecir una concentración de un componente aunque haya fuentes adicionales de variación en las señales químicas o físicas.

3.2.4.1. Regresión Lineal Múltiple (MLR)

Se asume que las concentraciones (matriz Y) son funciones lineales de las respuestas instrumentales (matriz X) y puede ser escrito de forma matricial como:

$$Y_{(cal)} = X_{(cal)} b_{(MLR)} + e$$

Donde b_{MLR} es el vector de los coeficientes de regresión lineal y e es el vector de errores en el modelo.

El vector b_{MLR} es estimado en la etapa de calibración por medio del criterio de “mínimos cuadrados” que minimiza el vector de los residuos ($e=Y_{(cal)}-X_{(cal)} b_{(MLR)}$) y es calculado por:

$$Y_{(cal)} = X_{(cal)} b_{(MLR)} + e$$

Con la limitación de que el número de variables no puede ser mayor que el número de muestras de calibración y que una alta correlación entre dos variables hace que el cálculo de la matriz

$(\mathbf{X}_{(cal)}^T \mathbf{X}_{(cal)})^{-1}$ sea imposible o pueda dar errores muy grandes.

Este último problema de colinearidad entre variables es lo que lleva a los métodos de calibración con reducción de variables, ya sea por selección de variables o cálculo de nuevas variables relacionadas indirectamente con las propiedades medidas.

3.2.4.2. Regresión en componentes principales (PCR)

Este método de reducción de variables consta de dos etapas. En la primera se efectúa una reducción de variables mediante un análisis de componentes principales (PCA) y en la segunda se realiza la regresión de estos componentes principales sobre la matriz de parámetros a estimar.

3.2.4.2.1. Etapa de análisis en componentes principales (PCA).

El análisis en componentes principales (PCA)¹⁰⁵ se aplica en química con diferentes finalidades. Entre ellas cabe destacar la clasificación de muestras y la reducción en la dimensionalidad de los datos, siendo éste el paso previo de muchos métodos multivariantes de análisis de datos. En la técnica multivariante PCA, un número elevado de variables, más o menos correlacionadas, son transformadas en un número inferior de variables ortogonales (no correlacionadas) y que contienen la información principal del sistema, eliminando la información redundante o reduciendo la contribución del ruido. Se parte de una matriz de datos \mathbf{X} , donde cada fila es una muestra u objeto, y cada columna una variable, que puede ser la absorbancia a una longitud de onda y tiempo determinados. La dimensionalidad de esta matriz, si se han registrado m muestras y k variables, será $m \times k$. Geométricamente, el PCA es un cambio en la dirección y dimensionalidad de los ejes, ver [Figura 3A](#). Busca las direcciones ortogonales que explican la máxima variabilidad de las muestras y las utiliza como nuevos ejes de coordenadas llamados componentes principales (PCs) para representarlas. El primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad; el segundo se escoge

¹⁰⁵ Hotelling H. Journal of Educational Psychology 24 (1933) 417-441.

de tal forma que sea perpendicular al primero y que explique la máxima variabilidad una vez extraída la explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente. Para poder definir estos nuevos ejes se utilizan sus *loadings* que son los cosenos de los ángulos que forman con los ejes antiguos. Los *scores* son las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes.

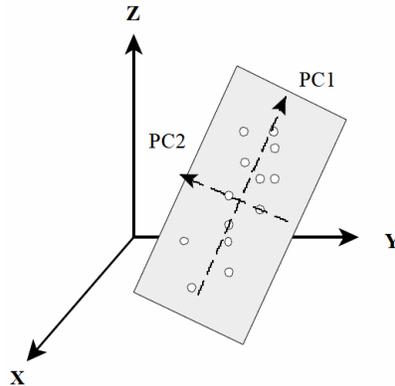


Figura 3A. Interpretación geométrica de un PCA.

Matemáticamente, la matriz de datos \mathbf{X} (datos cinético-espectrales) se descompone en el producto de dos matrices, \mathbf{T} (matriz de *scores*) y \mathbf{P} (matriz de *loadings*), más una matriz \mathbf{E} de residuales de \mathbf{X}

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$$

Los diferentes componentes principales no contienen la misma información. Los primeros describen la fuente de variación más importante de los datos, que se puede asociar a la información más relevante. Para tener una reproducción perfecta de la matriz \mathbf{X} se necesitan k vectores de *loadings* y *scores*, sin embargo, es posible representar la matriz original con un número $a < k$ de vectores puesto que la información relevante está contenida en los a primeros componentes, mientras que los últimos sólo describen variaciones debidas al ruido. Esto permite una reducción importante del número de variables. Resumiendo, se puede decir que el conjunto de datos \mathbf{X} , que estaba descrito por variables correlacionadas, en este momento está definido por un nuevo conjunto de variables, llamadas

componentes principales, que son variables no correlacionadas entre sí, en un nuevo sistema de ejes ortogonales.

3.2.4.2.2. Etapa de regresión en componentes principales (PCR)

La Regresión en Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*)¹⁰⁶ utiliza los componentes principales encontrados mediante el PCA y realiza una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los *scores*, en lugar de realizarla sobre los datos originales, con lo que se elimina cualquier posible problema en la inversión de la matriz, $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}$.

Obteniendo a partir de la matriz de datos \mathbf{X} la matriz de *scores* \mathbf{T} y la de *loadings* \mathbf{P} . Ahora se puede calcular la matriz \mathbf{Y} según:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}\hat{\mathbf{B}} + \mathbf{E}$$

donde $\hat{\mathbf{B}}$ es la matriz de regresores que se halla por mínimos cuadrados conociendo los valores de \mathbf{Y} del conjunto de calibración:

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^T\mathbf{Y}$$

donde el símbolo $\hat{}$ indica valores calculados. Una vez establecido el modelo de calibración, se pueden realizar los cálculos para predecir un conjunto de nuevas muestras. En primer lugar, la matriz de datos cinético-espectroscópicos desdoblada del conjunto de muestras de predicción, \mathbf{X}^* , se centra o autoescala utilizando los valores calculados a partir de la matriz de datos \mathbf{X} empleada en la calibración. A partir de la matriz de *loadings* calculada en la calibración, para el número a de componentes principales óptimo, se calculan los *scores* de las muestras de predicción, \mathbf{T}^* .

$$\mathbf{T}^* = \mathbf{X}^*\mathbf{P}$$

y, por último, se utiliza la matriz de regresores calculada en la calibración, junto con los *scores* de estas muestras, para el cálculo de la propiedad a determinar en las muestras desconocidas

¹⁰⁶ Park S.H.. *Technometrics* 23 (1981) 289–295.

$$\mathbf{Y}^* = \mathbf{T}^* \hat{\mathbf{B}}$$

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales escogidos que mejor representan la matriz de los datos, \mathbf{X} , pueden no ser los óptimos para la predicción de las propiedades de los analitos que queremos determinar [Joliffe, 1982; Sutter, 1992]. Por este motivo se han desarrollado otras técnicas de calibración que intenta concentrar el máximo poder predictivo en los primeros componentes principales como es el caso de la regresión parcial por mínimos cuadrados.

3.2.4.3. Regresión cuadrados mínimos parciales

El método de Regresión Cuadrados Mínimos Parciales (PLS, *Partial Least-Squares Regression*) fue desarrollado por H. Wold en 1966¹⁰⁷. La diferencia con el PCR es que se intenta que los primeros componentes contengan la mayor información para la predicción de la matriz \mathbf{Y} , ver Figura 3B.

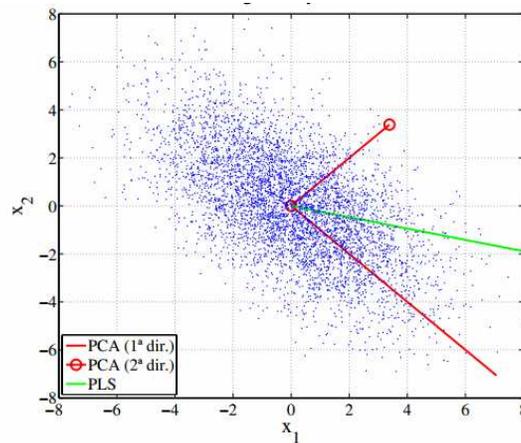


Figura 3B. Componentes principales de PCA y variable latente de PLS.

Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz \mathbf{Y} , por ej. concentraciones), obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes que tienen gran parecido a los componentes principales que se hallan a partir de un PCR. Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices \mathbf{X} e \mathbf{Y} se centran o autoescalan

¹⁰⁷ Wold H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. In P.R. Krishnaiah (Ed.). *Multivariate Analysis*. (pp.391-420) New York: Academic Press.

como en el caso del PCA. Cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de a factores de forma que:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{i=1}^a \mathbf{t}_i \mathbf{p}_i^T + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} = \sum_{i=1}^a \mathbf{u}_i \mathbf{q}_i^T + \mathbf{F}$$

donde \mathbf{T} es la matriz de *scores*, \mathbf{P} la de *loadings* y \mathbf{E} la matriz de residuales para la matriz de datos (matriz \mathbf{X}); \mathbf{U} es la matriz de *scores*, \mathbf{Q} la matriz de *loadings* y \mathbf{F} la matriz de residuales para la matriz de la propiedad a determinar (matriz \mathbf{Y}). Si tenemos m muestras, a factores, k variables y p analitos, la dimensionalidad de las matrices es la siguiente: \mathbf{T} y \mathbf{U} ($m \times a$), \mathbf{PT} ($a \times k$) y \mathbf{QT} ($a \times p$). En este caso, los *loadings* no coinciden exactamente con la dirección de máxima variabilidad de las muestras como en el caso de PCA, ya que están corregidos para obtener la máxima capacidad predictiva para la matriz \mathbf{Y} . La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los *scores* de los bloques \mathbf{X} e \mathbf{Y} de forma que para cada componente a , se cumpla que

$$\hat{\mathbf{u}}_a = b_a \mathbf{t}_a$$

donde el símbolo $\hat{}$ indica que es un valor calculado y b_a es el coeficiente de regresión para cada uno de los componentes. A partir de aquí se calcula el valor de \mathbf{Y} utilizando la relación interna $\hat{\mathbf{u}}_a$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TBQ}^T + \mathbf{F}$$

donde \mathbf{B} es la matriz de los coeficientes de regresión b_a , de dimensiones ($a \times a$), y \mathbf{F} la matriz de los residuales de \mathbf{Y} . En el caso de calcular una sola propiedad de la matriz \mathbf{Y} el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y si se determinan simultáneamente varias propiedades recibe el nombre de PLS2. Una vez establecido el modelo de calibración se puede realizar la predicción de la propiedad modelada en un nuevo conjunto de muestras según la siguiente expresión

$$\mathbf{y}_i^T = \mathbf{b}_o^T \mathbf{x}_i^T \hat{\mathbf{B}}$$

siendo \mathbf{x}_i el vector que define la señal analítica de la muestra, \mathbf{y}_i el vector de concentraciones o propiedades a determinar, y \mathbf{b}_o^T un vector que permite realizar la predicción de una muestra sin necesidad de descomponerla en matrices de *scores* y *loadings*.

3.2.4.4. Elección del número óptimo de componentes principales o factores

La elección del número de componentes principales (PCR) y variables latentes (PLS) o factores que configura el modelo óptimo es el punto clave en la utilización de cualquier técnica de calibración que realice una reducción de variables. Se han propuesto diferentes técnicas para deducir el número de PCs que se basan, en general, en el análisis del error de predicción al utilizar distinto número de éstos. Puesto que el método más habitual para la construcción del modelo es el de la validación cruzada (*cross validation*), una forma muy popular de seleccionar el número de factores óptimo es la sugerida por Wold¹⁰⁸, que consiste en representar el valor del error cuadrático medio de la validación cruzada (MSECV - Mean Squared Error Cross Validation) frente al número de PCs y buscar el mínimo. Se parte de la idea de que el error disminuye al aumentar el número de PCs, ya que se modela cada vez mejor el sistema, hasta que llega un momento en que los nuevos PCs introducidos únicamente explican ruido y el MSECV vuelve a aumentar debido al sobreajuste del modelo. Aunque es una idea razonable, el hecho de utilizar únicamente un número limitado de muestras (como máximo todas las presentes en el conjunto de calibración) hace que el método esté sujeto a un cierto error y tenga el peligro de generar un cierto sobreajuste de los datos. Otros autores prefieren utilizar el primer mínimo local que aparece en la representación del MSECV frente al número de PCs, aunque puede ser que en este caso se produzca un subajuste de los datos. Cuando la construcción del modelo se realiza por *test set*, el número de PCs se selecciona en función de la evolución del error para este conjunto de muestras.

¹⁰⁸ Wold S. - Technometrics, 1978 - Taylor & Francis

Otro método es el descrito por Haaland y Thomas¹⁰⁹ que escoge el número de componentes cuyo MSECv no es significativamente mayor que el mínimo MSECv del modelo, evitando de esta manera el sobreajuste. El mínimo valor del MSECv vendrá dado por un número de componentes que denominamos a^* . Cada valor de MSECv obtenido con un número de componentes menor al a^* se compara con el valor de MSECv(a^*) mediante una prueba de Fisher. Con esto se pretende encontrar el modelo más pequeño cuyo MSECv no sea significativamente más grande que aquel modelo que proporciona el mínimo, evitando así el sobreajuste. Para cada componente $a = 1, 2, \dots, a^*$ se calcula

$$F(a) = \frac{MSECv(a)}{MSECv(a^*)}$$

Como número de componentes óptimo se escoge el menor a tal que $F(a) < F_{\alpha, m, m}$ donde $F_{\alpha, m, m}$ es el valor tabulado para una prueba F unilateral con un porcentaje de nivel de significación de $(1 - \alpha)$ y m grados de libertad. Basándose en un criterio meramente empírico, el valor recomendado por Haaland y Thomas es 0.25. Los grados de libertad del numerador y denominador son los mismos (m en el caso de PLS1 es el número de muestras).

3.2.5. Métodos con selección de variables

Algunas variables dan información útil, y otras proporcionan ruido no deseado. Por esta razón es necesario escoger las variables que serán utilizadas por los diferentes algoritmos. Usando un criterio de selección de variables, la dimensionalidad de los datos puede reducirse sin perder información útil, y al mismo tiempo la información compuesta por ruido puede minimizarse. En definitiva, para estar seguro de que los resultados obtenidos sean buenos, es necesario seleccionar cuidadosamente las variables (parámetros) que se utilizarán junto a los algoritmos que se deseen aplicar.

La estrategia para la selección de variables más común consiste en evaluar cada variable individualmente y seleccionar aquellas variables que aportan información de mayor calidad. Desgraciadamente, este acercamiento ignora la redundancia o la sinergia entre variables y raramente encontrará un subconjunto óptimo. Ante esta situación uno puede tener la tentación de evaluar todos

¹⁰⁹ Haaland D.M., Thomas E.V. Anal. Chem. 60 (1988) 1193–1202.

los posibles subconjuntos de variables y seleccionar el óptimo. Sin embargo, esto es impráctico, ya que por lo general implica investigar una cantidad casi infinita de combinaciones que requeriría un tiempo de cálculo inasumible en la mayoría de aplicaciones. Por lo tanto, el objetivo es encontrar un criterio de selección simplificado y un procedimiento de búsqueda que proporcione resultados cercanos al óptimo global.

Para evitar la explosión exponencial de una búsqueda exhaustiva, se han desarrollado diferentes métodos que exploran el espacio de las variables de una manera más eficaz.

Estas estrategias de búsqueda pueden agruparse en tres grandes categorías: exponenciales, secuenciales (o deterministas), y aleatorias (o estocásticas).

3.2.5.1. Métodos secuenciales o (deterministas)

Los algoritmos de búsqueda secuenciales son estrategias que reducen el número de variables aplicando búsquedas locales. Los algoritmos más comunes son Stepwise y Algoritmo de las proyecciones sucesivas (SPA).

3.2.5.1.1. Stepwise

Engloba una serie de procedimientos de selección automática de variables significativas basados en la inclusión o exclusión de las mismas en el modelo de una manera secuencial¹¹⁰. Se pueden dividir los algoritmos en 2 categorías:

- Selección “forward stepwise”: el algoritmo comienza con el intercept, de modo que todas las variables predictoras están excluidas del modelo, e incorpora secuencialmente en el modelo aquella variable predictora que mejora el ajuste.

¹¹⁰ Hocking, R. R. Biometrics 32 (1976) 1-44.

- Eliminación “backward stepwise”: modelo completo que incluye todas las variables predictoras y a cada paso elimina aquellas con menor impacto en el ajuste hasta una determinada regla de parada.
- Selección “stepwise”: este método es una combinación de los dos procedimientos anteriores, comienza como la regresión forward, pero en cada paso se plantea si todas las variables introducidas en el modelo deben de permanecer. El algoritmo termina cuando ninguna variable entra o sale del modelo.

