



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura

Tesis presentada por el Licenciado en Ciencias Químicas

Ramón Alberto Martínez

Para optar al grado académico
Doctor de la Universidad Nacional
del Nordeste en Química

Título:

**“Evaluación del grado de depuración de
efluente de Industria de textiles por
parámetros no convencionales”**

Director: Dr. Roberto Gerardo Pellerano

Sub-Director: Dr. Mario Raúl Delfino (h)

2020

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Nordeste por brindarme la posibilidad de realizar mi formación de grado y posgrado.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE), por permitirme realizar esta tesis en su casa de estudios.

Al Laboratorio de desarrollo Analítico y Quimiometría (UNL-CONICET), en especial al Dr. Héctor Goicoechea por el apoyo incondicional, a Fabricio, y Quela Alcaráz por capacitarme en el manejo del software para el tratamiento de matrices fluorescentes (EEM).

A los evaluadores, y a la comisión de posgrado por cumplir con las tareas de evaluación y seguimiento de la tesis.

A mi director de tesis por los conocimientos y el apoyo que me brindó durante estos años.

A mi Sub-Codirector por todo su apoyo y sugerencias.

A todas aquellas personas que colaboraron en forma directa o indirecta para que este trabajo sea posible.

A mi Amada Esposa Diana por su incondicional apoyo, por ser el motor para realizar esta tesis.

A Gabriel y sus cariñosos niños, por alentar y alegrar.

A mis hermanos Franco y Chiky, por su apoyo y cariño.

Resumen

Los procesos empleados en la industria textil se caracterizan por un elevado consumo de agua como materia prima principal para toda la manufactura, y agregado de productos químicos en las diferentes etapas, tanto los de naturaleza orgánica (colorantes, solventes, etc.), como inorgánicas (sales, soluciones alcalinas, etc.). Sus procesos casi en su totalidad, son reacciones químicas en medio líquido, y por lo tanto generan un gran volumen de efluente, rico en intermediarios químicos productos de las reacciones que tienen lugar. Entre los principales contaminantes en las aguas residuales textiles se encuentran los surfactantes y colorantes utilizados durante el proceso de tinción, entre otras sustancias activas cloradas, sales de fosfato, sulfatos entre otros.

Dada la gran heterogeneidad de compuestos poluentes presentes en los efluentes de la industria textil, este trabajo de tesis se propuso como objetivo desarrollar criterios analíticos utilizando métodos de modelado multivariado para cuantificar analitos de interés ambiental y de esa manera comprobar el grado de depuración de un efluente de planta textil, a lo largo de las diferentes etapas de su planta de tratamiento de efluentes y cuerpo receptor.

Para alcanzar esos objetivos se trabajó con fluorimetría, determinando matrices excitación-emisión (EEM), y trabajando con calibración multivariada empleando diversos algoritmos, de los que resultaron útiles y se muestran en esta tesis son el PARAFAC y el U-PLS/RBL. El método obtenido se validó con una metodología de referencia: HPLC-FD.

En la implementación del método se trabajó con un espectrómetro de fluorescencia, trabajándose con diversos tensioactivos que se emplean en la industria textil para los procesos de lavado (conocido como jabonado), evaluándose por fluorimetría sincrónica cuáles de éstos presentan actividad fluorescente. La fluorescencia sincrónica fue realizada entre λ Excitación de 250 a 390 nm, con un delta de 2 nm. De los espectros

obtenidos, se seleccionaron los tensioactivos para trabajar en esta tesis: APEO, ADBS y AGFE.

Posteriormente se seleccionaron las condiciones instrumentales óptimas para estos analitos, las cuales fueron las siguientes: λ Excitación: 250-300 nm, λ Emisión: 250-450 nm, ambos con intervalo de 1 nm y con slits de 5 nm. Se evaluó también el rango de respuesta lineal de las matrices EEM de cada analito, trabajándose este rango de concentraciones en el siguiente paso.

Luego, se realizó un diseño experimental de mezclas para los tres tensioactivos en el rango lineal, para medir sus EEM. Se trabajó con un diseño central compuesto axial, trabajando a 5 niveles de concentración: 15, 21, 42, 63 y 70 $\mu\text{g/mL}$ para cada uno de ellos. De estas mezclas se midieron las EEM para la calibración de los métodos multivariados. Luego se trabajó con mezclas de validación, seleccionándose concentraciones intermedias a las concentraciones de calibración. Las siguientes mediciones fluorométricas fueron realizadas a mezclas test, de analitos que tenían el agregado de un posible interferente (colorante), para evaluar la ventaja de segundo orden, determinándose finalmente las EEM de muestras reales.

Para trabajar con los datos obtenidos, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos: importación de datos en formato ascii a partir de los datos generados por el fluorómetro; preprocesado de los datos, eliminando el scattering mediante un algoritmo de toolbox de Matlab R15a, y modelado mediante los algoritmos PARAFAC y U-PLS/RBL realizados en la interfaz gráfica MVC2. Para cada algoritmo se trabajó en las etapas de calibración, validación y test. Las cifras de mérito obtenidas con el algoritmo U-PLS/RBL en la etapa de validación para los analitos APEO, ADBS y AGFE fueron las siguientes: Sensibilidad analítica de 274,83; 4,10 y 10,25 L/mg respectivamente; LOD de 0,16; 0,83 y 0,38 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; y LOQ de 0,45; 2,77 y 1,15 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos valores fueron en todos los casos mejores a los obtenidos con PARAFAC, por lo que finalmente, para cuantificar los tensioactivos presentes en muestras reales, se decidió realizarlo con U-PLS/RBL. En muestras de agua superficial de un cuerpo

receptor de efluentes textiles, los tensioactivos analizados estuvieron debajo del LOD, mientras que en las distintas etapas de tratamiento del efluente fueron hallados los analitos en concentraciones desde 8,49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el APEO, hasta concentraciones de 73,94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el ADBS.

Los modelos quimiométricos obtenidos fueron evaluados en base a sus cifras de mérito analítico y fueron contrastados con resultados obtenidos por una técnica de referencia para determinar tensioactivos por HPLC-FD.

Por lo tanto, se puede afirmar que:

Se logró realizar un aporte al conocimiento de la composición química de un efluente textil y su grado de depuración.

Se propusieron métodos de análisis alternativos basados en metodología de calibración multivariada de segundo orden aplicados a matrices de excitación emisión obtenidas por Espectrofluorimetría, que presentan notorias ventajas respecto al método de referencia.

Se estudió el rendimiento de los algoritmos PARAFAC y UPLS/RBL, demostrándose un mejor desempeño del segundo para modelar los datos analíticos disponibles.

Se aplicó con éxito la metodología desarrollada al efluente de una industria textil del medio, avalado por los resultados determinados por el método de referencia.

Contenido

CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN	3
1.1 La actividad textil	3
1.2 El proceso textil	3
1.2.1 Procesos previos	4
1.2.2 Coloración	7
1.2.3 Procesos posteriores	9
1.3 Impacto ambiental de la industria textil	9
1.3.1 Tensioactivos, toxicidad y persistencia	11
1.3.2 Tratamiento de efluentes de la industria textil	14
1.4 Bibliografía.....	16
Objetivos Propuestos.....	21
Objetivos Generales.....	21
Objetivos Particulares	21
Hipótesis de Trabajo	22
CAPITULO 2: Espectrofluorimetría y calibración multivariada.....	25
2.1 Espectrofluorimetría.....	25
2.1.1 Características del espectro de emisión fluorescente	27
2.1.2 Los espectros de emisión son típicamente independientes de la longitud de onda de excitación	28
2.1.3 Vida de fluorescencia y rendimiento cuántico	29
2.1.4 Extinción (quenching) de la fluorescencia.....	30
2.1.5 Dispersión de la luz	32

2.1.6	Representación gráfica de la espectroscopía de fluorescencia.....	34
2.1.7	Instrumentación de la espectroscopía de fluorescencia.....	37
2.2	Análisis Multivariado	41
2.2.1	Nomenclatura de los datos	44
2.2.2	Calibración multivía o multivariado	45
2.2.3	Pretratamiento de datos trilineales o de tres vías.....	51
2.2.4	Nomenclatura para las muestras y los constituyentes	54
2.2.5	Modelo PARAFAC	56
2.2.6	Modelado U-PLS/RBL	58
2.3	Bibliografía.....	59
Capítulo 3: Materiales y métodos.....		65
3.1	Muestreo.....	65
3.2	Espectrofluorimetría de tensioactivos	68
3.2.1	Instrumentos.....	68
3.2.2	Estudio de excitación-emisión de los tensioactivos de uso textil	68
3.2.3	Condiciones instrumentales para la obtención de las EEMs	69
3.2.4	Reactivos.....	70
3.2.5	Determinación del rango lineal.....	72
3.3	Métodos de análisis multivariados	72
3.3.1	Diseño experimental	73
3.3.2	Importación de datos	76
3.3.3	Pre-procesamiento de datos.....	76
3.3.4	Proceso de modelado.....	82

3.3.5	Interfaz gráfica MVC2	82
3.4	Modelado PARAFAC	84
3.4.1	Cifras de mérito	86
3.4.2	Validación del modelo.....	87
3.4.3	Aleatoriedad de residuos	88
3.4.4	Refinamiento del modelo	88
3.4.5	Interpretación de los resultados	88
3.4.6	Regiones Elípticas de Confianza Conjunta (EJCR).....	89
3.5	U-PLS/RBL.....	90
3.5.1	Número óptimo de factores (A).....	93
3.5.2	Predicción basada en el score de la muestra.....	94
3.6	Método de referencia para la determinación de tensioactivos.....	96
3.6.1	Reactivos HPLC	98
3.6.2	Metodología.....	98
3.6.3	Flujo de la fase móvil	98
3.6.4	Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión	99
3.6.5	Ensayos en blanco	99
3.6.6	Estudio de interferencias	99
3.6.7	Condiciones instrumentales.....	100
3.7	Bibliografía.....	100
Capítulo 4: Resultados y discusión		107
4.1	Determinación espectrofluorimétrica de matrices de excitación-emisión.....	107
4.1.1	Espectro de Fluorescencia sincrónica (SFS)	107

4.1.2	Espectros de los tensioactivos.....	108
4.1.3	Rango lineal.....	110
4.1.4	Perfil de las mezclas ternarias	111
4.1.5	Eliminación de los efectos de dispersión en las EEMs.....	112
4.2	Calibración multivariada: PARAFAC	116
4.2.1	Estimación del número de componentes PARAFAC.....	116
4.2.2	Calibración PARAFAC.....	117
4.2.3	Validación PARAFAC	122
4.2.4	Prueba de Región elíptica de confianza conjunta (EJCR).....	124
4.2.5	Muestras artificiales	126
4.3	Calibración multivariada: U-PLS/RBL	128
4.3.1	Calibración.....	128
4.3.2	Validación U-PLS/RBL.....	132
4.3.3	Prueba de Región elíptica de confianza conjunta (EJCR).....	134
4.3.4	Muestras artificiales	136
4.4	Determinación de tensioactivos en muestras reales de efluente textil.....	137
4.4.1	Determinación empleando el algoritmo U-PLS/RBL.....	137
4.5	Validación de la metodología analítica propuesta	138
4.5.1	Técnica de referencia	139
4.5.2	Cifras de mérito	141
4.5.3	Análisis de muestras de efluentes de industria textil	143
4.6	Bibliografía.....	148
Capítulo 5: Conclusiones		153

INTRODUCCION

CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 La actividad textil

La actividad textil-tintórea nace con la necesidad de las primeras poblaciones humanas de proveerse abrigo y vestimenta, utilizando piezas de cuero cortadas rudimentariamente, que fueron evolucionando conforme se fue adquiriendo conocimiento tecnológico sobre el manejo de fibras como la lana, el lino y el algodón. Así por ejemplo los primeros tejidos de lino y algodón datan del neolítico, empleando telares para la obtención de dichos tejidos.

La disponibilidad de tejidos para elaborar telas se vio acompañada con el deseo de añadir color (Christie, 2007). Inicialmente se utilizaron colorantes naturales, extraídos de diversas fuentes como plantas, animales y algunos minerales que se encontraban disponibles en el ambiente. Para transferir cromaticidad a los tejidos, los colorantes eran disueltos en agua, luego se sumergían los tejidos o prendas a los que se deseaba impartir coloración, generalmente este procedimiento realizaba en caliente con lo que se alcanzaba mayor penetrabilidad del colorante al interior de la fibra (Haro, 2012).

La actividad textil avanzó con el desarrollo industrial, pero aún más con la obtención del primer colorante sintético, la Mauveína en 1859 por el químico Perkin. Posteriormente, en el siglo XX, se produjeron nuevos tipos de fibras sintéticas tales como el nylon, poliéster y la poliacrilamida que incidieron de manera significativa en el avance de la industria al disponer de nuevos materiales, que fue acompañado por el desarrollo de colorantes reactivos que impulsaron la industria del teñido algodón (Pezok, 2012).

1.2 El proceso textil

El proceso textil consiste en la fabricación de tejidos, constituyendo una de las industrias de gran importancia en la actualidad en todo el mundo. De acuerdo con la naturaleza de

la fibra a procesar, las etapas incluidas en el proceso textil varían notoriamente. La figura 1.1 resume las principales fibras que se procesan en la actualidad.

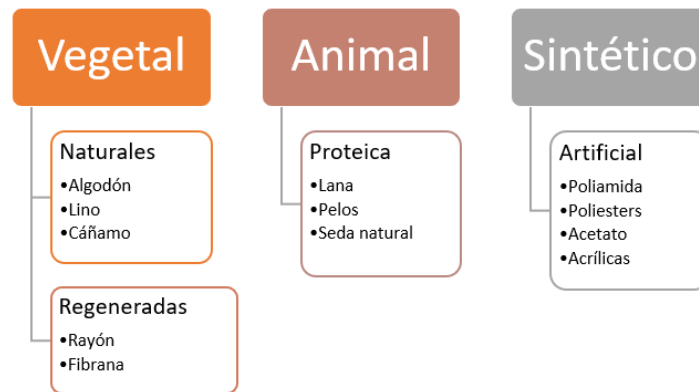


Figura 1.1. Diagrama de clasificación de fibras para el proceso textil.

Los procesos se pueden generalizar en una serie de operaciones, principalmente en fase húmeda, retroalimentadas unas con otras para obtener el resultado sobre cada sustrato (fibra/tejido). La figura 1.2 resume a grandes rasgos las principales operaciones que se realizan como parte del proceso textil (Masana, 2008; Pezok, 2012).



Figura 1.2. Etapas del proceso textil comúnmente utilizadas en la industria

1.2.1 Procesos previos

Se realizan principalmente en medio acuoso, el objetivo principal de esta fase es la remoción de impurezas y suciedad que están presentes en el material crudo, que pudiera interferir en los procesos de teñido y acabado. Para ello se emplean diversos compuestos químicos y diferentes formulaciones aplicación según sea el caso. La importancia de esta operación radica en el hecho de mejorar las propiedades químicas

y físicas de las fibras aumentando la hidrofiliidad del tejido. Generalmente incluye tres procesos: descruce, blanqueo y mercerizado.

Descruce: consiste en un lavado a elevada temperatura (100 °C), con agentes químicos denominados tensioactivos que favorezcan la remoción del material adherido a la fibra. Las cantidades empleadas de los compuestos químicos está en relación a la cantidad de sustrato a procesar y a la relación de baño (RB). Se entiende por relación de baño a la cantidad de material a teñir (Kg), y el volumen de baño donde estará inmerso.

Las proporciones de productos químicos empleados para una RB 1:10 para fibra de algodón se puede observar en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Proporción de productos químicos para el proceso de descruce algodón.	
Productos Químicos	Cantidad (g/L)
<i>NaOH 100 %</i>	4 – 6
<i>Tensioactivo</i>	0,5 – 1
<i>Humectante</i>	1 – 2
<i>Dispersante</i>	1-3
<i>Secuestrante</i>	1-3
<i>NaCl</i>	5-10

El tiempo de proceso es entre 30 a 45 minutos, el color natural de las fibras no es atacado por la solución alcalina. En caso de que sea necesario su remoción se realizará un proceso de blanqueo posterior al descruce.

El objetivo del proceso de descruce es producir una fibra con un aumentado grado de afinidad por el agua (hidrofiliidad), con lo cual se acortan los tiempos de los procesos tintóreos posteriores.

Para el caso de fibras sintéticas o sus mezclas, los procesos de descruce son menos severos y la mayor parte de las veces consisten en lavados solo con agua o soluciones de jabones y tensioactivos.

Blanqueo: es la remoción del color propio de las fibras por medio de agentes químicos oxidantes como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hipoclorito de sodio (NaClO), o agentes reductores como el ditionito de sodio (Na₂S₂O₄).

El blanqueo con agentes oxidantes da mejores resultados que los que se realizan con agentes reductores, los cuales luego de un tiempo se re-oxidan con el oxígeno del aire y vuelven a su color natural.

El proceso se realiza en medio alcalino, a pH controlado con el empleo de agentes secuestrantes de iones como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , que catalizan la descomposición del agente oxidante y tienden a provocar manchas en la fibra de algodón principalmente.

En la tabla 1.2 se da un ejemplo de cantidades para el blanqueo químico del algodón y una RB 1:10.

Tabla 1.2. Proporción de productos químicos para el proceso de blanqueo algodón.	
Productos Químicos	Cantidad (g/L)
<i>NaOH 50 %</i>	1 – 2
<i>Estabilizador de Peróxido</i>	5 – 8
<i>Humectante</i>	0,5 - 1
<i>H₂O₂ 50 %</i>	5 – 8

Estas cantidades a una temperatura de 80 °C, lleva un tiempo de proceso de 50 – 60 minutos. Finalizado el proceso, se realiza un enjuague en frío y seguidamente una neutralización del excedente de oxidante remanente por medio de un tratamiento enzimático con catalasas.

Mercerizado: proceso alcalino utilizado para el tratamiento de la fibra de algodón, mediante el cual se modifica la estructura cristalina y la composición química de la fibra.

El sustrato entra en contacto con una solución de hidróxido de sodio al 27-33 °Be, junto con un tensioactivo-humectante a temperatura entre 20-40 °C durante 1- 2 minutos. Esta exposición de la celulosa a una solución fuertemente alcalina genera “álcali-celulosa”, q luego se neutraliza con ácido acético al 1–3 %, y finalmente se lava generando el hidrato de Celulosa, que por pérdida de agua pasa a la forma cristalina de Celulosa II.

El cambio estructural de la celulosa se aprecia en la figura 1.3.

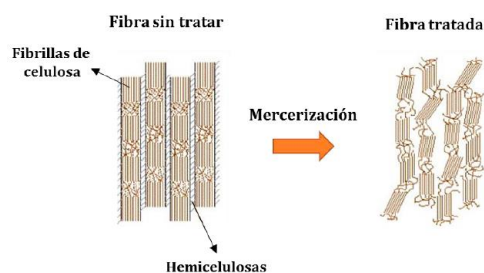


Figura 1.3 Esquema del efecto del mercerizado sobre la celulosa (Pezok, 2005).

El mecanismo propuesto por (Fink *et al.*), sugiere que el proceso de alcalinización provoca la deprotonación de los grupos hidróxidos, generando carga negativa en la molécula de celulosa, que por atracción contra iónica absorbe iones sodio y agua produciendo el aumento de volumen interfibrilar. Al realizar el lavado del sustrato alcalinizado, se produce una transformación irreversible a celulosa II (Figura 1.4).

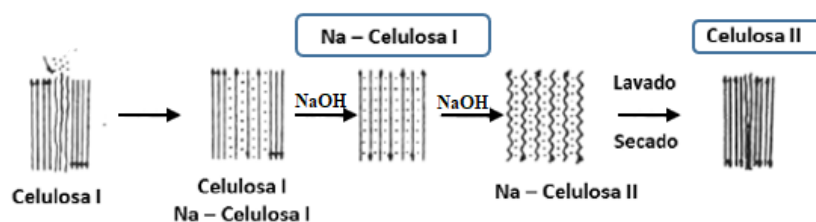


Figura 1.4. Esquema la transformación de la celulosa (Fink *et al.*, 1995).

Este proceso le confiere al sustrato mayor brillo y sedosidad, resistencia mecánica y aumento en la absorptividad.

1.2.2 Coloración

En general, el material textil, luego de los procesos previos, presenta un color crudo propio de las constituciones de las fibras que componen el tejido. El objetivo de esta etapa del proceso textil es impartir color por medio de procesos conocidos como “teñido”, se realiza en fase acuosa donde se transfiere color al tejido a partir del colorante disuelto o en dispersión, y el material textil bajo condiciones que favorecen la uniformidad en la distribución de colores.

Las fibras de los tejidos que se someten al proceso de teñido son polímeros lineales:

- La lana → polipéptidos

- La seda → polipéptidos
- El algodón → poliacelobiosa
- El nylon → poliamida

Los polímeros se orientan por regla general a lo largo del eje, cuya forma y magnitud de orientación determina sus propiedades físicas y su mayor o menor aptitud para la tintura.

Teñido:

Existe una gran variedad de compuestos químicos denominados como “colorantes” en el mercado, que se agrupan de acuerdo con el tipo de tejido al cual impartirá color.

La Tabla 1.3 muestra algunos colorantes frecuentemente utilizados para tinción de tejidos celulósicos como el algodón.

Tabla 1.3. Colorantes para fibras celulósicas		
TIPO DE COLORANTES	MECANISMO DE TINTURA	TIPO DE UNIÓN
<i>DIRECTOS</i>	<i>Difusión u adsorción del anión colorante</i>	<i>Fuerzas de Van der Wals</i>
<i>A LA TINA</i>	1-Reducción alcalina solubilizantes. 2- Difusión y adsorción del leuco anión colorante. 3- Oxidación insolubilizante	<i>Retención mecánica.</i>
<i>AL SULFURO</i>	1-Reducción alcalina solubilizantes. 2- Difusión y adsorción del leuco anión colorante. 3- Oxidación insolubilizante	Retención mecánica.
<i>REACTIVOS</i>	1-Difusión y adsorción. 2-Reacción química.	<i>Enlaces covalentes.</i>
<i>BASE AZOICAS</i>	1-Difusión y adsorción del precursor pigmentario 2-Difusión y adsorción de la base azoica 3-Reacción química entre el precursor y la base.	<i>Retención mecánica.</i>
<i>NEGRO DE ANILINA</i>	<i>Impregnación en medio ácido.</i> <i>Oxidación insolubilizante.</i>	<i>Retención mecánica.</i>

Para fibras proteicas, como la seda y la lana, existen colorantes ácidos, complejos metalizados, que corresponden a ácidos aromáticos coloreados cuyo proceso se realiza en medio ácido.

Los colorantes para teñir fibras sintéticas (poliéster, nylon), carecen de grupos que portan carga en sus moléculas; en su lugar se encuentran sustituyentes polares como el -OH, -CH₂, -CH₂OH, NO₂, u otro. En general son azoderivados, derivados de nitro difenil amina y derivados de la antraquinona. Por su estructura no iónica, son insolubles en agua, tienen tendencia a la sublimación. El proceso de teñido se realiza por encima de los 100 °C, en medio ácido acético, y con auxiliares de naturaleza orgánica que garanticen un buen resultado al teñido (Peters, 1967; Cegarra, Fuentes and Valdeperas, 1981).

1.2.3 Procesos posteriores

Acabado: consiste en una variedad de procesos mecánicos, térmicos y químicos con el objetivo de mejorar la apariencia, textura y desempeño del artículo textil producido. El resultado del acabado es garantizar un mejoramiento sobre la estabilidad dimensional y la resistencia de cada artículo frente a los lavados posteriores (Benninger, CSD Engineers, 2016).

Apresto: es el proceso donde a cada sustrato teñido se le da las características de suavidad según la demanda del mercado. Para ello se emplean tensioactivos catiónicos, agentes antipilling o antiestáticos.

1.3 Impacto ambiental de la industria textil

Los procesos realizados en la industria textil se caracterizan por un elevado consumo de agua como materia prima principal para toda la manufactura, y agregado de numerosos productos químicos en las diferentes etapas, tanto los de naturaleza orgánica (colorantes, solventes, etc.), como inorgánicas (sales, soluciones alcalinas,

etc.). Se estima un consumo de unos 100 L de agua por cada Kg de materia prima procesada (Lotito *et al.*, 2014; Chamini K Hemachandra and Pathiratne, 2016).

El vertido de poluentes en la naturaleza representa un grave problema para el ambiente y los ecosistemas circundantes, debido al gran uso de productos químicos y sus mezclas, y el gran volumen de agua que emplea durante todo el proceso textil, lo que conlleva a la generación de grandes volúmenes de efluentes de composición química muy variada y compleja (Eriksson *et al.*, 2008; Barrios-ziolo *et al.*, 2015). El efluente de plantas textiles tiene características propias, como una alta conductividad, pH alcalino, baja demanda biológica de oxígeno (DBO) y alta demanda química de oxígeno (DQO), lo que significa que están presentes compuestos químicos capaces de oxidarse en condiciones ácidas (Siddique *et al.*, 2017.; Touati *et al.*, 2015).

Entre los principales compuestos con gran capacidad para provocar alteraciones al ambiente, se encuentran los colorantes y tensioactivos utilizados durante el proceso textil. Estos compuestos no pueden ser vertidos en forma directa; previo a su descarga deben ser degradados en plantas de tratamiento de efluentes. Sin embargo, estos compuestos presentan una baja tasa de biodegradabilidad debido a sus elevados pesos moleculares y compleja estructura química. Adicionalmente, se ha demostrado que muchos de estos compuestos poseen actividad mutagénica o genotóxica para varios organismos (Chamini K Hemachandra and Pathiratne, 2016).

Dada la gran heterogeneidad de compuestos poluentes presentes en los efluentes de la industria textil, este trabajo de tesis se propuso como objetivo la determinación y seguimiento de compuestos tensioactivos presentes en el efluente de una planta procesadora textil, a lo largo de las diferentes etapas de su planta de tratamiento de efluentes y cuerpo receptor, como indicadores de funcionamiento del proceso de depuración del efluente.

1.3.1 Tensioactivos, toxicidad y persistencia

Los tensioactivos empleados en las diferentes etapas del proceso textil son de naturaleza iónica o no iónica o una mezcla de ambos. Se utilizan principalmente en las etapas de los tratamientos previos, coloración y terminación, debido a que por sus características acortan los tiempos de procesos, mejorando los tiempos y costos de producción.

Un surfactante o tensioactivo es un compuesto orgánico con característica anfifílicas o anfipáticas, con un extremo molecular hidrofílico (con afinidad por los solventes polares como el agua), y otro que resulta hidrofóbico (afinidad por solventes no polares). La parte hidrofóbica puede ser ramificada, lineal o alifáticas, corta o larga, típicamente está entre 8 a 18 átomos de carbono. La cabeza hidrofílica puede ser iónica o no iónica, por lo que existe una amplia gama de tensioactivos en el mercado (Salager, 2002; Sharma and Chadha, 2018)

1.3.1.1. Tensioactivos IONICOS

ANIONICOS: la parte hidrofílica son sulfatos ($R-OSO_3^- M^+$), sulfonatos orgánicos ($RSO_3^- M^+$), fosfatos ($ROPO_3^- M^+$) y/o grupos carboxílico ($RCOO^- M^+$); la parte hidrofóbica generalmente son cadenas alquílicas de longitud variable (R-R), alquilfenil eter o alquilbenceno.

Estos compuestos son los más antiguos que se encuentran en el mercado, representando actualmente el 50 % aproximadamente de los tensioactivos usados en Europa. Son los más efectivos para la remoción de aceite, grasa o tierra, y sustancias orgánicas adheridas a una superficie, pero son sensibles a aguas duras, o presencia de sales alcalino-térreas. En los últimos años hubo cambios en su formulación debido a cambios en la regulación para su descarga, debido a su baja tasa de biodegradabilidad.

Entre los principales compuestos representativos de este grupo se pueden nombrar a los compuestos de las Figuras 1.5 y 1.6:

industriales, esta familia de compuestos resulta ser muy efectiva para la remoción de aceites sintéticos o manchas de difícil remoción.

Tabla 1.4. Principales tensioactivos no iónicos de uso en la industria.	
Nombre	Porcentaje (%)
<i>Alcoholes Lineales etoxilados</i>	40
<i>Alquil Fenol etoxilado</i>	20
<i>Esteres de ácidos grasos</i>	20
<i>Derivados de aminas y amidas</i>	10
<i>Copolímeros de Óxidos de Etileno</i>	-
<i>Copolímeros de óxidos de etileno-óxido de propileno</i>	-
<i>Tiolis (mercaptanos) etoxilados</i>	-

Las unidades de óxido de etileno (EO), van de 5 a 7 para que sean solubles en agua, dependiendo del grupo lipofílico, pero hay formulaciones específicas de hasta 40 unidades de EO.

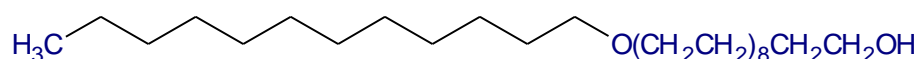


Figura 1.8. Tensioactivo no iónico Dodecanol, 9 mol etoxilado

1.3.1.3. Toxicidad de los tensioactivos

Los efectos tóxicos de estos compuestos para organismos acuáticos van desde 0,0025 a 300 mg/L para tensioactivos aniónicos y desde 0,3 a 200 mg/L para tensioactivos no iónicos (Arslan-Alaton and Erdinc, 2006; Barber *et al.*, 2015; Sharma and Chadha, 2018). Particularmente, algunos tensioactivos no iónicos son incluso tóxicos a muy bajas concentraciones (LC50 < 1 mg/L), dependiendo de la estructura y peso molecular (Akyüz and Roberts, 2002; Liwarska-Bizukojc *et al.*, 2005; Motteran *et al.*, 2014; Priac *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que los tensioactivos no iónicos como el alquilfenol etoxilado y el alcohol etoxilado son, en principio, fácilmente degradados tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, quedando el resto de moléculas del proceso de degradación que resultan ser más recalcitrantes para el ecosistema (Arslan-Alaton and Erdinc, 2006). Los metabolitos de la degradación de los tensioactivos no iónicos como el alquilfeno etoxilado (APEO), dejan compuestos lipofílicos, con elevada toxicidad y

poder estrogénico, con una elevada persistencia en el ambiente. El potencial efecto como irruptor endócrino provoca la disminución del número de espermatozoides en peces machos y un desorden reproductivo en humanos. (Loos *et al.*, 2007; Acir and Guenther, 2018). Por lo que es importante la monitorización de la descarga de estos compuestos al ambiente, y de una biorremediación adecuada con el fin de evitar la bioacumulación en animales y suelo (Ferrera *et al.*, 2009).

1.3.2 Tratamiento de efluentes de la industria textil

Los efluentes de la industria textil representan un grave problema ambiental al que se le debe prestar debida atención, ya que muchos de las sustancias químicas como colorantes y aditivos textiles son tóxicos y la mayoría de ellos no son biodegradables y, en consecuencia, al ser descargados a cuerpos de agua receptores, permanecen en el ambiente generando una alteración al ecosistema. Para su tratamiento existen procesos físicos, químicos y biológicos, que pueden ser aplicados para disminuir la composición de los compuestos tóxicos presentes en las aguas residuales. Cada método tiene sus limitaciones técnicas y económicas (Touati *et al.*, 2016).

Dependiendo de la naturaleza de las materias primas y productos empleados en los diferentes procesos, la composición incluye colorantes total o parcialmente hidrolizados, sales, tensioactivos, y pesados metales. Los tintes textiles son uno de los contaminantes más peligroso por su toxicidad y efecto en los cuerpos de agua (Khandegar and Saroha, 2013; Vijayalakshmidivi and Muthukumar, 2014; Manai *et al.*, 2016).

Para la descarga de efluentes de las industrias a cuerpos de agua se han establecido límites reglamentarios (límites de tolerancia), en varios países asiáticos y en la comunidad Europea (EU), para un conjunto seleccionado de parámetros fisicoquímicos de los efluentes (WEPA, 2015).

El tratamiento de aguas residuales de la industria textil para eliminar completamente de los colorantes es una tarea desafiante que ha recibido más atención científica en los

últimos tiempos (Kabra, Khandare and Govindwar, 2012). Consiste en una serie de etapas y procesos para reducir la carga tanto de material sólido disperso, como así también aquellos procesos fisicoquímicos que permitan la reducción de la carga de compuestos disueltos en la fase líquida. Se realiza en diferentes piletas retroalimentadas y automatizadas, sectorizadas adecuadamente y en las que se lleva a cabo determinado proceso.

La materia sólida macroscópica presente en el efluente en general se elimina por medios de rejillas (resto de tela, hilado, plástico). El efluente primario es conducido a la pileta de sedimentación y acondicionamiento de pH, allí se elimina la mayor cantidad de sólido suspendido (colorantes parcial o totalmente disueltos). Los lodos sedimentados son separados de los líquidos (efluente secundario), que pasa a una segunda pileta para acondicionar los parámetros biológicos de éste (Manekar *et al.*, 2014).

Un esquema general de planta de tratamiento con depuración biológica, y posterior disposición se presenta en la figura 1.9. Las etapas aquí mencionadas varían de una planta a otra, pudiendo estar presentes solo algunas de las etapas mencionadas.

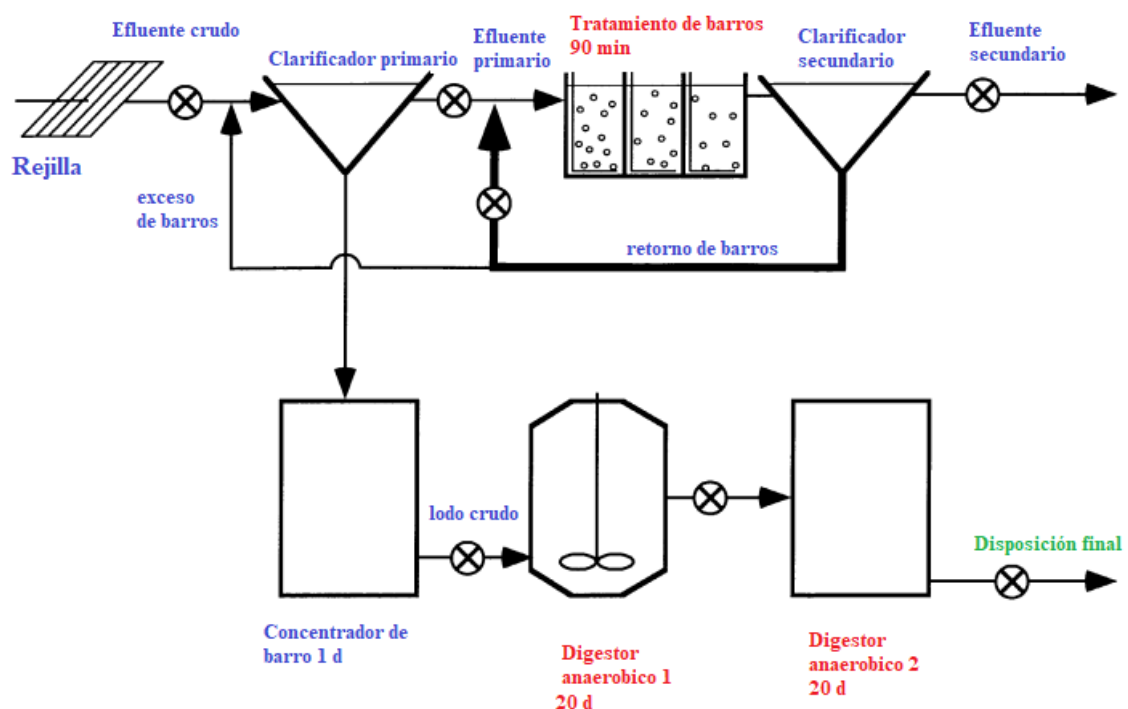


Figura 1.9. Esquema general de una planta de tratamiento de efluente textil

Se observa en el gráfico que después de un primer tratamiento para clarificar y separar los barros, el efluente secundario pasa a piletas de tratamiento biológico facultativo donde muchas de las sustancias como los tensioactivos son reducidos a compuestos secundarios (Kamaya, Sugimoto and Yamaguchi, 2014; Chamini K. Hemachandra and Pathiratne, 2016).

Es preciso realizar un monitoreo constante de la calidad del efluente en cada una de sus etapas, para acreditar su eficiencia como depurador de compuestos tóxicos descargados para generar el menor grado de impacto al cuerpo receptor del efluente proveniente de la actividad textil.

1.4 Bibliografía

- Acir, Ismail-h and Klaus Guenther. 2018. “Science of the Total Environment Endocrine-Disrupting Metabolites of Alkylphenol Ethoxylates – A Critical Review of Analytical Methods , Environmental Occurrences , Toxicity , and Regulation.” *Science of the Total Environment* 635:1530–46.
- Akyüz, Mehmet and David J. Roberts. 2002. “Determination of Linear Alkylbenzene Sulphonates and Their Biodegradation Intermediates by Isocratic RP-HPLC.” *Turkish Journal of Chemistry* 26(5):669–79.
- Arslan-Alaton, Idil and Elif Erdinc. 2006. “Effect of Photochemical Treatment on the Biocompatibility of a Commercial Nonionic Surfactant Used in the Textile Industry.” *Water Research* 40(18):3409–18.
- Barber, Larry B., Jorge E. Loyo-rosales, Clifford P. Rice, Thomas A. Minarik, and Ali K. Oskouie. 2015. “Science of the Total Environment Endocrine Disrupting Alkylphenolic Chemicals and Other Contaminants in Wastewater Treatment Plant Effluents , Urban Streams , and Fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions.” 517:195–206.
- Barrios-ziolo, Leonardo Fabio, Luisa Fernanda Gaviria-restrepo, Edison Alexander, and

- Santiago Alonso Cardona-gallo. 2015. “Technologies for the Removal of Dyes and Pigments Present in Wastewater . A Review Tecnologías Para La Remoción de Colorantes y Pigmentos Presentes En Aguas Residuales . Una Revisión.” 82(191):118–26.
- Benninger, CSD Engineers, ISSPPRO. 2016. “Technical Manual Textile Finishing Industry.” (July).
- Cegarra, José, Publio Fuentes, and José Valdeperas. 1981. *Fundamentos Científico y Aplicados de La Tintura de Materiales Textiles*. Universida.
- Christie, R. M. 2007. *Enviromental Aspects of Textil Dyeing*.
- Eriksson, Eva, Nina Christensen, Jens Ejbye Schmidt, and Anna Ledin. 2008. “Potential Priority Pollutants in Sewage Sludge.” 226(September 2006):371–88.
- Ferrera, Z. Sosa, J. J. Santana Rodri, T. Vega Morales, and M. E. Torres Padro. 2009. “Determination of Alkylphenol Ethoxylates and Their Degradation Products in Liquid and Solid Samples.” 28(10).
- Fink, H-p, E. Walenta, J. Kunze, and G. Mann. 1995. “Wide Angle X-Ray and Solid State 13 C-NMR Studies of Cellulose Alkalization.” Pp. 523–28 in *Cellulose and Cellulose Derivatives*. Elsevier.
- Haro, M^a Irene Ruiz de. 2012. “Orígenes, Evolución y Contextos de La Tecnología Textil: La Producción Del Tejido En La Prehistoria y La Protohistoria.” *Arqueología y Territorio* 9:133–45.
- Hemachandra, Chamini K. and Asoka Pathiratne. 2016. “Combination of Physico-Chemical Analysis, Allium Cepa Test System and Oreochromis Niloticus Erythrocyte Based Comet Assay/Nuclear Abnormalities Tests for Cyto-Genotoxicity Assessments of Treated Effluents Discharged from Textile Industries.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 131:54–64.
- Hemachandra, Chamini K and Asoka Pathiratne. 2016. “Ecotoxicology and

Environmental Safety Combination of Physico-Chemical Analysis , Allium Cepa Test System and Oreochromis Niloticus Erythrocyte Based Comet Assay / Nuclear Abnormalities Tests for Cyto-Genotoxicity Assessments of Treated Effluents Discha.” 131:54–64.

Kabra, Akhil N., Rahul V Khandare, and Sanjay P. Govindwar. 2012. “Development of a Bioreactor for Remediation of Textile Effluent and Dye Mixture : A Plant e Bacterial Synergistic Strategy.” *Water Research* 47(3):1035–48.