3.2.5.1.2. Algoritmo de las proyecciones sucesivas

SPA¹¹¹¹¹²¹¹³ es un algoritmo iterativo que emplea operaciones vectoriales simples para obtener un subconjunto de variables en las cuales el contenido de información es mínimamente redundante, lo que evita problemas de sobreajuste. SPA comienza con un vector x_0 (toma todas las variables como inicio, de a una por vez) y calcula cuál de los vectores restantes tiene la mayor proyección sobre el plano S_0 ortogonal a x_0 . Este vector, que denominaremos x_1 , puede considerarse que contiene la mayor cantidad de información no incluida en x_0 , ver [Figura 3C](#). En la siguiente iteración, SPA restringe el análisis al plano S_0 , tomando a x_1 como un nuevo vector de referencia y procediendo de la manera anteriormente descrita. De esta forma, se incorpora una nueva variable en cada iteración hasta alcanzar un determinado número N de longitudes de onda. El mejor vector de inicio y el criterio de parada (número de variables a seleccionar) se pueden optimizar de manera tal de obtener un modelo con la máxima capacidad predictiva.

Una restricción de este algoritmo es el número de variables que pueden ser seleccionadas, ya que este no puede ser mayor que el número de muestras de calibración.

Sobre cada conjunto de vectores (variables) seleccionados por las proyecciones, se realiza un modelo de calibración utilizando MLR. Una vez establecido el modelo se predicen las concentraciones de un

¹¹¹ Araújo M. C. U., Saldanha T. C. B., Galvão R. K. H., Yoneyama T., Chame H. C., Visani V. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 57 (2001) 65-73.

¹¹² Galvão R. K. H., Araújo M. C. U., Frago W. D., Silva E. C., José G. E., Soares S. F. C., Paiva H. M. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 92 (2008) 83-91.

¹¹³ Galvão R. K. H., Araújo M. C. U., Jose G. E., Pontes M. J. C., Silva E. C., Saldanha T. C. B. *Talanta* 67 (2005) 736-740.

conjunto de validación y se calcula la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción (RMSEP). El conjunto de variables seleccionadas es el que tiene el menor RMSEP.

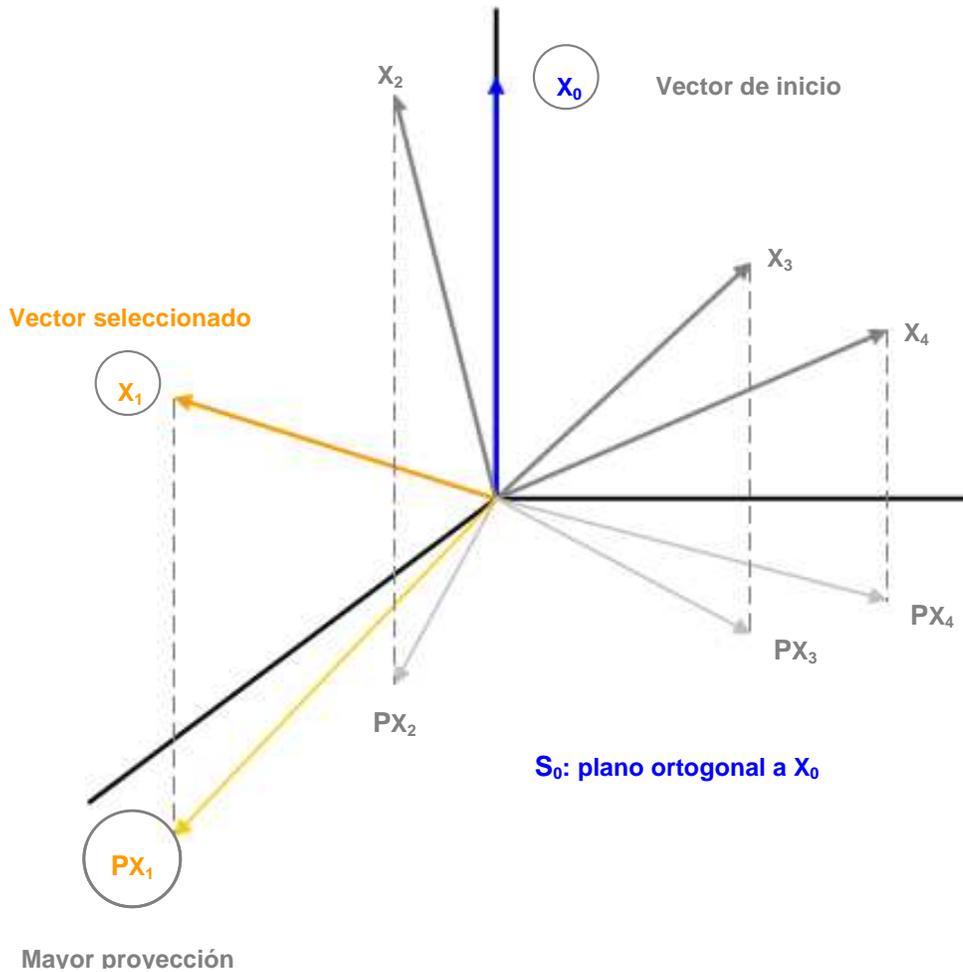


Figura 3C. Ejemplo de SPA con 5 variables y 3 muestras de calibración.

3.2.5.2. Métodos de optimización estocásticos

Los métodos no estocásticos revisados en la sección anterior permiten, en muchos casos, optimizar el número de variables que deben emplearse. Sin embargo, cuando el número de variables crece, dichos métodos tienden a quedarse atrapados en soluciones no óptimas. En estos casos, puede ser interesante abordar el problema de selección de variables empleando métodos estocásticos. Estos permiten realizar búsquedas locales alrededor de soluciones prometedoras pero poseen la componente de aleatoriedad que les permite explorar otras soluciones en el espacio de búsqueda. Un ejemplo de estos algoritmos son los Algoritmos genéticos.

3.2.5.3. Algoritmos genéticos

Los algoritmos genéticos¹¹⁴¹¹⁵ son procesos de búsqueda basados en los principios de la selección y la evolución natural. Las posibles soluciones a un problema son codificadas en forma de cadenas binarias y la búsqueda se inicia con una población de posibles soluciones generada aleatoriamente.

En el problema de la selección de variables, cada posible combinación es codificada con una cadena binaria tan larga como parámetros se consideren para encontrar la combinación óptima de variables. En dicha cadena, cada variable tiene asignada una posición o bit, de manera que una posible solución vendrá descrita por una sucesión de unos y ceros indicando la presencia (con un 1) o la ausencia (con un cero) de cada una de las variables en esa combinación particular. En las condiciones genéticas cada variable se llama gen y un juego de variables es un cromosoma. Por ejemplo, en un problema de selección que empieza con 8 variables, un posible cromosoma sería 00110101. Esto puede traducirse tal que las variables 3, 4, 6 y 8 serán usadas en el proceso de modelado (para entrenar y validar un clasificador neuronal) y las variables 1, 2, 5 y 7 serán omitidas.

En este tipo de algoritmos, cada miembro de la población, que representa una posible solución, es testada con algún criterio objetivo de manera que cada uno de los miembros de la población se valora en función de su ajuste (valor del criterio). Este criterio puede ser, por ejemplo, el error de predicción.

A las soluciones mejor valoradas se les permite sobrevivir y pasar a la siguiente iteración (“generación”), mientras que las soluciones de peor ajuste desaparecen en sucesivas generaciones. El algoritmo genético prosigue hasta que iguala o supera el ajuste establecido como meta, hasta que exista una convergencia en la población, de manera que un determinado porcentaje de sus miembros acaben siendo idénticos o hasta que se llegue al número máximo de iteraciones.

La generación de los miembros de la población de una nueva iteración se realiza a partir de combinaciones y mutaciones entre los miembros supervivientes de la anterior iteración. La

¹¹⁴ Yun Y.H., Cao D., Tan M., Yu L., Liang Y. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 130 (2014) 76-83.

¹¹⁵ Olivieri, A.C., Magallanes, J.F. *Talanta* Volume 97(2012) 242-248.

combinación consiste en cruzar, de dos en dos, los miembros de la antigua población, creando nuevos individuos y la mutación de un miembro consiste en el cambio aleatorio de algún bit de su cadena.

3.2.5.4. Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

El objetivo de la calibración es obtener parámetros de regresión que permitan calcular la concentración en futuras muestras de forma que, para cada muestra i y analito j , el residual de la concentración, f_{ij} , sea el menor posible,

$$f_{ij} = \hat{y}_{ij} - y_{ij}$$

donde \hat{y}_{ij} es la concentración calculada. Se desea minimizar algún tipo de error de predicción medio para la población a la que se aplicará la calibración. Para evaluar esta capacidad predictiva, se suele usar la sumatoria de los residuales al cuadrado, $(\sum (i_j - y_{ij})^2)$, denominado habitualmente PRESS (*Predicted Residual Error Sum of Squares*) o su valor medio, obtenido dividiendo el PRESS por el número de muestras, MSE (*Mean Square Error*). El cálculo de la concentración utilizando el modelo construido se denomina “predicción”. Así, se puede calcular el MSE de la predicción (MSEP) como

$$\text{MSEP} = \frac{\sum_{i=1}^{m_p} (\hat{y}_{ij} - y_{ij})^2}{m_p}$$

donde m_p es el número de muestras de predicción. También se suele utilizar la raíz cuadrada de este valor (*RMSEP, Root Mean Square Error of Prediction*), debido a que tiene las mismas unidades en que se mide la concentración. De manera similar, cuando se calcula con el modelo la concentración de las muestras del calibrado, se puede definir el MSEC y el RMSEC utilizando el PRESS y el número de muestras de calibración. Cuando se pretende comparar errores de calibración y/o predicción entre varios analitos, es útil el error cuadrático relativo (*RSE, Relative Standard Error*) definido para el analito j como

$$\text{RSE}_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\hat{y}_{ij} - y_{ij})^2}{\sum_{i=1}^m (y_{ij})^2}} \times 100$$

donde la sumatoria se extiende a las m muestras. Los símbolos utilizados para referirse a las muestras de calibración o de predicción son RSEC y el RSEP, respectivamente. Este parámetro es independiente de los rangos de concentraciones individuales, por tanto se podrán comparar errores entre analitos a diferentes concentraciones.

Para poder elegir el mejor modelo entre las posibilidades que dan las muestras de calibración es necesario un proceso de validación. Esta validación puede ser externa o interna. Para la validación externa de los modelos, se suelen utilizar dos grupos de muestras, uno denominado propiamente de calibración y el otro es el conjunto de prueba o *test set*. El número de muestras del *test set* ha de ser elevado, y deben ser muestras independientes de las del conjunto de calibración, pero representativas del mismo y de las futuras muestras a analizar. La concentración de las muestras del *test set* debe ser conocida y, por tanto, es posible comprobar cómo se comporta el modelo frente a muestras distintas a las utilizadas en la construcción el mismo. Cuando el número de muestras disponible es relativamente pequeño, se utiliza un método de validación interna. La metodología a seguir es la denominada “validación cruzada” (*cross validation*), la cual, para comprobar el modelo utiliza muestras del propio conjunto de calibración. Mediante este método, el conjunto de muestras de calibración se divide en varios bloques o segmentos. El modelo se construye reservando uno de los segmentos como conjunto de datos para comprobar los resultados y el resto para construir el modelo. El proceso se repite tantas veces como número de segmentos se ha elegido, de forma que cada vez se deja un segmento fuera del calibrado y el resto se utiliza para construir el modelo. Al final todos los segmentos han actuado para la construcción y para la validación del modelo. Esto se realiza para cada una de estas nuevas variables, calculando el MSE para cada segmento y acumulándolo, de forma que se consigue una buena estimación del poder predictivo de las muestras de calibración. El MSEC (Mean Squared Error of prediction by Cross Validation) para cada factor y cada analito es:

$$\text{MSEC} = \frac{\sum_{i=1}^{m_c} (\hat{y}_{ij} - y_{ij})^2}{m_c}$$

donde mc es el número de muestras de calibración en el segmento de *cross validation*. Tanto en modelos construidos por *test set* (construidos con validación externa) como en los obtenidos por *cross validation* (con validación interna), las muestras que definen el conjunto de validación han sido utilizadas indirectamente para construir el modelo, por lo que se utiliza un tercer conjunto de muestras, al que llamaremos conjunto de predicción externo (*external prediction set*), para comprobar realmente el comportamiento del modelo con nuevas muestras. Por tanto, para este tercer conjunto se pueden definir los parámetros anteriormente mencionados con los siguientes acrónimos: MSEP y RMSEP.

3.2.6. Algoritmos de clasificación

Una de las primeras áreas de trabajo que abordó la Quimiometría y donde se recogen importantes resultados es precisamente la relacionada con el Reconocimiento de Patrones. Entre los objetivos fundamentales del Reconocimiento de Patrones tenemos: La identificación de relaciones y/o vínculos entre objetos, en nuestro caso denominados muestras químicas o grupos de éstas previamente caracterizadas a través de diversos métodos de análisis instrumental, que permitan su agrupamiento y clasificación según la similitud de sus espectros, cromatogramas, análisis elemental, imágenes etc. De igual manera, estas herramientas deben permitir la clasificación de nuevas muestras como pertenecientes a un grupo determinado de una forma rápida y objetiva.

Para el cumplimiento de sus objetivos, el Reconocimiento de Patrones emplea diferentes métodos de trabajo, los cuales podemos dividir en dos grandes grupos: los métodos de clasificación entre los que se encuentran los Supervisados y No Supervisados.

3.2.6.1. No supervisado

Los algoritmos de clasificación no supervisada, a diferencia de los de clasificación supervisada, no disponen de un reconocimiento de patrones mediante un conjunto de entrenamiento, y valiéndose de algoritmos de agrupamiento intentan construirlo.

Si no se dispone del conjunto de entrenamiento, es decir, no existe conocimiento acerca de las etiquetas de los patrones, entonces para clasificar objetos se necesita un proceso previo de análisis de los datos que se conoce como clasificación no supervisada, aprendizaje no supervisado o técnicas de agrupamiento (clustering), que proporcionan un conocimiento sobre la estructura de los datos.

El objetivo del agrupamiento es clasificar un conjunto de objetos en grupos, de forma tal que los objetos dentro de un grupo posean un alto grado de semejanza, mientras que los pertenecientes a grupos diferentes sean poco semejantes entre sí. Debido a la gran cantidad de algoritmos de agrupamiento que existe en la actualidad, es necesario que éstos satisfagan ciertas propiedades deseables.

Entre los más destacados están:

-Análisis jerárquico de grupos, HCA (Hierarchical Cluster Analysis)¹¹⁶: agrupa conjuntos que sean muy semejantes entre sí, es decir, que el grupo esté cohesionado internamente y, por el otro, los objetos pertenecientes a grupos diferentes tengan un comportamiento distinto con respecto a las variables analizadas, es decir, que cada grupo esté aislado externamente de los demás grupos.

-PCA: se crea como ya fue explicado anteriormente un nuevo sistema de ejes coordenados generando una representación grafica de bajas dimensiones que describe la mayor parte de la variación de los datos de naturaleza multivariada.

3.2.6.2. Supervisado

Este tipo de clasificación ha sido utilizado ampliamente a través de los años en Quimiometría. Para construir un modelo de clasificación supervisada es necesario disponer de una muestra de objetos cuya clase sea conocida y para los que también se conozcan los valores de las variables predictoras. La pertenencia de los objetos a las clases puede ser supuesta, esto es, puede tratarse de una hipótesis a comprobar. La asignación de los objetos a las clases debe ser exhaustiva (todos los objetos pertenecen a alguna clase) y mutuamente exclusiva (ningún objeto pertenece a más de una clase). Estos objetos

¹¹⁶ R. Sibson. The Computer Journal (British Computer Society) 16 (1973) 30–34.

forman lo que se denomina el "conjunto de entrenamiento" con el cual se construye el modelo de clasificación. Una vez construido, el modelo se utiliza para predecir la clase a que pertenecen nuevos objetos a partir de la medida de las variables predictoras. Es usual utilizar muestras adicionales pertenecientes a clases conocidas, que no forman parte del conjunto de entrenamiento original, para comprobar el modelo y controlar su precisión y exactitud. De manera general en una clasificación supervisada se siguen los siguientes pasos: (1) modelaje del conjunto de entrenamiento. (2) validación del modelo. (3) mejoramiento de los datos (si es necesario). (4) aplicación del modelo.

Existe una variedad de técnicas de clasificación entre las más conocidas tenemos:

-Análisis discriminante¹¹⁷, tratando de maximizar la covarianza entre los dos tipos de variables para diferenciar entre los grupos y omitir la variación dentro de una clase.

-Método No paramétrico de los k vecinos más próximos o "método k-NN" (k Nearest Neighbours)¹¹⁸, KNN es un algoritmo no supervisado que identifica las K muestras más similares, en el colectivo de calibración, a la muestra a predecir. De este modo, los valores de referencia de esas muestras seleccionadas tienen un peso en función de la distancia a la muestra a predecir para determinar la clase a la que pertenece.

-Modelado Independiente Suave de Analogía de Clases (SIMCA)¹¹⁹: SIMCA es un algoritmo de reconocimiento de patrones supervisado que se basa en el desarrollo de un modelo PCA para cada una de las clases o categorías del colectivo en el que se proyecta la muestra a predecir. Posteriormente, la muestra desconocida se compara con cada modelo PCA desarrollado, calculando sus valores residuales y Hotellings. En función de la distancia de la muestra dentro de cada modelo PCA, SIMCA asigna una clase a la muestra desconocida. La desventaja de este algoritmo es que una misma muestra puede predecirse como que pertenece a una categoría, ninguna o varias.