Kamaya, Minori, Hikaru Sugimoto, and Yosuke Yamaguchi. 2014. “A Simple and Rapid Method for the Detection of Non-Ionic Surfactants.” (November):1121–28.

Khandegar, V. and Anil K. Saroha. 2013. “Electrocoagulation for the Treatment of Textile Industry Effluent - A Review.” *Journal of Environmental Management* 128:949–63.

Liwerska-Bizukojc, Ewa, Korneliusz Miksch, Anna Malachowska-Jutysz, and Joanna Kalka. 2005. “Acute Toxicity and Genotoxicity of Five Selected Anionic and Nonionic Surfactants.” *Chemosphere* 58(9):1249–53.

Loos, Robert, Georg Hanke, Gunther Umlauf, and Steven J. Eisenreich. 2007. “LC-MS-MS Analysis and Occurrence of Octyl- and Nonylphenol, Their Ethoxylates and Their Carboxylates in Belgian and Italian Textile Industry, Waste Water Treatment Plant Effluents and Surface Waters.” *Chemosphere* 66(4):690–99.

Lotito, Adriana Maria, Marco De Sanctis, Claudio Di Iaconi, and Giovanni Bergna. 2014. “Textile Wastewater Treatment: Aerobic Granular Sludge vs Activated Sludge Systems.” *Water Research* 54:337–46.

Manai, Imène, Baligh Miladi, Abdellatif El Mselmi, Issam Smaali, Aida Ben Hassen, Moktar Hamdi, and Hassib Bouallagui. 2016. “Industrial Textile Effluent Decolourization in Stirred and Static Batch Cultures of a New Fungal Strain *Chaetomium Globosum* IMA1 KJ472923.” *Journal of Environmental Management* 170:8–14.

- Manekar, Pravin, Guarav Patkar, Pawan Aswale, Manisha Mahure, and Tapas Nandy. 2014. “Detoxifying of High Strength Textile Effluent through Chemical and Bio-Oxidation Processes.” *Bioresource Technology* 157:44–51.
- Masana, Ismael. 2008. *Procesos de Tintorería*.
- Motteran, Fabricio, Juliana Kawanishi Braga, Isabel Kimiko Sakamoto, Edson Luiz Silva, and Maria Bernadete Amancio Varesche. 2014. “Degradation of High Concentrations of Nonionic Surfactant (Linear Alcohol Ethoxylate) in an Anaerobic Fluidized Bed Reactor.” *Science of the Total Environment* 481(1):121–28.
- Peters, R. H. 1967. *Textile Chemistry*. edited by E. P. Company.
- Pezok, Juan C. 2012. *Introducción a La Tecnología Textil*.
- Priac, Anne, Nadia Morin-Crini, Coline Druart, Sophie Gavaille, Corina Bradu, Céline Lagarrigue, Giangiacomo Torri, Peter Winterton, and Grégorio Crini. 2017. “Alkylphenol and Alkylphenol Polyethoxylates in Water and Wastewater: A Review of Options for Their Elimination.” *Arabian Journal of Chemistry* 10:S3749–73.
- Salager, Jean Lous. 2002. *Cuadernos Firp*. edited by U. de los Andes-Venezuela.
- Sharma, Madhu and Pooja Chadha. 2018. “Toxicity of Non-Ionic Surfactant 4-Nonylphenol an Endocrine Disruptor : A Review.” 6(2):190–97.
- Siddique, Khadija, Muhammad Rizwan, Munazzam Jawad Shahid, Shafaqat Ali, Rehan Ahmad, and Hina Rizvi. 2017. “Textile Wastewater Treatment Options : A Critical Review.” 183–207.
- Touati, Azza, Tijani Hammedi, Wahiba Najjar, Zouhaier Ksibi, and Sami Sayadi. 2015. “Photocatalytic Degradation of Textile Wastewater in Presence of Hydrogen Peroxide: Effect of Cerium Doping Titania.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 35:36–44.
- Touati, Azza, Tijani Hammedi, Wahiba Najjar, Zouhaier Ksibi, and Sami Sayadi. 2016. “Journal of Industrial and Engineering Chemistry Photocatalytic Degradation of

Textile Wastewater in Presence of Hydrogen Peroxide : Effect of Cerium Doping Titania.” 35:36–44.

Vijayalakshmi, S. R. and Karuppan Muthukumar. 2014. “Phytoremediation of Textile Effluent Pretreated with Ultrasound and Bacteria.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2(3):1813–20.

WEPA. 2015. *Ministry of the Environment Water Environmental Management in Asia.*

Objetivos Propuestos

Objetivos Generales

Desarrollar criterios analíticos utilizando métodos de modelado multivariado para cuantificar analitos de interés ambiental y de esa manera comprobar el grado de depuración de un efluente de planta textil. El plan de tesis se propone poner a disposición métodos alternativos que permitan cuantificar como indicadores a compuestos propios de la industria con capacidad fluorescente. Como metodología general se utilizará el modelado multivariado de matrices de excitación emisión fluorescente directamente determinadas sobre muestras de efluente y cuerpo receptor, con el objeto de realizar un seguimiento de los procesos de depuración.

Objetivos Particulares

- Contribuir al conocimiento de la composición química de aguas residuales producidas por una planta textil y el grado de depuración de este, previo a su deposición en el cuerpo receptor.
- Proponer métodos de análisis alternativos de menor costo a las técnicas establecidas como de referencia fundamentados en el modelado multivariado de información generada por Espectrofluorimetría
- Estudiar el rendimiento de los métodos multivariados como PARAFAC y UPLS/RBL al aplicarlos al análisis de datos obtenidos mediante Espectrofluorimetría con el objetivo de determinar la concentración de tensioactivos del proceso textil a lo largo de las diferentes etapas de una planta de tratamiento de efluentes textiles.
- Comparar los resultados obtenidos al cuantificar los tensioactivos en muestras de aguas residuales con mínimos pretratamientos con los adquiridos con un método clásico de referencia basado en cromatografía líquida con detector de fluorescencia.
- Aplicar la metodología desarrollada a una industria textil del medio.

Hipótesis de Trabajo

Es posible establecer modelos estadísticos multivariados de la concentración de tensioactivos poluentes, considerados como indicadores de contaminación, a lo largo de las diferentes etapas de una planta de tratamiento de efluentes textiles para utilizar esta información que permita evaluar el grado de depuración del efluente generado como consecuencia del proceso textil.

ESPECTROFLUORIMETRÍA Y CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

CAPITULO 2: Espectrofluorimetría y calibración multivariada

2.1 Espectrofluorimetría

La materia al interactuar con la radiación absorbe un fotón, generando la promoción de un electrón a un estado excitado de mayor energía, que, al retornar a su estado basal emite la energía excedente como radiación conocido como luminiscencia.

Formalmente se lo divide en dos categorías “fosforescencias” y “fluorescencias”; que se presente uno u otro fenómeno depende del estado excitado de la molécula. En la “fluorescencia” el estado excitado de *singulete*, el electrón se empareja (por giro opuesto), con el electrón del estado fundamental. En la fosforescencia el estado excitado triplete puede emparejarse con dos estados niveles de energía que difieren sus estados de giro (Harvey, 2008).

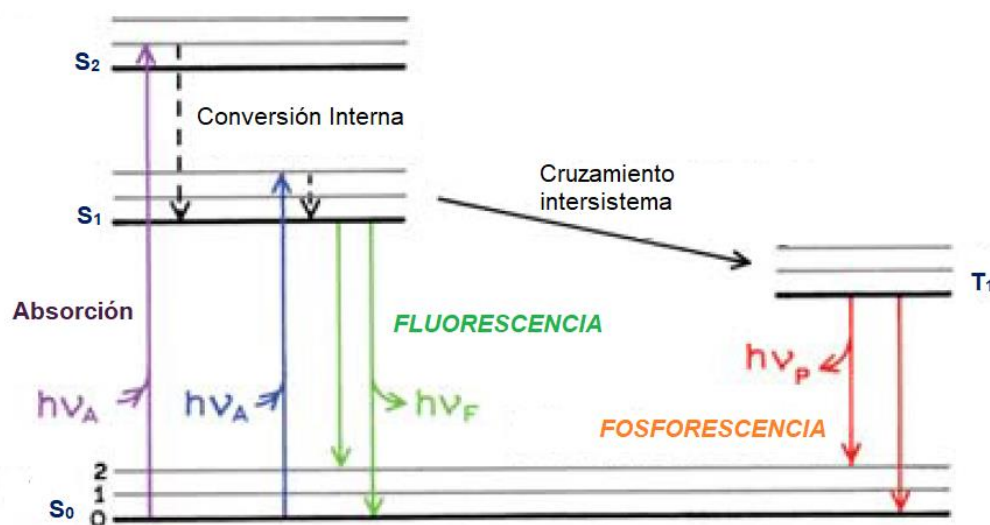


Figura 2.1. Diagrama simplificado de Jablonski de nivel de energía para una molécula que muestra la vía para la desactivación para el estado excitado (Lakowicz 2006).

Para cualquier molécula, existen varios estados electrónicos diferentes (ilustrados como $S_{(0)}$, $S_{(1)}$ y $S_{(2)}$, como se aprecia en la Figura 2.1), dependiendo de la energía electrónica total y la simetría de espín electrónico, cada estado electrónico se subdivide en varios niveles de energía vibracional y rotacional asociados con los núcleos atómicos y orbitales de enlace.

La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de energía absorbida por muestra y puede expresarse mediante la siguiente expresión:

$$I_f = k \cdot \Phi_f \cdot (P_0 - P_t) \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde k es la constante que explica la eficiencia de recolectar y detectar la emisión fluorescente.

De la ley de Beer se sabe que: $\frac{P_T}{P_0} = 10^{-\epsilon b C}$ Ec.2.2

Donde C representa la concentración de la especie con actividad fluorescente, P_0 y P_T corresponden a la energía radiante incidente y transmitida.

Sustituyendo en la ecuación 2.1 el valor de P_T , y reordenando términos, la expresión queda:

$$I_f = k \cdot \Phi_f \cdot P_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon b C}) \quad \text{Ec.2.3}$$

Si el valor de la expresión $\epsilon b C < 0,01$, que se presenta cuando la concentración de analito (fluoróforo), es muy pequeña, la ecuación 2.3 puede expresarse como:

$$I_f = 2,303 \cdot k \cdot \Phi_f \cdot \epsilon \cdot b \cdot C \cdot P_0 = k' P_0 \quad \text{Ec. 2.4}$$

La fluorescencia se estudia en moléculas aromáticas policíclicas altamente conjugadas que presentan diferentes niveles de energía en el estado fundamental, cada uno asociado con un nivel específico de disposición de los orbitales moleculares electrónicos. Como ejemplo, los compuestos heterocíclicos polinucleares como la piridina, o la rodamina B entre otros presentan actividad fluorescente (Figura 2.2):

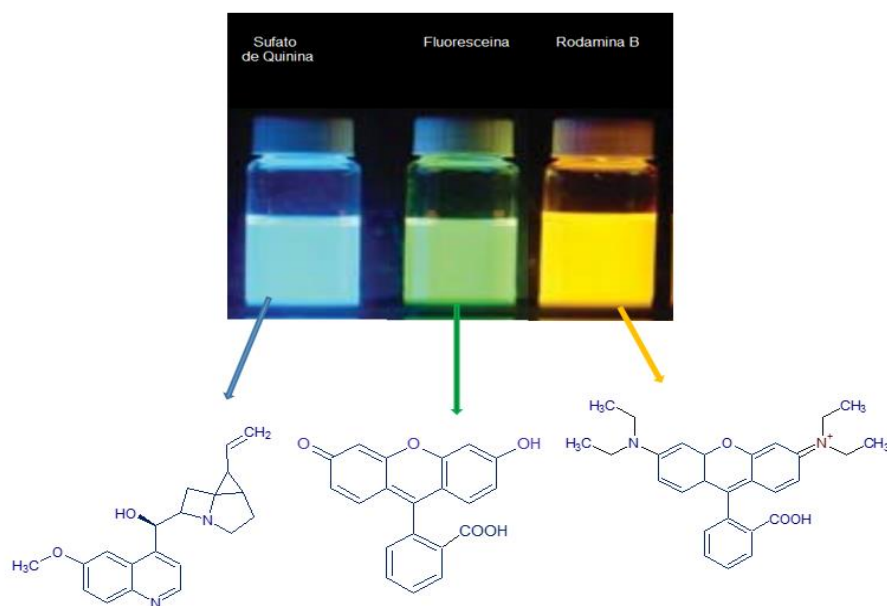


Figura 2.2. Estructura de sustancias fluorescentes típicas (Lakowicz 2006).

La tasa de emisión de fluorescencia es de $1 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, el tiempo de vida (τ), es de unos 10 ns, que corresponde al tiempo promedio entre el estado excitado y el estado fundamental (Lakowicz, 2006). Dado la pequeña escala de tiempo en que se produce la fluorescencia, la medición de la emisión con resolución temporal requiere una óptica y electrónica sofisticadas.

Los espectros de emisión varían ampliamente y dependen de la estructura química del fluoróforo y del disolvente en el cual se encuentre presente al momento de llevar a cabo la medición. Las grandes ventajas de la detección de fluorescencia son su alta sensibilidad, y que no requiere de gasto excesivo en instrumental y reactivos, comparados con otras metodologías como HPLC; GC u otras metodologías avanzadas de análisis.

2.1.1 Características del espectro de emisión fluorescente

Corrimiento de Stock. La energía de la emisión es típicamente menor que la de la absorción. Por lo que la fluorescencia se manifiesta a energías más bajas o en longitudes de onda más largas. Este fenómeno fue observado por primera vez por Sir. George G. Stokes en 1852 en la Universidad de Cambridge.

La causa del cambio de Stokes es la rápida caída al nivel vibracional más bajo de S_1 . Los fluoróforos generalmente decaen a los niveles vibracionales más altos de S_0 , lo que resulta en una mayor pérdida de energía de excitación por la termalización del exceso de energía vibratoria. Además de estos efectos, los fluoróforos pueden mostrar más cambios de Stokes debido a efectos de solventes en el que se encuentren, reacciones en estado excitado, formación de complejos y / o transferencia de energía.

2.1.2 Los espectros de emisión son típicamente independientes de la longitud de onda de excitación

Una propiedad característica de la fluorescencia, es la independencia del espectro de emisión con respecto a la longitud de onda de excitación, este fenómeno es conocida como la regla de Kasha. La excitación a niveles electrónicos y vibracionales altos genera un exceso de energía que es disipado rápidamente, dejando al compuesto fluoróforo en el nivel vibratorio más bajo que el estado S_1 . Esta relajación ocurre en aproximadamente 10^{-12} s, y es presumiblemente el resultado de una fuerte superposición entre numerosos estados de energía similares.

Para la mayoría de los fluoróforos, la emisión es la imagen especular de la absorción del estado S_0 a S_1 , y no del espectro de absorción total. La naturaleza generalmente simétrica de estos espectros es el resultado de las mismas transiciones involucradas tanto en la absorción como en la emisión, y los niveles de energía vibracional similares de S_0 y S_1 (Figura 2.3).

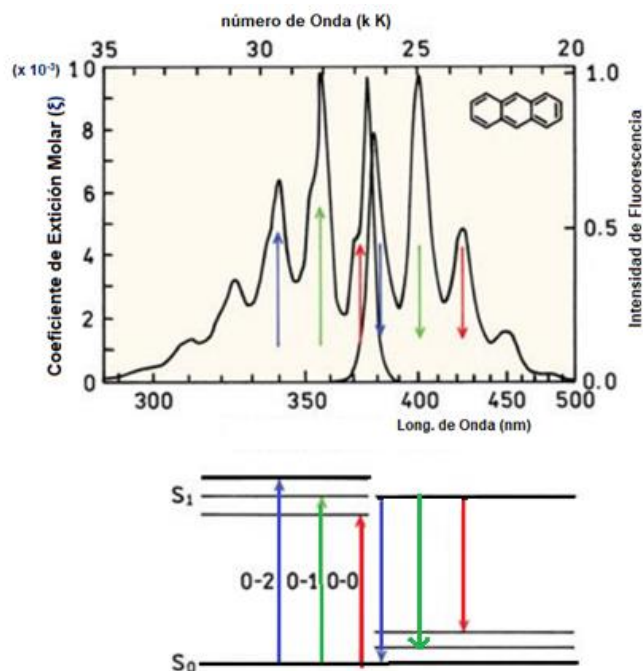


Figura 2.3. Regla de imagen especular y factores de Franck-Condon. Los espectros de absorción y emisión para antraceno. Los números 0, 1 y 2 se refieren a niveles de energía vibracional (Lakowicz 2006).

En la mayoría de los fluoróforos, estos niveles de energía no se alteran significativamente por las diferentes distribuciones electrónicas de S_0 y S_1 . El espectro de emisión tiene el mismo espacio de energía vibracional que el espectro de absorción; de acuerdo con el principio de Franck-Condon, todas las transiciones electrónicas verticales, ocurren sin cambio en la posición de los núcleos.

2.1.3 Vida de fluorescencia y rendimiento cuántico

La vida útil de la fluorescencia y el rendimiento cuántico son los parámetros característicos más importantes de un fluoróforo. El rendimiento cuántico (Q), es el número de fotones emitidos en relación con el número de fotones absorbidos. La constantes Γ (constante de emisión de velocidad de desintegración), y k_{nr} (constante de velocidad de decaimiento no radioactivo), despueblan el estado excitado S_1 , la fracción de fluoróforos que se descomponen por emisión está dado por la siguiente expresión (Noomnarm and Clegg, 2009):

$$Q = \frac{\tau}{\tau + k_{nr}} \tag{Ec. 2.5}$$

El rendimiento cuántico cercano a uno, se corresponde a valores de tasa de desintegración mayor a la tasa de decaimiento radioactivo, $k_{nr} < \tau$. Generalmente, el rendimiento energético de la fluorescencia para fluoróforos es menor a la unidad debido a pérdidas por cambios de Stokes.

Los procesos no radioactivos (Figura 2.4), generalmente son agrupados en el coeficiente k_{nr} .

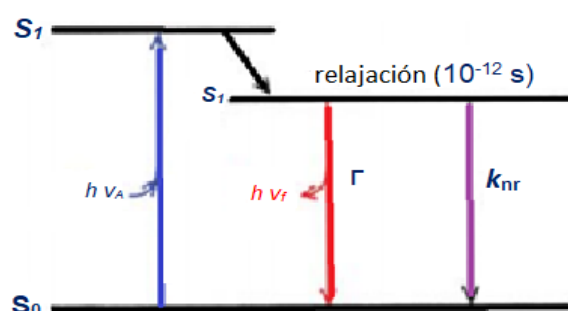


Figura 2.4. Diagrama simplificado de Jablonski donde se representa el significado del rendimiento cuántico y la vida media (Lakowicz 2006).

La vida útil de un fluoróforo en ausencia de procesos no radiactivos se denominan vida intrínseca o natural y está dado por la siguiente expresión:

$$\tau_n = \frac{1}{\tau} \quad \text{Ec. 2.6}$$

Donde τ es la tasa de desintegración radioactiva.

2.1.4 Extinción (quenching) de la fluorescencia

La intensidad de la fluorescencia puede disminuirse/extinguirse mediante una amplia variedad de procesos o mecanismos. Una de las vías de extinción más común se produce por colisión, cuando el fluoróforo en estado excitado se desactiva al entrar en contacto con alguna otra molécula (extintor), presente en la solución donde está presente el fluoróforo (Figura 2.5). En este caso, el fluoróforo retorna al estado fundamental, sin producirse alteraciones en su estructura molecular. La disminución de la intensidad se describe mediante la conocida ecuación de Stern-Volmer.

Teniendo presente la desactivación del fluoróforo, la razón del rendimiento cuántico es igual a la razón de la intensidad de emisión observada considerando el proceso de desactivación (quenching), y el proceso de no desactivación mediante la siguiente expresión:

$$\phi_Q = \frac{k_f}{k_f + k_{nf} + k_q [Q]} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Sabemos que:

$$\phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_q [Q]} \quad \text{Ec. 2.8}$$

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\phi_0}{\phi_Q} = \frac{k_f + k_{nf} + k_q [Q]}{k_f + k_{nf}} = 1 + \frac{1}{k_f + k_{nf}} k_q [Q] \quad \text{Ec. 2.9}$$

Considerando la vida útil de la fluorescencia en ausencia de efectos de desactivación, se obtiene la expresión final:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Ec. 2.10}$$

En esta expresión, K es la constante de extinción de Stern-Volmer, k_q es la constante de extinción bimolecular, τ_0 es la vida útil no extinguida y $[Q]$ es la concentración del extintor (Douglas, James and Thomoty, 2001).

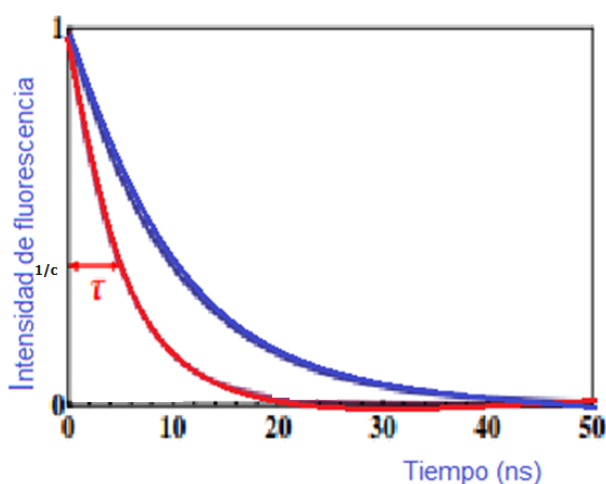


Figura 2.5. Diagrama de intensidad de fluorescencia expresada en función del tiempo luego de exponer a la luz de excitación una determinada sustancia. El tiempo de decadencia τ es el tiempo en el cual solo la fracción $1/e$ de la fluorescencia inicial es observada, rojo $\tau = 5$ ns y azul $\tau = 10$ ns (Lakowicz 2006).

Una amplia variedad de moléculas en solución puede actuar como extintores por colisión. Los ejemplos más comunes incluyen oxígeno, halógenos, aminas y moléculas

deficientes en electrones como la acrilamida. El mecanismo de extinción varía con el par de fluoróforo-extintor.

Además de la extinción por colisión, la desactivación puede ocurrir por formación de complejos no fluorescentes con moléculas presentes en la solución donde está presente el fluoróforo. Este proceso se conoce como *extinción estática*, tiene lugar en el estado fundamental y no se basa en la difusión o colisiones moleculares. La extinción también puede ocurrir por una variedad de mecanismos triviales, por ejemplo, mecanismos no moleculares, como la atenuación de la luz incidente por el fluoróforo u otras especies absorbentes.

2.1.5 Dispersión de la luz

Se define así al redireccionamiento de la radiación fuera de la dirección original de propagación. Generalmente, la causa de este fenómeno se debe a interacciones con moléculas o partículas presentes en la muestra o en la matriz donde está presente el fluoróforo.

Las dispersiones pueden ser elásticas o inelásticas. En el caso de las dispersiones *elásticas*, se presentan cuando la longitud de onda (frecuencia), de la luz dispersada es la misma que la frecuencia de la longitud de onda incidente. Para el caso de las dispersiones *inelásticas*, la luz dispersada experimenta cambios en la frecuencia y es independiente de la longitud de onda incidente (Clarke and Oprysa, 2006).

2.1.5.1. Dispersión de Rayleigh-Tyndall

Se produce por la interacción entre la radiación y las moléculas presentes en la muestra o a partir de pequeñas partículas en suspensión en estado coloidal (dispersión Tyndall), que inducen momentos dipolares, las cuales irradian energía con la misma frecuencia que la radiación incidente en todas las direcciones. La dispersión de la radiación incidente es recolectada junto con la señal de fluorescencia del analito de interés, por lo que habrá de aplicarse medidas adecuadas para separar la dispersión de la señal de

fluorescencia, de lo contrario se obtendrán resultados inexactos, afectando la interpretación. La dispersión de Rayleigh-Tyndall limitará la sensibilidad de un ensayo donde la fluorescencia tiene lugar a una longitud de onda cercana a la longitud de onda de excitación, ya que la separación total de la dispersión es imposible.

2.1.5.2. Dispersión de Raman

Se presenta cuando parte de la energía de la radiación incidente es absorbido por moléculas presentes en la matriz de la muestra, y convertido en energía vibratoria y rotacional, la cual es dispersada con menor energía (mayor frecuencia). El resultado es en una longitud de onda de emisión débil que puede interferir o ser confundido con la señal de fluorescencia que emita la muestra.

Algunas de las moléculas con las que impacta la radiación incidente pueden hallarse en estado rotacional o excitado que aportan energía extra al fotón, de forma que la dispersión de este fotón tendrá una energía superior a la radiación incidente en una cantidad correspondiente a la transición vibracional o rotacional de la molécula; a este fenómeno se lo conoce como *línea anti-Stokes*.

Las bandas Raman del solvente que coincidan con las bandas de emisión de fluorescencia del fluoróforo, pueden resolverse cambiando la longitud de onda de excitación a un valor inferior; por lo tanto, la banda Raman también será reducido. Como la longitud de onda de emisión de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación, la fluorescencia se separará de la dispersión Raman.

La dispersión de Raman de algunos solventes es bastante compleja de resolver y no debe ser ignorado. Generalmente, para resolverlos se recurre a realizar un espectro de emisión del blanco (solvente) antes de ejecutarse el compuesto fluorescente, y luego emplear los valores obtenidos con el blanco para sustraerlos de la señal de interés.

En la figura 2.6 se pueden apreciar los procesos de dispersión mencionados más arriba.

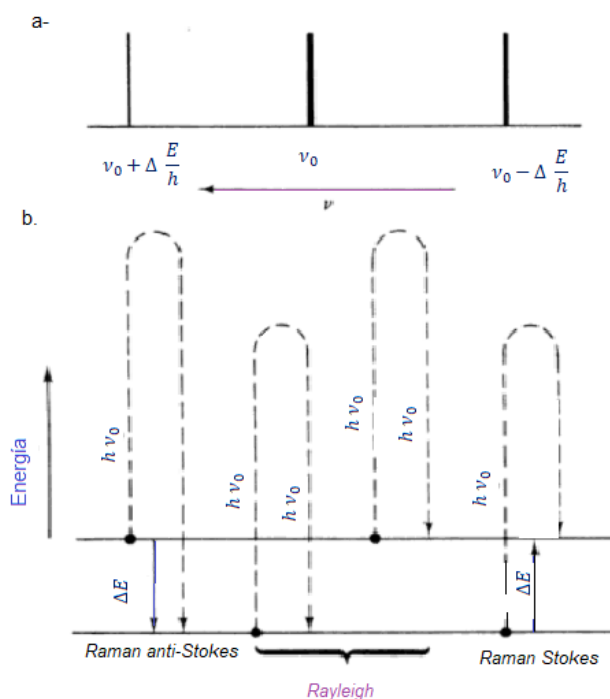


Figura 2.6. Dispersión de Rayleigh y Raman: (a) registro espectral, el grosor de las líneas representa las intensidades relativas de la dispersión. (b) diagrama de energía, las flechas de puntos indican el recorrido durante la transición y las flechas continuas representan la transición neta (Povrozin, Yevgen Barbieri, Beniamino 2016).

En la tabla 2.1, se presentan las longitudes de onda de excitación de la dispersión de Raman para diferentes solventes:

Tabla 2.1. Posición de las bandas Raman a determinada longitud de onda de excitación				
SOLVENTE	313 nm	366 nm	405 nm	436 nm
Agua	350	418	469	511
Acetonitrilo	340	406	457	504
Ciclohexano	344	409	458	499
Cloroformo	346	411	461	502

2.1.6 Representación gráfica de la espectroscopía de fluorescencia

Para un instrumento ideal, los espectros de emisión registrados directamente representan la tasa de emisión de fotones o la potencia emitida para cada longitud de onda, en un intervalo de longitud de onda determinado por los anchos de hendidura y la dispersión del monocromador de emisión. De manera similar, el espectro de excitación

representa la emisión relativa del fluoróforo para cada longitud de onda de excitación. La energía de la radiación se puede describir en términos de su longitud de onda λ , frecuencia (ν), o números de onda. Las unidades usuales para la longitud de onda se dan en nanómetros (nm), y los números de onda se dan en unidades de cm^{-1} , y la representación gráfica se conoce como perfil (Figura 2.7).

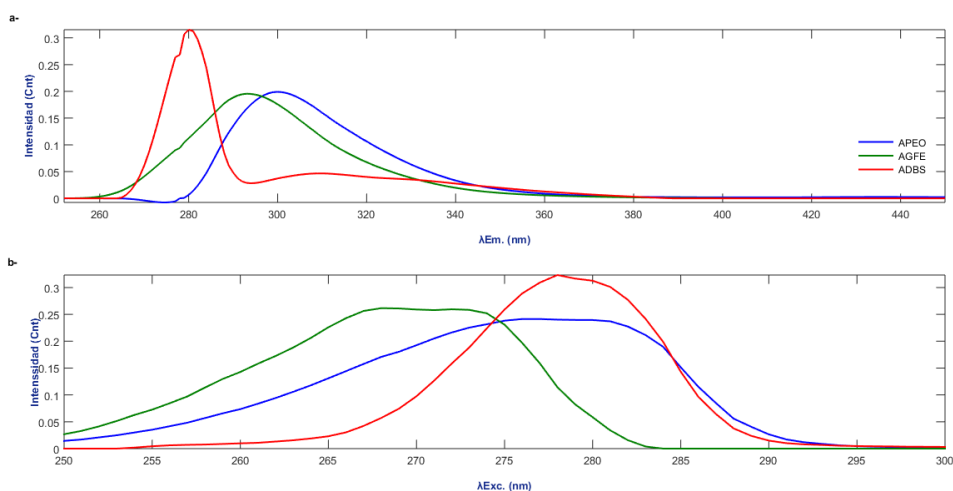


Figura 2.7. Representación gráfica de los perfiles emisión (a), y excitación (b), de los tensioactivos estudiados.

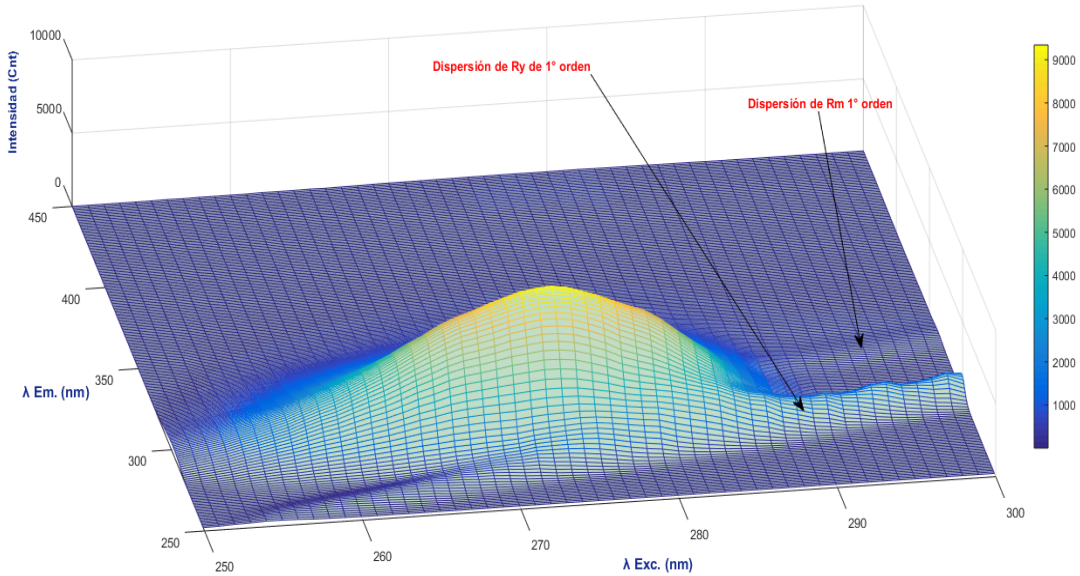
Por otra parte, cuando se determinan los espectros de excitación y emisión en simultáneo en un espectrofluorímetro, se obtiene una matriz de datos de fluorescencia conocida como matriz de emisión-excitación (EEM), su representación tridimensional se aprecia en la Figura 2.8. Los tres ejes de este “paisaje” corresponden a la intensidad de la fluorescencia (eje z), la longitud de onda de excitación (eje x), y la longitud de onda de emisión (eje y).

Es importante tener en cuenta que, al registrar datos de fluorescencia, el instrumento puede detectar señales de dispersión, generalmente más estrechas como: 1) La dispersión de Rayleigh, 2) La dispersión de Raman, 3) El armónico de segundo orden de la dispersión de Rayleigh.

Como se aprecia en la Figura 2.8, la dispersión de Rayleigh aparece como una señal de menor intensidad (en la emisión), para el rango de excitación, producida por el solvente

que dispersa la radiación (también por pequeñas partículas sólidas suspendidas en la solución). El disolvente también conduce a la dispersión inelástica, la señal Raman.

a-



b-

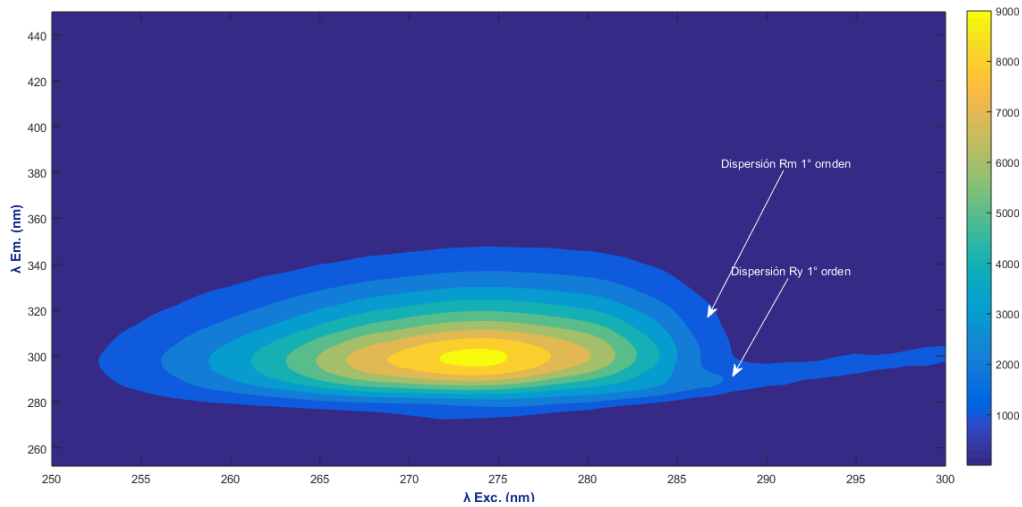


Figura 2.8. Representación tridimensional (a), y bidimensional o de contorno (b), de la fluorescencia para uno de los tensioactivos de uso textil.

La diferencia entre la excitación y la dispersión Raman, medida en unidades de frecuencia (frecuencia en $\text{cm}^{-1} = 10^7 / \text{longitud de onda en nm}$), es del orden de una frecuencia de vibración de la molécula del disolvente. Finalmente, también se pueden detectar señales armónicas; que corresponden a los armónicos de segundo orden de la red de difracción para la radiación incidente, de modo que el espectro mostrará un pico

estrecho a 600 nm, es decir, el doble de las longitudes de onda de excitación del ejemplo graficado.

2.1.7 Instrumentación de la espectroscopía de fluorescencia

La instrumentación básica para monitoreo de la actividad fluorescente o fosforescentes consiste en una fuente de radiación, un medio para la selección estrecha de longitudes de onda de radiación, monocromadores de excitación-emisión para seleccionar la longitud de onda deseada; compartimento de muestra y un detector cuya función consiste en el recuento del flujo de fotones emitidos por la muestra a la longitud de onda seleccionada.

El instrumento empleado en este trabajo de tesis es un espectrofluorímetro marca Scinco Modelo FS-2 (Figura 2.9).



Figura 2.9. Fospectrofluorímetro modelo FS-2, marca Scinco.

En la tabla 2.2, se describen brevemente las partes del espectrofluorímetro utilizado, y sus principales características.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

Tabla 2.2. Partes del Espectrofluorómetro FS-2 *

<p>1-2 Monocromadores de alta resolución:</p> <p>Monocromadores de 20cm de longitud focal, proporcionan un ancho de banda estrecho (0,5nm), para medidas de alta resolución. Los monocromadores de alto rendimiento optimizados gracias a una rejilla cóncava y a su ancho de banda de 0,5 nm.</p>	<p>3-Velocidad de digitalización:</p> <p>Recopilación de datos a velocidades superiores a 6.000 nm/min con la precisión propia del ancho de banda. Los 20.000 nm/min de velocidad de giro acelera las digitalizaciones de las mediciones y minimiza el tiempo de iluminación de la muestra.</p>	<p>4-Ancho de banda variable:</p> <p>Entre 0.5, 1.0, 2.5, 5.0,10, 20 nm de ancho de banda espectral para el monocromador, tanto de excitación como de emisión.</p>
<p>5-Lámpara de Xenón 150 W:</p> <p>Proporciona iluminación excepcionalmente estable, en todas las longitudes de onda. Evita los picos de ruido e intensidades asociados a lámparas flash de Xenón, hasta el IR-cercano.</p>	<p>6-Filtros personalizables:</p> <p>Filtros de 420, 435, y 530 nm de paso largo proporcionan la mayor pureza espectral, bloqueando la excitación y la luz dispersa.</p>	<p>7-Geometría haz horizontal:</p> <p>Haz de geometría horizontal permite la excitación óptima para proporcionar la señal de máxima fluorescencia. Permite medidas precisas con sólo 50 µL de muestra.</p>
<p>8-Compartimento de muestras:</p> <p>Gran compartimento de muestras permite incluir cómodamente instrumentos para el control de la temperatura, soporte multi-celda, mezclador, toma de muestras sólidas y accesorios de polarización.</p>		<p>9-Detector sensible:</p> <p>Detector de altas prestaciones R-928 PMT provee una sensibilidad incomparable de entre 190-900 nm.</p>



*Catalogo digital fuente www.scinco.com

A continuación de describen algunas de las partes principales del espectrofluorómetro.

2.1.7.1. Fuentes de luz: Lámparas de xenón de arco e incandescentes

En la actualidad, la fuente de luz más versátil para un espectrofluorómetro es una lámpara de arco de xenón (Xe), de alta presión. Estas lámparas proporcionan una salida de radiación relativamente continua de 250 a 700 nm (Figura 2.10), con una serie de líneas agudas que se producen cerca de 450 nm y superiores a 800 nm.

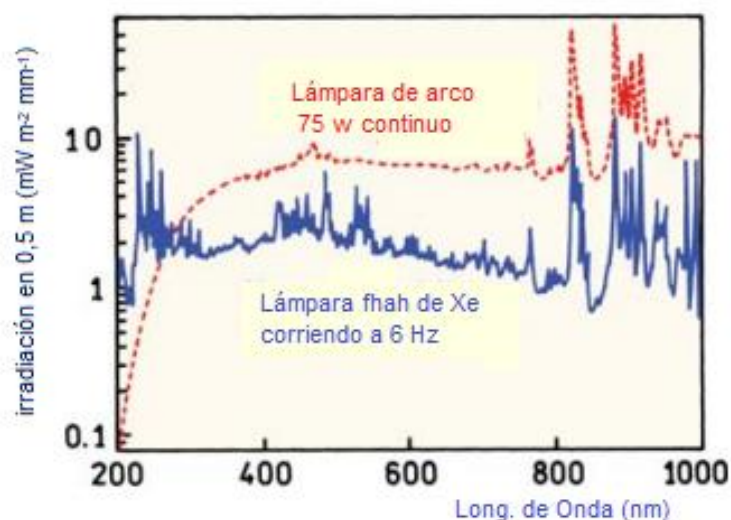


Figura 2.10. Espectro de salida de una lámpara de arco continuo de Xenón y flash de Xenón (Lakowicz 2006).

La emisión continua de radiación es el resultado de recombinación de electrones con átomos de Xe ionizados. Estos iones se generan mediante colisiones de los átomos de Xe con los electrones que fluyen a través del arco. La separación completa de los electrones de los átomos produce la emisión continua.

Muchas lámparas de Xe se clasifican como libres de ozono, lo que significa que su funcionamiento no genera ozono en el aire circundante. La envoltura de cuarzo utilizada en tales lámparas no transmite luz con longitudes de onda menores a 250 nm, y la salida de dichas lámparas disminuye rápidamente al disminuir la longitud de onda.