3.2.7. Limitaciones de la calibración multivariante

¹¹⁷ Fisher, R. A. *Annals of Eugenics* 7 (1936) 179–188.

¹¹⁸ Altman, N. S. *The American Statistician* 46 (1992) 175–185.

¹¹⁹ Wold S., Sjostrom M. *American Chemical Society* 52 (1977) 243-282.

Sin duda, la calibración multivariante tiene una mayor complejidad conceptual, matemática y estadística que la calibración univariante. Aunque hay programas que facilitan el uso de este tipo de calibración, su aplicación no es tan inmediata como la univariante y el usuario necesita más horas de formación. Además, el cálculo de la incertidumbre de las predicciones no está completamente desarrollado¹²⁰. A menudo se utilizan errores medios de predicción como medida de la calidad de las predicciones, aunque sabemos que la predicción tiene una calidad distinta según en qué punto del espacio de calibración se encuentre. A pesar de sus limitaciones, las ventajas de utilizar la calibración multivariante superan sus inconvenientes en muchos campos y el número de aplicaciones crece constantemente.

Es muy importante para el químico analítico recordar que la disponibilidad de todas estas herramientas (calculadoras, hojas de cálculo, programas para análisis multivariado) de datos aumenta, en vez de disminuir, la necesidad de un sólido conocimiento de los principios en los que se basan los cálculos estadísticos. Una computadora realizara con rapidez cualquier cálculo o contraste estadístico seleccionado por el usuario, tanto si ese procedimiento es adecuado o no para los datos en estudio.

3.3. Introducción a la problemática actual

Hoy en día, el biodiesel se ha convertido en la matriz energética más importante de muchos países. En Brasil, Argentina, Estados Unidos y varios miembros de la Unión Europea, los proveedores de combustible para el transporte están obligados a distribuir diesel mezclado con biodiesel, que se ha traducido en un aumento sustancial de la producción de este combustible obtenido a partir de fuentes renovables^{121 122 123}.

¹²⁰ Valderrama P., Braga J.W.B., Poppi R.J., *Quim. Nova* 32(2009) 1278-1287.

¹²¹ Law N° 11097, ANP- Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Bicomustíveis, Brasil, 2005.

¹²² Law 26.093, Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y uso Sustentables de Biocombustibles, Argentina, 2006.

¹²³ G. Knothe, J.V. Gerpen, J. Kral, L.P. Ramos, *Manual de Biodiesel*, Edgard Blucher, São Paulo, 2006.

El biodiesel puede ser producido a partir de una variedad de materias primas, incluyendo grasas de origen animal (sebo de vaca, manteca de cerdo y grasa de pollo, por ejemplo), aceite residual y aceites vegetales. En este contexto, aceites vegetales tales como soja, girasol y maíz son las fuentes de triglicéridos más comunes reportados en la literatura^{124 125 126 127}.

La materia prima tiene una influencia significativa en las propiedades del biodiesel. De hecho, la calidad del producto de transesterificación depende de la composición de ácidos grasos del aceite de base o grasa^{128 129 130}. El aceite crudo típico contiene hasta un 1,6% de materia insaponificable, que no se ve afectada por la preparación del éster y es probable que estén presentes en cantidades similares en el biodiesel resultante¹³¹.

Además, muchas insaturaciones en las cadenas de triglicéridos pueden llevar a una polimerización. Por otra parte, la presencia de compuestos saturados eleva el punto de fusión del combustible, lo que dificulta su uso en regiones con clima frío. Además, afecta el índice de cetano, el calor de combustión, la estabilidad oxidativa y lubricidad del biodiesel¹³². El uso de materias primas inadecuadas también puede causar la formación de incrustaciones en el motor, así como la liberación de componentes nocivos y partículas en los gases de escape¹³³.

¹²⁴ J. Janaun, N. Ellis, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 1312–1320.

¹²⁵ B. R. Moser, S.F. Vaughn, *Biomass and Bioenergy* (2012), doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.038.

¹²⁶ B. R. Moser, *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant* 45 (2009) 229–266.

¹²⁷ . Karmakar, S. Karmakar, S. Mukherjee, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7201–7210.

¹²⁸ S. K. Hoekmana, A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, M. Natarajan. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16 (2012) 143–169.

¹²⁹ A. Sagiroglu, Ş. Selenisbilir, H. Ozcan, H. Paluzar, N. M. Toprakkiran, *Chem. Ind. & Chem. Eng. Q.* 17 (2011) 53–58.

¹³⁰ K. R. Szulczyk, B. A. McCarl, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 2426–2433.

¹³¹ L. Yu, I. Lee, E.G. Hammond, L.A. Johnson, J.H. Van Gerpen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 1821-1824.

¹³² B. R. Moser, *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant* 45 (2009) 229–266.

¹³³ G. Karavalakis, E. Bakeas, G. Fontaras, S. Stournas, *Energy* 36 (2011) 5328-5337.

La importancia del tipo de materia prima para la calidad del biodiesel ha motivado el desarrollo de métodos analíticos para certificar el aceite de base empleado en el proceso de producción. Dentro de este ámbito, varias investigaciones se han desarrollado con el uso de la espectroscopia vibracional. Sin embargo, la baja sensibilidad de esta técnica, que no permite la detección de componentes minoritarios en la muestra, puede dificultar el análisis. Por ejemplo, los trabajos anteriores fueron incapaces de discriminar biodiesel a base de maíz mediante el uso de infrarrojo cercano (NIR)^{134 135}. Balabin y Safieva¹³⁶ usaron 9 tipos de aceites vegetales y Veras¹³⁷ utilizó 4 tipos para producir sus muestras de biodiesel e hizo la clasificación origen a través de la espectroscopia NIR y técnicas multivariadas. Silva¹³⁸ presenta una clasificación con NIR en mezclas biodiesel / diesel y Veras¹³⁹ utiliza UV-Vis para hacer la clasificación, pero ninguno de ellos discriminó el aceite de maíz.

Una alternativa interesante puede ser el uso de la espectroscopia de fluorescencia sincrónica (SFS), que ofrece una alta sensibilidad y ha mostrado excelentes resultados cuando se combina con métodos quimiométricos de clasificación^{140 141 142}. De hecho, el proceso de producción de biodiesel genera pigmentos fluorescentes que podrían actuar como marcadores intrínsecos para un tipo particular de materia prima¹⁴³.

¹³⁴ R. M. Balabin, R. Z. Safieva, *Anal Chim. Acta* 689 (2011) 190-197.

¹³⁵ G. Veras, A. A. Gomes, A. C. Silva, A. L. B. Brito, P. B. A. Almeida, E. P. Medeiros, *Talanta* 83 (2010) 565-568.

¹³⁶ R. M. Balabin, R. Z. Safieva, *Anal Chim. Acta* 689 (2011) 190-197.

¹³⁷ G. Veras, A. A. Gomes, A. C. Silva, A. L. B. Brito, P. B. A. Almeida, E. P. Medeiros, *Talanta* 83 (2010) 565-568.

¹³⁸ G. W. B. Silva, A. A. Gomes, P. Silva, G. B. Costa, D. D. S. Fernandes, M. M. Fontes, G. Veras, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 21(2012) 1-7.

¹³⁹ G. Veras, A. L. B. Brito, A. C. Silva, P. Silva, G. B. Costa, L. C. N. Félix, *Quim. Nova* 35 (2012) 315-318.

¹⁴⁰ O. Abbas, C. Rébufa, N. Dupuy, A. Permanyer, J. Kister, D. A. Azevedo, *Fuel* 85 (2006) 2653-2661.

¹⁴¹ K. I. Poulli, G. A. Mousdis, C. A. Georgiou, *Anal. Chim. Acta* 542 (2005) 151-156.

¹⁴² E. Sikorska, T. Górecki, I. V. Khmelinskii, M. Sikorski, J. Koziół, *Food Chem.* 89 (2005) 217-225.

¹⁴³ K. Kumar, A. K. Mishra, *J. Fluoresc.* 22 (2012) 339-347.

Este trabajo propone el uso de SFS con SPA-LDA para discriminar muestras de biodiesel con respecto al aceite de base empleado para su producción. El método propuesto es rápido, no destructivo y no requiere el uso de productos químicos para el tratamiento de la muestra. Con el fin de investigar los beneficios de selección de longitud de onda de espectro completo, se emplea también para la comparación el algoritmo SIMCA. El presente estudio es particularmente interesante por la discriminación de biodiesel a base de maíz, que no fue posible en trabajos anteriores relacionados con la espectroscopia NIR.

3.4. Experimental

3.4.1. Muestras

Las muestras de biodiesel empleadas en el estudio fueron producidas a partir de aceites de soja, maíz y girasol de diferentes lotes y fabricantes, los cuales fueron adquiridos en la ciudad de João Pessoa (Paraíba, Brasil). Los ésteres metílicos fueron obtenidos por transesterificación de los aceites con metanol en presencia de un catalizador (KOH). Se sintetizaron un total de 60 muestras (20 de cada tipo de aceite).

La reacción de transesterificación se llevó a cabo a una temperatura de 60 ° C con una relación molar de 6:1 (metanol:aceite). La relación catalizador: aceite fue de 0,5% w / w. Después de una hora, el subproducto de glicerina se separó y el biodiesel resultante se lavó con agua, con una solución de HCl 0,001M y luego agua destilada, hasta obtener el agua de lavado con pH neutro. Luego se calentó el biodiesel a 110°C durante 1h para evaporar el agua. Posteriormente se agregó sulfato de sodio anhidro y por último se filtro al vacío para eliminar cualquier resto de agua.

3.4.2. Adquisición de espectros

Se utilizó un espectrofluorímetro SLM Aminco Bowman serie 2, equipado con una fuente de luz de descarga de xenón (150 W) para obtener los espectros. La precisión y repetitividad de la elección en la longitud de onda es de $\pm 0,5$ y $\pm 0,25$ nm, respectivamente. Las rendijas de excitación y emisión

fueron de 8 nm. Las mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando una cubeta estándar de cuarzo (600 μl de volumen de trabajo). La velocidad de barrido fue de 5 nm s^{-1} .

Para cada muestra, se obtuvieron diez espectros de fluorescencia sincrónica mediante el movimiento de los dos monocromadores simultáneamente a las diferencias de longitud de onda constante ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{emisión}} - \lambda_{\text{excitación}}$) de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nm. El rango de excitación fue de 280-600 nm para todos los espectros, mientras que el rango de emisión varió desde 285-605 nm a 330-650 nm de acuerdo con la diferencia de longitud de onda ($\Delta\lambda$) empleada.

3.4.3. Software

El pre-procesamiento espectral (suavizado Savitzky-Golay), Análisis de Componentes Principales (PCA) y SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) se realizaron con el programa Unscrambler®9.7. La selección de muestras (algoritmo de Kennard-Stone) y el modelado SPA-LDA fueron hechos en Matlab 2010a®.

El algoritmo Kennard-Stone¹⁴⁴ se aplicó a los espectros con el fin de separar las muestras en conjuntos de entrenamiento, validación y de prueba. Las muestras de entrenamiento se emplean en SPA-LDA para calcular los vectores medios de cada clase, así como la matriz de covarianza. Las muestras de validación se utilizan para evaluar la función de costo asociada con el riesgo de una clasificación errónea, que guía el proceso de selección de variable. Finalmente, las muestras de prueba se utilizan como un conjunto externo para evaluar el desempeño de la clasificación resultante del modelo SPA-LDA.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Elección del $\Delta\lambda$

La [Figura 3D](#) presenta los espectros de fluorescencia sincrónica de las 60 muestras de biodiesel para cada una de los diferentes valores de $\Delta\lambda$.

¹⁴⁴ R.K.H. Galvão, M.C.U. Araújo, G.E. José, M.J.C. Pontes, E.C. Silva, T.C.B. Saldanha, Talanta 67 (2005) 736-740.

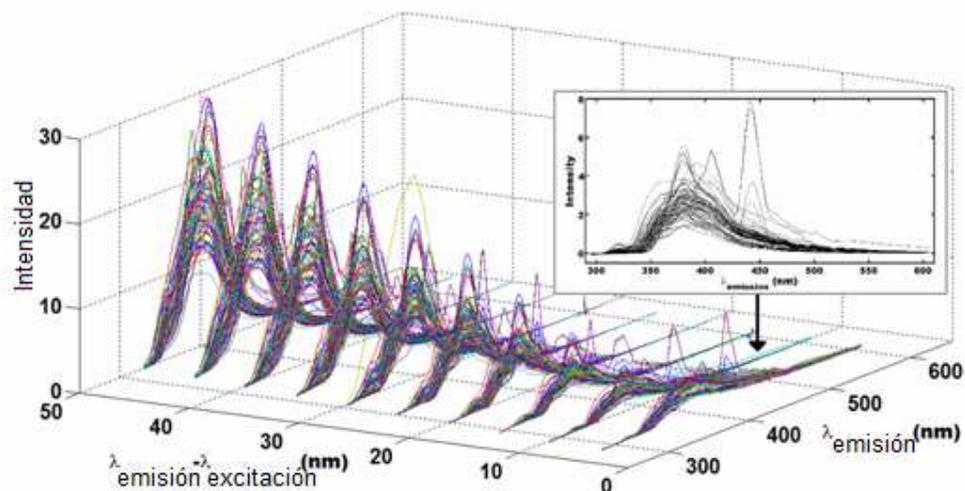


Figura 3D. Espectros de fluorescencia sincrónica de 60 muestra de biodiesel con $\Delta\lambda$ de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50nm.

Los espectros de cada $\Delta\lambda$ se suavizaron inicialmente utilizando un filtro Savitzky-Golay con un polinomio de segundo orden y una ventana de 11 puntos. El algoritmo Kennard-Stone se empleó entonces para dividir los datos en conjuntos de entrenamiento, validación y prueba, como se indica en la [Tabla 3A](#). Los espectros para cada $\Delta\lambda$ se evaluaron de acuerdo con el número de errores de entrenamiento y validación obtenidos mediante el uso de SPA-LDA. Como puede verse en la [Figura 3E](#), las mejores opciones de $\Delta\lambda$ serían de 10 nm o 15 nm, por lo que todo el entrenamiento y las muestras de validación fueron clasificados correctamente. Se seleccionó $\Delta\lambda = 10$ nm debido a que el modelo correspondiente tiene un menor número de variables espectrales (ocho) en comparación con $\Delta\lambda = 15$ nm (nueve).

Los espectros para $\Delta\lambda = 10$ nm, que fueron empleados en todos los cálculos subsiguientes, se indican con una flecha en la [Figura. 3D](#). Estos espectros se extienden desde 295 hasta 615 nm. De acuerdo con la literatura, esta rango incluye bandas intensas de fluorescencia de los polifenoles ¹⁴⁵ y

¹⁴⁵ S. Schober, M. Mittelbach, Eur. J. of Lipid Sci. and Technol. 106 (2004) 382–389.

feroles ¹⁴⁶ entre 300 y 330 nm, así como bandas de baja intensidad de las emisiones de vitaminas entre 350 y 600 nm ¹⁴⁷.

Tabla 3A. Conjuntos de entrenamiento, validación y prueba.

| Clase | Conjunto | | |
|--------------|---------------|------------|--------|
| | Entrenamiento | Validación | Prueba |
| Soja | 10 | 5 | 5 |
| Maíz | 10 | 5 | 5 |
| Girasol | 10 | 5 | 5 |
| Total | 30 | 15 | 15 |

¹⁴⁶ A. Fröhlich, S. Schober, J. Am. Oil Chem. Soc. 84 (2007) 579–585.

¹⁴⁷ M. Zandomenghi, L. Carbonaro, C. Caffarata, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 759-66.

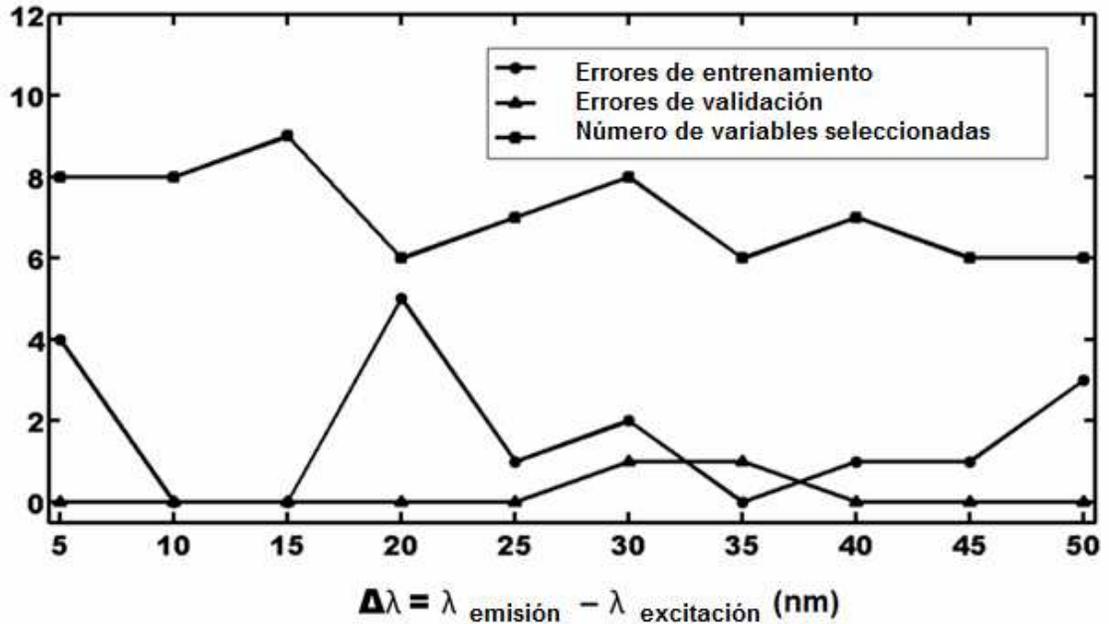


Figura 3E. Comparación de los diferentes $\Delta\lambda$ en función de errores de entrenamiento validación y número de variables seleccionados por SPA.