Las fuentes de alimentación de las lámparas de arco de Xe generan 25 amperios a 20 voltios, para una típica lámpara de 450 vatios (Ashutosh and Stephen G, 1999).

2.1.7.2. Filtros ópticos

Se emplean para compensar el comportamiento no ideal de los monocromadores con el fin de maximizar las propiedades espectrales del fluoróforo y alcanzar alta sensibilidad.

Los filtros de paso de banda brindan la posibilidad de emisión desde el propio filtro cuando se iluminan con luz UV, y pueden ser dispersados por la muestra. Por esta razón, generalmente es preferible ubicar el filtro a cierta distancia de la muestra, en lugar de hacerlo directamente contra la muestra.

Los filtros de vidrio son altamente versátiles, efectivos y económicos. Algunos filtros de color se denominan *filtros de paso largo*, transmiten todas las longitudes de onda por encima de alguna longitud de onda en particular.

Los filtros de excitación y emisión se pueden usar en todos los experimentos, incluso en los que usan monocromadores, para reducir la posibilidad de que las longitudes de onda no deseadas corrompan los datos que se pretenden obtener.

No es práctico adquirir específicamente un filtro para cada aplicación, por lo que una alternativa es utilizar una combinación de filtros para obtener las especificaciones deseadas.

2.1.7.3. Tubos fotomultiplicadores

La mayoría de los espectrofluorímetros hacen uso de los tubos fotomultiplicadores (PMT, Figura 2.11), que responden a fotones individuales, y los pulsos pueden detectarse como una señal promedio o contarse como fuentes individuales. Consisten en tubos que contienen un fotocátodo y una serie de dínodos que constituyen las etapas de amplificación.

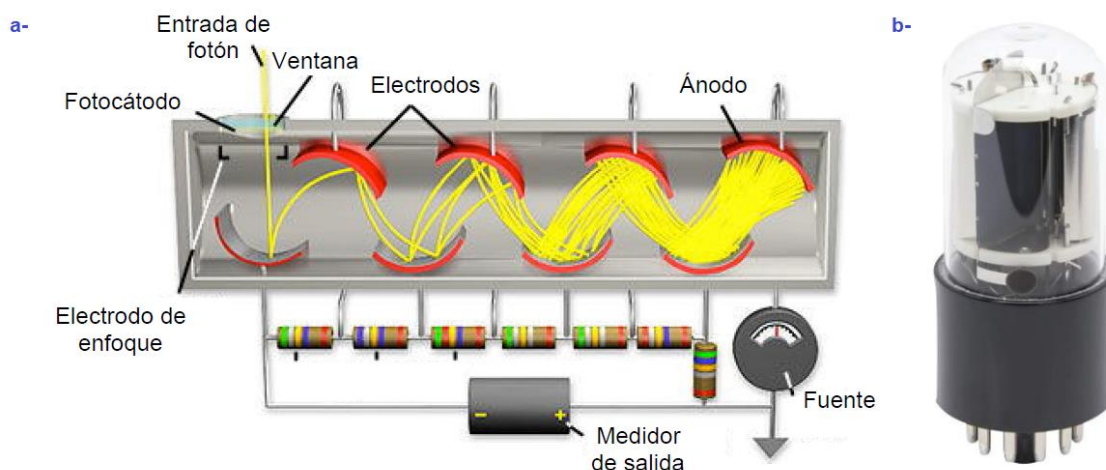


Figura 2.11. a- Diagrama de un tubo fotomultiplicador y cadena de dínodos. b-Tubo fotomultiplicador de 185 a 850 nm (Lakowicz 2006).

Las respuestas no lineales surgen como resultado de alta intensidad, y esto se da por la limitada capacidad de transmisión de corriente. La respuesta lineal requiere que los voltajes del dínodo permanezcan constantes, independientemente del nivel de radiación incidente y la corriente del ánodo. Las cadenas de dínodos están diseñadas de modo que la corriente total a través de la cadena sea al menos 100 veces mayor que la corriente máxima de ánodo.

La amplificación realizada por un PMT requiere un control cuidadoso de la alta tensión. Un PMT típico producirá un aumento triple en la ganancia por cada 100 voltios. Por lo tanto, un pequeño cambio en el voltaje puede resultar en un cambio significativo en la señal. El suministro de alto voltaje debe proporcionar un voltaje constante y sin ondulaciones que sea estable durante largos períodos de tiempo.

2.2 Análisis Multivariado

La “*Quimiometría*” conforma un patrón de estudio que tuvo sus inicios en el año 1969, siendo una disciplina química que reúne a la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar y seleccionar los procedimientos experimentales adecuados para extraer la información más relevante para el análisis de señales analíticas y datos más o menos complejos en información (Kroonenberg, 2008).

Es una técnica que envuelve el análisis simultáneo de más de una variable a la vez, conocido como análisis multivariado (Kumar and Kumar, 2013). Se inicia con el conocimiento químico del problema (“el primer principio”), para el cual se plantea una hipótesis del problema observado. Para evaluar la hipótesis planteada y por tanto verificar su validez, es necesario de datos experimentales (“observables”). Por lo que es necesario saber qué experimentos realizar para obtener dichos valores experimentales, por lo cual la quimiometría evalúa cómo y cuál experimento realizar con la ayuda de la matemática y de la estadística, conocido como “diseño experimental”.

Los experimentos generan datos, y la “quimiometría” procesa esos datos para obtener información que explique la hipótesis planteada, además de la aplicación de modelos que describan cómo el resultado de la medición (respuesta), se relaciona con las variables experimentales.

En la siguiente figura se esquematiza la metodología empleada en la quimiometría:

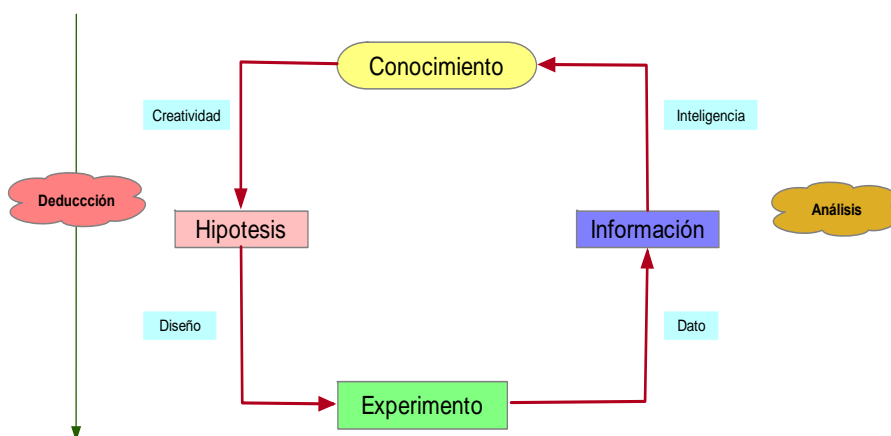


Figura 2.12. Diagrama de flujo del conocimiento

(Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, 1998).

Si la calidad del proceso de medida y por lo tanto de la calidad de los datos no resulta satisfactoria, la información obtenida quimiométricamente puede resultar incierta e incluso inducir a malas conclusiones. Es por ello que muchos autores proponen una división de la Quimiometría en tres grandes áreas generales: (1) optimización de los procedimientos experimentales y mediciones químicas; (2) extracción de la máxima

información química de los datos analíticos; y (3) calibración-validación y significancia de las mediciones analíticas.

En el contexto de la tercera área definida dentro de la quimiometría, es necesario distinguir dos tipos de calibraciones: *calibración instrumental* y *calibración metodológica*. Estas prácticas son claves en la trazabilidad química. Se entiende por “Calibración” en quimiometría a la relación lineal entre las variables de un modelo con los datos experimentales bajo ciertas condiciones.

Calibración Instrumental: es la seguridad que tiene un analista de que un instrumento y/o aparato funciona correctamente. El objetivo perseguido al realizar esta operación es corregir la respuesta instrumental hasta que la misma alcance el valor considerado como verdadero correspondiente al patrón de comparación empleado (Olivieri and Goicoechea, 2007; Olivieri and Escandar, 2014).

Calibración Metodológica: consiste en caracterizar la señal que proporciona un instrumento en función de las propiedades de un analito o de un grupo de ellos. Se busca establecer una relación inequívoca entre la señal instrumental y la concentración del analito en estudio.

Los datos obtenidos están en función de la respuesta instrumental empleada para obtenerlo, por ejemplo, para una simple muestra pueden obtenerse una sola medida como respuesta (escalar), lo cual constituye un dato “univariado”. En contraste, datos múltiples registrados para una sola muestra se conoce como “multivariado”. Si los datos pueden organizarse de manera significativa en un objeto matemático con al menos dos formas diferentes, o cuando los datos para un conjunto de muestras se ordenan en al menos una matriz de tres vías, pertenecen a la clase de datos multivariado (Muñoz de la Peña *et al.*, 2015).

La relación entre datos univariados, multivariados y de múltiples vías se ilustra gráficamente:

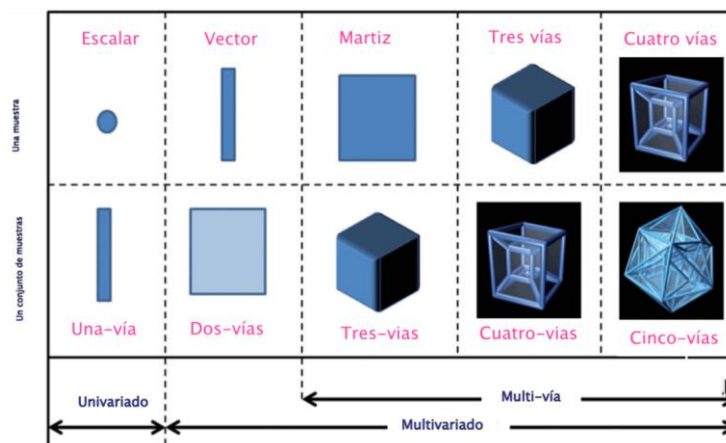


Figura 2.13. Ilustración de las formas que pueden tomar los datos para una simple muestra y para un conjunto de muestras (Olivieri, 2012).

La medición y el procesamiento de datos de múltiples vías brindan a los químicos analíticos una serie de ventajas: (1) sensibilidad mejorada, derivada del promedio de ruido de mediciones múltiples de datos redundantes, (2) mayor selectividad, porque cada nuevo modo de datos proporciona un grado adicional de parcial selectividad, y (3) modelado de la contribución del analito y su determinación cuantitativa en presencia de interferencias desconocidos, ausentes en las muestras de calibración.

Esta última es quizás la contribución más relevante de la investigación de datos de múltiples vías a la química analítica, implica que luego de registrar datos de múltiples vías para muestras de analito puro, es posible determinar su concentración en cualquier muestra futura, sin tener en cuenta qué tan compleja sea su composición, o cuántas interferencias potenciales contenga.

2.2.1 Nomenclatura de los datos

En la estructura de los datos mostrado en la figura 2.13, un escalar es un objeto cuyo orden es cero, un vector es de primer orden, una matriz es de segundo orden, etc. A su vez, las mediciones univariadas para varias muestras se pueden agrupar para formar un vector, los datos de primer orden se pueden colocar uno al lado del otro para crear una matriz, etc. Sobre esta base, se ha desarrollado una nomenclatura alternativa, en la que se nombran las calibraciones de acuerdo con el número de formas (modos), de

una matriz para un conjunto de muestras. Por lo tanto, la calibración de orden cero también es una calibración de una vía, el primer orden es de dos vías, el segundo orden es de tres vías, etc., y es habitual nombrar todas las metodologías de calibración que involucran datos de segundo orden y de orden superior como calibración de múltiples vías, que es, por lo tanto, una subdivisión de la calibración multivariada.

2.2.2 Calibración multivía o multivariado

Se basa en la obtención de muchas señales instrumentales por muestra, que pueden organizarse de manera significativa en un determinado objeto matemático con más modos que un vector, como por ejemplo una tabla de datos o una matriz. (Smilde, Bro and Geladi, 2004).

Con los datos contenidos en las EEMs, es posible predecir las concentraciones de analito en cualquier muestra incognita, habiendo calibrado previamente con estándares de analito puro. Esta es la manifestación experimental principal ofrecida por la calibración de múltiples vías. Además, es posible cuantificar analitos en presencia de interferentes, lo cual convierte a la calibración de múltiples vías en una herramienta inmensamente poderosa, comparado con las calibraciones basadas en datos univariados o vectoriales. Por otra parte, en la calibración multivía se observa un aumento de la sensibilidad, porque la medición de datos redundantes tiende a disminuir el impacto relativo del ruido en la señal. La selectividad también aumenta, porque cada nuevo modo instrumental que se agrega a los datos contribuye positivamente a la selectividad general. Otra ventaja es la posibilidad de obtener una interpretación cualitativa de los fenómenos químicos a través del estudio de los datos de múltiples vías, de una manera mucho mejor que con los datos univariados o de primer orden.

Considerando una muestra que contiene un solo componente analito de interés, registrando la señal empleando un espectrofluorímetro que mida el espectro de emisión en longitudes de onda j , fijando la longitud de onda de excitación en cada uno de los diferentes valores de k , entonces idealmente (en ausencia de ruido instrumental), se

puede expresar el valor de la señal x_{jk} en la longitud de onda de emisión j , y la longitud de onda de excitación k proporcional al producto de dos parámetros; la eficiencia cuántica en la longitud de onda j y el coeficiente de extinción en la longitud de onda k . Para simplificar, se incluye a la constante de proporcionalidad (concentración del constituyente, parámetros instrumentales), en uno de estos factores, por lo que se puede expresar la señal como el producto de dos parámetros, uno que depende de j (b_j) y otro que depende de k (c_k):

$$x_{jk} = b_j c_k \quad \text{Ec. 2.11}$$

Una forma compacta de escribir la Ecuación (2.11), para todos los valores de j y k es empleando la notación matricial y vectorial. Es posible describir toda la matriz de datos X (cuyo elemento genérico es x_{jk}), como el producto de dos vectores, uno que describe el comportamiento de emisión (b), y otro que describe el comportamiento de excitación (c) para un único constituyente (Figura 2.14):

$$X = b c^T \quad \text{Ec. 2.12}$$

Donde X es una matriz de datos, de tamaño $J \times K$, tomando J filas y K columnas, b resulta un vector columna con J filas ($J \times 1$), y c corresponde al vector columna con K filas ($K \times 1$).

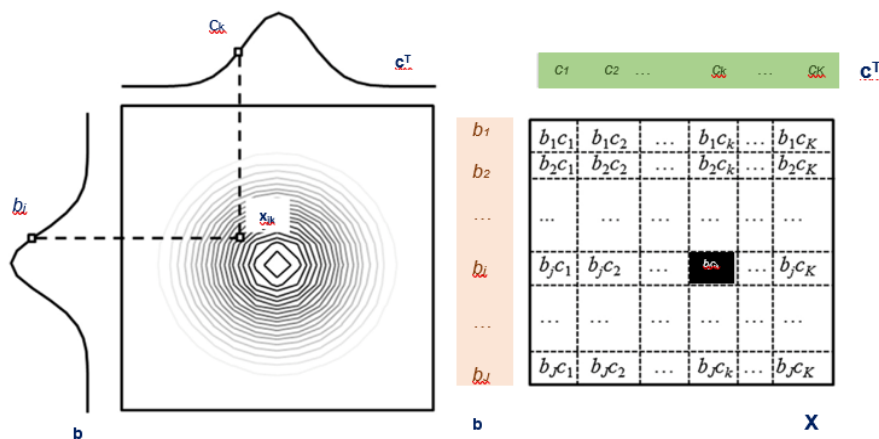


Figura 2.14. Representación de una matriz de datos bilineales. A la izquierda, gráfico de contorno que muestra el perfil que está en cada modo de datos y un elemento de matriz genérico. A la derecha, cada perfil se representa como un vector, y un elemento de la matriz se obtiene como el producto de los elementos del perfil (rectángulo negro) (Olivieri and Escandar, 2014).

La bilinealidad se puede representar mediante la proyección de la superficie o el paisaje correspondiente en un plano. Supongamos que X corresponde a una matriz de datos de emisión-excitación: se representa la intensidad de cada punto en función de la longitud de onda de emisión y la longitud de onda de excitación, luego se proyecta la superficie sobre el plano formado por el eje de intensidad (ordenada), y el eje de longitud de onda de emisión (eje de las abscisas). El resultado se muestra en la Figura 2.15. La proyección produce una serie de gráficos de diferente altura, de formas idénticas, que pueden verificarse escalando cada perfil de modo que su máximo sea uno para todos los gráficos, es decir, dividiendo los perfiles por su valor máximo. Esto proporciona perfiles de proyecciones idénticos, independientemente del valor de la longitud de onda de excitación a la que se tomó cada perfil. Lo mismo ocurre si se proyecta el paisaje en el plano formado por el eje de intensidad y el eje de longitud de onda de excitación. Este resultado es característico de los datos bilineales.

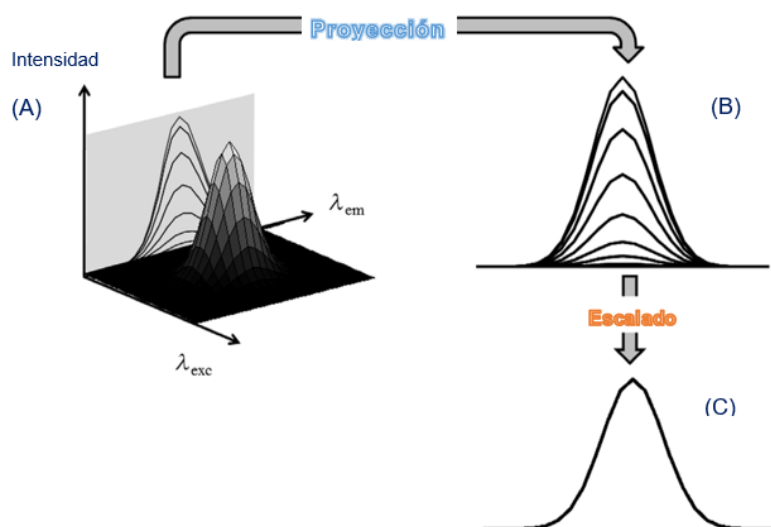


Figura 2.15. (A) Diagrama de superficie de una matriz bilineal de datos de fluorescencia de emisión. (B) Proyección de la superficie en el plano formado por el eje de intensidad y el eje longitud de onda de emisión (plano gris). (C) Escalado de cada uno de los perfiles proyectados (Olivieri and Escandar, 2014).

La parte modelada de X es lineal en a_{in} (para b_{jn} fijo), y lineal en b_{jn} (para a_{in} fijo), de la Ecuación 2.11, por lo tanto, se define como un modelo bilineal. Es posible realizar diferentes interpretaciones de esta ecuación: en el análisis de componentes principales, por ejemplo, a_{in} y b_{jn} no son concentraciones verdaderas o coeficientes de extinción, sino combinaciones abstractas de ellas.

Si la muestra contiene más de un constituyente de interés es necesario considerar perfiles adicionales para cada constituyente adicional en cada modo de datos, a fin de describir sus propiedades correspondientes a lo largo de estos modos. Asumiendo que la señal medida total es la suma de las contribuciones individuales de cada constituyente, una forma matemática simple de expresar la aditividad de la señal, la bilinealidad de la matriz de datos X , expresando sus elementos es por medio de la siguiente ecuación:

$$x_{ij} = b_{j1}c_{k1} + b_{j2}c_{k2} + \dots + b_{jn}c_{kn} = \sum_{n=1}^N b_{jn}c_{kn} \quad \text{Ec. 2.13}$$

Donde N corresponde al número total de constituyentes. Esta ecuación puede escribirse de manera compacta empleando notación matricial:

$$X = B C^T \quad \text{Ec. 2.14}$$

Donde B es una matriz de N -columna ($J \times N$), que contiene los N perfiles en uno de los modos de datos, y C es una matriz de N -filas ($K \times N$), que contiene los perfiles N en el otro modo Figura (2.16)

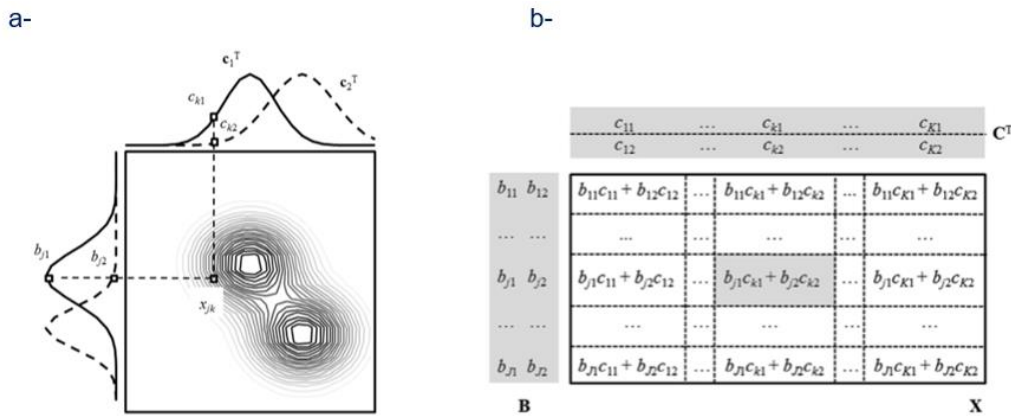


Figura 2.16. a- Matriz de datos bilineal para dos constituyentes químicos. Cada perfil está representado como un vector. b- Representación detallada para una matriz de datos con dos constituyentes. (Olivieri and Escandar, 2014).

La clave de la bilinealidad de X en la Ecuación 2.13 es que el número de columnas de B y C sean iguales al número de constituyentes sensibles (medibles), presentes en el sistema para el que se midió X . Cualquier matriz de datos se puede descomponer en el producto de dos matrices. Para matrices no bilineales, sin embargo, el número de

columnas de B y C puede exceder en gran medida el número de constituyentes químicos.

El concepto que condensa adecuadamente la discusión anterior es el *rango de una matriz*, que se define como el número de términos bilineales necesarios para reproducir la matriz de datos. Si el rango está cerca al número de constituyentes sensibles, la matriz es bilineal, de lo contrario no es bilineal. Por lo tanto, la expresión correcta para bilineal es "*bilineal de bajo rango*".

Es posible construir una matriz de datos de tres vías uniando varias matrices de datos de un grupo de muestras, tales matrices son de tamaño $J \times K$ para una muestra, ordenados en un objeto de tamaño $I \times J \times K$. Dos modos de datos corresponden a los modos de medición instrumental de cada matriz de datos, mientras que el tercer modo es el modo de muestra (Figura 2.17).

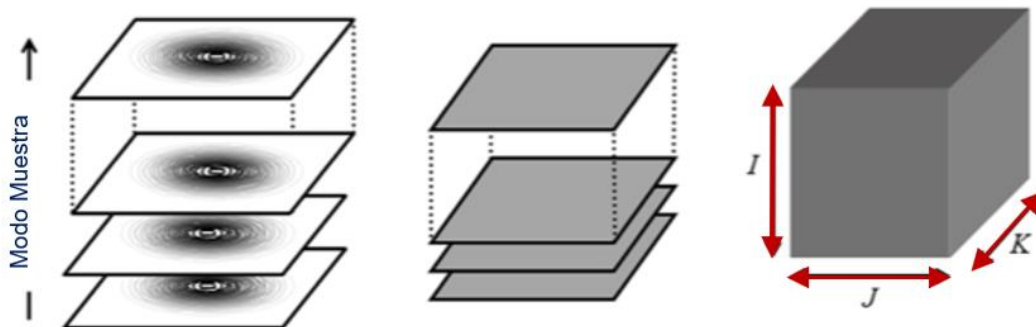


Figura 2.17. Una matriz de tres vías obtenida al apilar matrices de datos en el modo de muestra, mostrando el número de puntos de datos en cada modo (matriz izquierda) (Olivieri and Escandar, 2014).

Las condiciones que debe cumplir esta matriz para que sea trilineal es análoga a la de una matriz bilineal: una matriz de datos de tres vías \mathbf{X} , construida para un solo constituyente es trilineal si sus elementos están dados por la siguiente expresión (se indica la matriz de tres vías por \mathbf{x} usando ambas negritas y cursiva):

$$\mathbf{x}_{ijk} = a_i b_j c_k \quad \text{Ec. 2.15}$$

Para una mezcla de N constituyentes que genere señales trilineales, la expresión general viene dada por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{x}_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} \quad \text{Ec. 2.16}$$

donde a_{in} representa un elemento del perfil en el modo de muestra, es decir, el valor de este perfil para el constituyente n en la muestra i , y b_{jn} y c_{kn} representan los valores correspondientes del n constituyente en los perfiles b y c .

La ecuación 2.15 implica que N debería ser lo más cercano al número de constituyentes en una mezcla (idealmente igual “ a ”). Dado que las matrices de tres vías siempre se pueden descomponer en sumas de términos trilineales, la expresión correcta sería “*trilineal de bajo rango*” en lugar de trilineal, aunque es común expresarlo como trilineal.

Los datos trilineales generalmente constituyen una matriz de tres vías, donde las columnas y filas de la matriz bidireccional corresponden a secciones verticales y horizontales, como se puede apreciar en la Figura 2.18.

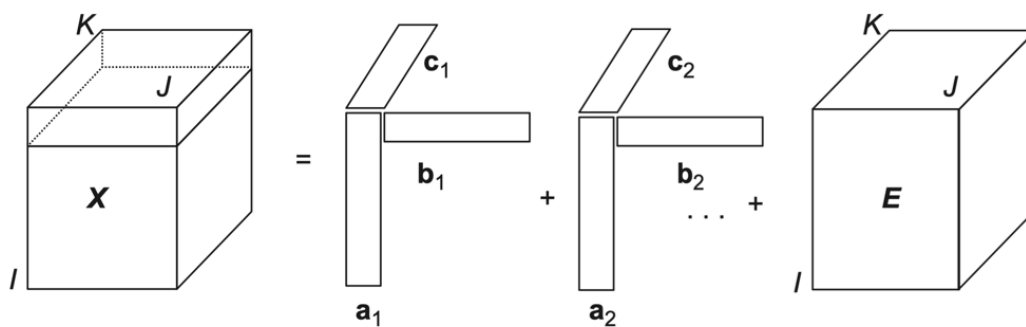


Figura 2.18. Conjunto de tres vías con estructura trilineal. La división horizontal representa una matriz de datos de segundo orden obtenida al medir una muestra. (Olivieri and Escandar, 2014).

Los arreglos de tres vías ajustados a la Ecuación 2.15, en general brindan soluciones únicas, lo que implica que las concentraciones de los componentes pueden estimarse independientemente del número y la naturaleza de otros constituyentes de la muestra, que es la base de lo que se conoce como “ventaja de segundo orden” (Alejandro C Olivieri, 2005).

Comprender las propiedades y estructura de los datos es un paso importante para la calibración de múltiples vías, ya que la correcta identificación del tipo de datos permite realizar una correcta elección del algoritmo de calibración a utilizar.

2.2.3 Pretratamiento de datos trilineales o de tres vías

El paso inicial más importante es la adecuación o pre-tratamiento de los datos de las señales medidas, por medio de la aplicación de métodos matemáticos con el fin de reducir o eliminar la fuente de variabilidad en la señal de naturaleza aleatoria, como el ruido (Mújica-Ascencio *et al.*, 2010).

Una vez eliminada la fuente de variabilidad, la estructura específica de datos es de gran importancia ya que inciden en el algoritmo de procesamiento de datos que se aplicará.

Los datos obtenidos a partir de lectura de fluorescencia son clasificados como trilineales, correspondiente a la categoría de datos de segundo orden.

A diferencia de la señal del analito que es trilineal, todos los fenómenos de dispersión no son trilineales, por lo que constituyen una fuente de error, ya que el análisis de señales no trilineales es considerablemente dificultoso de procesar. Existen varios procedimientos para eliminar estas dispersiones de las señales de interés como ser:

- 1) Eliminarlas digitalmente mediante el procesamiento previo de los datos de la EEM empleando algoritmos adecuados.
- 2) Modelarlos por separado con un modelo no lineal.
- 3) Reemplazando los valores de dispersión de Rayleigh por ceros o por los llamados valores "faltantes".
- 4) Restando los datos EEM de blanco de muestra.
- 5) Restringiendo los rangos de excitación espectrales para que las señales de dispersión no contribuyan a la señal general, ya sea durante la recolección de datos experimentales o mediante la manipulación digital posterior. En este último caso, existen softwares que permitirán que se realice una acción digital después de que se hayan medido los datos de la EEM, de modo que se puedan realizar pequeños ajustes sobre aquellas regiones espectrales indeseadas sin necesidad de volver a registrar los datos.

Las tres primeras alternativas mencionadas anteriormente requieren software adicional. No se recomienda la sustracción del blanco, principalmente porque la dispersión en condiciones de onda de excitación y emisión iguales es en general difícilmente reproducible.

El último recurso es empleado en la mayoría de los trabajos de la literatura actual, por brindar resultados satisfactorios, a menos que la emisión de la fluorescencia se superponga fuertemente con las señales de dispersión.

Actualmente existen algoritmos adecuados para analizar datos de segundo orden, como el análisis factorial paralelo (PARAFAC), el método de aniquilación de rango generalizado (GRAM), la descomposición trilineal directa (DTLD), los mínimos cuadrados de resolución de curva multivariada (MCR-ALS), mínimos cuadrados bilineales (BLLS), y descomposición trilineal alterna (ATLD), y sus variantes (descomposición trilineal alterna ponderada de forma automática (SWATLD) y penalización por descomposición trilineal (APTLD). Estos algoritmos son de primordial importancia para el análisis de mezclas complejas, porque logran cumplir con la ventaja de segundo orden (Yu *et al.*, 2011).

Una alternativa al trabajo con datos de segundo orden es reorganizarlos en vectores y el procesamiento por medio de un algoritmo de primer orden, lo que lleva a una regresión de componente principal desplegada (U-PCR), y mínimos cuadrados parciales desplegados (U-PLS). Estos enfoques se utilizaron por primera vez para tratar los datos de segundo orden, antes de que se desarrollaran verdaderos métodos de segundo orden. Una alternativa prometedora son los mínimos cuadrados parciales de varias vías (N-PLS), que es un método real de múltiples vías. Sin embargo, estos últimos métodos no contemplan la ventaja de segundo orden, a menos que estén acoplados a un procedimiento separado conocido como bilinealización residual (RBL). El método U-PLS / RBL es, por lo tanto, un método que disfruta de todas las capacidades de las metodologías de factores latentes, pero que preserva la importante ventaja de segundo orden.

En términos generales, se pueden concebir dos formas alternativas para lograr una ventaja de segundo orden:

- La calibración se realiza junto a los datos de la muestra de prueba, que influyen en los coeficientes de regresión que conducen a la predicción, Figura 2.19 A.
- La calibración se realiza primero utilizando sólo datos de entrenamiento, con la muestra de la prueba que conduce a los coeficientes de regresión específicos de la muestra en un paso posterior, Figura 2.19 B.

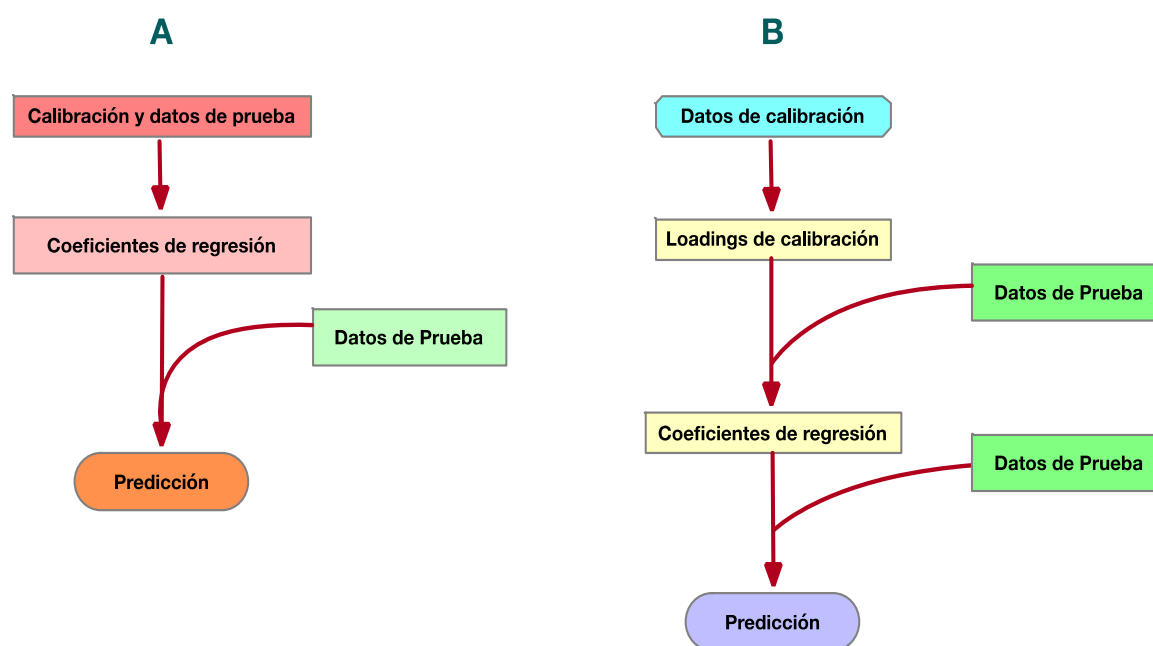


Figura 2.19. Dos modos básicos de obtener la ventaja de segundo orden de la información de orden superior: (A) combinar datos de la muestra de calibración y de prueba antes de calcular los coeficientes de regresión; y, (B) estimar las cargas a partir de los datos de calibración solamente, y luego calcular los coeficientes de regresión después de que la muestra de prueba ingrese a la escena (Pieter M. Kroonenberg).

En cada caso, la filosofía subyacente implica que la muestra de prueba se convierte en parte de todo el proceso de calibración.

La primera fase de cualquier procedimiento de calibración es la producción experimental de un conjunto adecuado de muestras para alcanzar el objetivo de “calibrar”. En la calibración univariada, por ejemplo, un conjunto de calibración típico se compone de al menos cinco muestras triplicadas del analito que se determina, con concentraciones igualmente espaciadas dentro de un rango lineal adecuado.

En la calibración multivariada de primer orden, se puede determinar más de un analito, y las posibles sustancias interferentes deben estar presentes en la fase de calibración, para poder ser modeladas y tenidas en cuenta al predecir las concentraciones de analito en las muestras de prueba.

En la calibración de múltiples vías, la determinación del analito en muestras complejas no requiere la presencia de posibles interferentes en el conjunto de calibración, gracias a la potencia de la ventaja de segundo orden. Por lo que resulta suficiente preparar un conjunto de muestras de calibración que contenga mezclas de los analitos que se determinarán, con el tamaño del conjunto de calibración en función del número de analitos de interés, para lo cual se recurre al diseño experimental.

Cuando el número de analitos es pequeño (es decir, menos de cuatro o cinco), un buen diseño de calibración que se emplea con frecuencia, es el denominado diseño central compuesto. Consiste en: (1) un diseño factorial completo de dos niveles, es decir, todas las combinaciones posibles de dos concentraciones diferentes de los analitos; (2) un punto central, que contiene todos los analitos en concentraciones, expresada como la media del rango de calibración; (3) una serie de puntos estelares, que combinan concentraciones extremas de analito.

2.2.4 Nomenclatura para las muestras y los constituyentes

Es importante definir diferentes categorías de nomenclatura para evitar confusión en la etapa experimental como en la etapa de adquisición y procesamiento: las correspondientes a muestras y constituyentes.

Como constituyentes se consideran a aquellos componentes que generan señales, esto incluye a los analitos de interés y otros que pudieran estar presentes. La presencia de un constituyente específico depende del tipo de muestra que se analiza.

Las muestras se pueden dividir en: 1) Calibración o entrenamiento, 2) Validación, 3) Prueba, 4) Aplicación a muestra real.

Las muestras de *calibración* se emplean para establecer la relación entre las concentraciones de analito conocidas y las señales instrumentales recopiladas.

Las muestras de *validación* son empleadas generalmente para verificar el rendimiento analítico de la calibración en condiciones controladas, por lo cual se disponen de los valores de concentración del analito. Estas muestras deben tener una composición química cuantitativamente similar a las muestras de calibración, aunque las concentraciones de analito deben ser diferentes y preferiblemente, deben proporcionar valores seleccionados al azar dentro del rango de calibración correspondiente para cada una de ellas.

Las muestras de *prueba* pueden contener componentes adicionales a los presentes en la calibración y validación, y se emplean en la calibración de múltiples vías para evaluar la capacidad para distinguir la presencia de estos compuestos extraños.

Finalmente, siempre es deseable tener un conjunto de *muestras reales*, cuya composición se espera que sea similar a las muestras de prueba, y para las cuales las concentraciones de analito no son conocidas, por lo que se desean determinar. La exactitud y la precisión de las determinaciones del conjunto real son comparadas con los resultados de la técnica de referencia.

Es posible realizar una distinción entre los componentes presentes en la *calibración* y la *validación*, de aquellos que sólo están presentes en las *muestras reales* y de *prueba*. Los primeros pueden llamarse "esperados", porque el analista debe incluir en el conjunto de calibración los componentes que se espera que estén presentes en las muestras futuras. En principio, los constituyentes esperados podrían dividirse en "calibrados" y "no calibrados": los calibrados se refieren a los constituyentes para los cuales están disponibles las concentraciones de calibración, mientras que no calibrados se refieren a los constituyentes presentes en la fase de medición de las señales instrumentales durante la fase de calibración, pero para los cuales no hay información de concentración disponible. Otros constituyentes presentes en las pruebas y muestras reales, se

denominan "inesperados" y siempre tienen el potencial de interferir en el análisis, lo cual puede o no ser perjudicial para la muestra.

Por definición 'interferencia' es cualquier sustancia u objeto que genere un error sistemático en la determinación del analito. En general, la interferencia será real o solo permanecerá como potencial, depende del tipo de señales instrumentales medidas y de la metodología de calibración empleada.

2.2.5 Modelo PARAFAC

El modelo de PARAFAC fue propuesto por Harshman y Carroll de manera independiente en 1970. Se destaca por su simplicidad y habilidad para el procesamiento de múltiples bases de datos, siendo empleado en quimiometría para el procesamiento de grandes cantidades de datos obtenidos mediante instrumentos cada vez más complejos.

El modelo PARAFAC aplicado a un conjunto de datos de 3-vías, conlleva a la descomposición de la señal en un conjunto de términos trilineales más un término de la suma de los cuadrados de los residuos, e_{ijk} , el cual se lo trata de minimizar. La expresión es la siguiente:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad \text{Ec. 2.17}$$

Donde el término x_{ijk} corresponde a la muestra i^n con la variable j^n en el modo 2 y con la variable k^n en el modo 3, y e_{ijk} es el residuo representando la variabilidad no explicada por el modelo. En el caso de matrices de fluorescencia EEM, i , j y k corresponden a la muestra, longitud de onda de emisión y excitación respectivamente.

La matriz del modelo trilineal resulta:

$$X_{...k} = A \text{diag}(c_{(k)}) B^T + E_{...k} \quad \text{Ec. 2.18}$$

Y el modelo también puede escribirse:

$$X = \sum_{n=1}^N a_n \otimes b_n \otimes c_n + E \quad \text{Ec. 2.19}$$

en donde \otimes indica el producto de Kronecker, N es el número total de componentes y E es una hiper matriz que contiene los residuos no ajustados por el modelo.

En resumen, PARAFAC es un modelo de análisis que descompone la matriz tridimensional de estudio X en componentes trilineales (triadas), obteniendo como resultado tres sub-matrices bidimensionales: 1) matrices de scores A (contiene todos los a_{if}); 2) matrices de loadings B (contiene todos los b_{if}); 3) matrices de loadings C (contiene todos los c_{fk}) (Bro, 1997). La primera lleva información sobre las concentraciones, mientras que los segundos proporcionan una visión cualitativa del comportamiento de los constituyentes en los modos de medición instrumental.

Recuperar los valores de las sub-matrices a_{if} , b_{if} y c_{kf} de X se conoce como descomposición, y se dice que la matriz de tres vías se descompone en las tres matrices A , B y C . Un algoritmo que realiza esta operación se conoce como algoritmo de descomposición trilineal (TLD). Matemáticamente el objetivo será encontrar el modelo trilineal que minimice la suma de los cuadrados de los residuales (SSE) (Escandar *et al.*, 2007; Olivieri and Escandar, 2014).

$$SSE = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K e_{ijk}^2 \quad \text{Ec. 2.20}$$

La principal ventaja del método reside en que presenta solución única. Esto se consigue mediante la optimización iterativa por mínimos cuadrados alternados (ALS). Además, al ser un método supervisado, se imponen condiciones para que la solución sea más fácil de interpretar o se ajuste mejor al modelo. En primer lugar, se deben inicializar las matrices B y C . Realizar una buena estimación de estas componentes ayuda a que el algoritmo de cálculo encuentre el mínimo absoluto de convergencia. Los métodos más comunes de obtener los valores iniciales son la Descomposición Trilineal o Métodos Generalizados de Anulación de Rango. Una vez realizada la estimación, se procede con el algoritmo iterativo:

-Estimación de A a partir de B y C . Estimación de B y C de la misma manera.

-Aplicación del criterio de convergencia. Este proceso debe repetirse hasta que se cumpla el criterio de convergencia. En general se establece parar cuando el porcentaje de falta de ajuste entre dos iteraciones no supere un cierto valor establecido.

Un punto crítico de este modelado es la correcta determinación del número de componentes del modelo. El método más utilizado para decidir este parámetro es el análisis de la “consistencia del modelo” o “core consistency”, propuesto por Rasmus Bro en 1998, consiste en comparar los resultados obtenidos con la matriz original. Este parámetro resulta muy útil para discernir si la solución alcanzada es válida o si el modelo ha resultado poco fiable e inestable (Andersen and Bro, 2003; Bro and Vidal, 2011).

La característica de que las soluciones de PARAFAC son únicas proporciona una de sus principales ventajas: permitiendo cuantificar analitos en muestras que contienen componentes inesperados (ventaja de segundo orden). La singularidad significa que existe una única solución para todos los parámetros a_{if} , b_{if} y c_{kf} cuando se descompone una matriz trilineal de tres vías con este algoritmo.

Las concentraciones de los componentes en una muestra incógnita se predicen luego de realizarse la regresión de los scores en A estimados por PARAFAC, en función de las concentraciones conocidas de las muestras de calibrado. Como el modelo usado para la predicción es un modelo de regresión lineal simple, se predice la concentración del analito de interés en la muestra, solo con el score de la muestra.

2.2.6 Modelado U-PLS/RBL

Es una poderosa herramienta para señales vectoriales por muestra, proporciona un procesamiento de datos multipunto con suficiente flexibilidad para enfrentar protocolos de calibración basados en datos complejos. Se complementa con bilinearización residual (RBL), que modela los residuos de U-PLS para la muestra de prueba como una suma de contribuciones bilineales de los componentes inesperados.

El algoritmo Cuadrados Mínimos Parciales Desdoblados contiene una etapa de calibración en donde se emplea información acerca de la concentración del analito, se utilizan las I muestras de calibración $X_{C,i}$ (de tamaño $J \times K$, donde J y K son los números de canales en cada dimensión) y las concentraciones de calibración $N_c \times 1$ (donde N_c es el número de muestras de calibración). Las matrices $X_{C,i}$ se vectorizan y se agrupan dentro de una matriz Z_X :

$$Z_X = [vec(X_{C,1}) | vec(X_{C,2}) | \dots | vec(X_{C,I})] \quad \text{Ec. 3.13}$$

donde ‘*vec*’ denota la operación de vectorización que convierte las matrices de $J \times K$ en vectores de $JK \times 1$. Con la matriz Z_X ($JK \times 1$), se calibra el modelo U-PLS convencional que provee dos clases de variables latentes: los loadings contenidos en la matriz P y los pesos de las cargas (weight loadings) contenidos en W , ambos de tamaño $JK \times A$, en donde A es el número de factores latentes. Además, se obtienen los coeficientes de regresión v ($A \times 1$). Las columnas de W son ortogonales, mientras que las de P no necesariamente lo son. Es importante aclarar que las columnas de W no son autovectores propiamente dichos, sino factores que dependen de las concentraciones de calibración del analito de interés y se llaman variables latentes (Öhman, Geladi and Wold, 1990; Bortolato, Arancibia and Escandar, 2007).

2.3 Bibliografía

- Andersen, C. M. and R. Bro. 2003. “Practical Aspects of PARAFAC Modeling of Fluorescence Excitation-Emission Data.” *Journal of Chemometrics* 17(4):200–215.
- Ashutosh, Sharma and Schulman Stephen G. 1999. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. Wiley interscience publication.
- Bortolato, Santiago A., Juan A. Arancibia, and Graciela M. Escandar. 2007. “Improvement of Residual Bilinearization by Particle Swarm Optimization for Achieving the Second-Order Advantage with Unfolded Partial Least-Squares.” *Journal of Chemometrics* 21:209–20.

- Bro, Rasmus. 1997. “PARAFAC. Tutorial and Applications.” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 38(2):149–71.
- Bro, Rasmus and Maider Vidal. 2011. “Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems EEMizer : Automated Modeling of FI Uorescence EEM Data.” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 106(1):86–92.
- Clarke, Ronald J. and Anna Oprysa. 2006. “Fluorescence and Light Scattering.” 81(5):705–7.
- Douglas, Skoog, Holler James, and Nieman Thomoty. 2001. *Principios de Analisis Instrumental 5ed - Skoog, Holler & Nieman - CD.*
- Escandar, Graciela M., Alejandro C. Olivieri, Nicholaas (Klaas) M. Faber, Héctor C. Goicoechea, Arsenio Muñoz de la Peña, and Ronei J. Poppi. 2007. “Second- and Third-Order Multivariate Calibration: Data, Algorithms and Applications.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26(7):752–65.
- Harvey, David. 2008. *Modern Analytical Chemistry.* McGraw-Hill Companies.
- Kroonenberg, Pieter M. 2008. “Applied Multiway Data Analysis.” 702.
- Kumar, Keshav and Ashok Kumar. 2013. “Analysis of Dilute Aqueous Multi FI Uorophoric Mixtures Using Excitation – Emission Matrix FI Uorescence (EEMF) and Total Synchronous FI Uorescence (TSF) Spectroscopy : A Comparative Evaluation.” 117:209–20.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Third Edit.
- Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. 1998. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics.*
- Mújica-Ascencio, C., E. Moreno-García, S. Stolik Isakina, and J. M. De La Rosa-Vázquez. 2010. “Fluorescence Spectroscopy and Chemometric Techniques to Identify Compounds in a Mixture.” *CONIELECOMP 2010 - 20th International Conference on Electronics Communications and Computers* (5):136–41.

- Muñoz de la Peña, Arsenio, Héctor C. Goicoechea, Graciela M. Escandar, and Alejandro C. Olivieri. 2015. *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*. Vol. 29. Elsevier.
- Noomnarm, Ulai and Robert M. Clegg. 2009. “Fluorescence Lifetimes: Fundamentals and Interpretations.” *Photosynthesis Research* 101(2–3):181–94.
- Öhman, Jerker, Paul Geladi, and Svante Wold. 1990. “Residual Bilinearization. Part 1: Theory and Algorithms.” *Journal of Chemometrics* 4(1):79–90.
- Olivieri, Alejandro C. 2005. “On a Versatile Second-Order Multivariate Calibration Method Based on Partial Least-Squares and Residual Bilinearization : Second-Order Advantage and Precision Properties.” (November):253–65.
- Olivieri, Alejandro C. 2012. “Analytical Methods Recent Advances in Analytical Calibration with Multi-Way Data.” 1876–86.
- Olivieri, Alejandro C. and Graciela M. Escandar. 2014. *Practical Three-Way Calibration*. Elsevier.
- Olivieri, Alejandro C. and Héctor C. Goicoechea. 2007. *La Calibración En La Química Analítica*.
- Smilde, A., R. Bro, and P. Geladi. 2004. *Multi-Way Analysis With*. edited by J. Wiley.
- Yu, Yong-jie, Hai-long Wu, Jin-fang Nie, Shu-rong Zhang, Shu-fang Li, Yuan-na Li, Shao-hua Zhu, and Ru-qin Yu. 2011. “Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems A Comparison of Several Trilinear Second-Order Calibration Algorithms.” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 106(1):93–107.

MATERIALES Y METODOS

Capítulo 3: Materiales y métodos

3.1 Muestreo

Uno de los principales objetivos de este trabajo de tesis es la propuesta de técnicas analíticas alternativas que permitan realizar un seguimiento de la degradación de contaminantes indicadores a lo largo de las etapas de una planta fabril. En este contexto, se decidió trabajar con una industria textil del medio que cuenta con un sector para el tratamiento de los efluentes generados, previo a su deposición en un cuerpo de agua receptor (laguna).

Todas las descargas líquidas luego de los procesos correspondientes al sector tintorería y terminación (acabado textil), son colectadas en una única pileta denominada “pileta Colectora”. De ésta, los líquidos son conducidos por medio de cañería a la pileta de contención, luego a una pileta de tratamiento y de ésta a la pileta de fitorremediación, para por último ser conducidos al cuerpo de agua receptor (Figura 3.1).

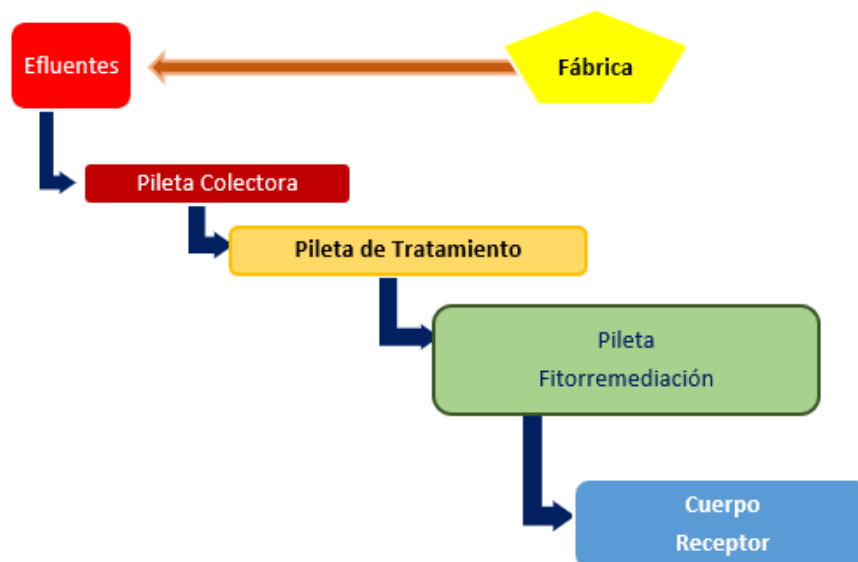


Figura 3.1. Diagrama de flujo del recorrido del efluente textil

Las características y dimensiones aproximadas correspondientes a cada pileta de esta planta industrial se describen a continuación:

Pileta Colectora: se halla ubicada inmediatamente a la salida de todos los procesos textiles. Es una pileta ecualizadora de dimensiones tales que compensa la composición del efluente antes de que sea conducida a la siguiente etapa. Las dimensiones se resumen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Dimensiones de la Pileta o Cámara Colectora	
Largo	4,64 m
Ancho	2,16 m
Profundidad	3,10 m
Área total	10,02 m ²
Volumen total	31,07 m ³

Los líquidos colectados en esta pileta, se homogenizan para aumentar la pérdida de temperatura; el tiempo de permanencia es de aproximadamente 2 horas, dependiendo del nivel de producción. Los sólidos macroscópicos (restos de fibras u otro material), se eliminan por medio de rejillas.

En esta instancia, una vez mezclados los líquidos se determina el pH, para luego realizar la corrección de pH aproximadamente a 9.

Pileta de Tratamiento: se lleva a cabo el tratamiento primario del efluente fabril. Las dimensiones se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Dimensiones de la Pileta de Estabilización	
Diámetro	23 m
Profundidad	1,00 m
Área total	903,21 m ²
Volumen total	415,50 m ³

El tiempo permanencia del efluente es de aproximadamente 16 horas, aquí se producen los procesos de sedimentación de las sustancias poco solubles presentes en el seno del efluente. La existencia de un sistema de tratamiento biológico facultativo favorece la degradación primaria de algunos compuestos como los tensioactivos y otros compuestos. Además, esta pileta se encuentra conectada a otra pileta de menores dimensiones que se utiliza para reacondicionamiento de pH previo a su paso hacia la pileta de fitorremediación.

Pileta de fitorremediación: las dimensiones se resumen en la Tabla 3.3.

Ancho	1,3 m
Profundidad	0,50 m
Largo	27 m
Volumen total	27,50 m ³

Es la pileta de mayor superficie, la cual se encuentra implantada con vegetales de la especie *Typas* (conocidas como totoras), que favorecen la degradación final de los poluentes presentes en las aguas residuales, en esta instancia se espera disminuir al máximo la carga de compuestos ajenos al medio ambiente que recibe los líquidos emanados por esta industria (Bonanno and Cirelli, 2017).

Las muestras se recolectaron de las siguientes secciones: (1) Pileta colectora de efluentes; (2) Pileta de tratamiento de efluentes; (3) Efluente final volcado al cuerpo receptor; (4) Cuerpo de agua receptor. Las tomas de muestras de efluentes empleadas para el estudio corresponden al período de los meses de marzo a julio del año 2019. Se obtuvo una muestra compuesta por semana, representativa de cada etapa señalada anteriormente.

(1) Pileta colectora de efluentes: cada muestra analizada fue obtenida al homogenizar 5 alícuotas de 500 mL, tomadas en el período de una jornada textil (24 h), utilizándose muestreador plástico, en el punto de control que se dispone a la salida de la pileta, obteniéndose de esta forma muestras representativas compensadas.

(2) Pileta de tratamiento de efluentes: cada muestra compuesta, obtenida al homogenizar 5 alícuotas tomadas en el período de una jornada textil, en distintos puntos, y en cada uno de ellos las profundidades de extracción fue desde la superficie hasta una profundidad de 30 cm. El volumen recolectado fue de 500 mL de líquido en cuatro puntos aleatorios de la pileta, se colocó en contenedor plástico de forma de obtener una muestra representativa de ese momento.

(3) Efluente emanado al cuerpo receptor: las muestras fueron también muestras compuestas, obtenidas luego de homogenizar 5 muestras tomadas en el período de una jornada textil. El volumen recolectando fue de 500 mL de líquido en la última cámara de inspección, inmediatamente previo a la descarga al cuerpo receptor.

(4) Cuerpo de agua receptor de la descarga de los efluentes fabriles. La muestra analizada corresponde a una muestra compuesta, la cual fue obtenida al homogenizar 4 sub-muestras tomadas en dos puntos de muestreo: a 1 y 3 metros del punto de descarga. Los resultados de las campañas realizadas se encuentran disponibles en el capítulo de resultados y discusión de esta tesis.

3.2 Espectrofluorimetría de tensioactivos

3.2.1 Instrumentos

Las determinaciones de la fluorescencia de los tensioactivos y de las muestras de efluentes se realizaron empleando un espectrofluorímetro FluoroMate FS-2, Marca Scinco, de SCINCO CO., LTD, Seoul, Korea (graficado en el capítulo 2, figura 2.9).

Las medidas de fluorescencia se realizaron a temperatura ambiente en una celda de cuarzo de 10 mm, siendo necesario un volumen de muestra de aproximadamente 2 mL.

La adquisición de datos se realizó a través de una PC conectada al equipo, con el software FluoroMaste Plus (versión 4.3 built 1).

3.2.2 Estudio de excitación-emisión de los tensioactivos de uso textil

La espectroscopía sincrónica es el escaneo tanto de longitudes de onda de excitación como longitudes de onda de emisión a un $\Delta\lambda$ constante, registrando la distribución de las intensidades sobre las longitudes de onda de emisión (o excitación), con el potencial de resolver espectros de diferentes componentes que, de lo contrario, permanecen sin resolver en la espectroscopía convencional, denominado por las siglas SFS(synchronous fuorescence spectroscopy),(Patra and Mishra, 2002; Carstea *et al.*, 2016).

Se realizó un barrido de fluorescencia sincrónica (SFS), con tensioactivos de uso textil, a una concentración de 1 µg/mL, con los siguientes parámetros del equipo (tabla 3.4).

<i>Longitud de onda de Excitación (nm)</i>	250 – 390
<i>Longitud de onda de Emisión (nm)</i>	252 -450
<i>Modo de escaneo</i>	Sincrónico
<i>Modo de los datos</i>	Fluorescencia.
<i>Delta (nm)</i>	2
<i>Rendija de Excitación (nm)</i>	1
<i>PMT (V)</i>	500
<i>Velocidad de escaneo (nm/min)</i>	300
<i>Tiempo de respuesta (s)</i>	0,1
<i>Tiempo de integración (ms)</i>	20

3.2.3 Condiciones instrumentales para la obtención de las EEMs

Las metodologías de fluorescencia son extensamente empleadas para el estudio de compuestos con riesgo medioambientales debido a su alta sensibilidad y selectividad (Carstea et al. 2016; Escandar* 2011).

Las condiciones instrumentales adecuadas para la detección y cuantificación de los tensioactivos en efluentes textil por :

- a- Determinación de las longitudes de onda máxima de emisión y de excitación para los tensioactivos de uso textil.
- b- Determinación de las condiciones óptimas de los parámetros del espectrofluorímetro para realizar las lecturas de las matrices excitación-emisión (EEMs), de los analitos estudiados.

Las condiciones óptimas del equipo se resumen en la siguiente tabla:

<i>Longitud de onda de Excitación (nm)</i>	250 – 300
<i>Longitud de onda de Emisión (nm)</i>	252 -450
<i>Intervalo de Excitación (nm)</i>	1
<i>Intervalo de Emisión (nm)</i>	1
<i>Rendija de Excitación (nm)</i>	2,5
<i>Rendija de Emisión (nm)</i>	2,5
<i>PMT (V)</i>	500
<i>Velocidad de escaneo (nm/s)</i>	300
<i>Tiempo de respuesta (s)</i>	0,1
<i>Tiempo de integración (ms)</i>	20

3.2.4 Reactivos

De acuerdo a la composición química de cada tensioactivo proporcionado por el distribuidor, se adquirieron los principios activos que se emplearon como estándar para la instancia de calibración: APEO, ADBS y AGFE, los que se detallan a continuación.

3.2.3.1. APEO

Alquil nonilfenol etoxilado. Obtenido del laboratorio Tecnolab (Buenos Aires, Argentina).

Solución al 98 %, $\delta = 1,0554 \text{ g/cm}^3$. Tensioactivo no iónico.

- Pictograma: 

- CAS: 104-35-8.

- Líquido incoloro, amarillo claro, algo viscoso.

- Formula química: $\text{C}_{17} \text{H}_{28} \text{O}_2$.

- Peso Molecular: 264,403 g/mol.

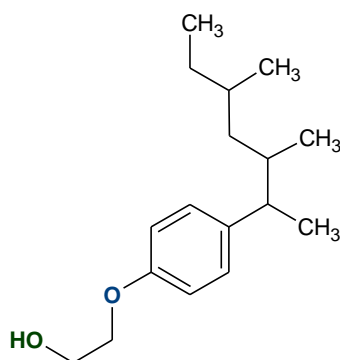


Figura 3.2. Fórmula química del Nonenilfenoletoxilado (APEO).

3.2.3.2.AGFE

Alcohol graso 2-fenoxietoxilado, obtenido de Sanyo Color S.A. (Buenos Aires, Argentina). Solución al 98 %, $\delta = 1,075 \text{ g/cm}^3$. Tensioactivo anfótero.

- Pictograma:
- CAS: -----
- Líquido transparente.
- Formula química: -----
- Peso Molecular: -----

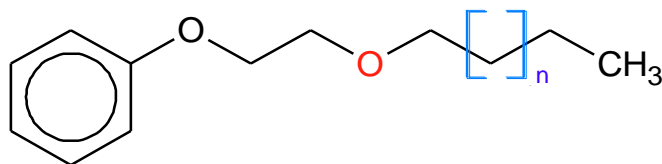


Figura 3.3. Fórmula química aproximada del alcohol graso 2-fenoxi-etoxilado (AGFE).

3.2.3.3.ADBS

Ácido Dodecilbencensulfónico, obtenido de Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Solución al 98 %, $\delta = 1,0420 \text{ g/cm}^3$. Tensioactivo aniónico.

- Pictograma:
- CAS: 121-65-3

- Líquido marrón oscuro.
- Formula química: C₁₈ H₃₀ O₃ S.
- Peso Molecular: 326,49 g/mol.

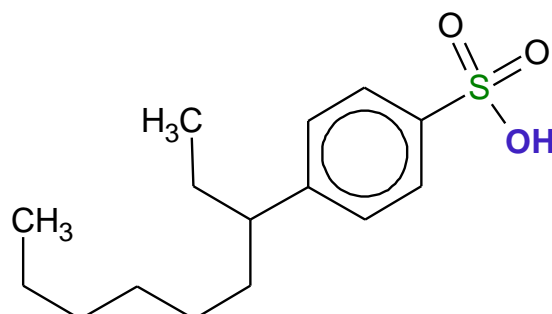


Figura 3.4. Fórmula química del ácido dodecilbencen sulfónico (ADBS).

3.2.5 Determinación del rango lineal

Para los tres tensioactivos fluorescentes se procedió a preparar soluciones estándares de cada uno de ellos, con el fin de determinar la linealidad en su respuesta según las condiciones instrumentales citada en la tabla 3.4. En la tabla 3.6 se presentan las concentraciones analizadas.

Tabla 3.6. Concentraciones de los estándares de los tensioactivos para la determinación del rango lineal de trabajo.

APEO (µg/mL)	ADBS (µg/mL)	AGFE (µg/mL)
0	0	0
106	104	101
211	202	202
528	505	505
739	750	707

3.3 Métodos de análisis multivariados

El análisis de datos multivariados debe seguir una secuencia de pasos, que se retroalimentan para la obtención de los resultados que permitan obtener información para la interpretación de un problema analítico, el enfoque general se resume esquemáticamente en la figura 3.5.

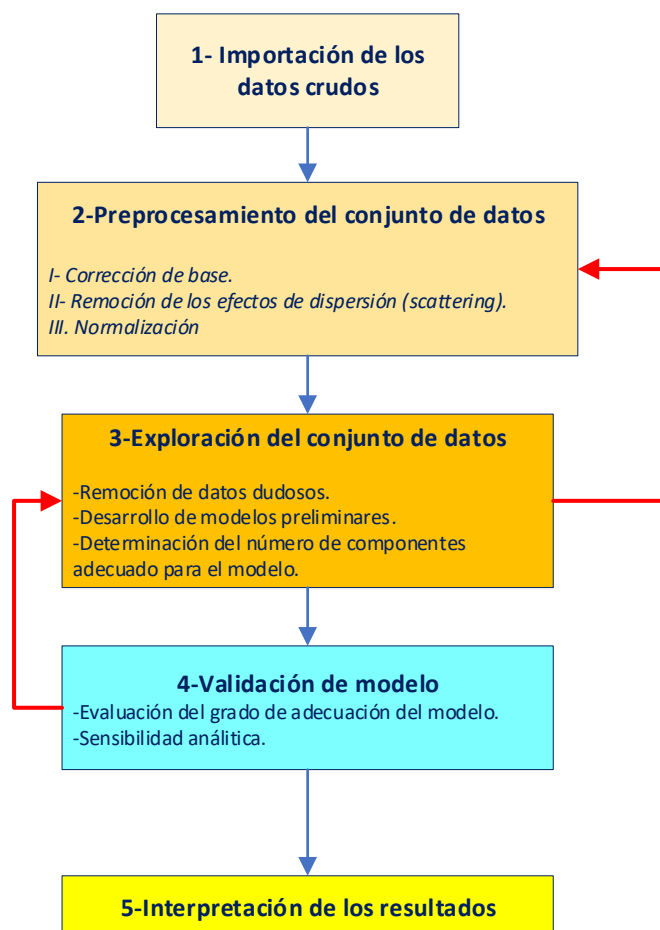


Figura 3.5. Esquema de los pasos a seguir en el análisis multivariado de los datos aplicado a EEMs (Murphy *et al.*, 2013a).

Los dos primeros pasos de la secuencia presentada en la figura 3.5, fueron aplicados en este trabajo de tesis para la adecuación del conjunto de datos (EEMs), que luego son empleados tanto para el modelado PARAFAC como para modelado U-PLS/RBL.

3.3.1 Diseño experimental

La modalidad de trabajo para las diferentes instancia se realizó siguiendo el diseño central compuesto (DCC), ya que permite la realización experimental secuencial (Leardi, 2009; Vera Candiotti *et al.*, 2014), para lo cual se empleando el software Design Expert 7 (licencia para estudiantes). En el siguiente esquema se presenta la distribución de los niveles de acuerdo a los factores con lo que se trabajó.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

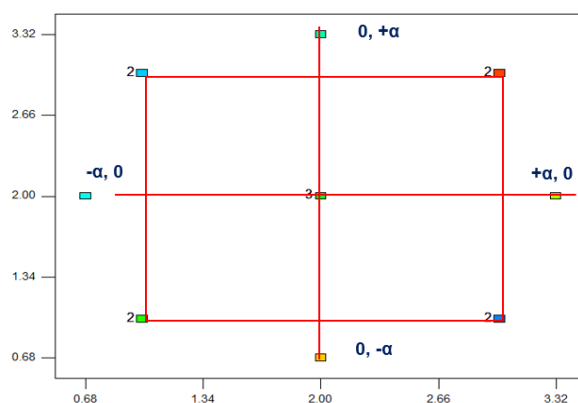


Figura 3.6. Diseño central compuesto de cinco factores para la mezcla ternaria de tensioactivos (en el gráfico se aprecia sólo para un par de analitos).

El número de muestras de calibración corresponde a una mezcla ternaria de los tensioactivos estándares. Los niveles de concentración se trabajaron dentro del rango lineal determinado. La composición de las muestras de calibrado se puede observar en la tabla 3.7:

Tabla 3.7. Listado de archivos de calibración y concentración nominal calculados por un DCC.			
Archivo	APEO (µg/mL)	ADBS (µg/mL)	AGFE (µg/mL)
Cal_1	63,32	62,52	64,50
Cal_2	21,11	62,52	64,50
Cal_3	63,32	62,52	21,50
Cal_4	69,66	41,68	43,00
Cal_5	42,22	41,68	70,95
Cal_6	14,78	41,68	43,00
Cal_7	42,22	14,59	43,00
Cal_8	21,11	62,52	21,50
Cal_9	21,11	20,84	21,50
Cal_10	63,32	20,84	21,50
Cal_11	42,22	41,68	15,05
Cal_12	21,11	20,84	64,50
Cal_13	42,22	41,68	43,00
Cal_14	42,22	68,77	43,00
Cal_15	63,32	20,84	64,50
Cal_16	14,78	14,59	15,05
Cal_17	63,32	0,00	0,00
Cal_18	0,00	62,52	0,00
Cal_19	0,00	0,00	64,50

Las concentraciones de las muestras de validación se presentan en la tabla 3.8, calculado empleando el diseño Central compuesto.

Tabla 3.8. Concentración de muestras de Validación calculadas por DCC.			
Muestra de Validación	APEO (µg/mL)	ADBS (µg/mL)	AGFE (µg/mL)
1	31,66	31,26	32,25
2	67,55	66,69	68,80
3	52,77	52,10	53,75
4	31,66	52,10	32,25
5	31,66	52,10	53,75
6	21,11	20,84	21,50
7	42,22	41,68	43,00
8	21,81	61,52	75,67
9	43,12	40,25	69,57
10	44,32	16,25	50,20
11	62,80	20,47	62,53

Las concentraciones de las muestras artificiales se presentan en la tabla 3.9, seleccionadas siguiendo un diseño al azar dentro del rango lineal determinado durante la calibración, al que se le agregó un interferente a una concentración final de 100 µg/mL. El interferente añadido es un posible compuesto presente en muestras de efluentes textil, proveniente del proceso de teñido, corresponde al colorante de blanco óptico (colorante de base estilbénica que presenta actividad fluorescente).

Tabla 3.9. Concentración de muestras artificiales con interferente (µg/mL)			
	APEO	ADBS	AGFE
1	32,32	62,52	34,5
2	14,50	68,77	23,0
3	15,22	14,59	13,0
4	5,55	20,84	22,25
5	15,66	41,68	27,0
6	22,77	62,52	35,05
7	31,32	66,69	33,50

3.3.2 Importación de datos

Los datos recopilados correspondientes a las determinaciones realizadas en cada una de las instancias de este trabajo de tesis fueron almacenados con extensión “3.fdt”, formato de datos salida del propio del instrumento.

Los archivos con esta extensión debieron ser adecuados para el procesamiento, tanto en el cambio de extensión (a formato ascii), como en la eliminación de efectos dispersivos.

Para matrices EEMs obtenidas, las filas se corresponden a las longitudes de onda de emisión, y las columnas a las longitudes de onda de excitación, registrando en cada celda las intensidades de fluorescencia correspondientes.

3.3.3 Pre-procesamiento de datos

El primer paso del preprocesamiento de datos generalmente se inicia con la corrección de la línea base de los espectros recogidos; en este trabajo no fue necesario realizar este procedimiento, para la obtención de las EEMs se programó al equipo para que realice esta corrección para cada una de las lecturas realizadas.

Las dispersiones de Rayleigh (R_y), y la dispersión de Raman (R_m), ambos de primer orden se encuentran integradas a la información analítica de interés (EEMs), en una estructura bidimensional que puede ser explicado por dos perfiles de vectores individuales e independientes (Zepp, Sheldon and Moran, 2004; Andersen, 2005; Escandar *et al.*, 2014), como se observa en la figura 3.7, para el agua destilada empleado para la preparación de las soluciones estándares de la mezcla ternaria de tensioactivos.

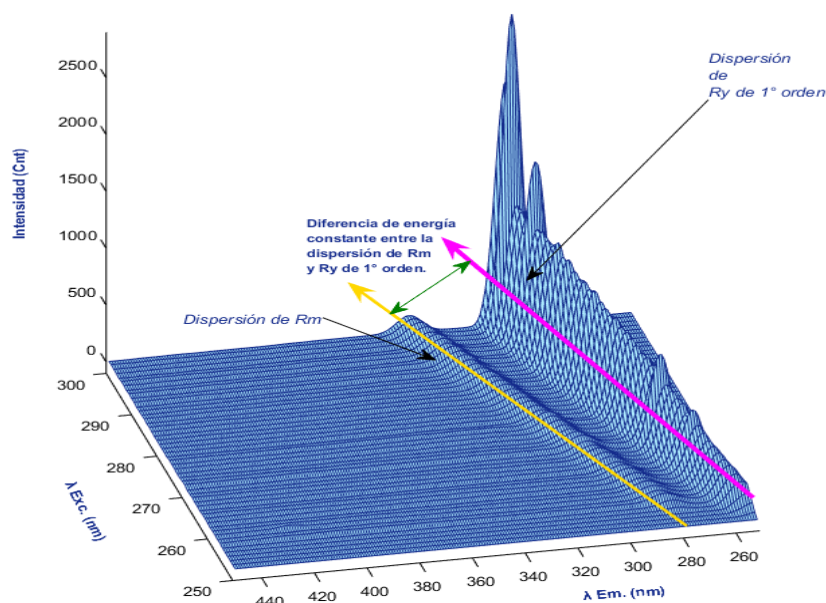


Figura 3.7. Superficie de respuesta EEM del agua destilada, donde se aprecia el efecto de la dispersión de Ry y Rm de 1° orden (Kumar, Tarai and Mishra, 2017).

Es preciso considerar la eliminación de ambas dispersiones en cada una de las EEMs, ya que afectan de manera significativa la cuantificación en la etapa procesamiento quimiométricos.

Eliminados los efectos dispersivos, la matriz de tres vías se constituye a partir de varias EEMs de la misma estructura, con lo cual cumpliría el concepto de trilinealidad de bajo rango. Esta propiedad es de vital importancia al trabajar con algoritmos quimiométricos basados en descomposición trilineal, como el análisis de factor paralelo (PARAFAC) (Bro, 1997; Jiji, Andersson and Booksh, 2000).

Si la señal de los fluoróforos se aleja de estas líneas de dispersión, éstas simplemente pueden ser omitidas de los datos de interés. Sin embargo, en muestras líquidas ambientales, la señal de los fluoróforos de interés se encuentra cerca o en la zona de los efectos de dispersión (Eilers, 2003; Booksh and Bro, 2005; Eilers and Kroonenberg, 2014; Wu *et al.*, 2016).

Entre los procedimientos que generalmente se utilizan para manejar los efectos de dispersión Ry y Rm, están las correcciones digitales mediadas por algoritmos matemáticos, que son los enfoques más utilizados, a pesar de que requieren habilidades

matemáticas o de programación (Zepp, Sheldon and Moran, 2004; Clarke and Oprysa, 2006; Eilers and Kroonenberg, 2014; Chiappini and Alcaraz, 2019; Yuan *et al.*, 2019).

La remoción por parte del algoritmo está basada en una estrategia conservadora que permita restar las señales de dispersión y mantener las propiedades inherentes de los espectros de interés.

El algoritmo para la corrección de las dispersiones de Ry y Rm empleado en este trabajo de tesis fue provisto por el Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ), de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe Argentina. El algoritmo corresponde a un toolbox que se ejecuta en el entorno del programa Matlab R15a (versión para estudiantes).

La matriz de datos con la extensión adecuada (ascii), se importa al entorno MATLAB, donde se realiza dicha operación. Los parámetros de tolerancias necesario que ayudan a mejorar la identificación de las dispersiones que deban tratarse para luego poder realizar el modelado adecuado son dos.

El primero de ellos es la tolerancia “h” representa el umbral de intensidad por debajo del cual no se realiza ninguna corrección; por lo tanto, solo los picos de dispersión que tienen una altura máxima (PMH), superior a h se considerará para la corrección.

La segunda es la tolerancia “w” denota el ancho medio esperado en la base del pico de dispersión (PHW), y define el modelo matemático apropiado para realizar la corrección.

El primer paso del procedimiento es la identificación de la posición definida de la dispersión, se logra utilizando los criterios establecidos por (Bahram *et al.*, 2007), en el que el centro de la señal Ry surge cuando:

$$\mu_{em,i} = n \times \lambda_{exc,i} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde n es el número de onda de emisión, $\lambda_{exc,i}$ es la longitud de onda de excitación i-ésimo.

La dispersión Rm se reconoce con la siguiente la ecuación:

$$\mu_{em,i} = \frac{(10^7 \lambda_{exc,i})}{(10^7 - wnr \times \lambda_{exc,i})} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde $\mu_{em,i}$ es la posición esperada de la señal Rm en el espectro de emisión (medida en nanómetros), en la longitud de onda de excitación i-ésima ($\lambda_{exc,i}$), wnr es la diferencia en números de onda entre las posiciones Ry y Rm en el perfil. Si es necesario, el valor de wnr puede modificarse considerando la naturaleza del sistema en estudio. Una vez que se identifica la posición máxima, la PMH en μ_{em} se calcula como la diferencia entre la intensidad a $\mu_{em} + w$ ó $\mu_{em} - w$, según corresponda, y comparado con h. Este paso no resulta ser crucial en aquellas regiones donde las señales de dispersión son solapadas por la señal o ruido, y con lo cual no se necesita corrección.

En caso de $PMH > h$, se confirma la presencia del pico de dispersión y deben ser aislados para su corrección. Para ello, la región espectral que contiene la señal de dispersión (r_0) se elimina temporalmente del espectro.

Para estimar la ventana espectral de r_0 , se considera el valor de w. A partir de entonces, el pico de la dispersión en r_0 se somete a un segundo control que define el procedimiento que se implementa para la resta. Dado a que w representa el ancho medio esperado en la base del pico de dispersión, se puede estimar fácilmente teniendo en cuenta los parámetros del instrumento.

El ancho medio izquierdo y derecho en la base del pico de dispersión (PHW), guarda una relación estrecha con una curva de distribución gaussiana. Sin embargo, en la práctica, los picos de dispersión son asimétricos o incompletos. Las ocurrencias de pico incompletas siempre están en los extremos de la EEM y, en consecuencia, esas señales no pueden considerarse curvas gaussianas. Por otro lado, el grado de asimetría observado en los picos es insignificante para este propósito y las señales deberán cumplir con el modelado gaussiano.

Para distinguir entre picos de dispersión completos e incompletos, se trabajó de acuerdo al siguiente criterio: un pico de dispersión se considera completo cuando tanto el PHW derecho como el izquierdo son iguales o superiores al 80 % de w. Por lo que si el

$PHW < 0,8 \times w$, ya sea para el lado derecho o izquierdo, el pico se considera incompleto y la señal de dispersión se reemplaza por valores faltantes y la interpolación lineal se logra agregando un valor cero al principio (o al final, según corresponda) de r_0 . En caso de que $PHW > 0,8 \times w$, el pico de dispersión será modelado con una distribución gaussiana. En este caso, la corrección comienza con la estimación de la línea base de r_0 , que se logra utilizando el procedimiento de suavizado asimétrico basado en mínimos cuadrados propuesto por (Eilers and Kroonenberg, 2014).

La línea de base estimada se resta de r_0 (figuras 3.8a y 3.8b), y solo la dispersión del pico permanecerá en la región (r_1) (figura 3.8c). Este proceso es esencial en caso de fuerte superposición entre el pico de dispersión y la señal del analito, ya que el ajuste de la curva conduciría a resultados no deseados por posibles derivas en la línea de base de la curva estimada. Posteriormente, se propone una curva gaussiana ajustado al pico de dispersión utilizando los valores PMH y PHW como estimaciones iniciales, que luego se resta directamente de r_1 (figura 3.8.c).

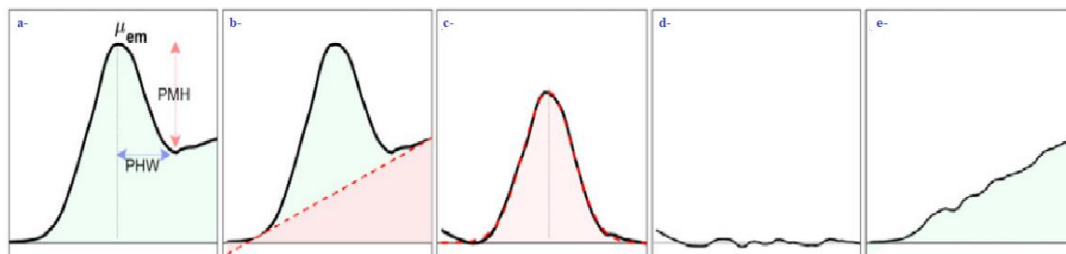


Figura 3.8. Secuencia de corrección de la dispersión. (a-) Región excluida de espectro de emisión original que comprende el pico r_0 superpuesto a la señal de analito (r_0); (b-) Señal original (línea negra) y la línea de base estimada (rojo línea discontinua); (c-) Señal espectral después de la resta basal (línea negra) y Gauss ajustado curva de distribución (r_1); (d-) Señal resultante después de restar la curva ajustada desde el pico de dispersión (r_2). (e-) Señal obtenida de la adición de la señal corregida y la línea base estimada. Los colores verde y rojo indican el áreas restantes y sustraídas, respectivamente. PMH y PHW son el pico altura máxima y el ancho medio pico, respectivamente.(Chiappini and Alcaraz, 2019)

De esta forma se obtiene una región que comprende la señal restante del espectro. Esta región, r_2 , contiene los residuos de la resta de la curva gaussiana y lo que es más importante, el ruido inherente del espectro (figura 3.8d). En este paso, si no se evalúa

la bondad del ajuste de la curva gaussiana, se pueden introducir artefactos no deseados en los espectros.

Por último, para recuperar el espectro corregido correctamente, a la línea de base estimada se agrega a r_2 , (figura 3.8d), y los valores resultantes se incluyen en la región que fue extraído del espectro original (figura 3.8d). Finalmente se logra un espectro de emisión libre de señal de dispersión.

En primer término, se corrigió la dispersión de R_y , para lo cual se tuvo presente las condiciones instrumentales como anchos de emisión y de excitación empleados en metodología desarrollada.

Esta corrección se inició calculando el ancho teórico de pico de la dispersión (TDPW):

$$TDPW = (Slit_{Em} + Slit_{Exc.}) \times 2 \pm 3 \quad \text{Ec. 3.3}$$

La dispersión de Raman, precisa especificar en qué número de sensor “k”, se inicia la dispersión.