3.5.2. Análisis exploratorio

Se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos espectrales mediante el uso de PCA. La Figura 3F presenta el grafico de scores PC1 vs. PC2. Como puede verse en la Figura 3F, la separación entre las tres clases no es clara. Tal hallazgo motiva el uso de un subconjunto de las variables espectrales, en lugar de todo el espectro, como se detalla a continuación.

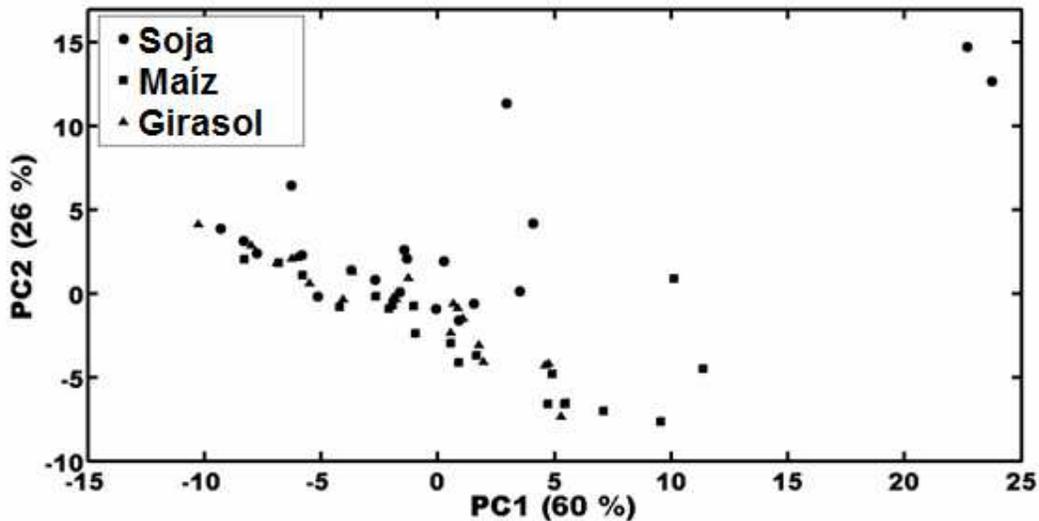


Figura 3F. Gráfico de scores de las 60 muestras.

3.5.3. Clasificación

La Figura 3Ga. presenta el gráfico del costo de validación asociada con el proceso de selección de variables en SPA-LDA. Como se puede observar, el mínimo de la función se encuentra en 8 variables que se indican en la Figura 3Gb. Las longitudes de onda seleccionadas fueron 321, 343, 354, 365, 380, 397, 442 y 460 nm. Como se informó en la literatura, la región de 430-455 nm se asocia a una baja fluorescencia de la vitamina E, así como un pico intenso de fluorescencia de los productos de descomposición de los aceites vegetales¹⁴⁸. La emisión a 460 nm podría atribuirse a los ácidos grasos poliinsaturados¹⁴⁹. La emisión a 442 nm puede ser debida a la clorofila, que se encuentra con un mayor contenido en biodiesel de soja¹⁵⁰.

Como se discutió en la Sección 3.1, el modelo SPA -LDA clasificó correctamente todos los entrenamientos y las muestras de validación. Mediante la aplicación de este modelo para el conjunto de prueba, todas las muestras también fueron clasificadas correctamente.

¹⁴⁸ N. Kyriakidis, P. Skarkalis, J. AOAC Int. 83 (2000) 1435-1439.

¹⁴⁹ B. Berra, R. Gaspeli, Third International Congress on the Biological Value of Olive Oil, Chania, Greece, 1980, pp 427-463.

¹⁵⁰ M.N. Merzlyak, T.B. Melo, K.R. Naqvi, J. Exp. Bot. 59 (2008) 349-359.

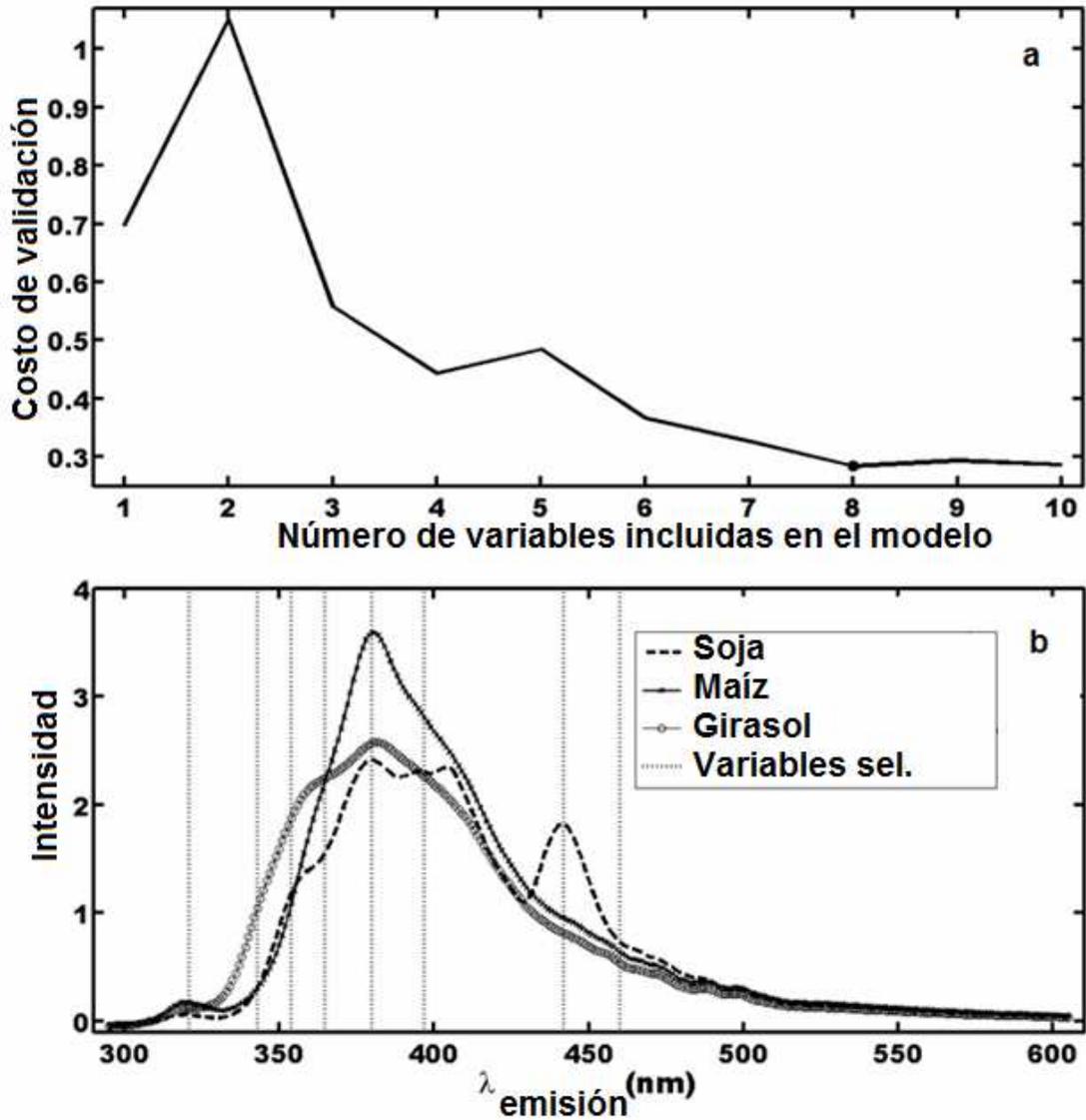


Figura 3G. a) Selección del número apropiado de variables a utilizar en el modelaje. b) Variables seleccionadas.

La discriminación adecuada de las tres clases con las variables seleccionadas por SPA-LDA se ilustra en la [Figura 3H](#). Esta Figura presenta una gráfica de las puntuaciones del conjunto de datos en general (entrenamiento, validación y prueba) usando las dos funciones discriminantes de Fisher obtenidos a

partir de los datos de entrenamiento¹⁵¹. Como puede verse, los límites de los discriminantes lineales separan perfectamente las muestras con respecto al aceite base.

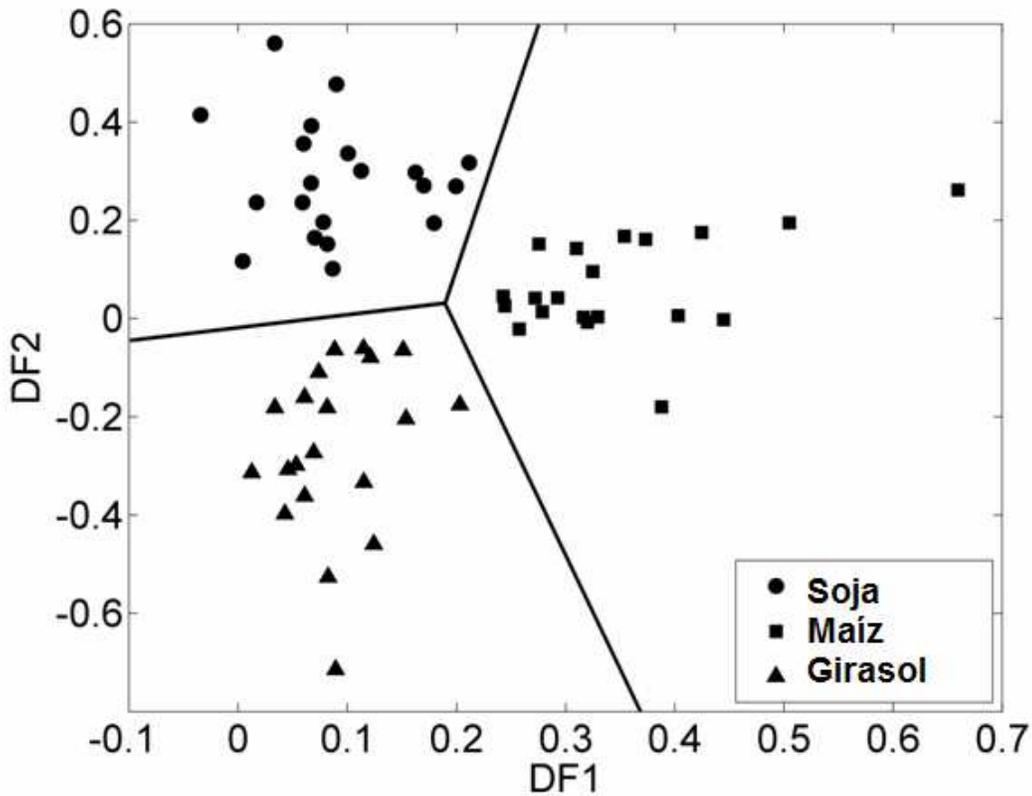


Figura 3H. Gráfico de funciones discriminantes de Fisher para el modelo SPA-LDA.

Una comparación de las Figuras 3F y 3H indica que la selección de las variables es en efecto, de importancia para el procedimiento de clasificación. De hecho, la gráfica de los scores de PCA en la Figura 3F, que se obtuvo a partir del espectro de emisión completo, difícilmente revela alguna separación entre las clases.

Con el fin de investigar más a fondo las ventajas de la selección de variables, la clasificación se repitió mediante modelos de espectro completo SIMCA. La Tabla 3B presenta el número de errores resultantes para un nivel de significación de 5% en SIMCA. Vale la pena señalar que a diferencia de LDA, SIMCA puede conducir a dos diferentes tipos de errores: una muestra se puede dejar fuera de

¹⁵¹ R.O. Duda, P.E. Hart, D.G. Stork. Pattern Classification, John Wiley, New York, 2001.

su propia clase (error tipo I), y que se pueden incluir en una clase incorrecta (error tipo II). Como se puede observar en la [Tabla 3B](#), no se obtuvieron errores de tipo I. Sin embargo, el gran número de errores de tipo II significa que muchas muestras fueron asignadas a más de una clase, dejando la clasificación final ineficaz.

Tabla 3B. Número de errores de clasificación

| Conjunto | SIMCA (Tipo I)* | SIMCA (Tipo II)** | SPA-LDA |
|---|-----------------|-------------------|----------|
| Entrenamiento (30 muestras) | 0 | 16 | 0 |
| Validación (15 muestras) | 0 | 10 | 0 |
| Prueba (15 muestras) | 0 | 15 | 0 |
| * Muestras no incluidas en su propia clase. ** Muestras incluidas en una clase incorrecta. | | | |

3.6. Conclusiones

El uso de la espectroscopia de fluorescencia sincrónica (SFS) sumada a la selección de longitudes de onda por SPA ha demostrado ser un enfoque prometedor para la identificación del aceite base que se utiliza en la producción de biodiesel, que es un aspecto importante para el control de calidad. En particular, SFS permitió la discriminación de biodiesel a base de maíz de otras muestras, lo cual es una mejora sobre las investigaciones anteriores utilizando la espectroscopia NIR. Todas las muestras empleadas en el estudio fueron clasificadas correctamente con respecto al aceite base empleando sólo ocho longitudes de onda del espectro de emisión con $\Delta\lambda = 10$ nm. Los resultados también revelaron que la selección de longitud de onda es la clave para la adecuada separación de las clases. De hecho, a

diferencia de SPA-LDA, los modelos SIMCA de espectro completo proporcionan una clasificación errónea en muchos casos.

Capítulo

4



Determinación de parámetros de calidad

Quimiometría

Color

Calor de combustión

%Biodiesel

Número de cetanos

4. Capítulo 4: determinación de parámetros de calidad en combustibles diesel - Quimiometría

4.1. Objetivo

En esta sección se estudiarán parámetros como son Color, Calor de combustión, Número de cetanos, y contenido de biodiesel en combustibles diesel comerciales; con el objetivo de desarrollar un nuevo método de análisis para determinar cuatro parámetros de calidad (porcentaje de biodiesel, número de cetano, calor de combustión Gross y color) en mezclas de biodiesel / diesel a través de un simple espectro sincrónico de fluorescencia.

Para este propósito, se utilizaron modelos quimiométricos basados en los espectros de fluorescencia y valores obtenidos por medio del analizador PetroSpect, de mezclas de biodiesel / diesel. Una selección de variables por medio del algoritmo de proyecciones sucesivas (SPA) se utilizó con el fin de obtener de modelo de regresión lineal múltiple (MLR) basado en un pequeño subconjunto de longitudes de onda. Los resultados SPA-MLR se compararon con la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

Los mejores valores encontrados para el error cuadrático medio de predicción utilizando validación externa fueron 0,37% (w / w) para el biodiesel en el diesel, 0,5 para el índice de cetano, 0,013 MJ / Kg para el calor de combustión y de 0,1 unidades ASTM para el color.

4.2. Introducción

La producción mundial y consumo de biodiesel puro y sus mezclas binarias con diesel han aumentado sustancialmente. A principios de 2010, el gobierno argentino permitió el uso comercial de mezclas de biodiesel¹⁵². Hoy en día, el mercado nacional de combustibles para el transporte requiere la adición de un 10% (B10) de biodiesel.

La combinación Biodiesel / Diesel es una mezcla muy compleja de miles de compuestos individuales con un número de carbonos entre 9 y 23 (número de átomos de carbono por molécula de hidrocarburo). La

¹⁵² Quarterly Report from Argentinean national statistics institute (INDEC), <http://www.indec.gov.ar/>. May of 2012.

mayoría de los compuestos de biodiesel son ésteres, glicéridos, pigmentos y antioxidantes. Los compuestos diesel son nafténicos, parafínicos y aromáticos en diferentes proporciones.

La adición de biodiesel a diesel produce varios cambios en parámetros tales como: el número de cetano, el color, el calor de combustión y el contenido de azufre, la volatilidad, estabilidad a la oxidación, la lubricidad, la formación de espuma, las partículas de contaminación (total), y la turbidez¹⁵³¹⁵⁴.

Hay varios trabajos en la literatura relacionados con el uso de la espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariable para controlar la calidad del biodiesel puro (B100) obtenido¹⁵⁵¹⁵⁶¹⁵⁷¹⁵⁸¹⁵⁹. Tanto la espectroscopia de infrarrojo cercano y medio (NIR, MIR) se utilizan para determinar parámetros de calidad de las mezclas de biodiesel / diesel¹⁶⁰¹⁶¹¹⁶²¹⁶³. En los laboratorios de combustible y las refinerías hay actualmente equipos compactos utilizados para determinar las propiedades químicas y físicas utilizando esta técnica¹⁶⁴¹⁶⁵. Flôres Ferrão ha trabajado con HATR-FTIR (Reflectancia horizontal total atenuada infrarrojo) para determinar los parámetros de mezclas biodiesel /

¹⁵³ R.A. Candeia, M.C.D. Silva, J.R. Carvalho Filho, M.G.A. Brasilino, T.C. Bicudo, I.M.G. Santos, A.G. Souza. *Fuel* 88 (2009) 738-743.