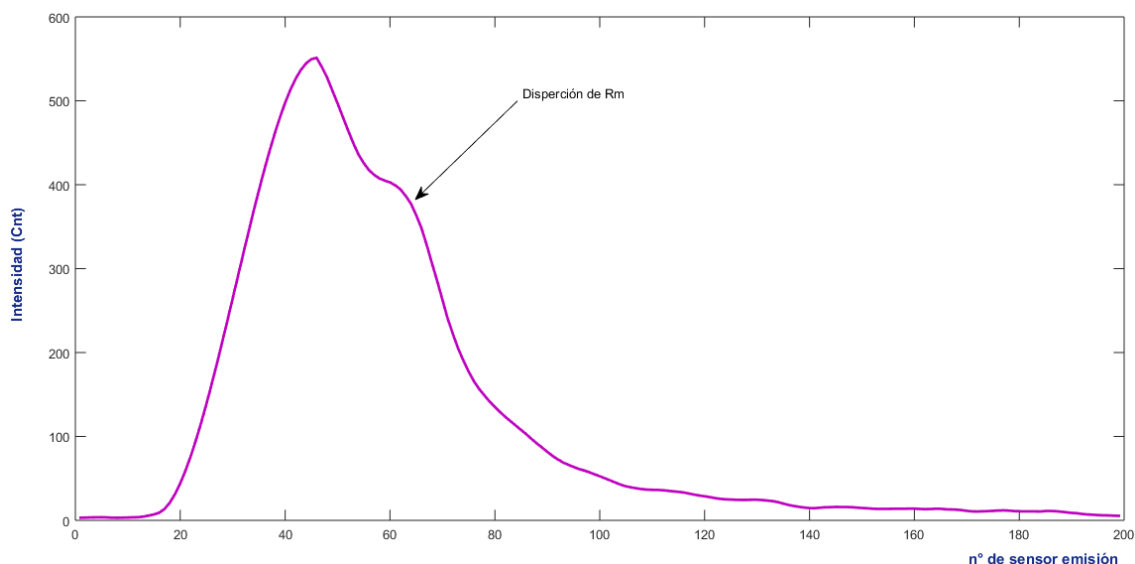


Figura 3.9. Perfil del sensor de emisión donde se inicia la dispersión de Raman.

En la figura 3.9 se muestra el número de sensor donde el perfil pierde continuidad en una de las matrices trabajadas. El número de onda de Raman (wnr), informa sobre la distancia en términos energéticos que hay entre la dispersión de R_y y la de R_m , y depende de la naturaleza del solvente, las determinaciones realizadas en este trabajo

de tesis fueron realizada empleando agua destilada y las muestras problema se encuentran en medio acuoso, este valor corresponde a 3500.

Al igual que en la corrección de R_y , se debe informar al algoritmo el valor de TDPW y aho de la dispersión:

$$TDPW = \frac{[(Slit_{Em} + Slit_{Exc.}) \times 2]}{2} \quad \text{Ec. 3.4}$$

3.3.4 Proceso de modelado

El proceso de modelado es la descripción del comportamiento de los datos que se obtuvieron en las diferentes instancias, suponiendo el cumplimiento de ciertas propiedades matemáticas (bilinealidad, trilinealidad, etc.), para lo cual se recurren a software para dicha operación.

Un algoritmo es un procedimiento (conjunto condensado de instrucciones) llevado a cabo con una herramienta computacional, partiendo de un estado inicial que finalizará en un estado final definido.

El software es el vínculo entre los datos y el algoritmo de procesamiento (el conjunto de instrucciones escritas en cierto lenguaje de programación).

Para la calibración multivariada de segundo orden realizado en esta tesis se empleó el software “MVC2”, se trata de un desarrollo gráfico de interfaz de usuario (GUI), actuando de “puente conveniente” entre el entorno de programación y los usuarios. La interfaz gráfica fue escrita en MATLAB por el Dr. Alejandro Olivieri (Olivieri, Wu and Yu, 2009) .

3.3.5 Interfaz gráfica MVC2

Con los datos obtenidos (EEMs), de la mezcla ternaria estándar, se construye la curva de calibración empleando la el programa MVC2(Olivieri, Wu and Yu, 2009).

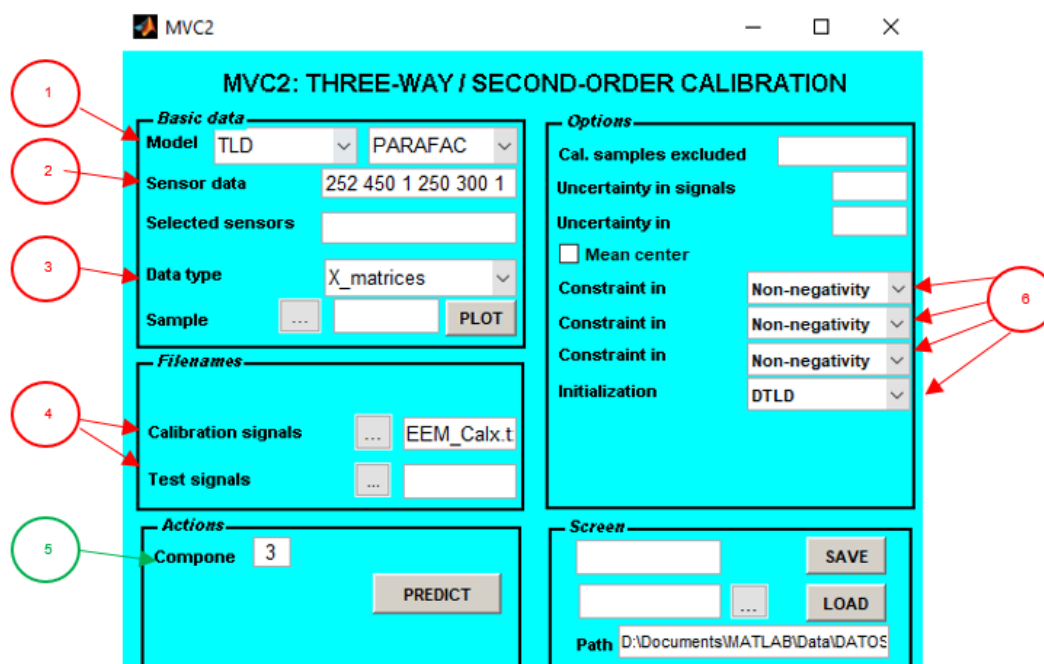


Figura 3.10. Interfaz gráfica del software MVC2, mostrando los parámetros de modelado seleccionado para las condiciones de estudio de los tensoactivos.

Como se observa en el Figura 3.10, cada uno de los casilleros debieron ser completados con archivos específicos para el procesamiento.

- 1- Algoritmo a ser empleado.
- 2- Sensores empleados en la medición de las matrices de fluorescencia. Indicando rango de longitud de onda de emisión y su intervalo, luego el rango de longitud de onda de excitación y su intervalo.
- 3- Formato de las matrices de datos, para el caso de esta tesis corresponden a X-matrices (.ascii).
- 4- Listado de las EEMs en formato .txt, donde se especifican qué archivos fueron empleados para calibración (primer casillero); mezclas de validación, o de muestras problema (segundo casillero).
- 5- Selección del número de componentes (N): el número de componentes sensibles que se incluirán en el modelo PARAFAC se pueden estimar por varios métodos:
 - a- Análisis de consistencia del núcleo (un nuevo componente se descarta cuando la consistencia del núcleo cae por debajo de un valor de 50 %).

b- Estudio del error residual de PARAFAC (una opción razonable de N es el número más pequeño de componentes para los cuales el error residual no es estadísticamente diferente al ruido instrumental).

c-) Inspección de perfiles, considerando que la adición de los componentes posteriores no debe generar perfiles repetidos o ruidosos.

6- Restricciones en los modos A, B y C que corresponden a los coeficientes de correlación entre las variables filas (emisión), y los factores columnas (excitación), como no negatividad, ortogonalidad o unimodalidad, disponibles para PARAFAC, y que fueron aplicado al sistema de estudio.

En la tabla 3.10 se presentan las condiciones que se emplearon para estimar los componentes y para realizar la calibración, validación y determinación en muestras reales para el modelado PARAFAC.

Tabla 3.10. Condiciones de modelado	
Algoritmo	PARAFAC
Restricción modo A	No-negatividad
Restricción modo B	No-negatividad
Restricción modo C	No-negatividad
Iniciación	DTLD

*DTLD: descomposición Trilineal de los datos

3.4 Modelado PARAFAC

La aplicación de este modelo requiere que los datos contenidos en las matrices EEMs, sean compiladas en un objeto de dimensiones $I \times J \times K$, cuyos elementos están dados por la ecuación:

$$x_{ijk} = \sum_{p=1}^P \sum_{q=1}^Q \sum_{r=1}^R a_{ip} b_{jq} c_{kr} g_{pqr} + e_{ijk} \quad \text{Ec. 3.5}$$

Donde e_{ijk} corresponde al error residual (parte no modelada de los valores medidos); a_{ip} , b_{jq} y c_{kr} son los elementos de la matriz loading A ($I \times P$), B ($J \times Q$)

La segunda y tercera suposición corresponden a la ley de Beer. Cuando se modelan datos reales, las dificultades incluyen la presencia de componentes fuertemente correlacionados con propiedades espectrales similares, errores sistemáticos no-trilineales resultados de, por ejemplo, efectos de dispersión presentes en la matriz de la muestra, y no-linealidad dependiente de la concentración debido a efectos de filtro interno. Otras cuestiones que pueden dificultar o incluso imposibilitar el análisis PARAFAC pueden ser reacciones químicas, “quenching”, interacción entre los fluoróforos, o cambios en el ambiente electrónico de los fluoróforos.

3.4.1 Cifras de mérito

Según Olivieri y colaboradores (Escandar, 2014), se puede obtener una expresión general para calcular la sensibilidad (SEN), en cualquier situación de calibración usando señales bilineales de segundo orden según:

$$SEN_n = sn \left\{ \left[(B_{cal}^T P_{b,int} B_{cal}) * (C_{cal}^T P_{c,int} C_{cal}) \right]^{-1} \right\}_{nn}^{-1/2} \quad \text{Ec. 3.6}$$

donde ‘*’ indica el producto de matrices Hadamard, ‘nn’ implica el elemento (n, n) de una matriz dada y sn es la señal total integrada del componente n expresada en unidades de concentración. B_{cal} y C_{cal} son los componentes esperados que están presentes en las muestras de calibración, y $P_{b,int}$ y $P_{c,int}$ se pueden obtener con la siguiente expresión:

$$P_{b,int} = I - B_{int} ; P_{c,int} = I - C_{int} \quad \text{Ec. 3.7}$$

donde B_{int} y C_{int} contienen los perfiles del componente inesperado (no calibrado) como columnas, e I es una matriz identidad. Cabe destacar que las matrices B_{int} y C_{int} pueden construirse con columnas que representan el verdadero perfil espectral del interferente.

Por otra parte, se puede calcular la sensibilidad analítica (γ_n) según:

$$\gamma_n = SEN_n / \|\delta r\| \quad \text{Ec. 3.8}$$

donde $\|\delta r\|$ es la medida del ruido instrumental, estimado a partir del análisis estadístico de réplicas de una muestra blanco. Este parámetro, permite la comparación analítica de

métodos sin tener en cuenta la metodología específica utilizada, el equipo ni la escala empleada. Además, su inversa (γ_n^{-1}) establece la mínima diferencia de concentración que el método puede discriminar estadísticamente a lo largo del rango dinámico, considerando como única fuente de error al ruido instrumental.

3.4.2 Validación del modelo

La interpretación química válida de un modelo PARAFAC se basa en el número correcto de componentes empleado para el modelado. Cuando los modelos están subestimados, se usan menos componentes que los analitos químicos presentes en el sistema, que varían independientemente y que son responsables de la señal medida. Cuando los modelos se sobreestiman con un número mayor de componentes, se pueden usar dos o más componentes PARAFAC para representar un resto único, en combinación con ruido. Hay muchas formas de evaluar si PARAFAC modeló con la cantidad correcta de componentes. Ningún método individual es infalible, por lo que se deben considerar varios de ellos en combinación siempre que sea posible. Esto es particularmente importante al evaluar conjuntos de datos reales, ya que inciden en los métodos de validación al producir indicaciones contradictorias sobre el número de componentes en un modelo. Por esta razón, un cierto nivel de subjetividad es inevitable; sin embargo, con una investigación cuidadosa y la confianza en una amplia gama de herramientas, la subjetividad se puede minimizar.

Una de las herramientas más utilizadas para evaluar la "adecuación" del modelo es la *consistencia del modelo (core consistency)*. Cuando se ejecuta una secuencia de modelos con un número creciente de componentes, la consistencia del modelo tiende a iniciar con un porcentaje alto (cerca del 100 %), si el valor de las iteraciones cae abruptamente por debajo de un cierto valor (<50%), hay una mala selección de componentes. Se determina que el número de componentes adecuado para el modelado es aquel valor numérico en el modelo que posee una alta consistencia del modelo (Bro and Kiers, 2003; Ten Berge, 2004; Escandar *et al.*, 2014).

3.4.3 Aleatoriedad de residuos

Determinado el número correcto de componentes PARAFAC, el modelo captura toda la variación sistemática significativa del conjunto de datos, con lo cual el error residual contiene solo el error aleatorio. En esta situación, los gráficos residuales para cada muestra no muestran un patrón consistente o distribución simétrica.

3.4.4 Refinamiento del modelo

La aplicación del modelo PARAFAC a un conjunto de datos real rara vez es un proceso lineal, por lo que las fases exploratorias y de validación del modelado requieren varias revisiones. El desenvolvimiento de un algoritmo puede mejorarse aplicando restricciones apropiadas durante el proceso de modelado. Para datos fluorescencia (EMM), generalmente las concentraciones y los espectros están limitados a ser no negativos, además de restringir los espectros a no tener más de un solo pico (unimodalidad).

La aplicación de restricciones al modelado con PARAFAC permite obtener soluciones estables y químicamente sensibles. Sin embargo, se debe tener la precaución no aplicar a los problemas que se resolverían mejor con otros enfoques. Una vez que se han decidido las restricciones y los criterios de modelado, lo recomendable para alcanzar la solución correcta para un número determinado de componentes es repetir el modelado, cada vez usando un vector de inicio aleatorio diferente.

3.4.5 Interpretación de los resultados

Cuando los conjuntos de datos de fluorescencia (EEMs), se ajustan a la Ley de Beer, los componentes PARAFAC en modelos validados pueden interpretarse como fluoróforos independientes o, posiblemente, grupos de los mismos que comparten espectros muy similares. Un componente puede atribuirse a un analito químico específico, mediante la adición de cantidades conocidas para determinar su concentración en cada muestra. Sin embargo, si se desconoce la identidad de un

componente PARAFAC, no es posible convertir las intensidades de fluorescencia en concentraciones.

3.4.6 Regiones Elípticas de Confianza Conjunta (EJCR)

La comparación de dos metodologías analíticas se realiza aplicando un modelo de regresión lineal para evaluar si los resultados obtenidos por ambos métodos son comparables. En general, se recurre a métodos de regresión que tenga en cuenta tanto los errores en el eje de las ordenadas como en de las abscisas, ya que ambos parámetros deben contener las concentraciones predichas para un analito determinado, por dos métodos analíticos diferentes. El método muy utilizado en estos casos es el de Cuadrados Mínimos Bivariados (BLS por sus siglas en inglés) (Riu and Rius, 1996; Gonza, Herrador and Asuero, 1999). Esta técnica de regresión busca minimizar la suma de los residuos ponderados (S), expresado en la siguiente ecuación:

$$S = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{w_i} \quad \text{Ec. 3.9}$$

donde \hat{y}_i es el valor estimado de y_i , y el factor w_i tiene en cuenta las variancias de cada par de datos (x_i, y_i) , $s_{y_i}^2$ y $s_{x_i}^2$:

$$w_i = s_{y_i}^2 + \hat{b}^2 s_{x_i}^2 \quad \text{Ec. 3.10}$$

donde \hat{b} es la pendiente estimada de la línea de regresión. La estimación del error experimental se define como:

$$\hat{S}^2 = \frac{[\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 / w_i]}{n-2} \quad \text{Ec. 3.11}$$

donde n es el número de niveles de concentración. Por lo tanto, el método asigna mayor peso (es decir, menos importancia), a aquellos pares de datos con altos valores de $s_{x_i}^2$ y/o $s_{y_i}^2$, es decir, a los pares de datos más imprecisos.

Si ninguno de los coeficientes de la regresión lineal difiere estadísticamente de la unidad (en el caso de la pendiente), o de cero (en el caso de la ordenada al origen), los resultados no se considerarán diferentes para un determinado nivel de confianza α .

La prueba conjunta del intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen que considera los errores en ambos ejes se emplea para analizar la existencia de diferencias significativas entre los coeficientes de regresión y los valores teóricos uno y cero, respectivamente. Esto consiste en comprobar la presencia de los puntos teóricos dentro de los límites de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR) definida por:

$$\sum_{i=1}^n \frac{1}{w_i} (\hat{a} - a)^2 + 2 \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{w_i} (\hat{a} - a)(\hat{b} - b) + \sum_{i=1}^n \frac{x_i^2}{w_i} (\hat{b} - b)^2 = 2\hat{S}^2 F_{1-\alpha(2,n-2)} \quad \text{Ec. 3.12}$$

donde $F_{1-\alpha(2,n-2)}$ es el valor tabulado de F con 2 y $n - 2$ grados de libertad para un nivel de confianza determinado. Sólo cuando los puntos teóricos caen dentro de la región elíptica delimitada por la anterior ecuación, se puede concluir que no hay diferencias significativas entre ambos métodos. El tamaño de la elipse depende directamente de la estimación del error experimental, \hat{s}^2 . Por lo tanto, cuando se dispone de pocos datos experimentales este valor puede sobreestimarse aumentando la incertidumbre a causa de la falta de información inherente a un bajo número de pares de datos y, a veces, a la falta de ajuste de los datos experimentales a la línea de regresión BLS. En estos casos, la región elíptica es de gran tamaño y puede incluir al punto (1,0) sólo por azar. Por lo tanto, el tamaño de la elipse da una idea de la precisión del método que se está probando.

El método EJCR se utiliza también para comparar valores predichos de concentración obtenidos por una técnica analítica con los valores nominales de concentración en muestras, por ejemplo, de validación.

3.5 U-PLS/RBL

El modelo opera en dos pasos, inicialmente la información de la concentración se introduce en el paso de calibración (sin incluir datos para la muestra desconocida),

obteniéndose dos tipos de variables latentes: factores de carga contenido en la matriz P y factores de carga de peso contenidos en matriz W.

La obtención de los parámetros necesarios para el modelado se realiza mediante cálculos iterativos realizados por el algoritmo, que pueden resumirse en los siguientes pasos (Wold *et al.*, 1987; Alejandro C. Olivieri, 2005):

1. Proyección de la matriz de datos en el vector de concentraciones y_n para el analito n en las muestras de calibración, obteniéndose el primer weight loading factor:

$$w_1 = Z_x / y_n (y_n^T y_n) \quad \text{Ec. 3.13}$$

En este paso el algoritmo asume el valor de concentración de un único componente en las mezclas de calibración, en este caso el analito 1; w_1 es una aproximación por cuadrados mínimos al espectro puro del analito 1. En este paso se aprecia la introducción de información concerniente a las concentraciones contenidas en y_1 en el cálculo del primer factor.

2. Normalización del factor w_1 , dividiéndolo por $w_1^T w_1 = \|w_1\|^2$ para contar finalmente con un juego de factores ortonormales.

3. Obtención del primer score: $t_1 = Z_x^T w_1$

Se continúa bajo la suposición de que únicamente está presente el analito 1, y se calcula cuál es la contribución del primer factor w_1 presente en las mezclas de calibración. Estas “concentraciones” forman el vector t_1 .

4. Obtención del primer coeficiente de regresión v_1 : $v_1 = t_1 y_1 / (y_n^T y_n)$

Se calcula el coeficiente de regresión que relaciona el score t_1 calculado en el paso 3 con las concentraciones de calibración.

5. Obtención del primer loading p_1 : $p_1 = Z_x t_1 / (t_1^T t_1)$

6. Cálculo de los residuos espectrales y de concentración:

$$E_Z^T = Z_x^T - t_1 p_1^T \quad \text{Ec. 3.14}$$

$$e_c = y_n - v_1 t_1$$

En los pasos 5 y 6 se asegura que los vectores t_a y w_a subsiguientes serán ortogonales entre sí. Para ello se calculan los vectores p_a , llamados loadings. Estos vectores no explican la varianza espectral en la matriz Z_X , sino que representan un intento de explicar dicha varianza, mientras simultáneamente se correlacionan los scores t_a con las concentraciones y_1 .

7. Se substituyen E_Z y e_c por Z_X y y_n respectivamente en el paso 1 y se continúa hasta llegar al número de factores deseado (A).

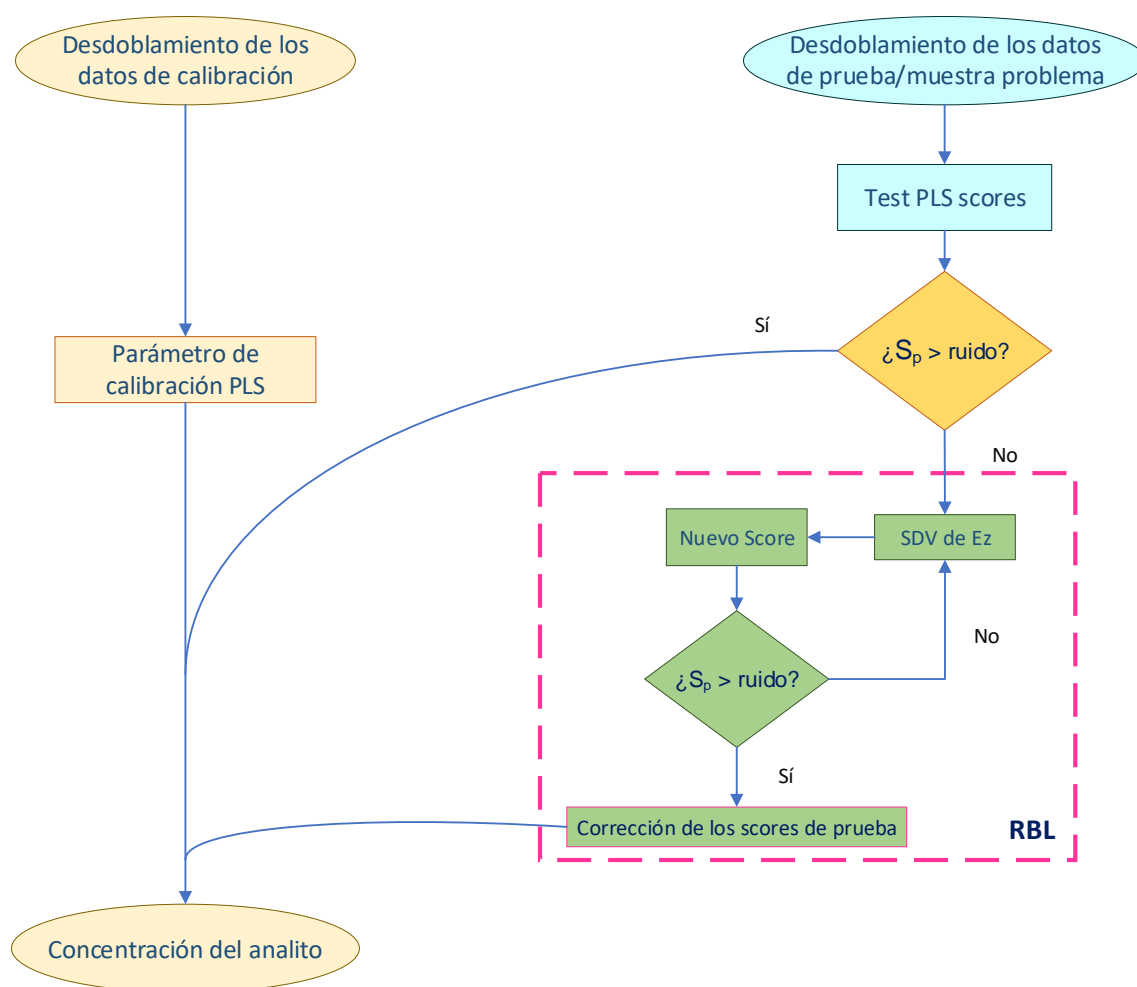


Figura 3.12. Diagrama de flujo de cómo opera el algoritmo U-PLS/RBL para muestras de calibración, validación y muestras problemas. Las cajas amarillas corresponden a la calibración, las cajas de color celeste corresponden a la validación o muestra prueba y las cajas verdes al procedimiento RBL (Bortolato et al., 2007).

3.5.1 Número óptimo de factores (A)

El parámetro A se selecciona usualmente mediante técnicas de validación cruzada (Haaland and Thomas, 1988) o utilizando el test propuesto por Faber y colaboradores (Susanne Wiklund, David Nilsson, 2007).

El método de validación cruzada consiste en calibrar con todas las muestras de calibración menos una. Con este nuevo juego de calibración se predice la concentración de la muestra que se dejó de lado; luego se repite dejando de lado otra de las muestras de calibración y así sucesivamente hasta que todas son dejadas de lado y usada para la predicción. Con las concentraciones predichas y las concentraciones nominales se calcula el error a través de un estadístico llamado PRESS (del inglés prediction error sum of squares):

$$PRESS = \sum_1^I (C_{nom} - C_{pred})^2 \quad \text{Ec. 3.15}$$

Donde C_{nom} es la concentración nominal del componente en las mezclas utilizadas para la calibración y C_{pred} es la concentración predicha por el modelo. Normalmente el PRESS va disminuyendo hasta alcanzar el valor óptimo, que generalmente coincide con el número de factores de variación de las mezclas, y luego comienza a aumentar. Esto ocurre porque los factores comienzan a sumar ruido espectral. El número óptimo de factores corresponde al que tiene menor PRESS, aunque no siempre es el más indicado para la predicción. Al seleccionar el parámetro A con este criterio, pueden ocurrir errores por sobreajuste. La mejor manera de seleccionar el número de factores es a través del estadístico F , propuesto por Haaland y Thomas (Haaland and Thomas, 1988), según ecuación:

$$F_i = \frac{PRESS_i}{PRESS_{menor}} \quad \text{Ec. 3.16}$$

donde $PRESS_i$ corresponde a cada uno de los errores calculados y $PRESS_{menor}$ es el menor error obtenido, para $i = 1, 2, \dots, I/2 + 1$.

El número óptimo de factores corresponderá al F_i , tal que $F_i < F_{\alpha}$; donde $(1-\alpha)$ es el percentil de Snedecor para la distribución F, e I los grados de libertad. Asumiendo que los errores predichos tienen distribución normal, media igual a cero, que son independientes, y que no existe diferencia significativa entre sus varianzas, la probabilidad $\{F_i > F_{\alpha,1,1} | \sigma_i^2 = \sigma_{menor}^2\} = 2\alpha$, donde σ_i^2 y σ_{menor}^2 son las varianzas de los errores predichos. En consecuencia, se acepta el primer F_i , cuya probabilidad sea menor que 0,75.

3.5.2 Predicción basada en el score de la muestra

Si la calibración resulta conveniente y no hay interferencias, “v” se puede emplear para estimar las concentraciones del analito en una muestra incógnita, y_u :

$$y_u = t_u^T v \quad \text{Ec. 3.17}$$

donde t_u es el score de la muestra incógnita, obtenido por proyección de los datos vectorizados para la muestra incógnita X_u dentro del espacio de los A factores latentes de acuerdo a la siguiente expresión:

$$t_u = (W^T P)^{-1} W^T \text{vec}(X_u) \quad \text{Ec. 3.18}$$

Cuando existen componentes no esperados en X_u , el score de la muestra dado por la Ec. 3.18 no es adecuado para la predicción del analito utilizando la Ec. 3.17. En este caso, los residuos del paso de predicción de U-PLS (s_p), representados por la Ec. 3.19, serán anormalmente grandes en comparación con el ruido instrumental típico:

$$\begin{aligned} s_p &= \|e_p\| / (JK - A)^{1/2} \quad \text{Ec. 3.19} \\ &= \|\text{vec}(X_u) - P(W^T P)^{-1} W^T \text{vec}(X_u)\| / (JK - A)^{1/2} \\ &= v \|\text{ec}(X_u) - P t_u\| / (JK - A)^{1/2} \end{aligned}$$

donde $\|\cdot\|$ indica la norma Euclídea. En este caso, la muestra incógnita es considerada como muestra anómala (outlier). La posibilidad de descartar muestras que presentan

interferencias no modeladas y que por ende están sujetas a un nivel de error alto es la denominada “ventaja de primer orden”. Si la muestra incógnita contiene componentes inesperados, la situación puede ser solucionada aplicando un procedimiento aparte denominado bilinealización residual que se basa en la descomposición de valores singulares (Culzoni et al. 2006; Olivieri 2005; Wold et al. 1987).

La muestra de validación puede (o no), contener componentes no calibrados, y su señal puede ser descompuesta en dos partes: una que puede ser modelada usando las variables latentes de la calibración (X_{mod}) y otra que no puede ser modelada con estas variables (X_{nomod}):

$$X_u = X_{mod} + X_{nomod} \quad \text{Ec. 3.20}$$

X_{mod} se puede expresar en función de las variables latentes de la calibración P y de los loadings de la muestra asociada con t_u , de la siguiente manera:

$$vec(X_u) = Pt_u + e_{mod} + vec(X_{nomod}) \quad \text{Ec. 3.21}$$

donde e_{mod} es el vector de los residuos no ajustados en X_{mod} mediante el modelo PLS de A factores y tiene elementos del orden del ruido instrumental. Si en X_{nomod} existe algo que tenga una estructura bilineal con valores mayores que el ruido experimental, puede ser modelado por SVD (valor de descomposición singular), que permite la estimación de los perfiles de las interferencias b_{int} y c_{int} mediante la minimización de la norma del vector de los residuos e_u (calculado mientras se ajustaron los datos de la muestra a la suma de las contribuciones relevantes):

$$vec(X_u) = Pt_{uRBL} + vec[g_{int}b_{int}(c_{int})^T] + e_u \quad \text{Ec. 3.22}$$

donde b_{int} y c_{int} son los autovectores izquierdo y derecho de E_p , y g_{int} , corresponden a factores de escala según ecuación:

$$(g_{int}, b_{int}, c_{int}) = SVD_1(E_p) \quad \text{Ec. 3.23}$$

donde E_p es la matriz de $J \times K$ obtenida luego de reordenar el vector e_u de $JK \times 1$ de la Ec. 3.22, y SVD_1 indica las consideraciones que se tuvieron en cuenta para el primer componente principal.

Durante el proceso RBL, P se mantiene constante en los valores de calibración y t_{uRBL} se varía hasta que $\|e_u\|$ se minimiza. La minimización se puede llevar a cabo utilizando el procedimiento Gauss-Newton (GN), comenzando desde la Ec. 3.17. Una vez minimizado $\|e_u\|$, la concentración del analito se calcula usando la Ec. 3.18, mediante la introducción del vector final encontrado por el procedimiento RBL, t_{uRBL} .

El número de interferencias N_{int} se puede evaluar comparando los residuos finales S_u con el nivel de ruido instrumental de acuerdo a la siguiente expresión:

$$S_u = \|e_u\|/[JK - (N_c + N_{int})]^{1/2} \quad \text{Ec. 3.24}$$

donde e_u se obtuvo de la Ec. 3.22 y N_c es el número de analitos calibrados.

Debe tenerse en cuenta que para $N_{int} > 1$, la forma de los perfiles obtenidos para los componentes esperados está menos correlacionada con el espectro del componente verdadero, debido al hecho de que los componentes principales están restringidos a ser ortonormales (Bortolato, Arancibia and Escandar, 2007; Olivieri, Escandar and Mun, 2011).

Por otro lado, la adición de más variables latentes al número de compuestos químicos al aplicar RBL, podría, de alguna manera, compensar la falta de trilinealidad en los datos (Cañada-Cañada *et al.*, 2009).

3.6 Método de referencia para la determinación de tensioactivos

La metodología de referencia para cuantificar tensioactivos es HPLC (Marcomini *et al.*, 1993; Yokoyama, Kondo and Sato, 1993; Loos *et al.*, 2007; Alberto *et al.*, 2017).

Los detalles del instrumento utilizado se presentan en la tabla 3.11.

Table 3.11. Especificación técnica del HPLC	
Equipo	HPLC Modular marca Shimadzu
Horno	CTO-10AS-Columna ODS 5
Detector de Fluorescencia	modelo RF-10AXL-. Lámpara de Xenón 150 W
Columna	ODS C18 5 μm , 4,0 x 250 mm
Pre-columna	Kromasil 100-5C18, 50 mm
Filtro	para jeringa Gamafil MGF-NYL022-SC nylon 0,22 μm



Figura 3.13. a-Equipo de HPLC modular Shimadzu, b- Compartimento horno y columna ODS.

En la figura 3.14 se muestran la columna y la precolumna empleadas:

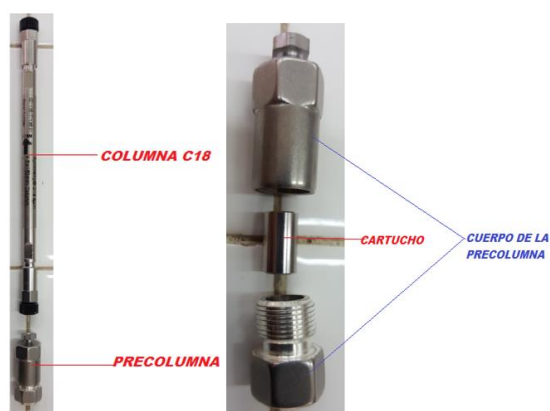


Figura 3.14. Columna y precolumna utilizados para el estudio de los tensioactivos por HPLC.

3.6.1 Reactivos HPLC

- Agua grado HPLC Sintorgan.
- Acetonitrilo grado HPLC Sintorgan.
- Perclorato de sodio ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Analar, BDH Chemicals Ltd Poole England.

Se emplearon los mismos tensioactivos estándares empleados para la calibración por espectrofluorometría (sección 3.2.4).

Se tomaron muestras de efluentes de industria textil y de cuerpo de agua receptor (sección 3.1). Teniendo en cuenta que los efluentes industriales tienen material sólido en suspensión, la técnica cromatográfica se adaptó utilizando un filtro de preinyección para proteger la pre-columna y columna cromatográfica.

3.6.2 Metodología

Selección de la fase móvil

La fase móvil seleccionada para las pruebas preliminares fue una solución de NaClO_4 0,05 M en agua de grado HPLC, teniendo en cuenta el trabajo publicado (Reemtsma, 2003). Las señales obtenidas no fueron satisfactorias para los requisitos de detección y cuantificación, por lo que la fase móvil se modificó, eligiendo trabajar con una solución $\text{H}_3\text{CCCN} / \text{NaClO}_4$ 65/35 (v/v) según lo utilizado por (Hirayama, Ohmichi and Tatsumoto, 2005; Hirayama *et al.*, 2006). Esta fase móvil fue adecuada para la cuantificación de tensioactivos estándares, por lo que se adoptó como una fase móvil de rutina.

3.6.3 Flujo de la fase móvil

Se ensayaron diferentes tasas de flujo, a partir de 0,6 mL/min, aumentando hasta obtener el óptimo en 1 mL/min. Los flujos más altos produjeron déficits de separación y flujos menores de 0,6 mL/min resultaron inconvenientes debido al aumento en el tiempo de análisis.

3.6.4 Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión

Se analizaron las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para la detección y cuantificación de los componentes fluorescentes de los tensioactivos estándares. Inicialmente se realizó un barrido de excitación entre las longitudes de onda 210 y 250 nm para cada estándar. En estos casos, la longitud de onda de emisión (λ_{em}), se fijó a 297 nm, de acuerdo con la literatura consultada (Castles, Moore and Ward, 1989b; Akyüz and Roberts, 2002; Hong and Slingsby, 2013).

La determinación se realizó por triplicado. Los tres tensioactivos analizados presentaron la excitación máxima entre 215 y 235 nm, seleccionándose a 225 nm la longitud de onda como la óptima.

Para el escaneo de las longitudes de onda de emisión, se trabajó con la longitud de onda de excitación seleccionada previamente: 225 nm. APEO y ADBS mostraron máximos para las longitudes de emisión entre 295 y 300 nm. Mientras que el tensioactivo AGFE mostró el máximo entre 285 y 295 nm. Por lo tanto, en una situación de compromiso, se seleccionó como longitud de onda óptima de emisión a 297 nm, para estudiar la mezcla ternaria de los tensioactivos.

3.6.5 Ensayos en blanco

Se llevaron a cabo ensayos en blanco, inyectando agua destilada en las mismas condiciones que los estándares, para verificar las señales de interferencia que podrían aparecer como consecuencia de las condiciones empleadas.

3.6.6 Estudio de interferencias

Las pruebas de interferencia se realizaron en las condiciones de trabajo seleccionadas, utilizando detergente comercial de uso domiciliario como interferencia en la detección de tensioactivos textiles.

3.6.7 Condiciones instrumentales

Se adoptaron las siguientes condiciones instrumentales seleccionadas para realizar todas las determinaciones posteriores:

Tabla 3.12. Condiciones HPLC para la detección de tensioactivos	
Fase móvil	H ₃ CCN/NaClO ₄ (12,3 g/L) 65:35
Flujo	1 mL/min
Columna	ODS C18 5 µm, 4,0 x 250 mm
Pre-columna	Kromasil 100-5C18
λ_{ex}	225 nm
λ_{em}	290 nm
Volumen inyección	200 µL

Estas condiciones instrumentales fueron adoptadas para realizar todas las corridas cromatográficas de la mezcla ternaria de tensioactivos empleados en industrias textiles, y también del cuerpo de agua receptor de los efluentes de dicha industria, para realizar el estudio de validación de la metodología desarrollada en esta tesis.

3.7 Bibliografía

Akyüz, M. and Roberts, D. J. (2002) 'Determination of linear alkylbenzene sulphonates and their biodegradation intermediates by isocratic RP-HPLC', *Turkish Journal of Chemistry*, 26(5), pp. 669–679.

Bahram, M. *et al.* (2007) 'Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation'. doi: 10.1002/cem.

Booksh, K. S. and Bro, R. (2005) 'First order Rayleigh scatter as a separate component in the decomposition of fluorescence landscapes', 537, pp. 349–358. doi: 10.1016/j.aca.2005.01.044.

Bortolato, S. A., Arancibia, J. A. and Escandar, G. M. (2007) 'Improvement of residual

bilinearization by particle swarm optimization for achieving the second-order advantage with unfolded partial least-squares’, *Journal of Chemometrics*, 21, pp. 209–220. doi: 10.1002/cem.

Bro, R. (1997) ‘PARAFAC. Tutorial and applications’, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38(2), pp. 149–171. doi: 10.1016/S0169-7439(97)00032-4.

Cañada-Cañada, F. *et al.* (2009) ‘Second-order multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled to fast-scanning fluorescence detection for the determination of fluoroquinolones’, *Journal of Chromatography A*, 1216, pp. 4868–4876. doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.033.

Carstea, E. M. *et al.* (2016) ‘Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: A review’, *Water Research*. Elsevier Ltd, 95, pp. 205–219. doi: 10.1016/j.watres.2016.03.021.

Castles, M. A., Moore, B. L. and Ward, S. R. (1989) ‘Measurement of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous environmental matrixes by liquid chromatography with fluorescence detection’, *Analytical Chemistry*, 61(22), pp. 2534–2540. doi: 10.1021/ac00197a016.

Chiappini, F. A. and Alcaraz, M. R. (2019) ‘Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems An improved signal-conservative approach to cope with Rayleigh and Raman signals in fluorescence landscapes’, 187(February), pp. 6–10. doi: 10.1016/j.chemolab.2019.02.007.

Clarke, R. J. and Oprysa, A. (2006) ‘Fluorescence and Light Scattering’, 81(5), pp. 705–707.

Culzoni, María J., Héctor C. Goicoechea, Ariana P. Pagani, Miguel A. Cabezón, and Alejandro C. Olivieri. 2006. “Evaluation of Partial Least-Squares with Second-Order Advantage for the Multi-Way Spectroscopic Analysis of Complex Biological Samples in the Presence of Analyte-Background Interactions.” *The Analyst* 131(6):718–23.