¹⁵⁴ M.F. Ferrão, M.S. Viera, R.E. Panta Pazos, D. Fachini, A. Engel Gerbase and Marder. *Fuel* 90 (2011) 701-706.

¹⁵⁵ G. Knothe. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 1025-1028.

¹⁵⁶ I.P. Soares, T.F. Rezende, R.C. Silva, E.V.R. Castro and I.C.P. Fortes. *Energy Fuels* 22 (2008) 2079-2083.

¹⁵⁷ F.L.B. Lira, M. S. Albuquerque, J.G.A. Pacheco, T.M. Fonseca, E.H.S. Cavalcanti, L. Stragevitch and M.F. Pimentel. *Microchem. J.* 96 (2010) 126-131.

¹⁵⁸ P. Baptista, P. Felizardo, J.C. Menezes and M.J.N. Correia. *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 153-159.

¹⁵⁹ P. Baptista, P. Felizardo, J.C. Menezes and M.J.N. Correia. *Talanta* 77 (2008) 144-151.

¹⁶⁰ J.S. Oliveira, R. Montalvão, L. Daher, P. Suarez and J.C. Rubim. *Talanta* 69 (2006) 1278-1284.

¹⁶¹ M.F. Pimentel, G.M.G.S. Ribeiro, R.S. Cruz, L. Stragevitch, J.G.A.P. Filho and L.S.G. Teixeira. *Microchem. J.* 82 (2006) 201-206.

¹⁶² L.F.B. Lira, F.V.C. Vasconcelos, C.F. Pereira, A.P.S. Paim, L. Stragevitch and M.F. Pimentel. *Fuel* 89 (2010) 405-409.

¹⁶³ F.B. Gonzaga, C. Pasquini. *Anal. Chim. Acta* 670 (2010) 92-97.

¹⁶⁴ PAC [Internet]. *Advance Analytical Instrumentation for Lab and Process Application*. <http://www.pacip.com/>.

¹⁶⁵ Eralytics [Internet]. *Analytical Instrumentation*. <http://www.eralytics.com/>.

diesel¹⁶⁶. ¹H RMN (Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno) se utiliza con frecuencia para seguir la síntesis de biodiesel^{167,168}, y su correlación con NIR también fue descrita para la determinación de biodiesel de soja en diesel¹⁶⁹.

Trabajos recientes predicen el contenido de biodiesel en mezclas de biodiesel / diesel mediante espectroscopia de fluorescencia^{170,171}.

El objetivo de este trabajo es proponer un método rápido para determinar cuatro parámetros (porcentaje de biodiesel, Número de cetano (CN), calor de combustión (HOC), y color) que establecen la calidad de una mezcla comercial de biodiesel / diesel. Para la creación del modelo quimiométrico se utiliza calibración multivariada y espectroscopia de fluorescencia molecular (ver [Figura 4A](#)).

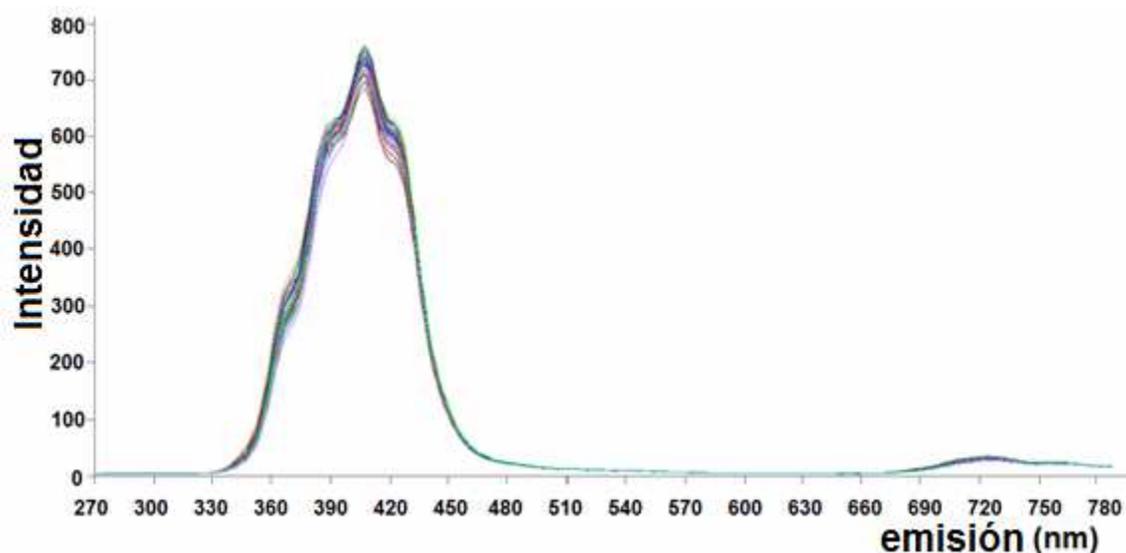


Figura 4A. Espectros suavizados de las 70 muestras de combustibles.

¹⁶⁶ M.F. Ferrão, M.S. Viera, R.E. Panta Pazos, D. Fachini, A. Engel Gerbase and Marder. *Fuel* 90 (2011) 701-706.

¹⁶⁷ M. Morgenstern, J. Cline, S. Meyer and S. Cataldo. *Energy Fuels* 20 (2006) 1350-1353.

¹⁶⁸ G.F. Ghesti, J.L. Macedo, I.S. Resck, J.A. Dias and S.C.L. Dias. *Energy Fuels* 21 (2007) 2475-2480.

¹⁶⁹ G. Knothe. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 1025-1028.

¹⁷⁰ M.D. Scherer, S.L. Oliveira, S.M. Lima, H.C. Andrade, A.R.L. Caires. *J. Fluoresc.* 21 (2011) 1027-1031.

¹⁷¹ A.R.L. Caires, V.S. Lima, S.L. Oliveira. *Renewable Energy* 46 (2012) 137-140.

4.2.1. Parámetros de calidad de las mezclas biodiesel / diesel

4.2.1.1. Porcentaje de biodiesel

El análisis más ampliamente utilizado para la medición de biodiesel en el diesel es por medio de técnicas de espectroscopia infrarroja. Ambas normativas EN 14078¹⁷² y ASTM D7371¹⁷³ utilizan métodos analíticos de espectroscopia infrarroja y, más concretamente espectroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared). La norma EN 14078 implica una dilución en hexano, seguida por la medición de la transmitancia y luego se compara el valor obtenido a la frecuencia de vibración del carbonilo con el de muestras testigo. La ASTM D7371 utiliza la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) y un análisis quimiométrico por mínimos cuadrados parcial (PLS). En la medición de biodiesel, el éster metílico de ácido graso (FAME) tiene una absorción característica a 1745 cm⁻¹ (5,4 micrómetros) debido al grupo carbonilo. Ambos métodos, correspondientes a EN y ASTM, especifican esta longitud de onda para la cuantificación del biodiesel.

4.2.1.2. Número de cetano (CN)

Es uno de los parámetros más estudiados en la literatura y define la calidad de ignición que tiene el combustible diesel en un motor de encendido por compresión. El CN se determina en un motor estándar (ASTM D613)¹⁷⁴, que requiere un volumen relativamente grande de muestra de combustible. También, debido al tiempo necesario para realizar el ensayo, este método no se puede utilizar en línea para controlar la mezcla diesel. Existen otros métodos alternativos usando espectroscopia infrarroja o prediciendo a partir de parámetros físicos que se desarrollaron para monitorear CN en la refinería^{175,176}.

¹⁷² European Standard EN 14078: Liquid petroleum products - Determination of fatty acid methyl esters (FAME) in middle distillates - Infrared spectroscopy method.

¹⁷³ ASTM International D7371-07: Standard Test Method for Determination of Biodiesel (Fatty Acid Methyl Esters) Content in Diesel Fuel Oil Using Mid Infrared Spectroscopy (FT-IR-ATR-PLS Method).

¹⁷⁴ ASTM D613 - 10a Standard Test Method for Cetane Number of Diesel Fuel Oil. Book of Standards Volume: 05.05.

¹⁷⁵ F.B. Gonzaga, C. Pasquini. Anal Chim Acta 670 (2010) 92-97.

¹⁷⁶ N. Ladommatos, J. Goacher. Fuel 74 (1995) 1083-1093.

Un mayor porcentaje de biodiesel en la muestra da como resultado un valor de CN bajo¹⁷⁷. Este parámetro está influenciado por las características estructurales de los alquil ésteres de ácidos grasos, tales como longitud de la cadena, grado de insaturación y ramificaciones¹⁷⁸. Generalmente, el CN aumenta con la longitud de la cadena, y disminuye con el aumento de la insaturación en la composición global de biodiesel / diesel¹⁷⁹.

4.2.1.3. Calor de combustión Gross

El calor de combustión Gross (HOC) puede ser conocido como “poder calorífico Gross”, que es la entalpía de combustión total de un combustible, es decir, todo el carbono convertido en dióxido de carbono, y todo el hidrógeno convertido en agua.

La determinación precisa de HOC es de gran interés para el comercio de gasóleo debido al hecho de que este es el parámetro más importante para determinar el precio del combustible. Numerosas ecuaciones empíricas se han desarrollado anteriormente para relacionar el valor de HOC con la composición elemental de hidrógeno en el combustible (ASTM D240)¹⁸⁰. Otra relación se encontró con la longitud de la cadena, insaturación y el peso molar¹⁸¹.

4.2.1.4. Color

Determinar el color de los productos del petróleo es una característica de calidad importante, ya que el color sirve como una indicación del grado de refinamiento del producto, contaminación, degradación, y

¹⁷⁷ YPF [Internet] Impacto de porcentajes crecientes de Biodiesel en las propiedades de las mezclas con Gas Oil. <http://www.ypf.com>.

¹⁷⁸ G. Knothe. Fuel Proc. Tech. 86 (2005) 1059-1070.

¹⁷⁹ R.A. Candeia, M.C.D. Silva, J.R. Carvalho Filho, M.G.A. Brasilino, T.C. Bicudo, I.M.G. Santos, A.G. Souza. Fuel. 88 (2009) 738-743.

¹⁸⁰ ASTM D240-02. Standard test method for heat of combustion of liquid hydrocarbon fuels by bomb calorimeter. Book of standards volume: 05.01; 2007.

¹⁸¹ K. Cheenkachorn, Predicting Properties of Biodiesels Using Statistical Models and Artificial Neural Networks, As. J. Energy Env. 7 (2006) 299-306.

oxidación del diesel. Esto ocurre cuando el diesel se almacena durante largos períodos de tiempo, cuando se expone a temperaturas superiores a la temperatura ambiente o en presencia de humedad. La mayoría de los compuestos diesel, parcialmente hidrogenado, hidrocarburos aromáticos, hidroxiaromáticos, pirroles, indoles, compuestos aromáticos policíclicos, así como las olefinas son susceptibles a la oxidación.

Los compuestos de diesel asociados a la medición del color como indoles, cicloalquilindoles y benzoindoles (predominantemente carbazoles), son compuestos aromáticos policíclicos.

La metodología recomendada para la determinación del color de las muestras de diesel de petróleo es el análisis de colorimetría de acuerdo con ASTM D1500, donde se introduce una muestra en una cubeta de vidrio y el color de la misma se compara con una escala de óptica de filtros de color¹⁸².

4.3. Experimental

4.3.1. Instrumentación

Laboratorio FIA (INQUISUR, UNS-CONICET):

Se utilizó un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 para obtener todos los espectros, con una fuente de luz de descarga de xenón (150 W). Los espectros de fluorescencia se realizaron utilizando una celda de cuarzo, 0,2 cm x 1 cm x 3 cm = 0,6 mL. El intervalo de longitud de onda ($\Delta\lambda$) utilizada fue 50 nm.

Laboratorio PETROBRAS (Refinería Ricardo D. Eliçabe, Bahía Blanca):

El equipo para combustibles Petrospec (PAC) (TD PPA) es un analizador espectroscópico de infrarrojo medio y cercano. El Petrospec TD PPA se utilizó para la determinación de FAME, CN, HOC y color.

Este instrumento permite la determinación de los parámetros arriba mencionados con la repetitividad y la reproducibilidad de acuerdo con los exigidos por las normas ASTM [14]. Tiene una biblioteca interna con

¹⁸² ASTM D1500 - 07 Standard Test Method for ASTM Color of Petroleum Products (ASTM Color Scale). Book of Standards Volume: 05.01.

una matriz diversa de más de 600 combustibles, obteniéndose una variabilidad a nivel mundial por los principales productores de combustible (Shell y Ethyl Corp). La [Tabla 4A](#) muestra el rango operativo de los parámetros del analizador Petrospec.

Las muestras que estuviesen fuera del rango de calibración son detectadas en el conjunto de calibración por medio de distancias de Mahalanobis¹⁸³.

Tabla 4A. Petrospec: Rango de los parámetros, repetitividad y reproducibilidad rendimiento

| | Alcance | Repetitividad | Reproducibilidad |
|-------------------------------------|------------------|---------------|------------------|
| Biodiesel [% w / w] | 0-15 | 0,1 | 0,3 |
| Número de cetano | 30-70 | 0,3 | 0,8 |
| Calor de combustión[MJ / Kg] | 44.100-48.800 | - | - |
| Color | 1-5 ^c | - | - |
| ^c Unidades de color ASTM | | | |

4.3.2. Reactivos

Se utilizó, como disolvente de las muestras de biodiesel / diesel, Isooctano (2, 2, 4-trimetilpentano), 99,8% anhidro (Sigma-Aldrich).

4.3.3. Muestras

Un conjunto de 30 muestras de diesel fueron adquiridos en diferentes estaciones de servicio (de diversas refinerías) en Bahía Blanca, 15 con 5% de biodiesel (w / w), y los otros 15 con el 7% de biodiesel (w / w).

PETROBRAS suministró 5 muestras de biodiesel de soja (B100) y una muestra de diesel puro.

Además de las 30 muestras compradas de biodiesel / diesel, 40 muestras se prepararon mediante el uso de esas muestras suministradas por PETROBRAS, mezclando diesel y biodiesel con el fin de obtener el rango de porcentaje de biodiesel entre 1,5% a 12,0% (w / w), en incrementos de 1,5 % (w / w).

¹⁸³ P.C. Mahalanobis. Proceedings of the National Institute of Science of India 12 (1936) 49-55.

Todas las muestras fueron analizadas luego de una dilución con isooctano. La dilución de las muestras se realizó en un matraz volumétrico, 0,5 ml de muestra se diluyó a 10,0 ml con isooctano 99,8%. Las muestras se midieron sin diluir en el instrumento Petrospec.

4.3.4. Procesamiento de datos

Los datos obtenidos de los espectros y del analizador Petrospec fueron pre-procesados y modelados con PLS usando el software Unscrambler 9.7 y SPA-MLR usando una rutina escrita en MATLAB 7.6. Se utilizó “full cross validation – leave one out (CV)” para determinar el número de factores latentes (PLS) y el número de variables utilizadas para MLR (SPA-MLR).

Del conjunto total de 70 muestras, se tomaron 40 muestras para calibración y 30 para predicción separadas mediante el algoritmo SPXY (Partición basada en las distancias X-Y)¹⁸⁴. SPXY es una modificación del algoritmo KS¹⁸⁵, que utiliza las distancias tanto en x como en y entre las muestras con el fin de poder evaluar la capacidad de predicción del modelo resultante de manera uniforme. El conjunto de predicción resultante es representativo, y se asegura de que la capacidad de predicción del modelo se evalúa de una manera acertada a lo largo de todo el rango de calibración.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Adquisición de espectros de fluorescencia sincrónica

El biodiesel y el diesel muestran fluorescencia nativa¹⁸⁶ y la superposición en las bandas de fluorescencia impide la determinación directa de los parámetros de calidad¹⁸⁷. Por lo tanto, la fluorescencia sincrónica se utilizó con el fin de reducir esta superposición y el algoritmo SPA permitió la resolución de los cuatro

¹⁸⁴ R.K.H. Galvão, M.C.U. Araújo, G.E. José, M.J.C. Pontes, E.C. Silva, T.C.B. Saldanha. *Talanta* 67(2005) 736-740.

¹⁸⁵ R.W. Kennard, L.A. Stone. *Technometrics* 11 (1969) 137-148.

¹⁸⁶ C.N.C. Corgozinho, V.M.D. Pasa, P.J.S. Barbeira. *Talanta* 76 (2008) 479-484.