- Eilers, P. H. C. (2003) 'A Perfect Smoother', 75(14), pp. 3631–3636.
- Eilers, P. H. C. and Kroonenberg, P. M. (2014) 'Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Modeling and correction of Raman and Rayleigh scatter in fluorescence landscapes', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier B.V., 130, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.chemolab.2013.09.002.
- Elcoroaristizabal, S. *et al.* (2015) 'PARAFAC models of fluorescence data with scattering: A comparative study', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier B.V., 142, pp. 124–130. doi: 10.1016/j.chemolab.2015.01.017.
- Escandar*, J. A. P. and G. M. E. (2011) 'Analytical Methods Spectrofluorimetric study of the herbicide bentazone in organized media', pp. 1494–1500. doi: 10.1039/c1ay05028a.
- Escandar, A. C. O. and G. M. (2014) *Practical Three-Way Calibration*. Elsevier.
- Escandar, G. M. *et al.* (2014) 'Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial', *Analytica Chimica Acta*, 806, pp. 8–26. doi: 10.1016/j.aca.2013.11.009.
- Gonza, A. G., Herrador, M. A. and Asuero, G. (1999) 'Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays', 48, pp. 729–736.
- Haaland, D. M. and Thomas, E. V. (1988) 'Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information', *Analytical Chemistry*, 60(11), pp. 1193–1202. doi: 10.1021/ac00162a020.
- Hirayama, Y. *et al.* (2006) 'Simple and Rapid Determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates by In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography', *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, 52(3), pp. 228–236. doi: 10.1248/jhs.52.228.
- Hirayama, Y., Ohmichi, M. and Tatsumoto, H. (2005) 'Simple and rapid determination of golf course pesticides by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid

chromatography’, *Journal of Health Science*, 51(5), pp. 526–532.

Hong, J. and Slingsby, R. (2013) ‘Automated Solid-Phase Extraction of Linear Alkylbenzene Sulfonate in Wastewater Using a Weak Anion-Exchange Cartridge Followed by HPLC with UV Detection’, pp. 2–4.

Olivieri, A. C. (2005) ‘On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties’, (November), pp. 253–265. doi: 10.1002/cem.927.

Olivieri, A. C., Escandar, G. M. and Mun, A. (2011) ‘Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms’, 30(4), pp. 607–617. doi: 10.1016/j.trac.2010.11.018.

Olivieri, A. C., Wu, H. and Yu, R. (2009) ‘Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration’, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier B.V., 96(2), pp. 246–251. doi: 10.1016/j.chemolab.2009.02.005.

Reemtsma, T. (2003) ‘Liquid chromatography – mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants’, 1000, pp. 477–501.

Riu, J. and Rius, F. X. (1996) ‘Assessing the accuracy of analytical methods using linear regression with errors in both axes’, *Analytical Chemistry*, 68(11), pp. 1851–1857. doi: 10.1021/ac951217s.

Susanne Wiklund, David Nilsson, L. E. (2007) ‘A randomization test for PLS component selection’, *Journal of Chemometrics*, (September), pp. 209–220. doi: <https://doi.org/10.1002/cem.1086>.

Wold, S. *et al.* (1987) ‘Multi-way principal components- and pls-analysis*’, 1(January 1986), pp. 41–56.

Wu, Q. *et al.* (2016) ‘Removal of fluorescent dissolved organic matter in biologically treated textile wastewater by ozonation-biological aerated filter’, *Journal of the Taiwan*

Institute of Chemical Engineers. Elsevier Ltd., 59, pp. 359–364. doi:
10.1016/j.jtice.2015.08.015.

Yuan, Y. Y. *et al.* (2019) ‘Simultaneous determination of carbendazim and chlorothalonil pesticide residues in peanut oil using excitation-emission matrix fluorescence coupled with three-way calibration method’, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 220, p. 117088. doi:
10.1016/j.saa.2019.04.080.

RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 4: Resultados y discusión

4.1 Determinación espectrofluorimétrica de matrices de excitación-emisión

4.1.1 Espectro de Fluorescencia sincrónica (SFS)

En la figura 4.1 se muestran los espectros sincrónicos obtenidos para cinco tensioactivos utilizados en industrias textiles.

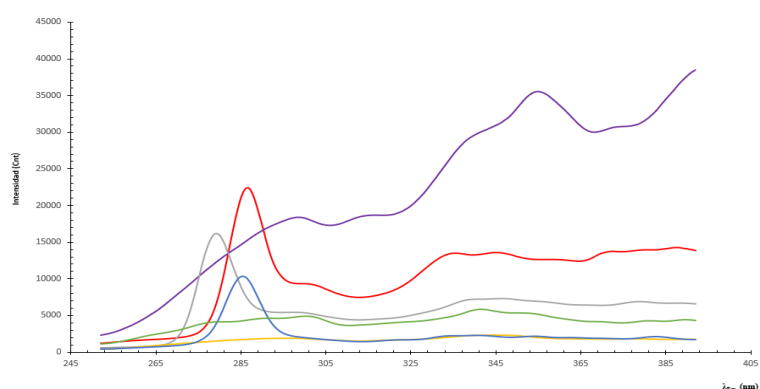


Figura 4.1. Espectros de fluorescencia sincrónica de tensioactivos de uso en industria textil. Rojo: Tensia MA; gris: Croscolor Miro; amarillo: Cotoblanco; azul: Unipal DL; verde: Octavon.

De los cinco tensioactivos analizados, tres de ellos presentaron respuesta fluorescente, cuyos nombres comerciales son: Tensia MA, Unipal DL y Croscolor Miro. Las longitudes de onda de emisión máxima que presentan los tres analitos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4.1. Longitud de onda de emisión de los tensioactivos que mostraron actividad fluorescente.			
Tensioactivo	Ionicidad	Principio Activo	Long. de onda de Emisión (nm)
Tensia MA	No Iónico	APEO	287
Unipal DL	Aniónico	ADBS	285
Croscolor Miro	Anfótero	AGFE	278

Los máximos de emisión de los tensioactivos se encuentran muy próximos entre sí, además se podrían encontrar mezclados en la matriz del efluente, y en la mezcla ternaria de los estándares empleado en la etapa de calibración y validación. Por lo que para su identificación y cuantificación se deberán de resolver.

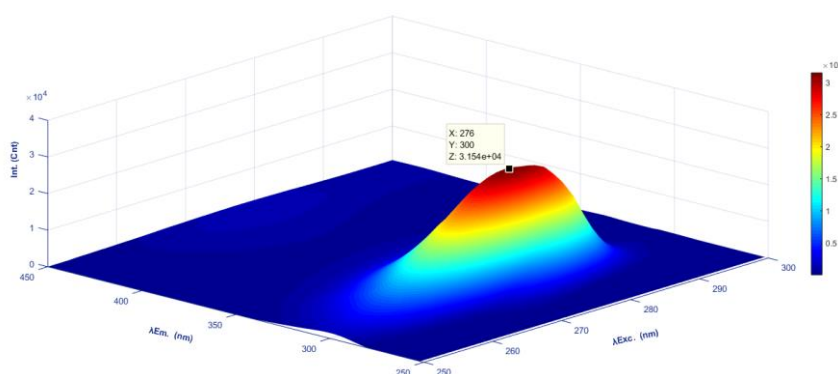
4.1.2 Espectros de los tensioactivos

En las figuras 4.2 a 4.4 se presentan para cada tensioactivo estándar la representación tridimensional y el perfil de emisión. La intensidad de la fluorescencia se representa en unidades arbitrarias de fluorescencia (Cnt).

4.1.2.1 APEO:

El tensioactivo alquilfenol etoxilado (APEO), presentó un máximo de intensidad fluorescente a 276 nm en longitud de onda de excitación, y a 300 nm en emisión, como se observa en la figura 4.2.

a-



b-

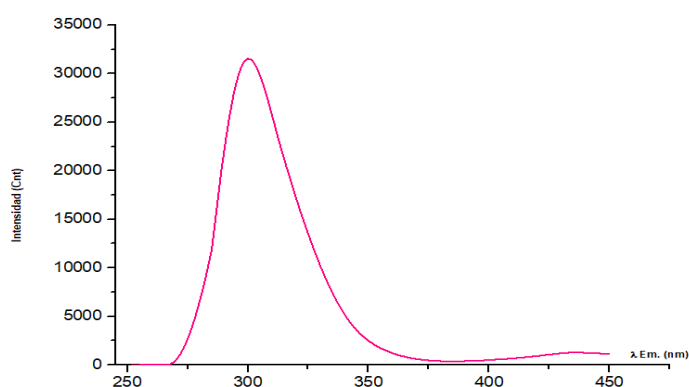
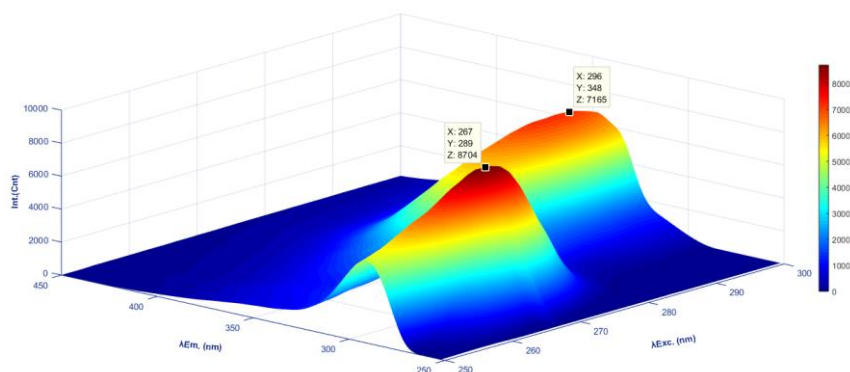


Figura 4.2. a-Superficie EEM; b- espectro de emisión tensioactivo APEO $\lambda_{exc} = 276 \text{ nm}$.

4.1.2.2 ADBS:

El tensioactivo ácido dodecibenzen sulfónico (ADBS), presentó dos máximos. El primer pico se presentó a 267 nm en longitud de onda de excitación y a 289 nm en emisión; y el segundo pico en excitación a 296 nm y en emisión a 348 nm.

a-



b-

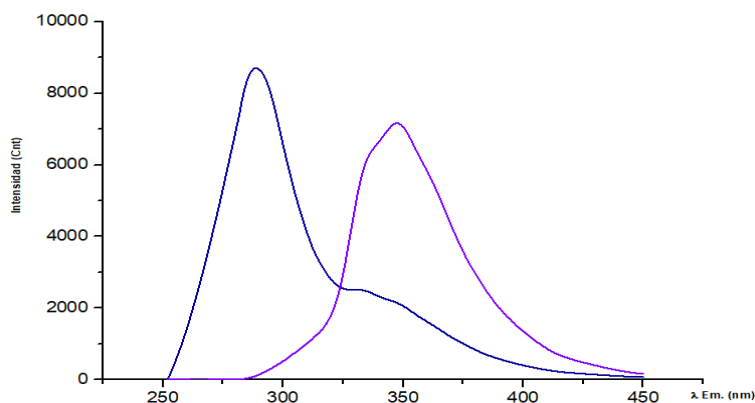
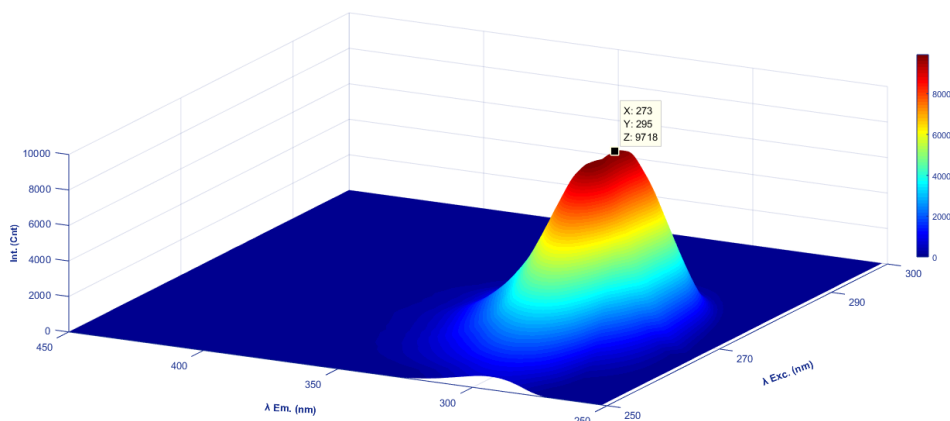


Figura 4.3. a-Superficie EEM; b- espectro de emisión tensioactivo ADBS.

4.1.2.3 Alcohol graso fenoxietoxilado (AGFE):

El tensioactivo AGFE presentó un máximo a 273 nm en longitud de onda de excitación y a 295 nm en emisión.

a-



b-

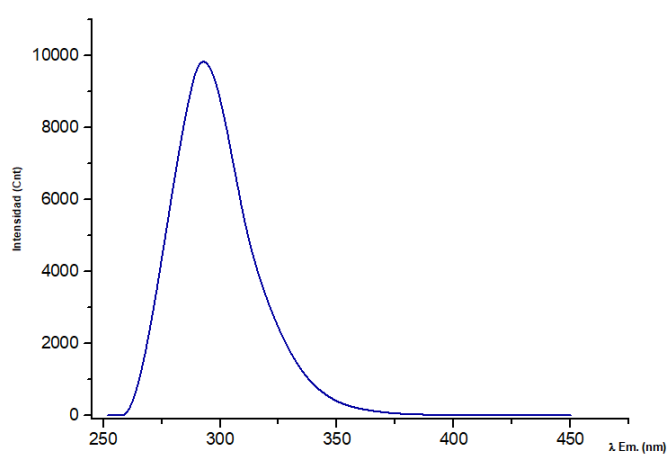


Figura 4.4. a-Superficie EEM; b- espectro de emisión tensioactivo AGFE $\lambda_{exc} = 273 \text{ nm}$.

4.1.3 Rango lineal

Los resultados de fluorescencia obtenidos para los tres tensioactivos estándares en su estudio de linealidad se presentan en la tabla 4.2 y figura 4.5.

Tabla 4.2. Concentraciones de los estándares de los tensioactivos para la determinación del rango lineal de trabajo.

APEO		ADBS		AGFE	
µg/mL	Intensidad (Cnt)	µg/mL	Intensidad (Cnt)	µg/mL	Intensidad (Cnt)
0	0	0	0	0	0
106	611,3	104	54,7	101	413,9
211	1360,9	202	89,8	202	751,2
528	2651,9	505	135,6	505	1409,8
739	3146,1	750	175	707	1734,56

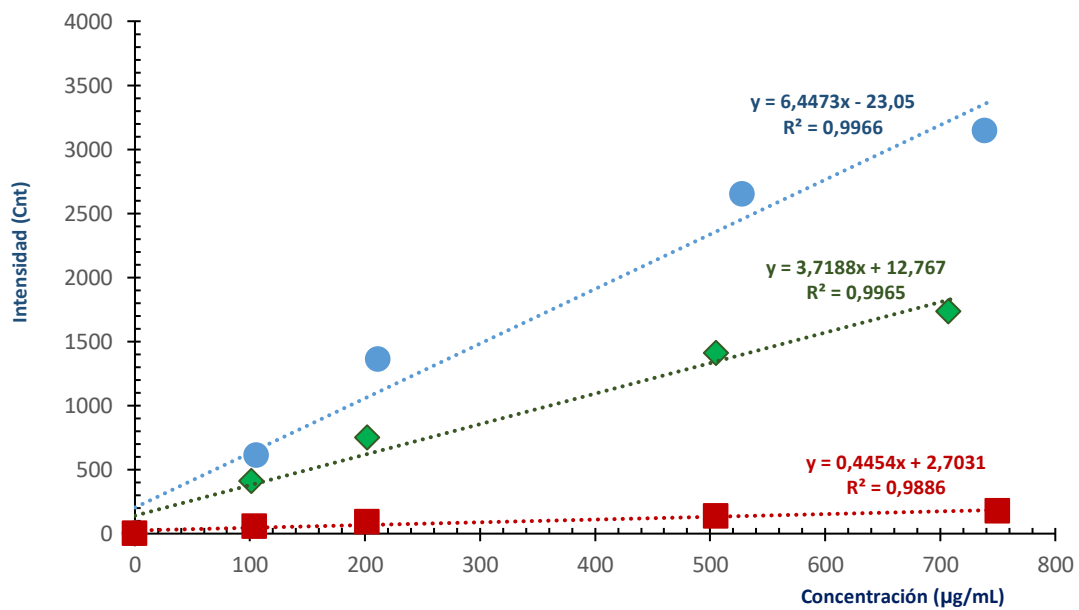


Figura 4.5. Gráfica del rango de concentración de los tensioactivos estudiados por espectrofluorimetría, rojo: ADBS; verde: AGFE; celeste: APEO.

El rango lineal de concentración para los tres tensioactivos estándares fue de 10 a 200 µg/mL. Mediciones posteriores fueron realizadas teniendo presente este rango de concentraciones, considerando, además, que en los diseños experimentales de mezcla la sumatoria de las concentraciones tampoco supere los 200 µg/mL.

4.1.4 Perfil de las mezclas ternarias

Para cada una de las mezclas ternarias se obtuvieron las correspondientes matrices EEMs donde las respuestas de cada uno de los tensioactivos se presentan completamente superpuestas (Figura 4.6), generando la necesidad de utilizar técnicas

de calibración de segundo orden para resolver el problema analítico para cada componente por separado. A continuación, se presentan los perfiles de los tres analitos de manera individuales, que se superponen en la señal de la mezcla ternaria (Li *et al.*, 2015).

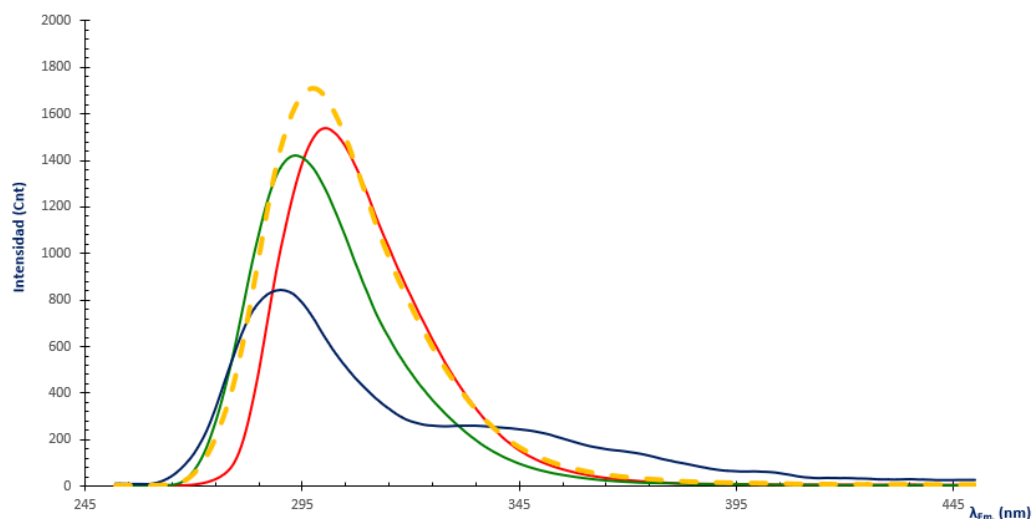


Figura 4.6. Espectro de emisión de la mezcla de tensioactivos (amarillo), y de los tensioactivo individuales APEO (rojo), AGFE (verde), y ADBS (azul).

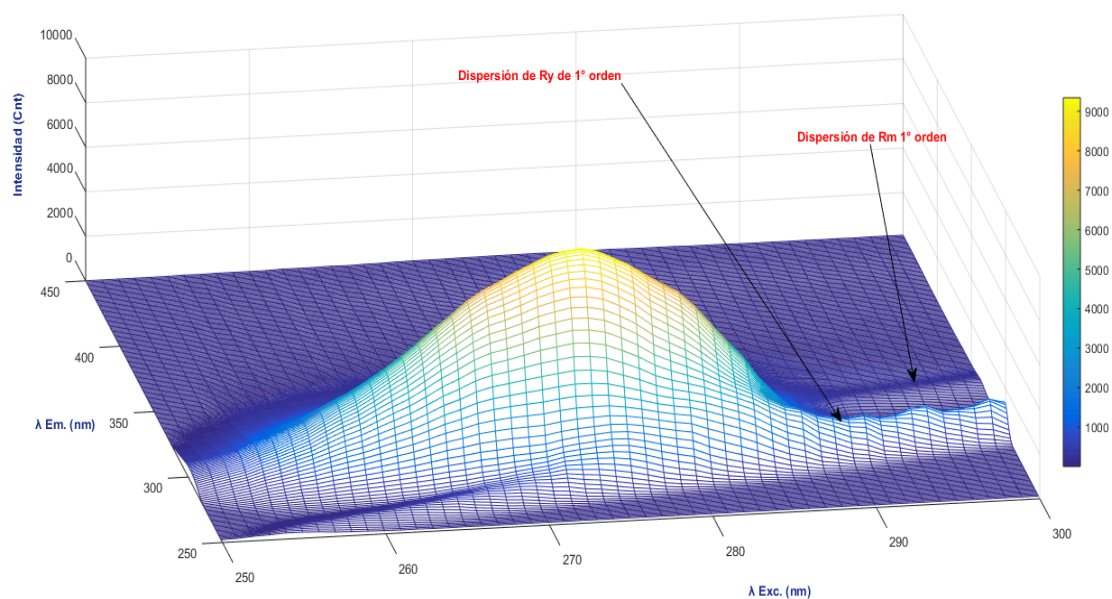
En este trabajo, la resolución de los perfiles superpuestos se realizó con los algoritmos de procesamiento para datos de segundo orden: Análisis del Factor Paralelo (PARAFAC) (Smilde, Bro and Geladi, 2004; Murphy *et al.*, 2013b; Elcoroaristizabal *et al.*, 2015), y Desdoblamiento por Mínimos cuadrados parciales con Bilinearización residual (U-PLS/RBL) (Bortolato and Olivieri, 2014; Escandar, 2014).

Previo a la instancia de procesamiento de las EEMs por los algoritmos citados, se trataron los efectos de dispersión.

4.1.5 Eliminación de los efectos de dispersión en las EEMs

Las EEMs de la mezcla ternaria presentaron efectos de dispersión de Rayleigh (Ry) y de Raman (Rm) como se puede apreciar en la figura 4.7, en ambos casos de primer orden (Elcoroaristizabal *et al.*, 2015). Se observó que la intensidad de ambos efectos de dispersión variaba con la concentración de las mezclas ternarias, haciéndose más notorias para mezclas de concentraciones más bajas.

a-



b-

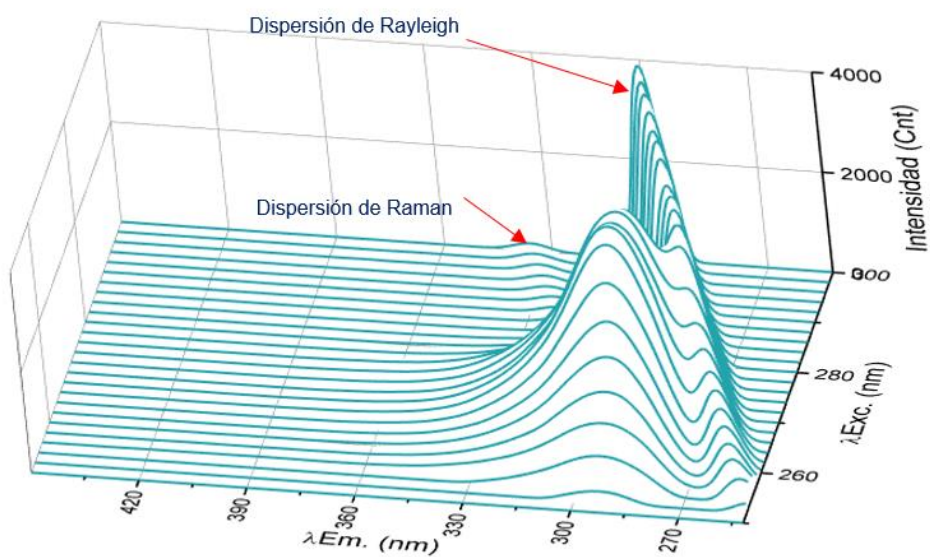


Figura 4.7. Dispersión de Rayleigh y Raman de primer orden a- concentración de la mezcla ternaria de 106 $\mu\text{g/mL}$. b- concentración de la mezcla ternaria de 41 $\mu\text{g/mL}$.

En primera instancia se eliminó la dispersión Ry, obteniéndose EEMs como la que se aprecia en la figura 4.8.

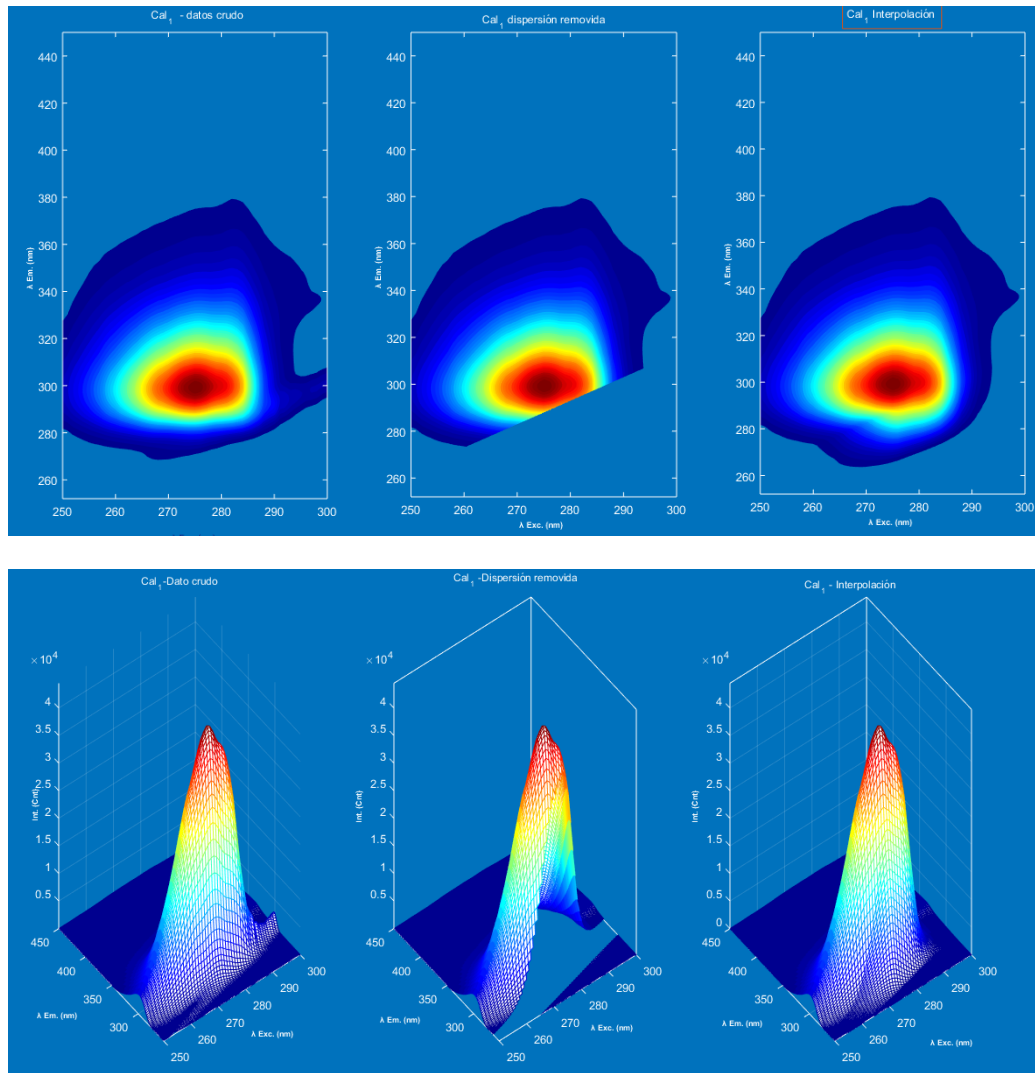
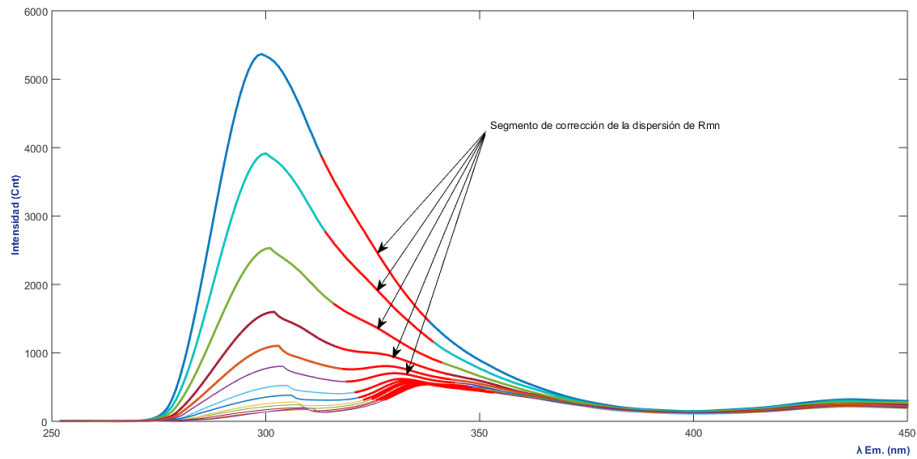


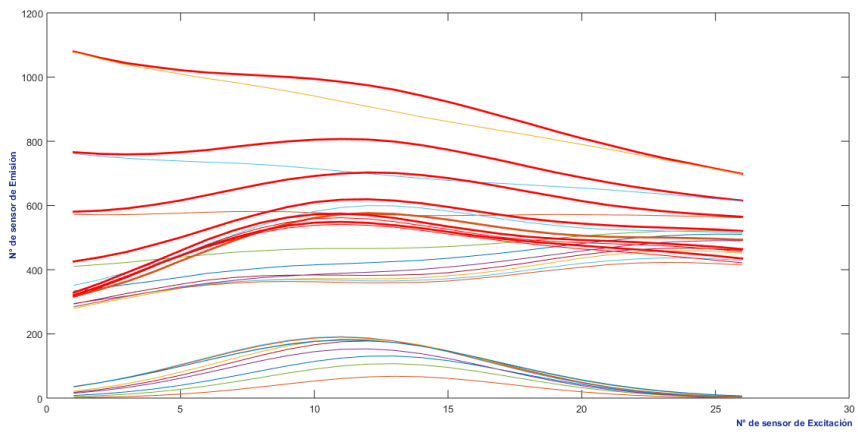
Figura 4.8. Esquema secuencial de remoción de la dispersión de Rayleigh de 1° orden.

Concluida la remoción de R_y , se procedió a la eliminación de la dispersión de R_m , especificando el número de sensor “k” donde se inicia esta dispersión. Cabe señalar que esta dispersión se encuentra integrada a la señal de interés, por lo que esta operación resulta muy sensible. La secuencia de corrección realizada por el algoritmo sobre cada uno de los sensores es por interpolación de funciones gaussianas. La corrección ejecuta hasta un cierto número de sensor que se indica en cada caso, donde ya no se observa ninguna dispersión de Raman, tal como se ejemplifica en la figura 4.9.

a-



b-



c-

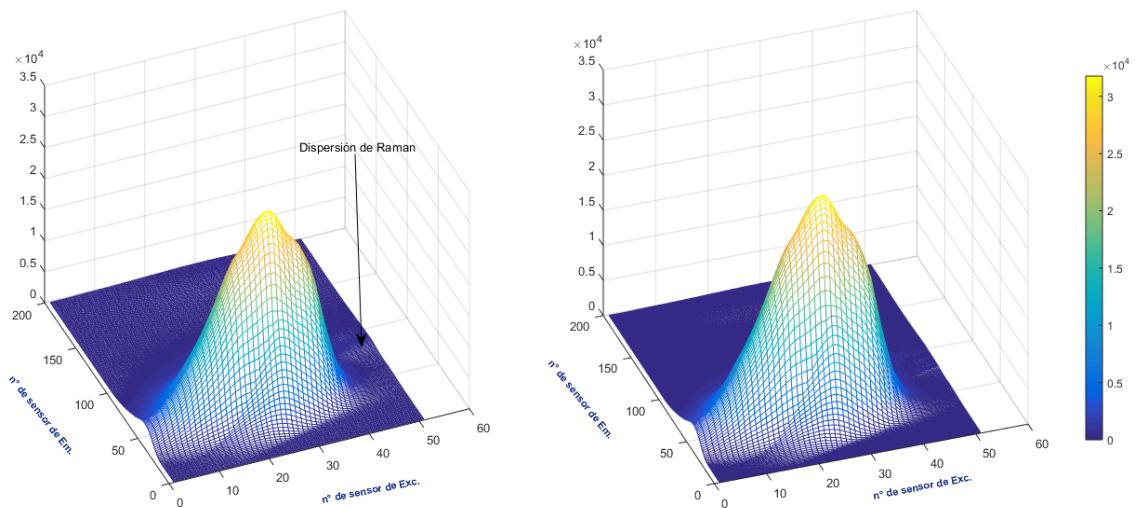


Figura 4.9. Diagrama de selección y corrección de la dispersión de Rm: a- sobre cada espectro afectado; b-interpolación para la corrección de la dispersión; c-superficie EEM antes y después de la remoción.

Usando el método de interpolación gaussiana, ha sido posible la eliminación del efecto de las dispersiones de Rayleigh y Raman para todas las EEMs, tanto de calibración, validación, muestras artificiales y muestras reales de efluentes.

4.2 Calibración multivariada: PARAFAC

4.2.1 Estimación del número de componentes PARAFAC

Inicialmente se estimó y corroboró el número de componentes adecuados para el modelado PARAFAC, evaluando el comportamiento de los parámetros como el desvío estándar residual y la consistencia del modelo. En la tabla 4.3 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4.3. Reporte de la descomposición PARAFAC							
N° de Componentes	1	2	3	4	5	6	7
Iteración	4	34	47	2500	2500	2500	2500
SSR	5,76.10 ¹⁰	1,40.10 ¹⁰	8,32.10 ¹⁰	5,57.10 ¹⁰	3,17.10 ¹⁰	2,13.10 ¹⁰	1,39.10 ¹⁰
S_{fit}	578,01	285,38	220,07	180,18	136,07	111,63	90,18
Varianza Explicada	98,94	99,74	99,85	99,90	99,94	99,96	99,97
Core Consistency	100	98,57	83,48	7,99	-1,26	-0,07	-0,61
SD de residuales	580	290	220	180	140	110	90

**SSR: suma de los residuales al cuadrado; S_{fit}: desvío estándar de los residuales; Core consistency: consistencia del modelo.*

Analizando los valores del desvío estándar de adecuación del modelado (S_{fit}), se observa que conforme aumenta el número de componentes, este valor va disminuyendo hasta estabilizarse en un cierto valor considerado como óptimo.

Otro indicador del número óptimo de componentes (Bro and Kiers, 2003), es el core consistency (consistencia del modelado), cuyo valor cae por debajo del 50 % cuando se ha alcanzado en número óptimo de componentes. Evaluando la tabla 4.3, este valor corresponde al número de componente igual a tres.

Además de los parámetros elegidos para evaluar el número óptimo de componentes para el algoritmo PARAFAC, también puede ser determinado gráficamente, como se observa en la figura 4.10.

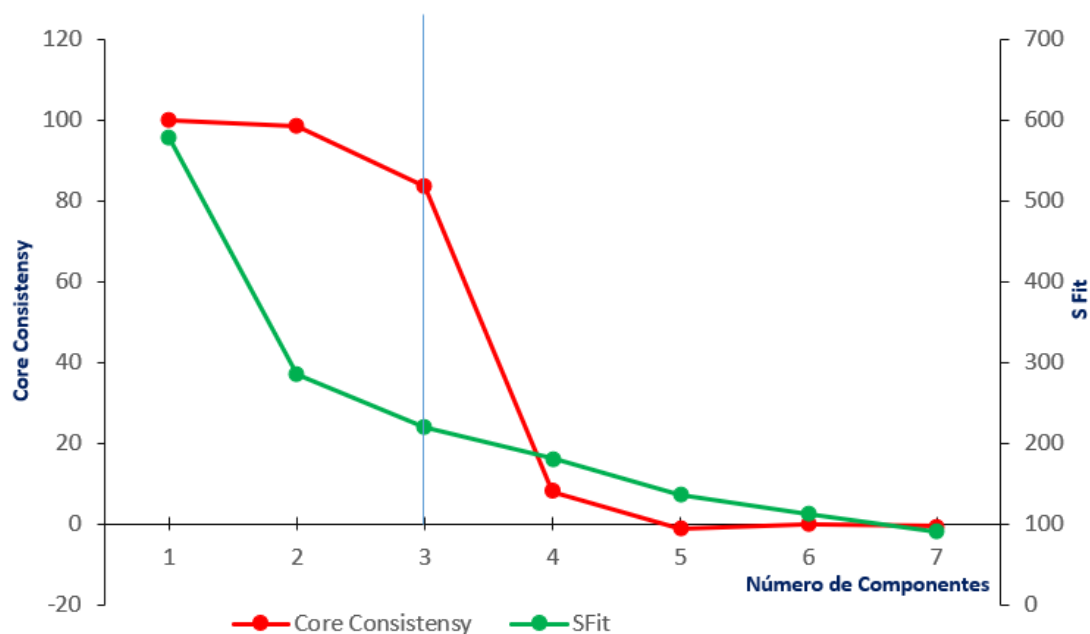


Figura 4.10. Estimación gráfica del número óptimo de componentes PARAFAC.

El número de componentes determinado analizando los valores de tabla como gráficamente es de tres. Con este valor se procedió a la elaboración de curva de calibrado.

4.2.2 Calibración PARAFAC

La identificación de los analitos de interés en las mezclas ternarias se realizó a través de la comparación de los perfiles PARAFAC recuperados en ambos modos de datos con los perfiles espectrales de los tensioactivos estándares individuales.

Siguiendo el esquema obtenido al realizar el diseño experimental (sección 3.3.1), en la interfaz del algoritmo (sección 3.3.5, figura 3.10), con el número óptimo de componentes determinado para el algoritmo, se carga el listado de archivo de calibración.

En la tabla 4.4, se presentan las cifras de mérito obtenidas para el modelo PARAFAC para la calibración, considerando 3 componentes:

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

Tabla 4.4. Reporte.	
Número de Componentes	3
Iteración	47
SSR	8,32.10 ⁹
S_{fit}	220,07
Varianza Explicada	99,85
Core consistency	83,48
SD de los residuales	220

*SSR: suma de los residuales al cuadrado; S_{fit}: desvío estándar de los residuales; Core consistency: consistencia del modelo.

El valor de consistencia del modelo es superior al 80 %, lo que indica un buen modelado para la calibración de la mezcla ternaria de los tensioactivos estándares. Se observa también que el modelo logró explicar prácticamente la totalidad de la variabilidad presente en los datos (superior a 99 %).

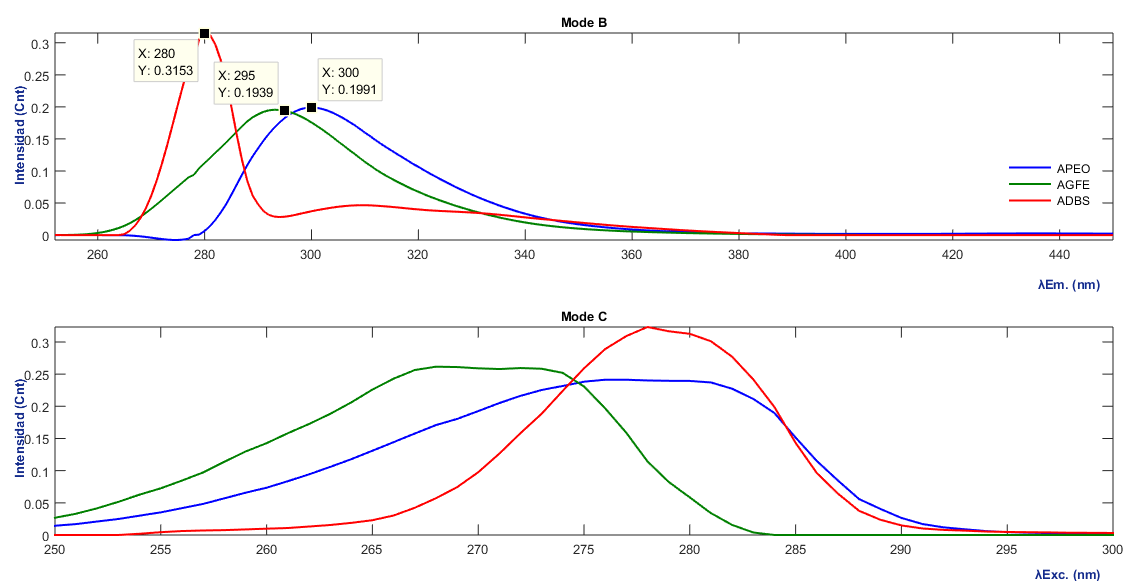


Figura 4.11. Perfiles de calibración en modo de Emisión (Mode B), y en modo excitación (Mode C), recuperados mediante algoritmo PARAFAC.

Los perfiles de calibración obtenidos luego de aplicar el modelado PARAFAC (figura 4.11), son concordantes con los perfiles determinados experimentalmente para cada uno de los tensioactivos analizados (Figuras 4.2 a 4.4), aunque se aprecia un cierto grado de corrimiento para el tensioactivo ADBS.

Tal como era de esperarse, el algoritmo demuestra una elevada capacidad para resolver los perfiles individuales de los tres tensioactivos que se encuentran solapados en las EEMs determinadas experimentalmente, permitiendo la identificación de los perfiles individuales de los tensioactivos analizados.

Con los valores de descomposición de cada una de las EEMs de calibración se obtuvieron las correspondientes curvas de calibrado.

4.2.2.1 Curva de Calibración APEO (PARAFAC)

Se presenta en la figura 4.12 la curva de calibración para el tensioactivo APEO, y su correspondiente gráfico de la distribución de los errores.

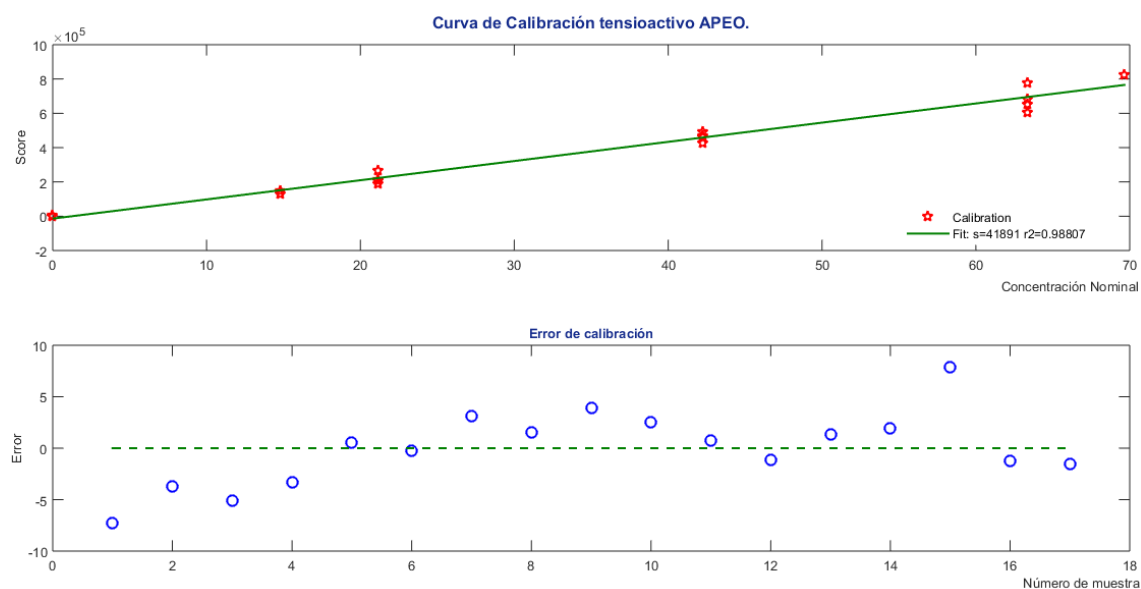


Figura 4.12. Curva de calibrado para el Alquil fenol etoxilado (APEO), y distribución de los errores.

La bondad del ajuste para la calibración de este tensioactivo es $R^2=0,98807$, indicando un buen grado de confianza para la cuantificación de este tensioactivo en muestra problema.

El error de calibración tiene una distribución al azar de acuerdo al número de muestra de calibración, lo cual posibilita continuar con el análisis multivariado.

4.2.2.2 Curva de Calibración AGFE (PARAFAC)

Se presenta en la figura 4.13 la curva de calibración para el tensioactivo AGFE, y su correspondiente gráfico de la distribución de los errores.

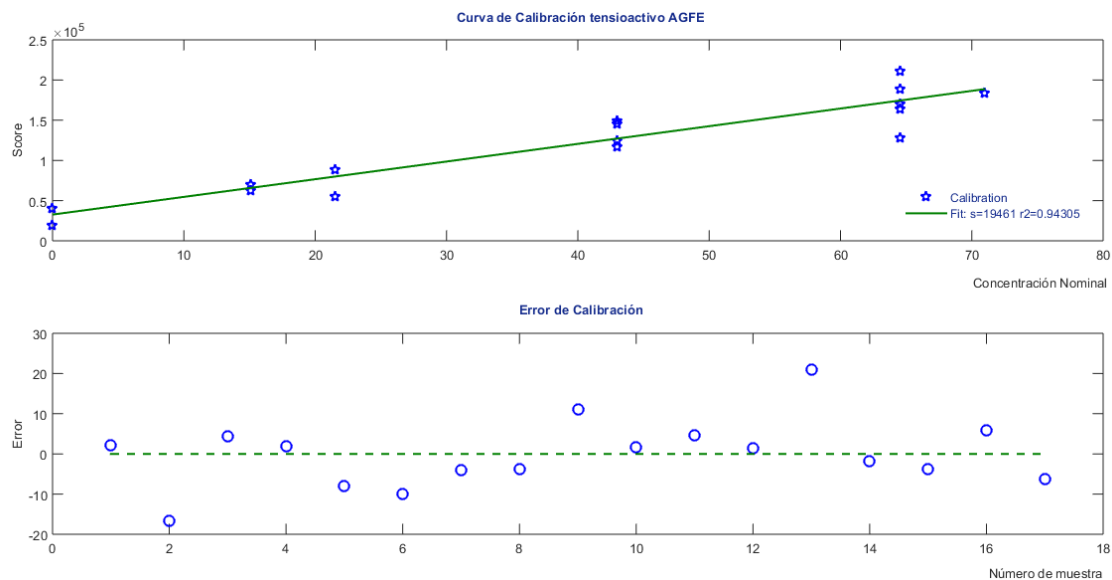


Figura 4.13. Curva de calibrado para el Alcohol graso feniletóxido (AGFE), y distribución de los errores.

La bondad del ajuste es $R^2= 0,94305$, y la distribución del error es al azar en función al número de muestra de calibrado, permitiendo continuar trabajando con el modelo PARAFAC para la calibración de este tensioactivo.

4.2.2.3 Curva de Calibrado ADBS (PARAFAC)

En la figura 4.14, se presenta la curva de calibración para el tensioactivo ADBS, y su correspondiente gráfico de la distribución de los errores.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

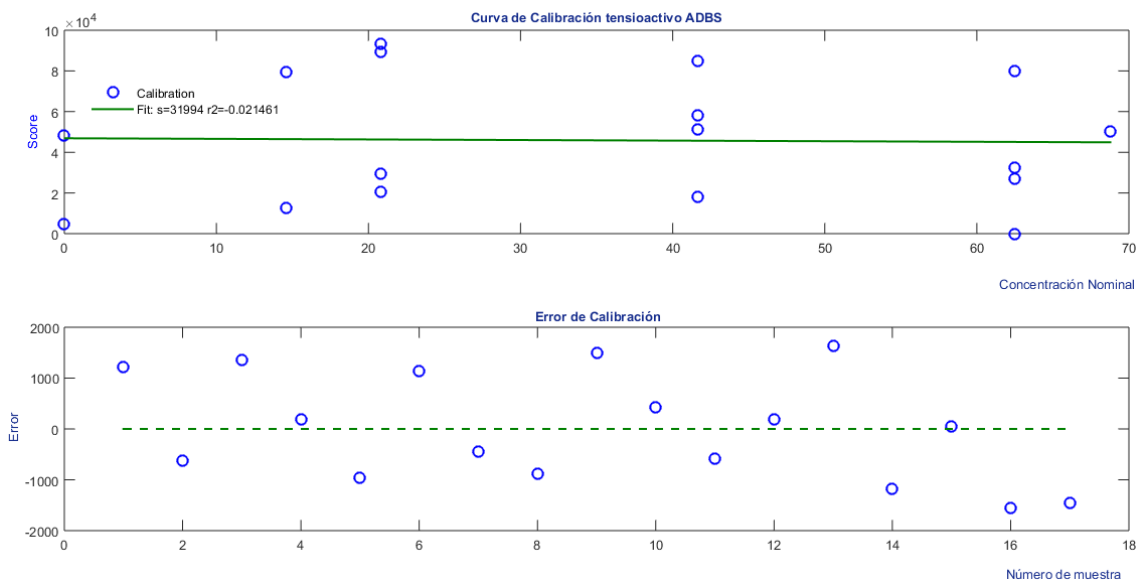


Figura 4.14. Curva de calibrado para el tensioactivo ADBS por PARAFAC, y distribución de los errores.

La curva de calibrado muestra una bondad de ajuste $R^2=0,021461$, insuficiente a pesar de que este tensioactivo poseía una buena intensidad de señal.

La distribución del error respecto al número de muestra de calibrado aparece en forma simétrica. Estos resultados experimentales indican que el algoritmo PARAFAC no brinda resultados satisfactorios para la calibración del tensioactivo ADBS en las condiciones que se realizaron las mediciones. La posible causa de este hecho puede encontrarse en que este tensioactivo presenta dos máximos de emisión (Figura 4.3 b), generando dificultad al algoritmo ya que los perfiles de emisión y de excitación para este analito no son los mismos en todas las muestras analizadas, provocando pérdida de trilinealidad, requisito necesario para el modelado con este algoritmo.

Con este resultado, se optó por considerar en la calibración, validación y aplicación a muestra problema por PARAFAC sólo dos de los tensioactivos, APEO y AGFE.

4.2.2.4 Cifras de mérito:

En la tabla 4.5 se presentan las cifras de mérito obtenidas para la calibración de dos de los tensioactivos con el algoritmo PARAFAC.

	APEO	AGFE
Sensibilidad (AFU)	7600	1970
Sensibilidad Analítica (mL/μg)	34,42	8,75
LOD (μg/mL)	5,75	10,70
LOQ (μg/mL)	17,42	32,36

* AFU: unidades arbitrarias de fluorescencia.

Analizando los valores presentados, se observa que las cifras de mérito para la calibración de los tensioactivos APEO y AGFE resultan adecuadas, indicando el correcto modelado de las señales generadas por las distintas concentraciones de los estándares de los mismos desde el punto de vista de la sensibilidad, LOD y LOQ. Con respecto al tensioactivo ADBS, las cifras de mérito no se presentan dado a que resultan objetables para la calibración con PARAFAC.

4.2.3 Validación PARAFAC

Las muestras del conjunto de validación correspondieron a mezclas ternarias preparadas con concentraciones de analito establecidas empleando el diseño central compuesto (Tabla 3.8), y diferentes a las concentraciones utilizadas para la calibración. Con EEMs de validación libre de efectos de dispersión, se generó un listado en formato (.txt), con el número de muestras de validación que se carga en la interfaz del algoritmo (Figura 3.10), empleando las mismas condiciones, restricciones y número de componentes que en el paso de calibración. Los resultados obtenidos se describen en las secciones siguientes.

4.2.3.1 Validación APEO

En el caso del tensioactivo APEO se observa que las concentraciones de las mezclas de validación (cruces rojas en la Figura 4.15) se distribuyen sobre la curva de calibración determinada en la etapa anterior.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

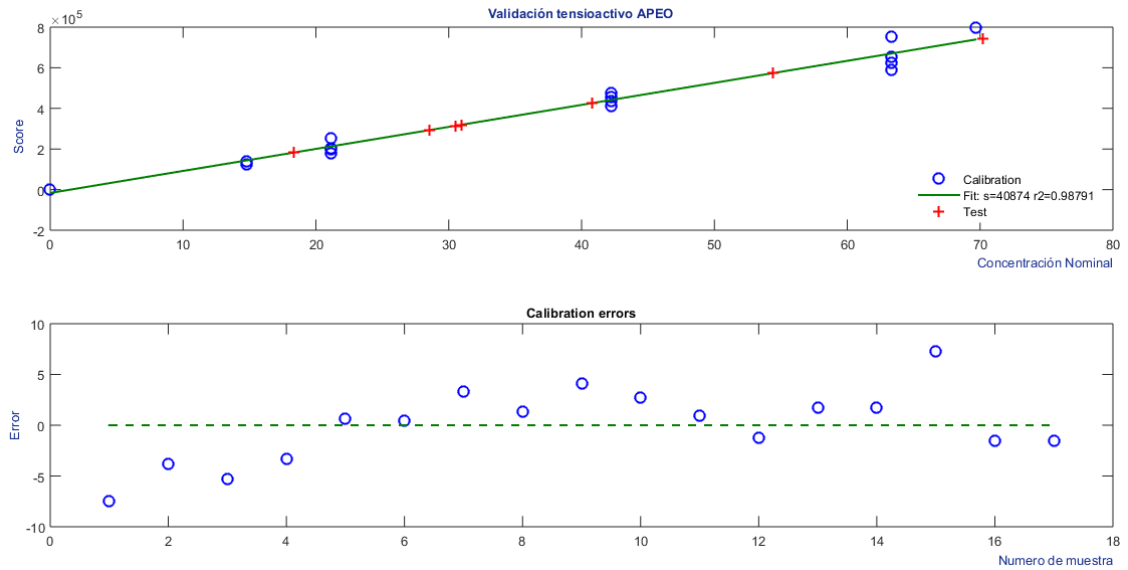


Figura 4.15. Curva de Validación tensioactivo APEO.

4.2.3.2 Validación AGFE

Al igual que en el caso anterior, las respuestas para las mezclas de validación del tensioactivo AGFE aparecen sobre la curva de calibrado (figura 4.16), indicando una correcta predicción de las mismas.

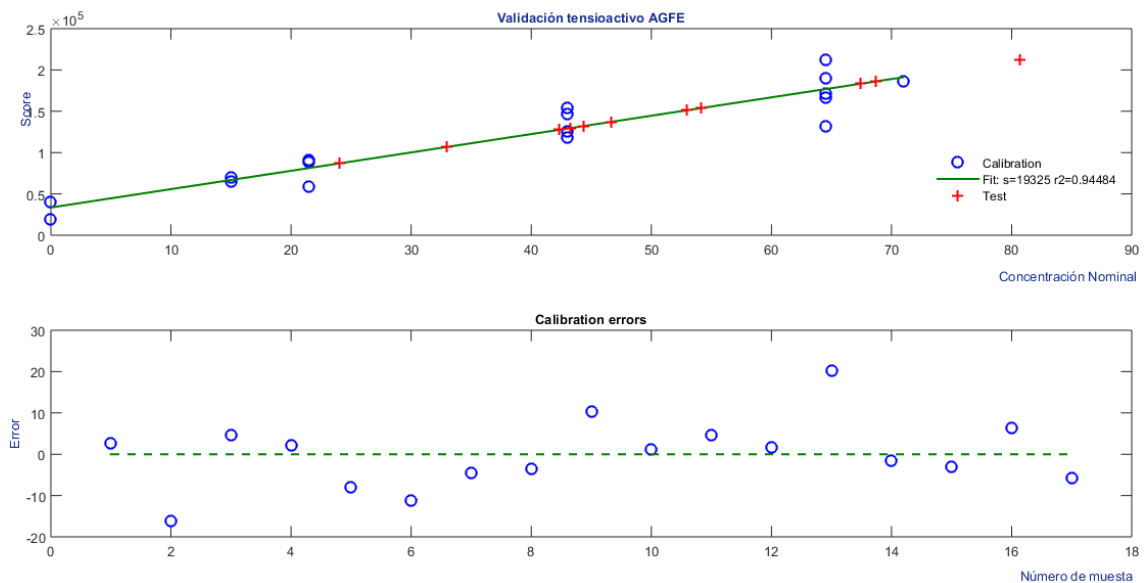


Figura 4.16. Curva de Validación tensioactivo AGFE.

4.2.3.3 Tabla de Validación modelado PARAFAC

Para evaluar la exactitud del modelo, se compararon los valores de concentración predichos obtenidos al aplicar el algoritmo, con los valores nominales de cada analito (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Concentración nominal versus concentración predicha por PARAFAC.								
APEO					AGFE			
	Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Predicha ($\mu\text{g/mL}$)	SD	% Recup.	Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Predicha ($\mu\text{g/mL}$)	SD	% Recup.
1	31,66	30,94	0,96	97,71	32,25	43,11	1,64	133,69
2	67,55	70,23	1,73	103,98	68,80	53,48	1,89	77,73
3	52,77	54,39	1,23	103,06	53,75	46,85	1,70	87,15
4	31,66	30,52	0,97	96,40	32,25	32,85	1,66	101,86
5	31,66	28,56	0,99	90,21	53,75	67,19	2,51	125,01
6	21,11	18,35	1,19	86,93	21,50	23,78	1,91	110,60
7	42,22	40,77	0,97	96,58	43,00	42,35	1,63	98,49
8	21,81	24,93	1,05	114,35	75,68	80,72	3,35	106,66
9	43,13	45,63	1,04	105,81	69,57	68,69	2,65	98,73
10	44,32	41,58	0,98	93,82	50,20	54,17	1,96	107,91
11	62,80	61,51	1,45	97,96	62,53	44,40	1,69	71,01

La validación para los tensioactivos APEO y AGFE resultó satisfactorio, con porcentajes de recuperación promedio de 100,10 % para APEO, y de 102,13 % para AGFE; algunas muestras de validación estuvieron sobreestimados en hasta un 25 %.

4.2.4 Prueba de Región elíptica de confianza conjunta (EJCR)

Con el objeto de comparar los valores de concentración predichos por el modelo PARAFAC con los valores nominales de concentración en las muestras de validación se utilizó la prueba de regiones elípticas de confianza conjunta (EJCR). Se construyeron

elipses a partir del ajuste por cuadrados mínimos ordinarios de las concentraciones nominales versus las predichas por el algoritmo, y se comparó el valor de la pendiente y la ordenada al origen con sus valores ideales 1 y 0. Si los métodos son exactos (no presentan errores constantes ni proporcionales), estos valores ideales (habitualmente señalado con una cruz) estarán incluidos dentro de la elipse (Gonza, Herrador and Asuero, 1999; Escandar, 2014).

4.2.4.1. APEO

Para este tensioactivo se observa claramente que el valor predicho para la pendiente y ordenada al origen se encuentra dentro de la región limitada por la elipse (figura 4.17).

Método: WLS. Pendiente: $0,99 \pm 0,11$. Desvío Estándar: 0,05862

RMSE: 2,34 $\mu\text{g/mL}$.

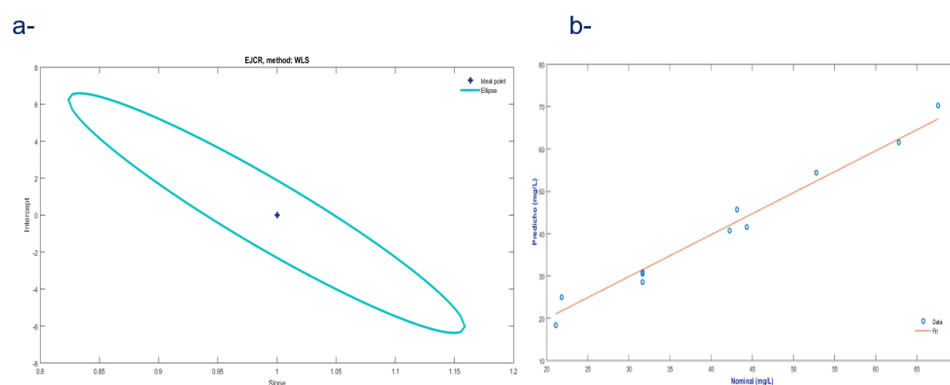


Figura 4.17. a-Región elíptica para un 95 % de confianza, la cruz en la gráfica señala el punto teórico (1, 0).

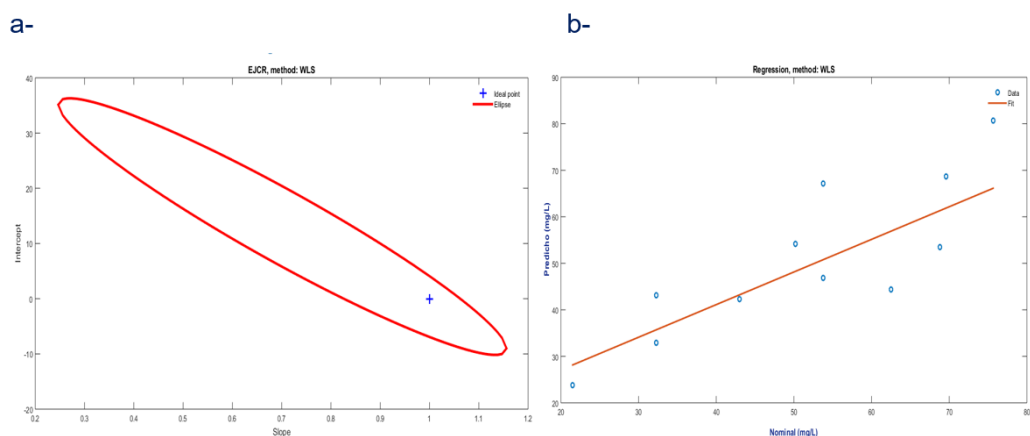
b-Concentración predicha por PARAFAC en la muestra de validación en función de los valores nominales.

4.2.4.2. AGFE

Como se puede observar en la Figura 4.18, la elipse generada por los valores predichos del tensioactivo AGFE mediante el algoritmo PARAFAC contienen los valores teóricos de ordenada al origen (0) y pendiente (1).

Método: WLS. Pendiente: $0,70 \pm 0,29$ Desvío Estándar: 0,16

RMSE: 9,1 $\mu\text{g/mL}$.



**Figura 4.18. a-Región elíptica para un 95 % de confianza, la cruz en la gráfica señala el punto teórico (1, 0).
b-Concentración predicha por PARAFAC en la muestra de validación en función de los valores nominales para el tensioactivo AGFE.**

La aplicación de esta prueba demuestra que la validación modelada para los tensioactivos APEO y AGFE resultó aceptable y permitió obtener concordancia entre los valores de concentración nominal y concentración predicha.

4.2.5 Muestras artificiales

Evaluada la capacidad de predicción del modelo PARAFAC en la validación de muestras de concentración conocidas, se han seleccionado soluciones de concentración conocida de tensioactivos (tabla 3.9), a los que se le ha añadido un posible interferente, el colorante de blanco óptico, a una concentración final de 100 µg/mL.

Los perfiles recuperados por PARAFAC se muestran en la figura 4.19, donde fue necesario incluir un cuarto componente en la regresión debido a la presencia del interferente.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

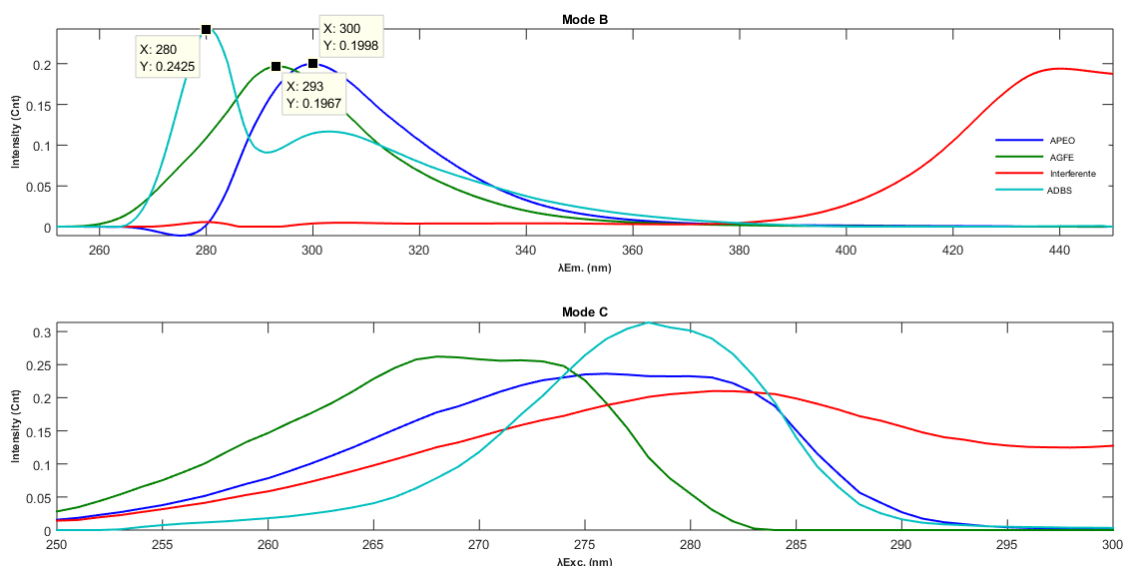


Figura 4.19. Perfiles de recuperación del modelado PARAFAC donde se identifican los tensioactivos estándares y el interferente (en línea de color verde).

El algoritmo PARAFAC fue capaz de resolver los espectros y predecir las concentraciones para dos de los tensioactivos en las muestras en presencia de interferente.

A continuación, en la tabla 4.7 se pueden comparar los resultados predichos para el tensioactivo APEO y AGFE realizada por el algoritmo PARAFAC en presencia de interferente; al igual que en la sección anterior, el tensioactivo ADBS no fue considerado para el modelado por PARAFAC.

Tabla 4.7. Concentración Nominal y Predicha para muestras test con interferente* (PARAFAC)								
Muestra	APEO				AGFE			
	Nominal (µg/mL)	Predicho (µg/mL)	SD	% Recup.	Nominal (µg/mL)	Predicho (µg/mL)	SD	% Recup.
1	32,32	32,15	0,99	99,47	34,50	36,26	1,74	105,10
2	14,50	15,84	1,30	109,24	23,00	23,09	2,08	100,39
3	15,22	19,01	1,22	124,90	13,00	14,54	2,48	111,85
4	5,55	6,83	1,59	123,06	22,25	24,04	2,04	108,04
5	15,66	15,71	1,31	100,32	27,00	28,76	1,88	106,52
6	22,77	25,06	1,08	110,06	35,05	33,94	1,77	96,83
7	31,32	34,39	0,98	109,80	33,50	34,95	1,75	104,33

*Concentración del interferente 100 µg/mL.

Los resultados obtenidos para las concentraciones predichas demuestran un elevado grado de recuperación de los analitos a pesar de la presencia del interferente fluorescente en las muestras preparadas artificialmente. Los porcentajes de recuperaciones medias obtenidas fueron de 111 % para APEO, y 105 % para el AGFE. Con estos resultados, el algoritmo PARAFAC ha demostrado capacidad y habilidad para modelar y cuantificar los tensioactivos APEO y AGFE en presencia de interferentes.

4.3 Calibración multivariada: U-PLS/RBL

La calibración multivariada de EEMs obtenidas para mezclas ternarias de tensioactivos empleados en la industria textil, no resultó satisfactoria para tres analitos empleando PARAFAC, en particular para el tensioactivo ADBS, por lo que se propone modelar empleando el algoritmo de cuadrados mínimos parciales desdoblados con el fin de lograr modelar y predecir la presencia de los tres tensioactivos.

4.3.1 Calibración

Para la calibración con U-PLS-RBL se trabajó con mezclas de calibración empleando un diseño central compuesto, cuyas concentraciones se detallan en la sección 3.3.1.

Inicialmente se estimó el número de componentes o factores adecuado para la calibración, pero a diferencia del algoritmo PARAFAC, la estimación se realiza para cada tensioactivo estándar por separado y no para las mezclas ternarias en su conjunto. El procesamiento de datos por U-PLS/RBL se realizó en la misma interfaz gráfica MVC2, la carga de datos y selección del modelado se realizó de manera semejante a como se mostró en la sección 3.3.5.

4.3.1.1 Estimación del número de componentes para APEO

En una primera aproximación, se tuvieron en cuenta un alto valor de factores, para evaluar los parámetros obtenidos que se muestran en la tabla 4.8.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

Tabla 4.8. Reporte de Parámetros para la estimación de variables latentes.				
N° de Variable Latentes	PRESS	SEP	F	p
1	880,64	7,20	8,59	0,99
2	292,44	4,15	2,85	0,98
3	167,18	3,14	1,63	0,83
4	125,82	2,72	1,23	0,66
5	102,78	2,46	1,00	0,50
6	134,96	2,82	1,32	0,71
7	102,49	2,46	1,00	0,49

*PRESS: suma de los cuadrados del error de predicción; SEP: error de predicción estándar; F: consiente de PRESS; p: estadístico.

Para la determinación del número de componentes se consideró como valor crítico de p aquel valor que sea menor a 0,75. En la tabla 4.8, esta condición se da para el número de componente o factor igual a cuatro. Es decir, para el modelado de calibración para el tensioactivo APEO, este algoritmo necesitó cuatro variables latentes para calibrar el sistema adecuadamente. La curva de calibración se muestra en la figura 4.20.

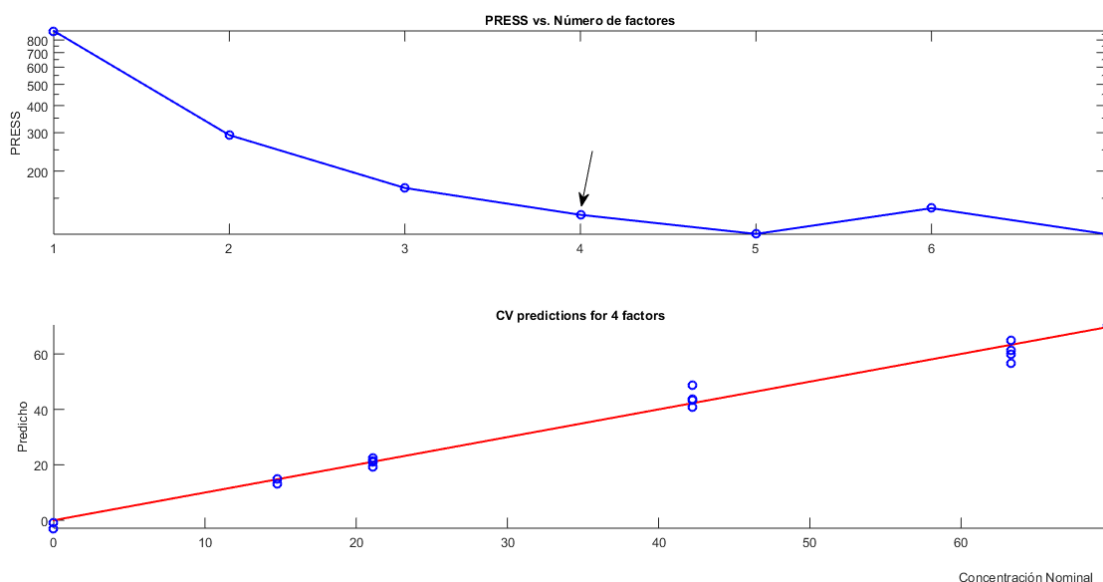


Figura 4.20. Curva de Calibración tensioactivo APEO modelado por el algoritmo U-PLS/RBL.

4.3.1.2 Estimación del número de componentes para ADBS

En una primera aproximación, se tuvieron en cuenta los parámetros obtenidos que se muestran en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Reporte de Parámetros para la estimación de variables latentes.				
Nº de Variable Latentes	PRESS	SEP	F	P
1	1,37.10 ⁴	28,44	6,80	0,99
2	1,19.10 ⁴	26,44	5,89	0,99
3	4,81.10 ³	16,82	2,38	0,96
4	2,41.10 ³	11,92	1,19	0,64
5	2,36.10 ³	11,78	1,17	0,62
6	2,45.10 ³	12,01	1,21	0,65
7	2,02.10 ³	10,90	1,00	0,49

*PRESS: suma de los cuadrados del error de predicción; SEP: error de predicción estándar; F: consiente de PRESS; p: estadístico.

Para el tensioactivo ADBS, el número óptimo de variables latentes necesario para explicar el sistema fue de cuatro. La curva de calibrado es lineal para el rango de concentraciones con las cuales se trabajó las mezclas ternarias, lo cual se aprecia en la figura 4.21.

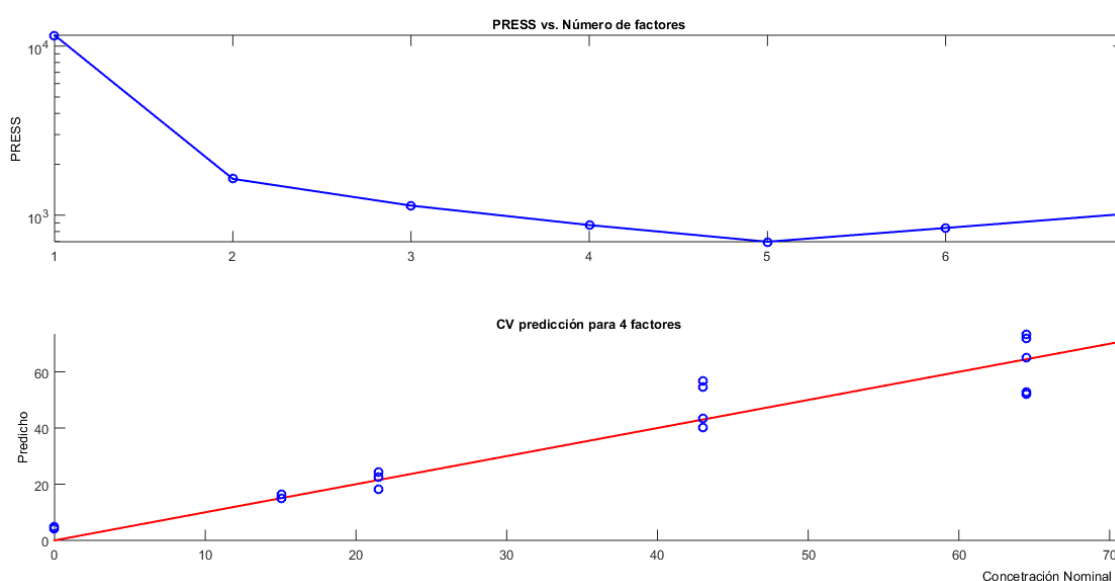


Figura 4.21. Curva de Calibración tensioactivo ADBS modelado por el algoritmo U-PLS/RBL

4.3.1.3 Estimación del número de componentes para AGFE

En una primera aproximación, se tuvieron en cuenta los parámetros obtenidos que se muestran en la tabla 4.10.

N° de Variable Latentes	PRESS	SEP	F	p
1	1,16.10 ⁴	26,12	16,66	0,99
2	1,64.10 ³	9,82	2,35	0,96
3	1,13.10 ³	8,19	1,64	0,8
4	874,03	7,17	1,26	0,68
5	696,37	6,40	1,00	0,49
6	840,13	7,03	0,00	0,00
7	1,016.10 ³	7,73	0,00	0,00

*PRESS: suma de los cuadrados del error de predicción; SEP: error de predicción estándar; F: consiente de PRESS; p: estadístico.

Con cuatro variables latentes se logra explicar el modelo, y se trazó la curva de calibrado, que se muestra en la figura 4.22.

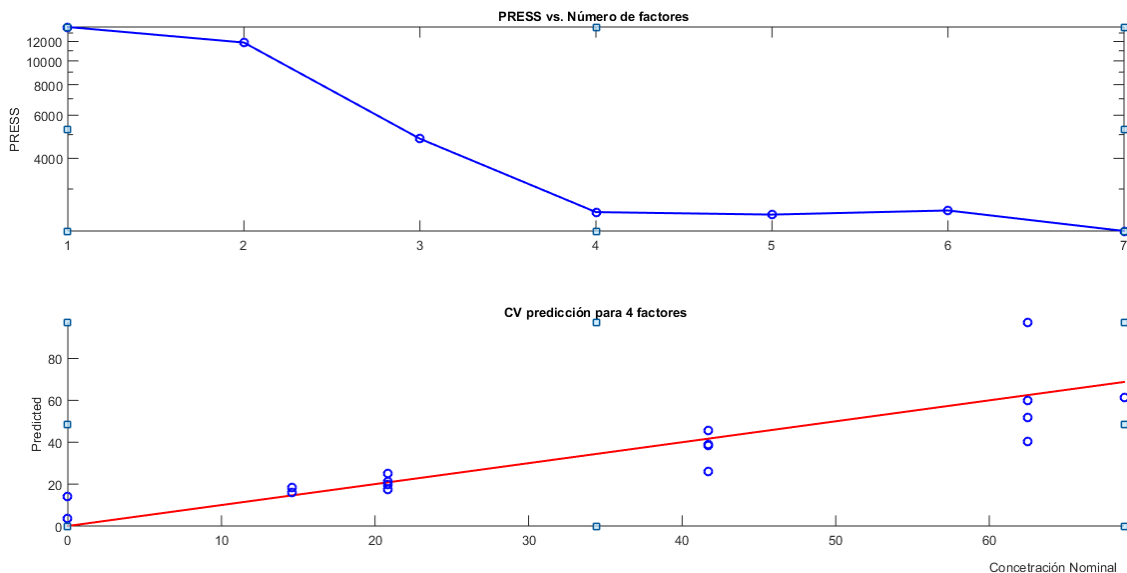


Figura 4.22. Curva de Calibración tensioactivo AGFE modelado por el algoritmo U-PLS/RBL.

Para los tres tensioactivos, el número de componentes (o factores) calculado por el algoritmo es cuatro, valor que se utilizó en todas las instancias desde la calibración hasta la aplicación a muestras problemas.

4.3.2 Validación U-PLS/RBL

Se realizó un ensayo de validación del modelo obtenido, para evaluar la capacidad y la predicción de este algoritmo para mezclas ternarias de tensioactivos, empleando las concentraciones detalladas en la tabla 3.8.

En la tabla 4.11 se presentan los resultados de las concentraciones predichas por el algoritmo U-PLS/RBL y las concentraciones nominales de las mezclas ternarias de tensioactivos. Según se puede observar, los porcentajes de recuperación promedio son: 99,6 % para el APEO; 98,3 % para el ADBS y 99,6 % para el AGFE.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

Tabla 4.11. Concentración Nominal y concentración predicha en la validación por UPLS/RBL

APEO				ADBS				AGFE				
	<i>Concentración Nominal (µg/mL)</i>	<i>Concentración Predicha (µg/mL)</i>	<i>SD</i>	<i>% de Recup.</i>	<i>Concentración Nominal (µg/mL)</i>	<i>Concentración Predicha (µg/mL)</i>	<i>SD</i>	<i>% de Recup.</i>	<i>Concentración Nominal (µg/mL)</i>	<i>Concentración Predicha (µg/mL)</i>	<i>SD</i>	<i>% de Recup.</i>
1	31,66	34,45	0,46	108,81	31,26	35,47	3,70	113,47	32,25	33,83	2,46	108,81
2	67,54	62,71	0,78	92,85	66,69	55,69	4,72	83,51	68,80	65,92	2,76	92,85
3	52,77	54,47	0,59	103,22	52,10	52,84	2,73	101,42	53,75	51,88	1,85	103,22
4	31,66	32,83	0,56	103,69	52,10	51,39	2,70	98,64	32,25	30,25	1,35	103,69
5	31,66	27,89	0,47	88,09	52,10	39,25	2,58	75,34	53,75	64,31	1,63	88,09
6	21,11	20,51	0,38	97,17	20,84	22,98	1,73	110,27	21,50	23,20	1,08	97,17
7	42,22	42,26	0,42	100,10	41,68	38,19	2,19	91,63	43,00	43,29	1,16	100,10
8	21,81	22,10	0,59	101,35	61,52	61,00	3,52	99,15	75,68	70,81	2,06	101,35
9	43,13	43,03	0,49	99,78	40,25	39,01	2,86	96,92	69,57	65,73	1,85	99,78
10	44,32	45,40	0,48	102,44	16,25	18,82	4,44	115,82	50,20	46,03	2,43	102,44
11	62,80	61,52	0,48	97,97	20,47	19,47	3,10	95,11	62,53	56,89	2,27	97,97

Las cifras de mérito obtenidas para la validación por U-PLS/RBL son las que se presentan a continuación:

Tabla 4.12. Cifras de mérito modelado UPLS/RBL			
	APEO	ADBS	AGFE
Sensibilidad (AFU L/mg)	2720	369	1010
Sensibilidad Analítica (L/mg)	273,83	4,10	10,25
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,16	0,83	0,38
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,45	2,77	1,15

* AFU L/mg: unidades arbitrarias de fluorescencia.