¹⁸⁷ M.F. Pistonesi, M.S. Di Nezio, M.E. Centurión, M.E. Palomeque, A.G. Lista and B.S. Fernández Band. *Talanta* 69 (2006) 1265-1268.

parámetros en las mezclas. Para disminuir el efecto de filtro interno o autoabsorción de la fluorescencia emitida todas las muestras fueron diluidas¹⁸⁸. Cuando se utiliza la técnica de fluorescencia sincrónica, la selección del intervalo entre la longitud de onda de excitación y la de emisión ($\Delta\lambda$) es uno de los parámetros experimentales más importantes. Esta selección se hizo probando diferentes $\Delta\lambda$ entre $\Delta\lambda = 10$ a 80 nm en incrementos de 10 nm y análisis multivariado. Los mejores modelos de SPA-MLR y PLS se obtuvieron con $\Delta\lambda = 50$ nm.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron dentro de un rango de 272 - 800 nm, manteniendo una $\Delta\lambda$ fijo de 50 nm, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y una velocidad de barrido de 230 nm min^{-1} . Esta región espectral da un total de 529 valores de longitud de onda para cada muestra que se usaron en el análisis multivariado.

4.4.2. Modelos quimiométricos

Los espectros se pre-procesaron suavizandolos con el algoritmo Savitzky-Golay usando un polinomio de primer orden y una ventana de 13 puntos. Los datos fueron centrados para realizar el análisis PLS. La calibración multivariada implica el desarrollo de un modelo matemático que relaciona una propiedad, en este caso la intensidad de fluorescencia de un conjunto de parámetros de referencia conocidas. Se trata de una etapa de calibración en el que se estima la relación entre los espectros y valores de parámetro a partir de un conjunto de muestras de referencia, y una etapa de predicción en el que los resultados de la calibración se utilizan para estimar los valores de los parámetros de un espectro de una muestra desconocida.

Los algoritmos utilizan un grupo de muestras de calibración (X_{cal}) y una predicción (X_{pred}) que consisten en datos instrumentales y valores de los parámetros medidos por el Petrospec (**valores de y**). Para los modelos PLS se eliminaron las variables ruidosas con las herramientas del paquete UNSCRAMBLER.

Es preciso destacar que las muestras de predicción no se utilizan en ninguna fase de la selección de variables o procedimientos de calibración. En la [Tabla 4B](#) y [Figura 4B](#) se presentan los resultados de ambos

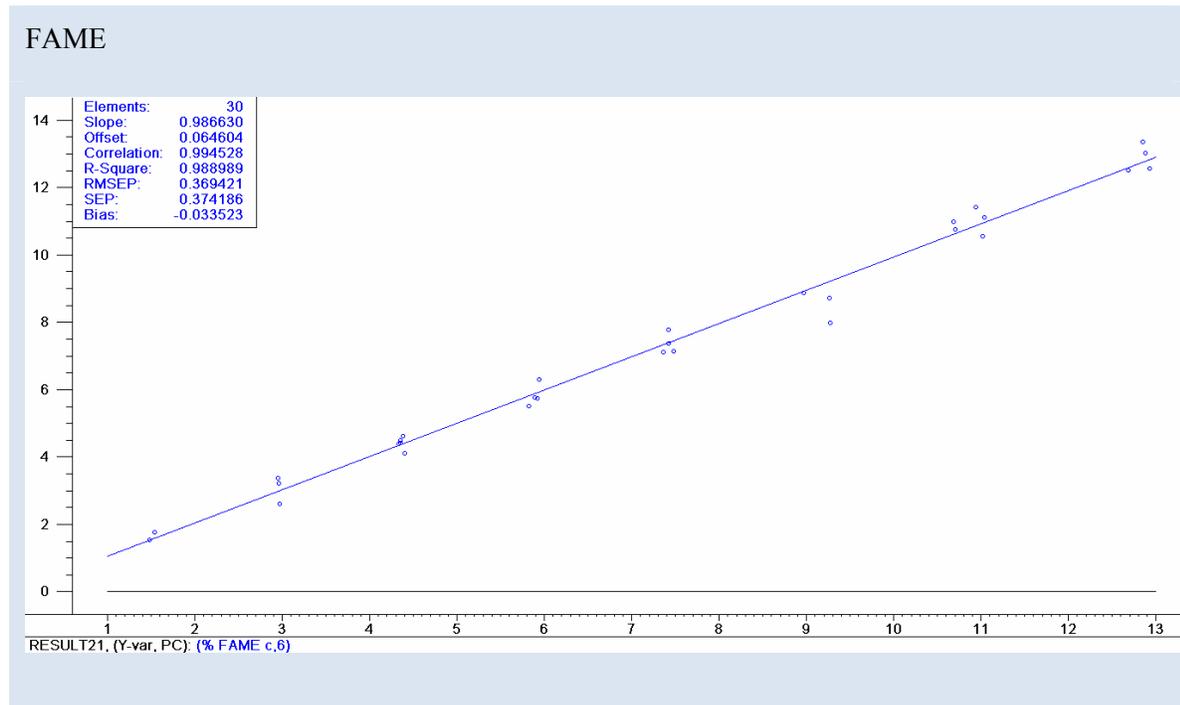
¹⁸⁸ D. Patra, A.K. Mishra. Talanta 53 (2001) 783-790.

métodos de calibración y el número de variables latentes (VL para PLS) y el número de variables seleccionadas (NV para SPA-MLR) que se utilizan en los modelos. La Figura 4C presenta las variables seleccionadas para cada parámetro en un espectro medio.

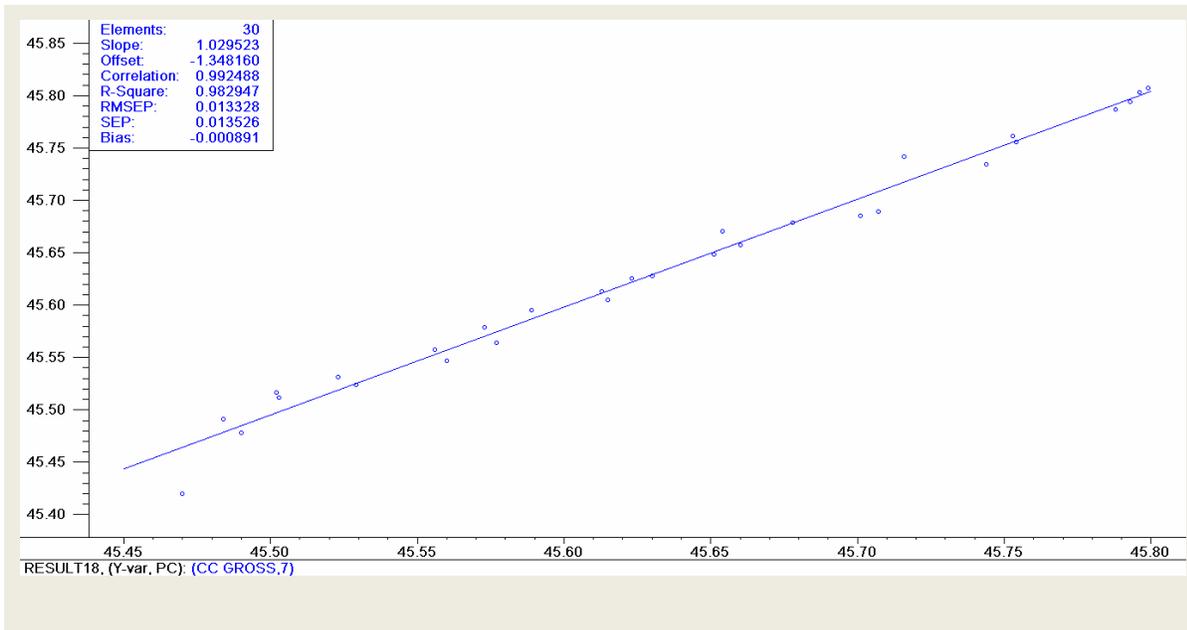
Tabla 4B. Resultados del análisis multivariado.

| | | PLS | SPA-MLR |
|--|---------|--------|---------|
| FAME (% de biodiesel p/p) | VL / NV | 6 | 14 |
| | RMSECV | 0,58 | 0,65 |
| | RMSEP | 0,37 | 0,58 |
| | BIAS | -0,03 | 0,09 |
| | SEP | 0,37 | 0,59 |
| | R | 0,9945 | 0,9846 |
| Número de cetanos | VL / NV | 7 | 9 |
| | RMSECV | 0,9 | 0,9 |
| | RMSEP | 0,7 | 0,5 |
| | BIAS | 0,01 | -0,15 |
| | SEP | 0,7 | 0,5 |
| | R | 0,9621 | 0,9693 |
| Calor de combustión (MJ / kg) | VL / NV | 7 | 11 |
| | RMSECV | 0,018 | 0,035 |
| | RMSEP | 0,013 | 0,026 |
| | BIAS | 0,00 | 0,01 |
| | SEP | 0,014 | 0,027 |
| | R | 0,9924 | 0,9677 |
| Color | VL / NV | 2 | 18 |
| | RMSECV | 0,2 | 0,2 |
| | RMSEP | 0,2 | 0,1 |
| | BIAS | 0,00 | -0,09 |
| | SEP | 0,2 | 0,2 |
| | R | 0,9470 | 0,8785 |

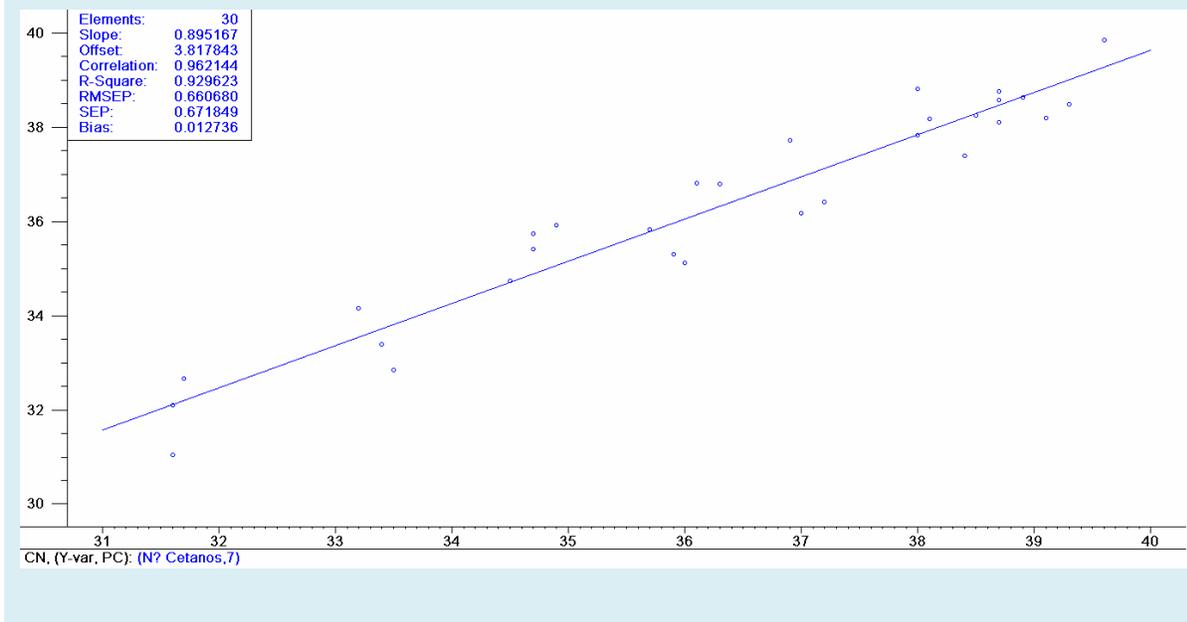
Figura 4B. Predicciones de los diferentes modelos PLS



Heat of Combustion



Cetane Number



Color

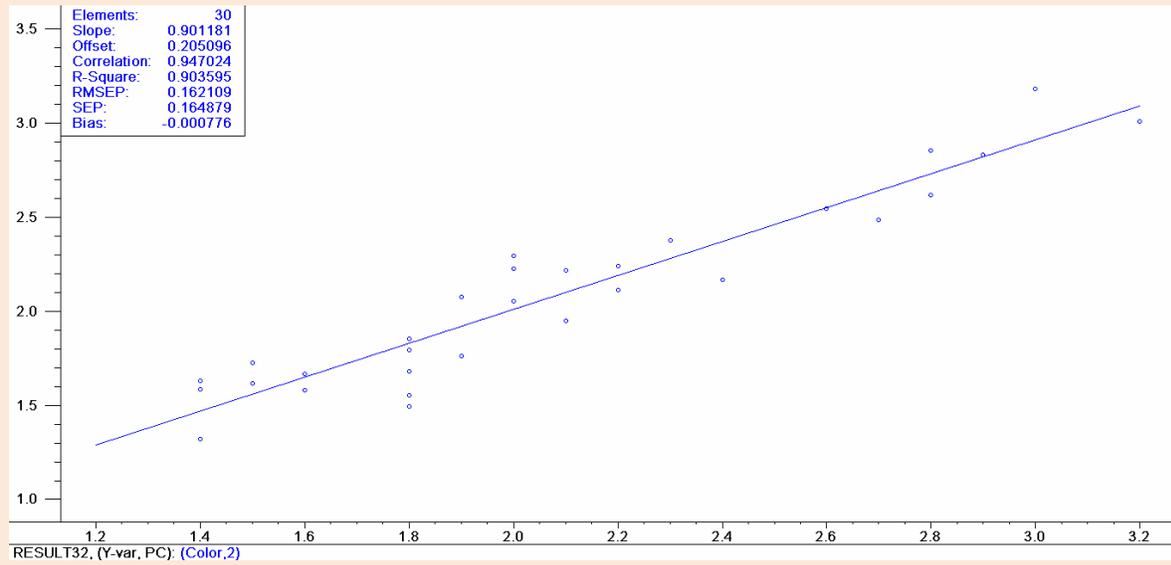
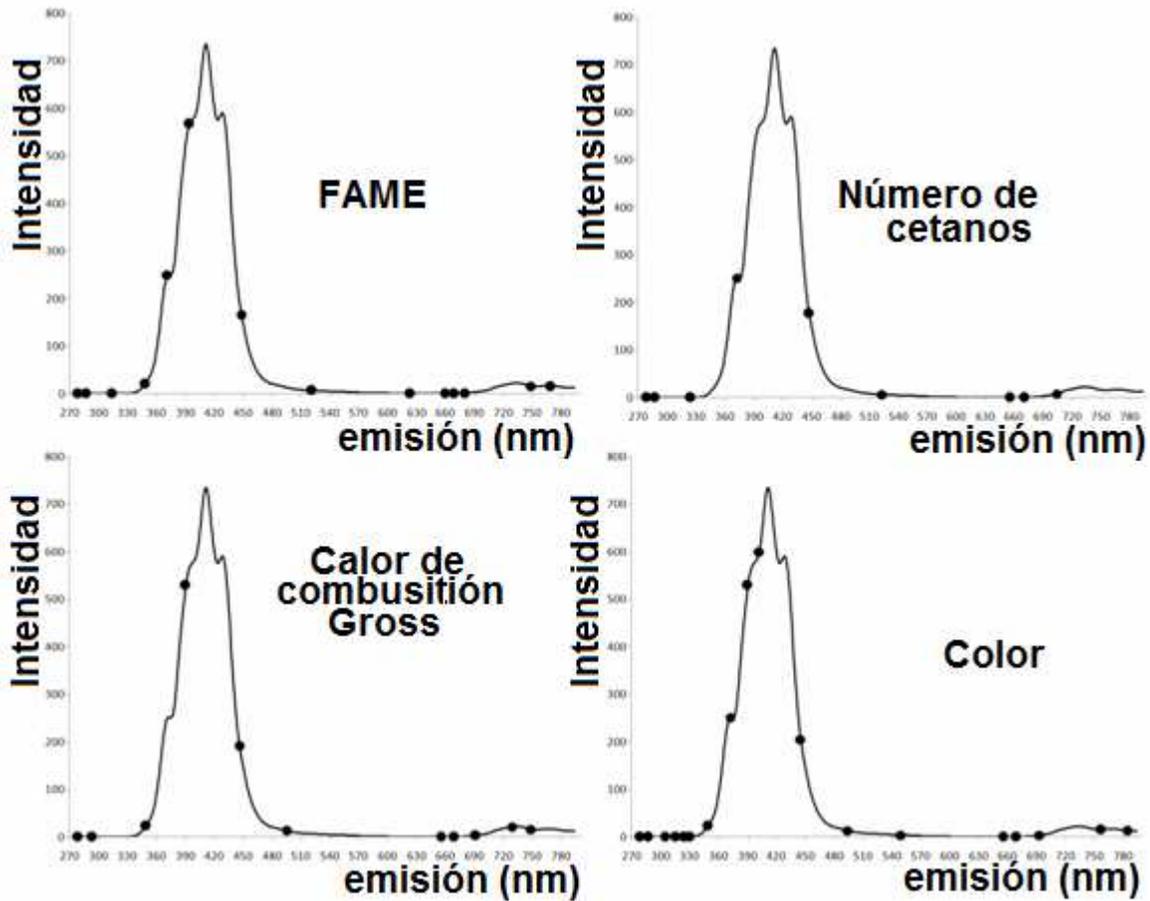


Figura 4C. Las variables escogidas para cada parámetro en un espectro promedio.



4.5. Calidad de la predicción

La Tabla 4C muestra los resultados del FAME, CN, HOC y Color utilizando métodos ASTM y el método propuesto con modelos SPA-MLR. Como se puede observar, para todas las muestras analizadas, los valores obtenidos por el método propuesto concuerdan los obtenidos de los métodos ASTM.