Los valores obtenidos para las cifras de mérito para la validación con el algoritmo U-PLS/RBL, mejoraron respecto a los valores obtenidos por el algoritmo PARAFAC (tabla 4.4).

4.3.3 Prueba de Región elíptica de confianza conjunta (EJCR)

Se evaluó el modelo obtenido mediante los gráficos que se presentan en las figuras 4.23 a 4.25, de la región elíptica de confianza conjunta.

4.3.3.1 APEO:

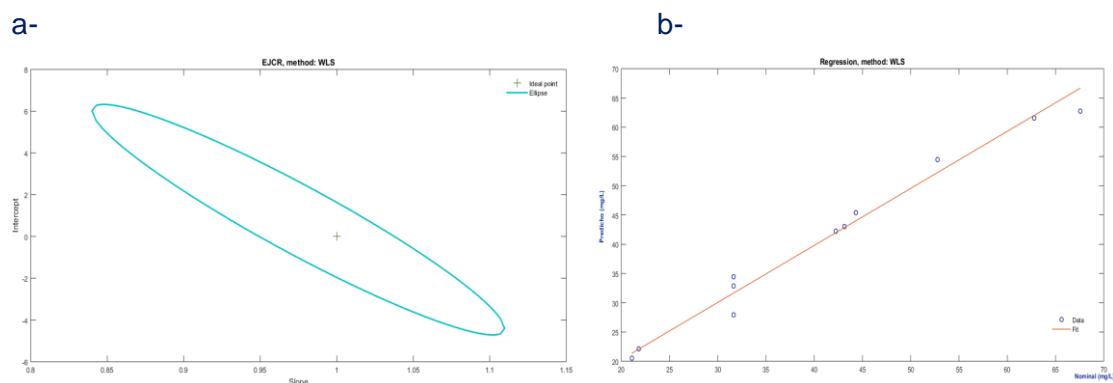


Figura 4.23. a- Región elíptica para un 95 % de confianza, la cruz en la gráfica señala el punto teórico (1, 0).

b- recta de regresión para la concentración nominal versus la concentración predicha.

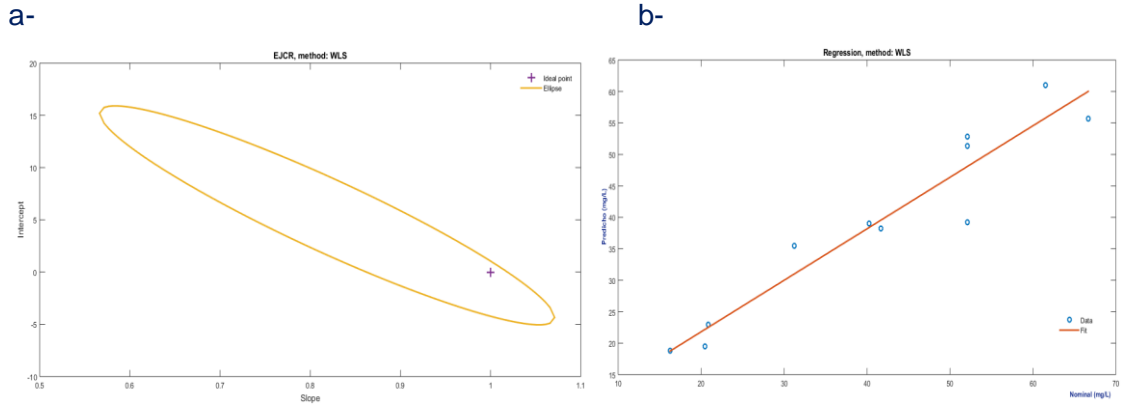
Método: WLS. Pendiente: $0,97 \pm 0,085$. Desvío Estándar: 0,05

RMSE: 2,2 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.3.2 ADBS:

Método: WLS. Pendiente: $0,82 \pm 0,16$. Desvío Estándar: 0,09.

RMSE: 5,5 µg/mL.

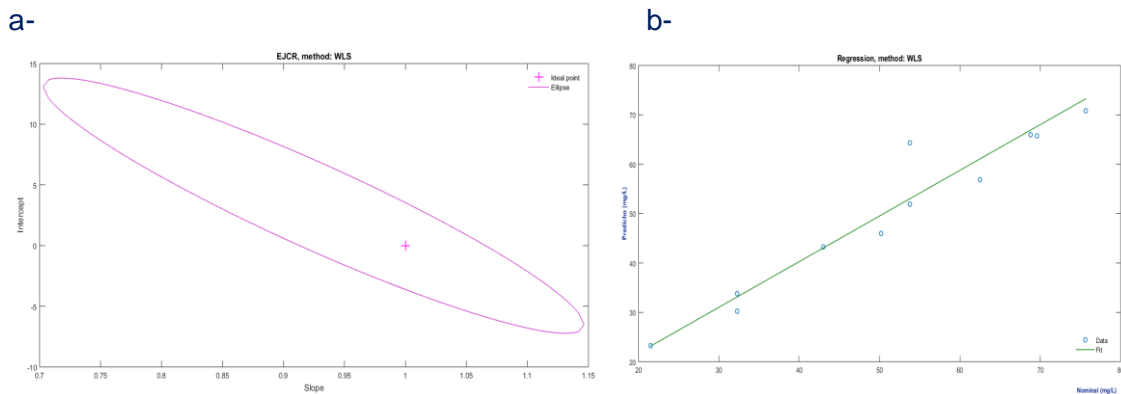


**Figura 4.24. a- Región elíptica para un 95 % de confianza, la cruz en la gráfica señala el punto teórico (1, 0).
b- recta de regresión para la concentración nominal versus la concentración predicha.**

4.3.3.3 AGFE:

Método: WLS. Pendiente: $0,92 \pm 0,14$. Desvío Estándar: 0,08

RMSE: 4,48 µg/mL.



**Figura 4.25 a- Región elíptica para un 95 % de confianza, la cruz en la gráfica señala el punto teórico (1, 0).
b- recta de regresión para la concentración nominal versus la concentración predicha.**

Los resultados de la prueba de confianza de la región elíptica muestran que el modelado con el algoritmo U-PLS/RBL ha resultado ser adecuado para la calibración de los tres tensioactivos, mejorando los resultados obtenidos por el algoritmo PARAFAC.

4.3.4 Muestras artificiales

Del mismo modo que se realizó para el algoritmo PARAFAC, se evalúa la capacidad de predicción del algoritmo U-PLS/RBL para una mezcla ternaria con la presencia de un interferente a una concentración final de 100 µg/mL. En este caso se consideró cuatro factores o componentes, y RBL = 1 por la presencia del interferente. La mezcla ternaria con interferente se preparó siguiendo un diseño experimental al azar. Las concentraciones nominales y predichas se presentan en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Concentración Nominal y Predicha para muestras test con interferente* (U-PLS/RBL)												
	APEO				ADBS				AGFE			
	Nominal (µg/mL)	Predicho (µg/mL)	SD	% Recup	Nominal (µg/mL)	Predicho (µg/mL)	SD	% Recup.	Nominal (µg/mL)	Predicho (µg/mL)	SD	% Recup.
1	32,32	24,7	0,55	106,01	62,52	73,94	3,96	118,27	34,50	35,82	0,56	103,83
2	14,50	13,48	0,48	92,97	68,77	54,29	2,84	78,94	23,00	25,42	1,05	110,52
3	15,22	16,57	0,38	109,01	14,59	17,31	2,53	118,64	13,00	17,26	0,96	132,77
4	5,55	5,58	0,28	101,45	20,84	20,89	1,51	100,24	22,25	27,15	0,94	122,02
5	15,66	14,66	0,43	93,38	41,68	44,34	2,24	106,38	27,00	33,79	0,93	125,15
6	22,77	21,73	0,49	95,31	62,52	68,76	3,42	109,98	35,05	34,22	1,35	97,63
7	31,32	30,11	0,64	96,20	66,69	89,10	4,63	133,60	33,50	29,65	0,89	88,51

*Concentración del interferente 100 µg/mL.

Los resultados que se obtuvieron muestran porcentajes de recuperación variables, resultando los promedios de recuperación: 99,2 % para el APEO; 109,4 % para el ADBS y 111,5 % para el AGFE.

Comparado con las pruebas test de PARAFAC (111 % para APEO, y 105 % para AGFE), se evidencia que la tasa de predicción de los analitos es semejante para ambos métodos, y que U-PLS/RBL logra resolver y predecir, además, al tensioactivos ADBS.

4.4 Determinación de tensioactivos en muestras reales de efluente textil

De la aplicación de dos algoritmos para el modelado de los datos EEMs, y en función de los resultados obtenidos, se decidió trabajar con el algoritmo U-PLS/RBL como algoritmo para la determinación de tensioactivos en muestras reales de efluente de una empresa textil por metodología espectrofluorimétrica porque permitió cuantificar los tres tensioactivos estudiados de forma simultánea.

4.4.1 Determinación empleando el algoritmo U-PLS/RBL

Las EEMs de las muestras de efluentes de la textil se procesaron considerando las mismas condiciones empleadas en la calibración para este algoritmo.

Las muestras de efluente fueron tomadas de forma compuesta, y corresponden a diferentes sectores de la planta de tratamiento de los mismos. La descripción del muestreo se detalla en la sección 3.1.

Los puntos de muestreo considerados fueron:

- a- **Pileta Colectora: muestras referenciadas como "Col".**
- b- **Pileta de tratamiento (ajuste de acidez): muestras referenciadas como "Trat".**
- c- **Efluente tratado volcado al cuerpo receptor: muestras referenciadas como "Efl".**
- d- **Aguas del cuerpo receptor (laguna): muestras referenciadas como "Cuerpo receptor".**

La tabla 4.14 resume los resultados de los análisis realizados a las muestras consideradas en este estudio. Los resultados presentados corresponden a valores promedio de muestras tomadas a lo largo del período (sección 3.1).

En el caso de las determinaciones realizadas en el cuerpo receptor, los niveles de tensioactivos se encontraron por debajo del LOQ del método propuesto, razón por la cual se repitió este análisis con sobreagregado de estándar del analito correspondiente.

“Evaluación del grado de depuración de efluente de industria textil por parámetros no convencionales”.

Tabla 4.14. Detección y cuantificación de tensioactivos en efluente textil

Muestra	APEO		ADBS		AGFE	
	µg/mL	SD	µg/mL	SD	µg/mL	SD
Col. 1	24,72	0,55	73,94	3,96	54,82	2,56
Trat. 1	16,57	0,38	54,29	2,84	33,42	1,05
Efl. 1	13,48	0,48	47,31	2,53	27,26	0,96
Col. 2	23,70	0,50	70,12	3,64	39,08	1,49
Trat. 2	14,30	0,32	45,25	2,24	29,10	0,89
Efl. 2	8,49	0,25	25,67	1,29	19,57	0,54
Cuerpo receptor	< 0,16		< 0,83		< 0,38	
Cuerpo receptor*^a	10,12	0,33	10,32	1,47	9,78	0,63
Cuerpo receptor*^b	50,07	0,86	51,28	51,28	51,28	51,28
Cuerpo receptor*^c	102,23	0,45	2,87	2,87	2,87	2,87

*Sobregregado de los tensioactivos APEO, ADBS y AGFE a una concentración final de: a: 10 µg/mL; b: 50 µg/mL; c: 100 µg/mL.

Los resultados obtenidos muestran que, desde la pileta colectora de la planta textil, la concentración de los tres tensioactivos analizados presentan una disminución hasta llegar al punto en el que realizan el volcamiento al cuerpo de agua receptor. El tensioactivo APEO es el que presenta un mayor porcentaje de disminución a lo largo de la línea de descarga.

En todos los casos, la disminución en la concentración puede deberse a los distintos procesos y tiempos de permanencias en cada una de las piletas, que favorecen que los procesos de degradación sobre cada uno de los tensioactivos analizados se realice de manera efectiva.

4.5 Validación de la metodología analítica propuesta

Con el objeto de validar los resultados obtenidos, las muestras reales de efluente de planta textil se analizaron por una técnica de referencia basada en HPLC con detector de fluorescencia.

4.5.1 Técnica de referencia

Las condiciones instrumentales utilizadas para el método HPLC-FD que se implementaron para realizar las determinaciones de los tensioactivos analizados a muestras de los efluentes de la industria, son las descritas en la sección 3.6.7.

La técnica cromatográfica se aplicó a los tres tensioactivos analizados, uno a la vez, en diferentes concentraciones. Los cromatogramas obtenidos para cada tensioactivo se presentan en las Figuras 4.26 a 4.28. Se fijó el tiempo de análisis total para la cromatografía de 15 minutos.

El cromatograma del tensioactivo APEO presenta un pico característico a $T_R = 11,7$ minutos, el resto de los picos que se observan corresponden a impurezas del tensioactivo comercial, también con actividad fluorescente.

El cromatograma del tensioactivo ADBS presenta cuatro picos, dos de ellos coinciden con las del agua destilada (blanco), y un pico $T_R = 4,9$ minutos, que es característico ADBS.

El cromatograma del tensioactivo AGFE presenta dos picos, coincidiendo uno de ellos con uno de los tiempos de retención de la prueba del blanco, por lo que solo tiene un pico característico para este producto, $T_R = 2$ minutos.

Se corroboró la linealidad para el rango de concentración con la que se trabajó para los tres tensioactivos seleccionados. Inicialmente, se prepararon soluciones stock de cada uno de los tensioactivos, y a partir de estas soluciones se realizaron las diferentes diluciones para realizar las lecturas cromatográficas. Las concentraciones de los estándares medidos cromatográficamente se muestran en la tabla 4.15.

Tabla 4.15. Concentraciones empleadas de los tensioactivos estándar.					
<i>Tensioactivo</i>	<i>Concentración (µg/mL)</i>				
APEO	21,11	42,22	63,32	69,66	100,00
ADBS	14,59	20,84	41,68	62,52	68,77
AGFE	15,05	21,50	43,00	64,50	70,95

Las curvas de calibración externa de cada tensioactivo fueron construidas a partir del área bajo la curva para las distintas concentraciones inyectadas, las cuales fueron empleadas para cuantificar los tensioactivos en las muestras analizadas posteriormente. Los cromatogramas obtenidos para los distintos tensioactivos obtenidos por HPLC se presentan a continuación:

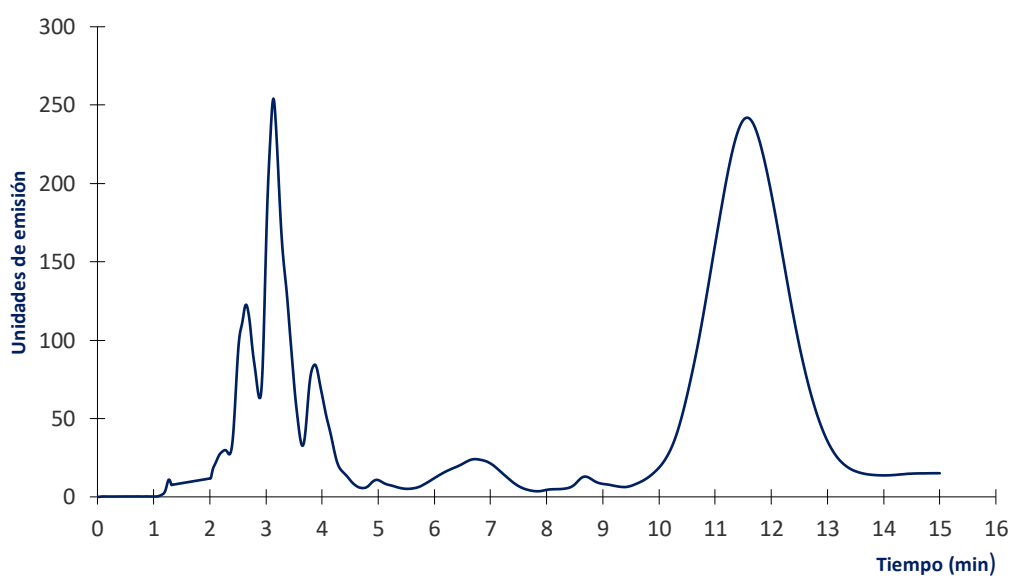


Figura 4.26. Cromatograma del tensioactivo APEO.

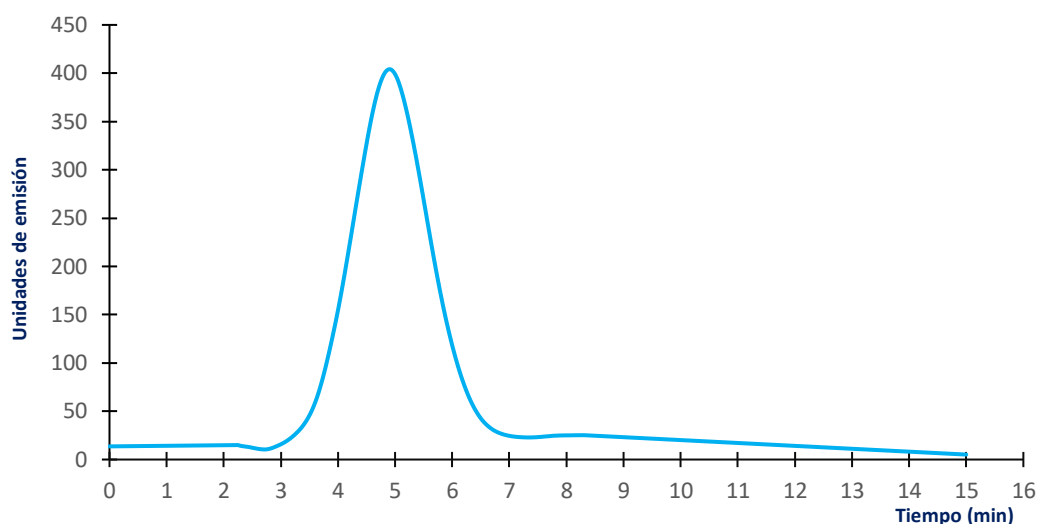


Figura 4.27. Cromatograma del tensioactivo ADBS.

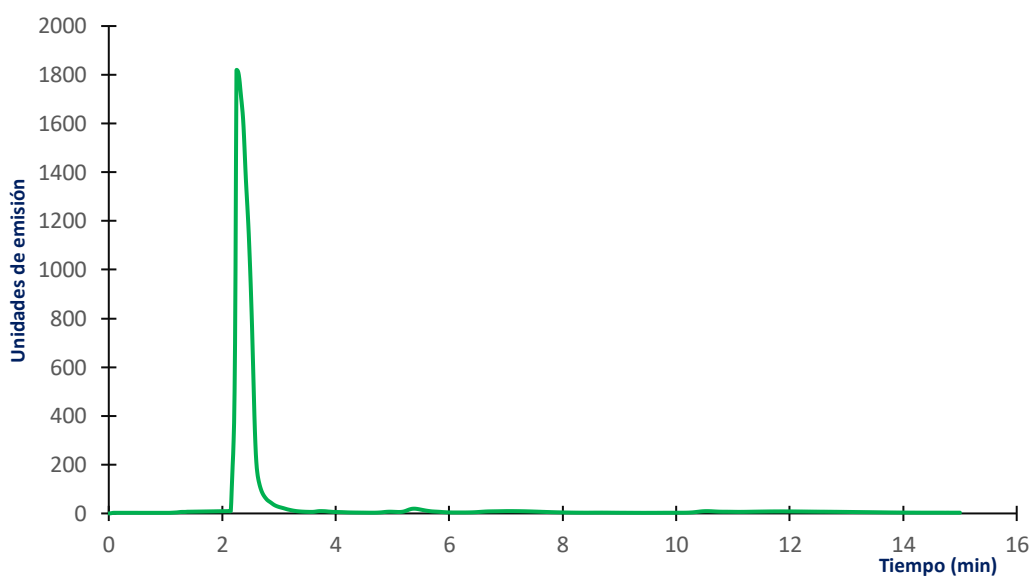


Figura 4.28. Cromatograma del tensioactivo AGFE.

4.5.2 Cifras de mérito

Esta prueba se realizó para calificar la metodología y obtener información sobre su fiabilidad. Las pruebas de homocedasticidad y estimación de las cifras de mérito se realizaron con MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, EE. UU.). El análisis estadístico univariado y las cifras de mérito obtenidos para los picos propios de cada tensioactivo ensayado se presentan en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Cifras de mérito del método de HPLC-FD para tensioactivos textiles

	APEO	ADBS	AGFE
Tiempo de retención (min)	12,2	4,9	2,1
Sensibilidad Analítica (L/μg)	1,38.10 ⁶	5,81.10 ⁵	2,04.10 ⁶
LOD (μg/mL)	0,02	0,05	0,002
LOQ (μg/mL)	0,07	0,01	0,05

Los tensioactivos analizados tienen sus datos de calibración homocedástica, significa que los gráficos de residuos presentaron variaciones constantes y su distribución fue aleatoria para todos los tensioactivos analizados. Esto supone que la calibración de los datos analíticos mantiene el ruido instrumental constante a lo largo del rango de calibración (Olivieri and Goicoechea, 2007).

Por otra parte, se verificó que todos presentaban una respuesta lineal en el rango de los valores de concentración de trabajo.

El LOQ encontrado por Motteran *et al.*, (2014, 2017), fue de 0,3 μg/mL para lauril alquilbencen sulfónicos (LAS) y alcohol láurico etoxilado (ALE), mientras que en el presente trabajo se encontró un LOQ de 0,07; 0,01 y 0,06 μg/mL para APEO, ADBS y AGFE respectivamente. Esto fue una ventaja, por un lado, porque el LOQ es más bajo que los reportados en la bibliografía, y por otro lado porque el método propuesto en la presente investigación resulta simple y sencillo al prescindir de etapas de pretratamiento en las muestras (Castles, Moore and Ward, 1989a; Loos *et al.*, 2007).

Los valores de LOD y LOQ obtenidos por HPLC-FD son mejores a los valores obtenidos por el algoritmo U-PLS/RBL, no obstante, los resultados alcanzados por ambas técnicas no presentan diferencias significativas cuando los valores superan las concentraciones de LOD y LOQ, según la prueba de región elíptica de confianza conjunta. Estos resultados sustentan que se considere emplear como primera alternativa para cuantificar los analitos estudiados a la metodología de calibración multivariada por U-PLS/RBL a partir de los datos de EEMs, lo cual resulta económico y bajo el concepto de la química verde. Si los resultados obtenidos de las muestras están por debajo de los

límites de cuantificación, y se pretende cuantificar concentraciones aún más bajas, se deberá considerar recurrir a la técnica HPLC-FD por presentar mejores cifras de mérito.

4.5.3 Análisis de muestras de efluentes de industria textil

Teniendo en cuenta que los efluentes industriales presentan material sólido en suspensión, la técnica cromatográfica requiere que las muestras provenientes del cuerpo receptor sean previamente filtradas, con el fin de proteger la columna cromatográfica, por lo cual se trabajó siempre con un filtro de preinyección.

Las muestras analizadas fueron las mismas que se utilizaron para el estudio por calibración multivariada (Sección 4.4.1): Colectora, Tratamiento, Efluente, y una muestra del cuerpo receptor correspondiente al mismo periodo, tomada en inmediaciones del punto de salida. Además, también se trabajó con muestras del cuerpo receptor con sobrealimentado de tensioactivos.

Se halló que las muestras evidencian presencia de los tensioactivos analizados APEO, ADBS y AGFE, por coincidir en los tiempos de retención (figura 4.29).

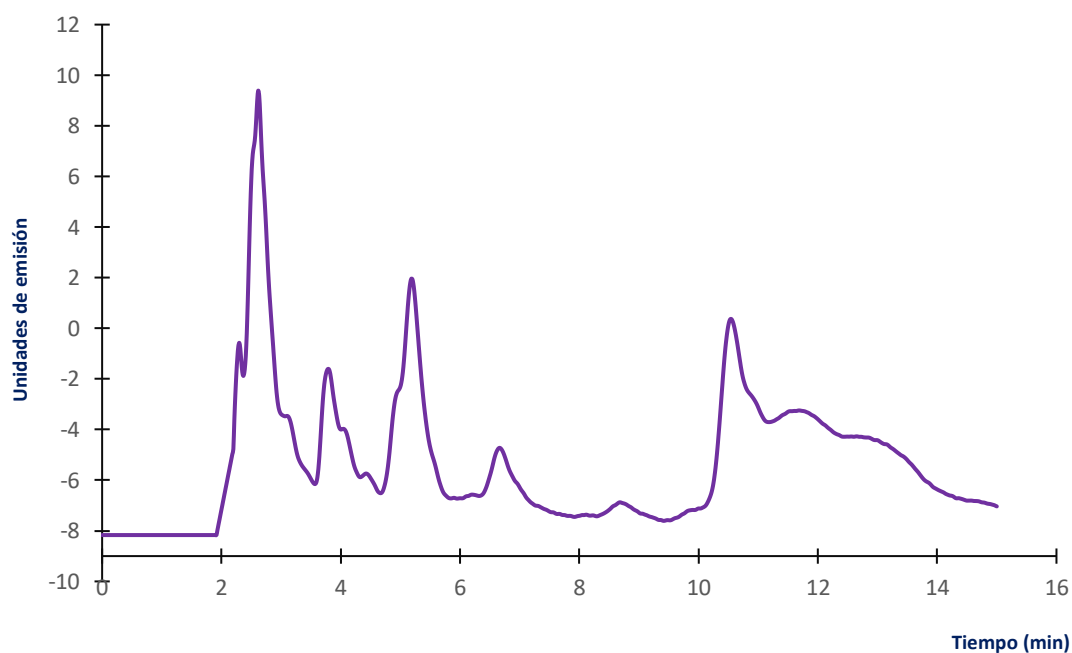


Figura 4.29. Cromatograma de efluente volcado al cuerpo de agua receptor.

Las concentraciones de tensioactivos en las muestras fueron calculadas a partir de las curvas de calibración externa que se realizó para cada tensioactivo, en el rango lineal hallado. Las concentraciones calculadas en las muestras correspondiente al periodo 2 se presentan en la tabla 4.17:

Tabla 4.17. Cuantificación de tensioactivos en efluente textil por HPLC-FD						
Muestra	APEO		ADBS		AGFE	
	µg/mL	SD	µg/mL	SD	µg/mL	SD
Col. 2	22,5	0,75	71,23	4,25	45,45	2,15
Trat. 2	12,87	0,42	47,24	3,15	32,67	1,92
Efl. 2	9,60	0,28	26,21	1,82	19,83	0,99
Cuerpo receptor	< 0,0239	--	< 0,0447	--	< 0,0447	--
Cuerpo receptor*^a	10,03	0.21	10,26	1,05	9,95	0.54
Cuerpo receptor*^b	49,95	0,37	50,00	1,29	51,04	1,67
Cuerpo receptor*^c	100,09	0,48	100,53	0,89	100,30	1,02

*Sobregregado de los tensioactivos APEO, ADBS y AGFE a una concentración final de: a:10 µg/mL; b:50 µg/mL; c: 100 µg/mL.

Se presenta en la tabla 4.18 la comparación correspondiente a las concentraciones obtenidas tanto por el método de fluorescencia con algoritmo U-PLS/RBL como por el método de HPLC-FD para muestras de efluente correspondiente al periodo de muestreo 2.

Tabla 4.18. Comparación HPLC-FD y U-PLS/RBL

Muestra	HPLC-FD						U-PLS/RBL								
	APEO		ADBS		AGFE		APEO			ADBS			AGFE		
	µg/mL	SD	µg/mL	SD	µg/mL	SD	µg/mL	SD	% Recup.	µg/mL	SD	% Recup.	µg/mL	SD	% Recup.
Col_2	22,5	0,75	71,23	4,25	45,45	2,15	23,70	0,50	105,33	70,12	3,64	98,44	39,08	1,49	85,98
Trat_2	12,87	0,42	47,24	3,15	32,67	1,92	14,30	0,32	111,11	45,25	2,24	95,79	29,10	0,89	89,07
Efl_2	9,60	0,28	26,21	1,82	19,83	0,99	8,49	0,25	88,44	25,67	1,29	97,94	19,57	0,62	98,69
Cuerpo receptor ^{*a}	10,03	0,21	10,26	1,05	9,95	0,54	10,12	0,33	100,90	10,32	1,47	100,58	9,78	0,63	98,29
Cuerpo receptor ^{*b}	49,95	0,37	50,00	1,29	51,04	1,67	50,07	0,86	100,24	51,28	2,87	102,56	50,93	0,75	99,78
Cuerpo receptor ^{*c}	100,09	0,48	100,53	0,89	100,30	1,02	102,23	0,45	102,14	101,79	1,23	101,25	99,69	0,92	99,39

*Sobregregado de los tensioactivos APEO, ADBS y AGFE a una concentración final de: a:10 µg/mL; b:50 µg/mL; c: 100 µg/mL.

Los porcentajes de recuperación del método fluorescencia modelado con el algoritmo U-PLS/RBL, comparado con el método de referencia HPLC-FD, fueron de: 101,4 % para APEO; 99,4 % para ADBS y 95,2 % para AGFE. Los valores de concentración obtenidos por esta metodología fueron considerados como aceptables comparados con el método de referencia al HPLC-FD.

Finalmente, se aplicó un modelo de regresión lineal para evaluar si los resultados obtenidos por ambos métodos son comparables, por medio del método de Cuadrados Mínimos Bivariados, con los resultados obtenidos para un juego de muestras por el método de referencia HPLC-FD y por el método desarrollado U-PLS/RBL.

Al realizar la prueba conjunta del intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen que considera los errores en ambos ejes, se comprobó la presencia de los puntos teóricos (1,0) dentro de los límites de la región elíptica de confianza conjunta (Figuras 4.30 a 4.32), con lo cual se afirma que ambos métodos presentan resultados que no son significativamente diferentes.

APEO:

Pendiente: $1,20 \pm 1,4$. Desvío Estándar: 0,23

RMSE: 1,25

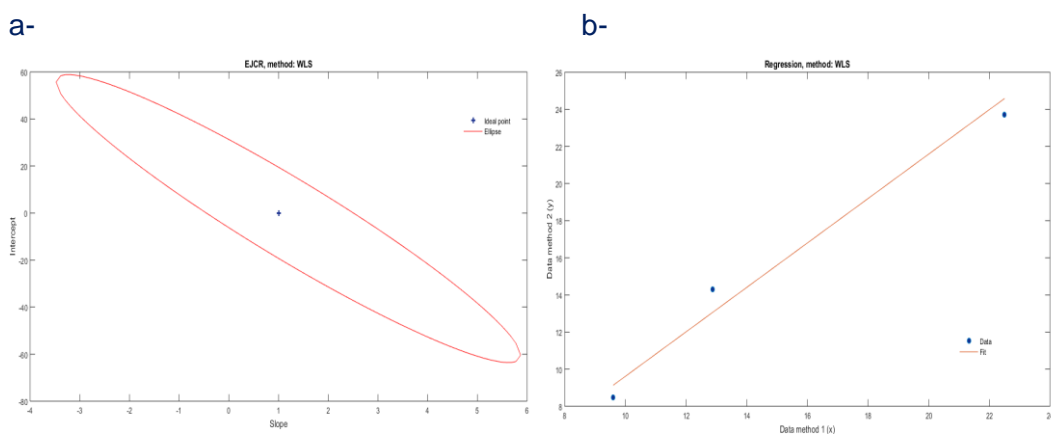


Figura 4.30. a- Región elíptica para un 95 % de confianza, b- recta de regresión para la concentración nominal versus la concentración predicha para el tensioactivo APEO.

ADBS:

Pendiente: $0,97 \pm 0,19$. Desvío Estándar: 0.031.

RMSE: 1,35.

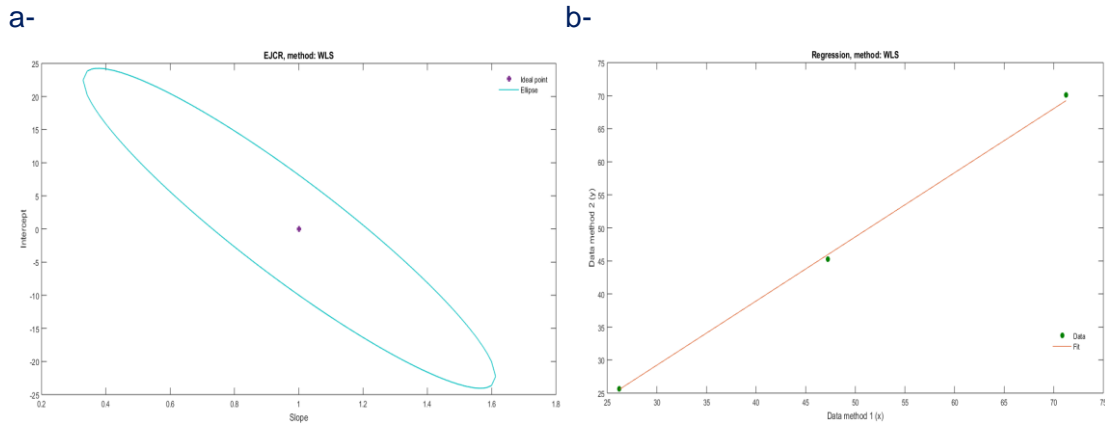


Figura 4.31. a- Región elíptica para un 95 % de confianza, b- recta de regresión para la concentración nominal versus la concentración predicha para el tensioactivo ADBS.

AGFE:

Pendiente: $0,89 \pm 0,66$. Desvío Estándar: 0,11

RMSE: 2,84

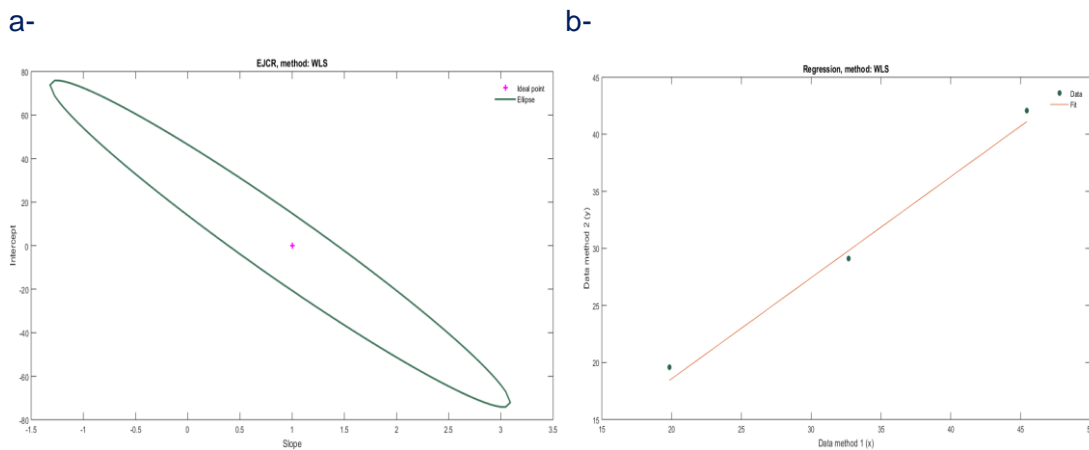


Figura 4.32. a- Región elíptica para un 95 % de confianza, b- recta de regresión para la concentración nominal versus la concentración predicha para el tensioactivo AGFE.

La evaluación de las gráficas anteriores, permite afirmar que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos en las muestras analizadas entre el método de referencia (HPLC-FD) y el método desarrollado por espectrofluorimetría con calibración multivariada por U-PLS/RBL.

4.6 Bibliografía

- Bortolato, S. A. and Olivieri, A. C. (2014) 'Analytica Chimica Acta Chemometric processing of second-order liquid chromatographic data with UV – vis and fluorescence detection . A comparison of multivariate curve resolution and parallel factor analysis 2', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 842, pp. 11–19. doi: 10.1016/j.aca.2014.07.007.
- Bro, R. and Kiers, H. A. L. (2003) 'A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models', pp. 274–286. doi: 10.1002/cem.801.
- Castles, M. A., Moore, B. L. and Ward, S. R. (1989) 'Measurement of Linear Alkylbenzenesulfonates in Aqueous Environmental Matrices by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection', pp. 2534–2540.
- Elcoroaristizabal, S. *et al.* (2015) 'PARAFAC models of fluorescence data with scattering: A comparative study', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier B.V., 142, pp. 124–130. doi: 10.1016/j.chemolab.2015.01.017.
- Escandar, A. C. O. and G. M. (2014) *Practical Three-Way Calibration*. Elsevier.
- Gonza, A. G., Herrador, M. A. and Asuero, G. (1999) 'Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays', 48, pp. 729–736.
- Li, W. *et al.* (2015) 'Characterization of fluorescent-dissolved organic matter and identification of specific fluorophores in textile effluents', *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), pp. 4183–4189. doi: 10.1007/s11356-014-3201-4.
- Loos, R. *et al.* (2007) 'LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters.', *Chemosphere*, 66(4), pp. 690–9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.060.
- Motteran, F. *et al.* (2014) 'Degradation of high concentrations of nonionic surfactant (linear alcohol ethoxylate) in an anaerobic fluidized bed reactor', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 481(1), pp. 121–128. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.024.

Motteran, F. *et al.* (2017) 'Simultaneous determination of anionic and nonionic surfactants in commercial laundry wastewater and anaerobic fluidized bed reactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 580, pp. 1120–1128. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.12.068.

Murphy, K. R. *et al.* (2013) 'Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC', *Analytical Methods*, 5(23), pp. 6557–6566. doi: 10.1039/c3ay41160e.

Olivieri, A. C. and Goicoechea, H. C. (2007) *La Calibración en la Química Analítica*.

Smilde, A., Bro, R. and Geladi, P. (2004) *Multi-way Analysis with*. Edited by J. Wiley.

CONCLUSIONES

Capítulo 5: Conclusiones

La Espectrofluorimetría combinada con técnicas de calibración multivariada de segundo orden permitió disponer de una metodología analítica alternativa para el monitoreo de la presencia de tensioactivos poluentes en las aguas residuales de una planta textil. Esta metodología alternativa logra resultados consistentes con las técnicas de referencia de cromatografía líquida, pero con una reducción considerable de los tiempos de análisis, consumo de reactivos y por tanto menor costo. La reducción del uso de solventes impacta fuertemente en los costos ambientales de la técnica analítica propuesta. Si bien el trabajo presentado se encuentra referido a una planta textil del medio en particular, la metodología empleada lo hacen apto para extrapolar sus procedimientos a otras plantas de tratamiento de efluentes textiles. Los modelos quimiométricos obtenidos fueron evaluados en base a sus cifras de mérito analítico y fueron contrastados con resultados obtenidos por una técnica de referencia para determinar tensioactivos por HPLC-FD.

Por lo tanto, se puede afirmar que:

- Se logró realizar un aporte al conocimiento de la composición química de un efluente textil y su grado de depuración.
- Se propusieron métodos de análisis alternativos basados en metodología de calibración multivariada de segundo orden aplicados a matrices de excitación emisión obtenidas por Espectrofluorimetría, que presentan notorias ventajas respecto al método de referencia, reduciendo los costos de análisis y tiempo de ejecución para la obtención de resultados.
- Se estudió el rendimiento de los algoritmos PARAFAC y UPLS/RBL, demostrándose un mejor desempeño del segundo en la predicción, aprovechando la ventaja de segundo para modelar los datos analíticos disponibles en presencia de interferentes en muestras complejas como lo es el efluente textil.

- Se aplicó con éxito la metodología desarrollada al efluente de una industria textil del medio, avalado por los resultados determinados por el método de referencia.
- A través de la validación de la metodología propuesta, el cálculo de cifras de mérito y la aplicación de pruebas estadísticas apropiadas se demostró que es posible desarrollar y proponer métodos alternativos a los oficiales y obtener resultados comparables aplicados a la detección y cuantificación de tensioactivos presentes en efluente textil.