Tabla 4C. Determinación de la FAME, CN, HOC y el color en biodiesel / diesel mezclas comerciales

| ASTM | | | | | MÉTODO PROPUESTO | | | |
|---------|----------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|------------------|-----------|---------------|----------|
| Muestra | FAME (ASTM D7371) | CN (ASTM D613) | HOC (ASTM D240) | Color (ASTM D1500) | FAME | CN | HOC | Color |
| 1 | 5,39 (0,02) | 30,8 (0,3) | 45,635(0,010) | 1,7 (0,1) | 5,25(0,37) | 31,0(0,4) | 45,645(0,025) | 1,7(0,1) |
| 2 | 7,87 (0,03) | 37,8 (0,2) | 45,756(0,009) | 2,3 (0,0) | 7,86(0,21) | 37,8(0,2) | 45,739(0,010) | 2,4(0,0) |
| 3 | 6,56 (0,02) | 39,3 (0,3) | 45,540(0,005) | 2,2 (0,1) | 6,70(0,43) | 39,1(0,5) | 45,542(0,021) | 2,2(0,0) |
| 4 | 4,98 (0,04) | 33,1 (0,1) | 45,661(0,008) | 1,6 (0,0) | 5,09(0,15) | 33,4(0,4) | 45,669(0,008) | 1,7(0,1) |
| 5 | 5,12 (0,01) | 33,2 (0,1) | 45,653(0,008) | 1,1 (0,0) | 4,95(0,36) | 33,3(0,3) | 45,645(0,014) | 1,1(0,1) |

Las muestras se analizaron por triplicado (n = 3). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.

Las muestras se analizaron por triplicado (n = 3). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.

4.6. Conclusiones

Se propuso un método rápido, simple y económico para la determinación de parámetros de calidad (ésteres metílicos de ácidos grasos, número de cetano, calor de combustión y el color) de mezclas comerciales de biodiesel / diesel. Los parámetros fueron determinados a partir de los espectros de fluorescencia sincrónica de las muestras reales mediante el uso de los modelos quimiométricos.

Basándose en los resultados obtenidos en esta propuesta, se sugiere usar esta metodología para construir equipos compactos para la medición de muestras comerciales, con una simple dilución en línea, fuentes de luz y sensores específicos para cada longitud de onda seleccionada por el SPA.

Capítulo

5



Determinación de parámetros de calidad

Quimiometría

Determinación

de 2-nitrato de

etilhexilo

5. Capítulo 5: Determinación del aditivo mejorador del número de cetanos en combustibles biodiesel/diesel por medio de un espectro excitación-emisión de fluorescencia.

5.1. Objetivo

A partir de un espectro de excitación y uno de emisión fluorescente (EEF) de combustibles biodiesel/diesel, se pretende determinar el contenido del mejorador 2-nitrato de etilhexilo

5.2. Introducción

Con el fin de mejorar las propiedades del combustible diesel y de reducir las emisiones de escape, se han realizado numerosos estudios sobre combustibles líquidos y gaseosos alternativos. Además, se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre aditivos y mejoradores del número de cetanos¹⁸⁹ que se utilizan para obtener mejores características de combustión¹⁹⁰.

Varios tipos de productos químicos tales como los nitratos de alquilo, éter nitratos o compuestos nitrosos se han identificado como eficaces para aumentar el número de cetanos. El más comúnmente usado para este propósito es el 2-nitrato de etilhexilo (EHN), que es capaz de mejorar las características de combustión, acortando los tiempos de ignición y disminuyendo el punto de inflamación. El aditivo actúa iniciando de manera temprana la formación de radicales al proporcionar un eficiente mecanismo de producción de hidroxilos. Específicamente, la descomposición unimolecular de EHN crea dióxido de nitrógeno (NO₂), que reacciona adicionalmente con átomos de hidrógeno disponibles para producir radicales hidroxilo¹⁹¹. Este efecto es mayor en condiciones de temperatura y densidad baja, correspondiente a una baja torque del motor o condiciones de puesta en marcha de un motor diesel, y se convierte en insignificante en condiciones de temperatura y densidad más altas.

¹⁸⁹ F. Frusteri, L. Spadaro, C. Beatrice, C. Guido, *Chem. Eng. J.* 134 (2007) 239–245.

¹⁹⁰ M. Karabektas, E. Gokhan, M. Hosoz, *Fuel* 115 (2014) 855–860.

¹⁹¹ D.J. Bogan, R. Guirguis, *Mechanism of Ignition Enhancement by Nitro and Nitrate Compounds*, Symposium on the Chemistry of Cetane Number Improvement, Am. Chem. Soc. (1985).

Este aditivo tiene una producción a gran escala, la cual se estima en alrededor de 100.000 toneladas por año mundialmente. Durante mucho tiempo se ha considerado que la presencia de este compuesto no presenta ningún riesgo particular para la salud humana. Aunque, se ha descubierto que el EHN se puede considerar como un contaminante potencial de suelos y el agua natural. Según el procedimiento estándar de dióxido de carbono (CO₂) (Prueba Headspace¹⁹²), el EHN se considera como difícilmente biodegradable. El uso de 2-nitrato de etilhexilo como mejorador del número de cetano incrementa las emisiones de NO_x. Parece que la descomposición del mejorador de cetano forma óxido nítrico (NO) y nitroso (NO₂), adicionando un mecanismo de formación de NO_x, con aproximadamente un tercio del nitrógeno en el aditivo de combustible contribuye notablemente en las emisiones de NO_x adicionales en los gases de escape¹⁹³. Teniendo en cuenta todas estas razones anteriormente mencionadas, el EHN puede ser considerado como un contaminante atmosférico¹⁹⁴.

El método de ensayo estándar ASTM D 4046 se utiliza para determinar la cantidad de nitrato de alquilo agregado al combustible diesel para juzgar el cumplimiento de las especificaciones que cubren cualquier nitrato de alquilo. Este método es una determinación espectrofotométrica que incluye extracciones tediosas líquido-líquido, con disolventes orgánicos y una posterior derivatización. Metodologías alternativas se desarrollaron usando quimioluminiscencia y la espectrometría de infrarrojo¹⁹⁵¹⁹⁶ y cromatografía¹⁹⁷. Pero, en el trabajo diario de rutina, la petroquímica y la industria de la automoción exigen el desarrollo de nuevos métodos de bajo costo y rápidos para la determinación de estos aditivos.

¹⁹² American Chemistry Council Petroleum Additives Panel (2006) High production volume: challenge program for nitric acid, 2-ethylhexylester.

¹⁹³ A.M. Ickes, S.V. Bohac, D.N. Assanis, *Energy Fuels* 23 (2009) 4943–4948.

¹⁹⁴ D.A. Day, S. Liu, L.M. Russel, P.J. Ziemann, *Atmosph. Environ.* 44 (2010) 1970–1979.

¹⁹⁵ P. Bajeroová, T. Bajer, M. Adam, A. Eisner, K. Ventura, *Fuel* 117 (2014) 911–916.

¹⁹⁶ C.X. Wang, R. Firor, *Analysis of Trace 2-Ethylhexyl Nitrate in Diesel Using Chemiluminescence Detector*, Agilent Technologies (2010) Application Brief.

¹⁹⁷ B. Dvořák, P. Bajeroová, A. Eisner, O. Nykodýmová, K. Ventura, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1664–1668.

Los métodos espectrofluorimétricos han sido ampliamente aplicados como una herramienta cuantitativa en diferentes muestras. Los métodos que involucran fluorescencia se están utilizando cada vez más debido a su excelente sensibilidad, selectividad, no invasivos, rapidez y bajo costo del equipamiento¹⁹⁸. Sin embargo el uso de espectrofluorimetría en los análisis de muestras reales se ve obstaculizado por la complejidad de las matrices, que pueden tener una gran variedad de compuestos intrínsecamente fluorescentes, cuyos espectros pueden estar solapados¹⁹⁹. El biodiesel y el diesel poseen fluorescencia nativa²⁰⁰²⁰¹, y son ejemplos de matrices muy complejas, siendo una mezcla de miles de compuestos con un número de carbonos entre 9 y 23 (número de átomos de carbono por molécula de hidrocarburo). Los combustibles diesel son mezclas de compuesto parafínicos, nafténicos y aromáticos en diferentes proporciones. Además al agregar biodiesel se están incorporando ésteres, glicéridos, pigmentos y antioxidantes. Algunos problemas en fluorescencia no se pueden resolver haciendo caso omiso de los espectros de excitación, usando sólo los espectros de emisión que no proporcionan suficiente información para obtener las soluciones analíticas del problema²⁰². Debido a una mayor selectividad y simplicidad, la espectroscopia de fluorescencia sincrónica (SFS) ha sido explotada con éxito en las secciones anteriores para discriminar muestras de biodiesel con respecto al aceite de base usada en su producción²⁰³ y cuantificar varios parámetros en las mezclas de diesel²⁰⁴. Otra solución para la determinación multicomponente es la espectroscopia de Matrices de Excitación-Emisión de fluorescencia (EEM)²⁰⁵ y la fluorescencia sincrónica

¹⁹⁸ D. Patra, A.K. Mishra, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 787–798.

¹⁹⁹ J. Orzel, M. Daszykowski, I. Grabowski, G. Zaleszczyk, M. Sznajder, B. Walczak, Talanta 15 (2012) 78-84.

²⁰⁰ A.R.L. Caires, V.S. Lima, S.L. Oliveira, Renew. Energy 46 (2012) 137–140.

²⁰¹ M.D. Scherer, S.L. Oliveira, S.M. Lima, L.H. Andrade, A.R. Caires, J Fluoresc 21 (2011) 1027–1031.

²⁰² S.R. Zhang, H.L. Wu, Y. Chen, X.H. Zhang, J.Y. Wang, Y. Li, R.Q. Yu, Chem. Int. Lab. Sys. 121 (2013) 9–14.

²⁰³ M. Insausti, A.A. Gomes, F.V. Cruz, M.F. Pistoneli, M.C. Araujo, R.K.H. Galvão, C.F. Pereira, B.S. Fernandez Band, Talanta 97 (2012) 579-583.

²⁰⁴ M. Insausti, C. Romano, M. Pistonesi, B.S. Fernández Band, Microchem. J. 108(2013): 32-37.

²⁰⁵ A. García-Reiriz, P.C. Damiani, A.C. Olivieri, Anal. Chim. Acta 588 (2007) 192-199.

de ángulo variable no lineal²⁰⁶. Otro enfoque utilizado en trabajos anteriores para resolver la superposición espectral es la utilización de espectros de excitación y emisión conjuntamente²⁰⁷.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método espectrofluorimétrico para la determinación de EHN en matrices complejas como lo es el combustible biodiesel/diesel sin ningún tratamiento previo de la muestra. Además, mediante la obtención de un único espectro de EEF del combustible puro es posible cuantificar el analito.

5.3. Experimental

5.3.1. Instrumental

Se utilizó un espectrofluorímetro Jasco FP6500, con lámpara de descarga de xenon (150 W), y una cubeta de flujo con 18 μ L hecha de cuarzo.

Para las medidas directas del mejorador EHN se utilizó un espectrómetro infrarrojo ERASPEC con transformada de Fourier (FTIR). Este instrumento viene calibrado con una base de datos de más de 600 muestras de diesel internacionales, permitiendo la determinación de varios parámetros con repetitividad y reproducibilidad acorde con los requeridos por los métodos de las normas ASTM²⁰⁸.

5.3.2. Muestras

Una colección de 12 muestras de diesel de diferentes estaciones de servicio y distintas refinerías fueron adquiridas en Bahía Blanca. La mitad de estas muestras eran grado 3 y la otra mitad fue grado 2. Como las muestras fueron tomadas durante el periodo de 1 año, donde cambió la regulación del porcentaje de biodiesel, las primeras 5 tienen 5% de biodiesel y el resto 7%.

²⁰⁶ J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, N. Boras, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 98 (2012) 190–198.

²⁰⁷ M.F. Pistoneli, M.S. Di Nezio, M.E. Centurión, A.G. Lista, W.D. Fragoso, M.J. Pontes, M.C.U. Araújo, B.S. Fernandez Band, *Talanta* 83 (2010) 320-323.

²⁰⁸ Eralytics [Internet], *Advance Analytical Instrumentation for Lab and Process Application* <http://www.eralytics.com/>.

El 2-nitrato de etilhexilo (CAS 27247-96-7), pureza $\geq 97\%$, fue adquirido en Sigma Aldrich.

Un conjunto de 30 muestras fueron preparadas mezclando diesel y EHN, incluyendo muestras de diesel puro para obtener muestras con 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,5% EHN (v/v) en triplicado. Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) se establece que al menos 5 puntos en triplicado son necesarios para validar un modelo²⁰⁹. Este conjunto de muestras se preparó usando 5 muestras de diesel libre de EHN.

Para confirmar la aplicabilidad del método propuesto para la cuantificación de EHN en muestras de diesel en análisis de rutina, este método fue aplicado en el análisis de 7 muestras comerciales, que fueron previamente medidas usando el método referencia (repetitividad de 0.0024%EHN v/v).

5.3.3. Adquisición de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia

Los espectros fueron obtenidos con una velocidad de barrido de 1000nm/mín. y 340v en el detector PMT. El rango de emisión estudiado fue de 350-500nm con excitación en 346nm. Los espectros de excitación fueron medidos entre 220-350nm, colectando la emisión en 675nm, teniendo en cuenta los máximos de excitación y emisión del EHN puro. La Figura 5A muestra los espectros estudiados en una matriz 3D de fluorescencia con una muestra de diesel enriquecida con EHN.

²⁰⁹ A.C. Olivieri, N.M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J.H. Kalivas, H. Mark, Pure Appl. Chem. 78 (2006) 633–661.

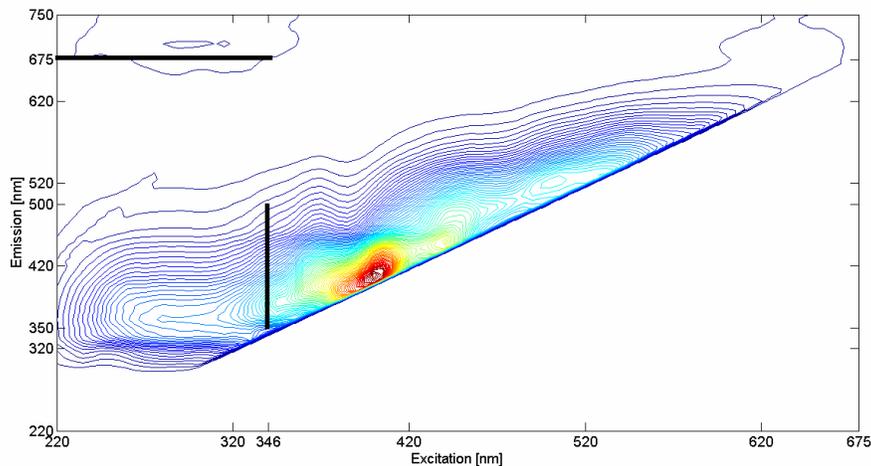


Figura 5A. Espectro 3D de diesel aditivado con EHN donde se grafican los espectros de excitación y emisión utilizados con una línea continua negra.

5.3.4. Quimiometría

El método cuantitativo en estudio se basó en la relación entre la intensidad de señal de fluorescencia y el porcentaje de aditivo adicionado. Las interferencias y el solapado de espectros se modelan usando el análisis multivariado de mínimos cuadrados parciales (PLS)²¹⁰. Este método permite la utilización de todo el espectro en lugar de bandas aisladas. El procedimiento de validación cruzada (full cross-validation leave-one-out) ha sido utilizado para determinar el número óptimo de variables latentes para el modelo de regresión²¹¹.

²¹⁰ A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, F.A. Iñón, *Chemom. Int. Lab. Syst.* 73(2004) 189–197.

²¹¹ D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.

5.4. Resultados y discusión

La fluorescencia convencional es utilizada comúnmente cuando se tiene un solo fluoróforo aislado o cuando una mezcla posee un limitado número de compuestos con propiedades fluorescentes y no se esperan fenómenos de apagamiento. Al ignorar el espectro de excitación puede que no sea suficiente para resolver el problema analítico, por lo tanto incluir el espectro de emisión parece ser esencial para realizar determinaciones en diesel ya que contiene varios fluoróforos.

Un problema inherente a los varios procedimientos fluorimétricos es que la composición de una muestra real puede contener compuestos indeseados que absorban la radiación emitida. Este efecto de filtro interno nos lleva a la variación no solo de la intensidad de fluorescencia sino a la “forma del espectro”²¹².

5.4.1. Modelaje quimiométrico

Los datos sin preprocesar se muestran en la Figura 5B.

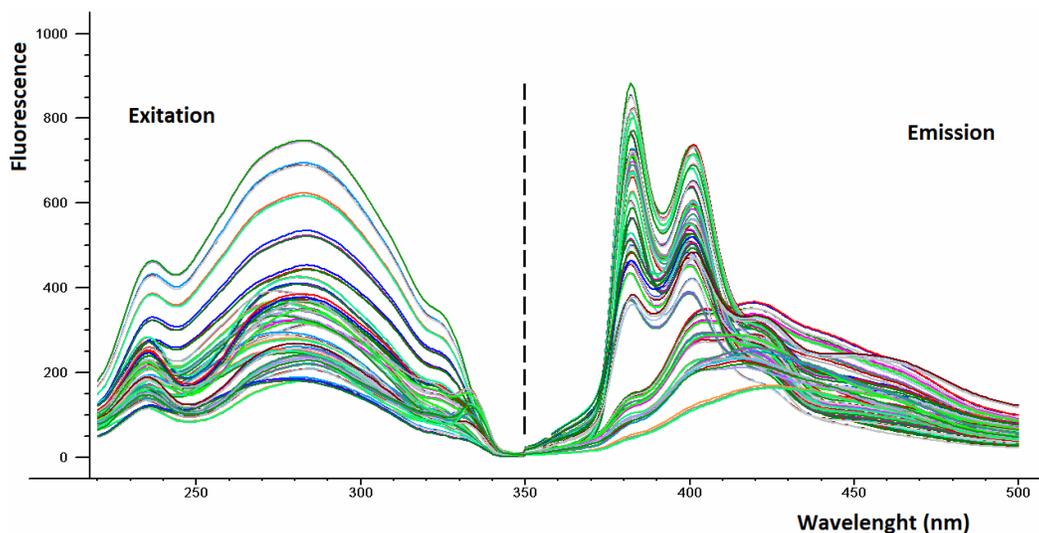


Figura 5B. Espectros de excitación y emisión sin procesar.

²¹² A.V. Schenone, M.J. Culzoni, M.M. Galera, H.C. Goicoechea, Talanta 109 (2013) 107-115.

Observando la [Tabla 5A](#) se presentan los resultados de la determinación EHN usando solo el espectro de excitación (Ex), solo el de emisión(Em) y ambos (EEF), se demuestra que usando EEF se soluciona eficientemente el problema fluorescente. Esta propuesta permite modelar las notables diferencias entre las muestras.

Tabla 5A. Compara los diferentes modelos PLS usando solo el espectro de excitacion, solo el de emisión, y ambos.

| | Ex | Em | EEF | %Diferencia Ex:EEF | %Diferencia Em:EEF |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| PLS-Latent var. | 7 | 7 | 7 | - | - |
| R-Square | 0.9647 | 0.9817 | 0.9943 | 3.1 | 1.3 |
| RMSECV | 0.032 | 0.017 | 0.013 | - 59.3 | - 23,5 |
| SEP | 0.032 | 0.016 | 0.013 | - 59.3 | - 18,8 |
| Bias | -0.000742 | -0.000199 | -0.000270 | - 63.6 | 35,7 |
| Offset | 0.00662 | 0.00086 | 0.00126 | - 81.0 | 46,5 |

Los valores de prediccion en CV para los modelos EEF se muestran en la [Figura 5C](#) comparado con los valores de referencia.

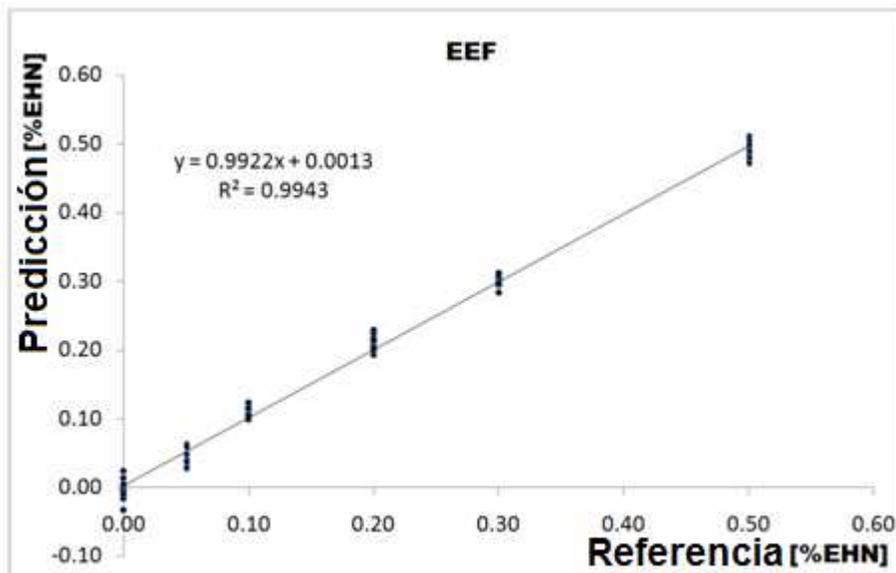


Figure 5C. CV para las muestras de calibración modelando los espectros de excitación y emisión simultáneamente.

El límite de cuantificación (LQ) es definido como la mínima concentración de analito en la muestra que puede ser determinado cuantitativamente con precisión y exactitud apropiada. El LQ encontrado para nuestro método es de 0,01446% (v/v) EHN. El límite de detección (LOD), es la mínima cantidad de una sustancia que puede ser distinguida de la ausencia de esa sustancia. El LOD encontrado para nuestra propuesta es de 0,00434% (v/v) EHN. Los límites encontrados son mejores que los encontrados en bibliografía²¹³.

5.4.2. Muestras comerciales

El modelo validado de EEF fue aplicado a muestras comerciales de diesel, ver [Figura 5D](#). La [Tabla 5B](#) muestra los resultados obtenidos comparados con el método estándar para 7 muestras. El rango de

²¹³ B. Dvořák, P. Bajerová, A. Eisner, O. Nykodýmová, K. Ventura, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1664–1668.

concentración fue de 0,047 a 0,470% v/v. Se realizaron análisis por triplicado para cada muestra. El modelo predice con un RMSEP = 0,018 % EHN(v/v), $R^2 = 0,9846$ SEP = 0,01856 %EHN(v/v) y Bias = -0,002516.

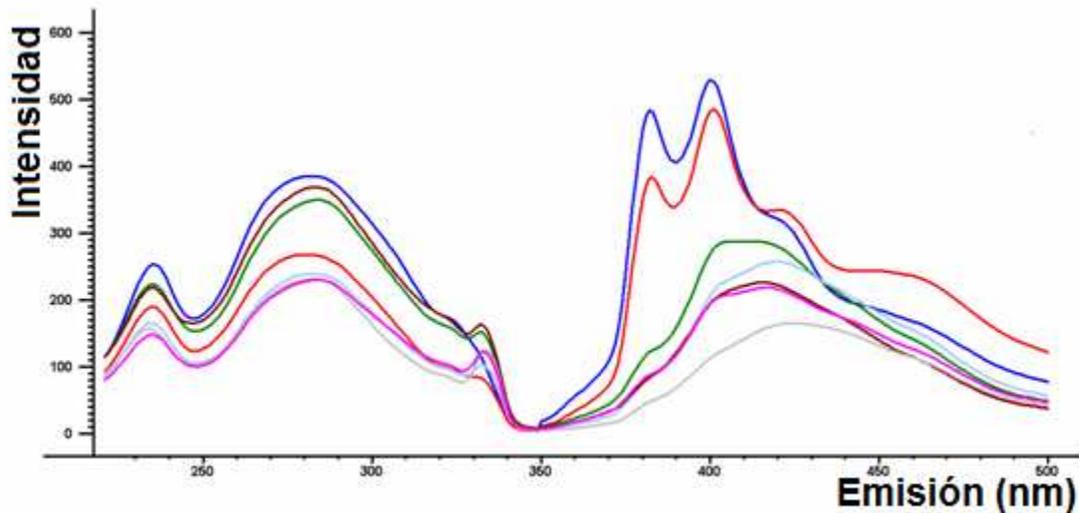


Figura 5D. Los espectros de las 7 muestras comerciales utilizadas.

Tabla 5B. Resultados obtenidos por el método estándar y nuestra propuesta.

| Muestra | Referencia [%EHN] | Predicción [%EHN] | SD* |
|---------|-------------------|-------------------|-------|
| 1 | 0,125 | 0,119 | 0,013 |
| 2 | 0,441 | 0,450 | 0,018 |
| 3 | 0,147 | 0,136 | 0,006 |
| 4 | 0,235 | 0,240 | 0,011 |
| 5 | 0,208 | 0,213 | 0,017 |
| 6 | 0,470 | 0,465 | 0,007 |
| 7 | 0,351 | 0,357 | 0,025 |

*Análisis en triplicado (n=3).

Como puede observarse para todas las muestras analizadas, las concentraciones obtenidas por el método propuesto están en concordancia con las obtenidas por el método de referencia.

5.5. Conclusiones parciales

El presente método es útil para ser utilizado en las refinerías y las industrias petroquímicas, donde el EHN tiene que ser cuantificado.

Como el método desarrollado es simple y rápido puede ser propuesto como una alternativa a la determinación de EHN por el método estándar tedioso.

Los resultados del análisis se obtienen rápido porque después de que el modelo quimiométrico fue construido, sólo necesita registrar un espectro fluorescente de excitación y un espectro de emisión de la muestra desconocida. La muestra de combustible se mide directamente en el espectrofluorímetro, sin ningún pre-tratamiento. Los datos de EEF son procesados por el modelo quimiométrico y la concentración EHN se obtiene inmediatamente.

Dado que este aditivo es un contaminante ambiental, su control es muy importante, y el presente método se puede utilizar también en las estaciones de servicio.

El nuevo método EEF ofrece una interesante mejora a las técnicas de fluorescencia siendo posible cuantificar un analito en una matriz compleja como los es el combustible diesel, que presenta los efectos de filtro interno.

6. CONCLUSIONES FINALES

En base a los objetivos propuestos se generaron los siguientes métodos analíticos:

- **Cuantificación de glicerol en biodiesel puro:** la glicerina residual como subproducto de la reacción de generación del combustible puede generar residuos en los tanques de combustible, obstrucción de filtros y liberación de acroleína con los gases de combustión. Las normas internacionales proponen un límite máximo de glicerina libre de 0,020 g(m/m), controlado mediante un análisis por cromatografía gaseosa luego de un pretratamiento de la muestra. Entonces se propuso una extracción y determinación del glicerol automatizada en línea donde no es necesario ningún tipo de interacción por parte del operador. Utilizando la metodología FLow-Batch se obtuvo un sistema simple y rápido para la cuantificación de glicerina en muestras de Biodiesel con resultados comparables a los métodos de referencia.

Este trabajo se encuentra publicado en Talanta 89 (2011) 21-26; “Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction”; Marcelo B. Lima, Matías Insausti, Claudia E. Domini, Marcelo F. Pistonesi, Mário C. Ugulino de Araújo, Beatriz S. Fernández Band.

- **Clasificación de biodiesel en base a la materia prima:** el tipo de oleaginosa utilizado para extraer el aceite vegetal base en la producción de biodiesel le impone las características al producto final. Es por eso que se propuso una determinación del origen del aceite utilizando un simple espectro de fluorescencia y modelaje quimiométrico. Las muestras utilizadas fueron sintetizadas en el laboratorio mediante una metodología propuesta por el grupo brasilero en el marco del Programa de Proyectos Conjuntos de Investigación en el MERCOSUR (PPCP 013/2011). Se probaron diferentes algoritmos de clasificación, obteniendo resultados satisfactorios utilizando una selección de variables aplicando el Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas y posterior clasificación mediante el Análisis Discriminante Lineal. Es para destacar también que por primera vez se puede clasificar correctamente el biodiesel producido con aceite de maíz.

El trabajo se encuentra publicado en Talanta 97 (2012) 579-583; “Screening analysis of biodiesel feedstock using UV–vis, NIR and synchronous fluorescence spectrometries and the successive projections algorithm”; Matías Insausti, Adriano A. Gomes, Fernanda V. Cruz, Marcelo F. Pistonesi, Mario C.U. Araujo, Roberto K.H. Galvão, Claudete F. Pereira, Beatriz S.F. Band.

-Cuantificación de 4 parámetros de calidad en combustibles Biodiesel/Diesel: de forma rápida se pueden cuantificar el Porcentaje de Biodiesel, Número de Cetanos, Calor de Combustión y Color. Este trabajo propone el reemplazo de los métodos de referencia especificados en las normas internacionales que necesitan de equipamiento específico y costoso, con metodologías demoradas y gran consumo de reactivos; por una simple determinación mediante un espectro de fluorescencia sincrónica y modelaje quimiométrico. Se obtuvieron resultados comparables utilizando sólo algunas longitudes de onda específicas para cada parámetro, seleccionadas con el Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas.

Trabajo publicado en Microchemical Journal 108 (2013) 32-37; “Simultaneous determination of quality parameters in biodiesel/diesel blends using synchronous fluorescence and multivariate analysis”; Matías Insausti, Carlos Romano, Marcelo F. Pistonesi, Beatriz S. Fernández Band.

-Cuantificación del aditivo mejorador del Número de Cetanos en Biodiesel/Diesel: el aditivo 2-nitrato de etilhexilo se adiciona al combustible mezcla de Biodiesel/Diesel para elevar el parámetro de calidad Número de Cetanos. Dado que este compuesto es un contaminante ambiental se propone una determinación alternativa, más simple, rápida y de bajo costo que una cuantificación por medio de cromatografía gaseosa como lo especifican las normas internacionales. La nueva metodología propuesta no necesita de ningún pretratamiento de muestra, en comparación con las demoradas extracciones líquido-líquido con solventes orgánicos descritos en las normas. Además se propone una interesante mejora en las técnicas de fluorescencia al usar información de un espectro de fluorescencia de excitación y uno de emisión en muestras que poseen efecto de filtro interno.

Trabajo enviado para publicación a Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,
en este momento se encuentra aceptado con revisiones mayores.

7. Anexo

7.1. Trabajos publicados

7.1.1. Congresos

- “7to Congreso Argentino de Química Analítica”, desarrollado en Mendoza, en el mes de octubre de 2013. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “Selección de variables aplicado a espectros de fluorescencia tridimensional (U-SPA-MLR)”. Autores del trabajo: Matías Insausti, Sófacles F.C. Soares, Beatriz S. Fernández Band, Mario Cesar Ugulino de Araujo.
- “7to Congreso Argentino de Química Analítica”, desarrollado en Mendoza, en el mes de octubre de 2013. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “Determinación de 2-etilhexil nitrato en diesel, usando fluorescencia de excitación - emisión (EEF) y análisis quimiométrico”. Autores del trabajo: Matías Insausti, Beatriz S. Fernández Band.
- “5to Congreso Iberoamericano de Química Analítica y 2do Congreso Uruguayo de Química Analítica”, desarrollado en Montevideo, Uruguay, en el mes de octubre de 2012. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “Determinación de 2-nitrato de etilhexilo (EHN) en combustibles diesel/biodiesel a partir de curvas de destilación y métodos multivariados”. Autores del trabajo: Matías Insausti, Carlos Romano, Mario C. Ugulino de Araujo, Beatriz S. Fernández Band.
- “6to Congreso Argentino de Química Analítica”, desarrollado en Santa Fé, en el mes de septiembre de 2011. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “Sistema Flow-Bach para Determinación del Glicerol Libre en Muestras de Biodiesel”. Autores del trabajo: Marcelo Batista de Lima, Matías Insausti, Claudia E. Domini, Marcelo F. Pistonesi, Mario C. Ugulino de Araujo, Beatriz S. Fernández Band.
- “6to Congreso Argentino de Química Analítica”, desarrollado en Santa Fe, en el mes de septiembre de 2011. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “Clasificación de biodiesel empleando espectroscopia de fluorescencia sincrónica y LDA-SPA”. Autores del trabajo: Matías Insausti, Adriano A. Gomes, Fernanda Vera Cruz, Marcelo Fabian Pistonesi, Mario Cesar Ugulino de Araujo, Roberto K. H. Galvão, Beatriz S. Fernández Band.
- “6to Congreso Argentino de Química Analítica”, desarrollado en Santa Fe, en el mes de septiembre de 2011. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “Determinación simultanea de parámetros de calidad en mezclas biodiesel/diesel, usando espectroscopia de fluorescencia sincrónica y modelos de calibración multivariada MLR - APS”. Autores del trabajo: Matías Insausti, Carlos Romano, Marcelo F. Pistonesi, Beatriz S. Fernández Band.

7.1.2. Revistas internacionales

- “Single excitation-emission fluorescence spectrum (EEF) for determination of cetane improver in diesel fue”. Matías Insausti, Beatriz S. Fernández Band. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 140 (2015) 416-420.
- “Simultaneous determination of quality parameters in biodiesel/diesel blends using synchronous fluorescence and multivariate analysis”. Matías Insausti, Matías Insausti, Carlos Romano, Marcelo F. Pistonesi, Beatriz S. Fernández Band. *Microchemical Journal* 108, pág. 32-37. 2013.
- “Screening analysis of biodiesel feedstock using UV-vis, NIR and synchronous fluorescence spectrometries and the successive projections algorithm”. Matías Insausti, Adriano A. Gomes, Fernanda Vera Cruz, Marcelo Fabian Pistonesi, Mario Cesar Ugulino de Araujo, Roberto K. H. Galvão, Beatriz S. Fernández Band. *Talanta* 97, pág. 579-583. 2012.
- “Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction”. Marcelo Batista de Lima, Matías Insausti, Claudia E. Domini, Marcelo F. Pistonesi, Mario C. Ugulino de Araujo, Beatriz S. Fernández Band. *Talanta* 89, pág. 21-26. 2012.

7.2. Enviados para publicación

- Fast additive determination in diesel/biodiesel blends: distillation curves behavior in presence of cetane improver. Matías Insausti, Beatriz S. Fernández Band. *Energy & Fuels*.