

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIAS PRIMAS

#### 2.1.1 PASTAS

##### 2.1.1.1 Pasta no maderera: lino

La pasta de lino es suministrada por la empresa Celesa (España), obtenida mediante un proceso de cocción químico NaOH-AQ (sosa-antraquinona). Las características de esta pasta se muestran en la Tabla 2-1. La pasta se somete a un lavado ácido antes de iniciar los tratamientos, las propiedades de las pastas lavadas, consideradas pastas iniciales en el estudio, se muestran en la Tabla 2-2.

Tabla 2-1. Propiedades de la pasta cruda de lino.

Índice kappa	11,0
Blancura (%ISO)	33,6
Viscosidad (mL·g <sup>-1</sup> )	970

Tabla 2-2. Propiedades de la pasta de lino inicial en los estudios de lacasa.

	Pasta Cap. 4	Pasta Cap. 5 a 9
Índice kappa	10,1	10,5
Blancura (%ISO)	35,3	36,5
Viscosidad (mL·g <sup>-1</sup> )	952	932

##### 2.1.1.2 Pasta maderera: eucalipto

La pasta utilizada en los estudios de aplicación de xilanasas es una pasta de eucalipto proveniente de una mezcla de eucalipto *Eucalyptus salignus* y *Eucalyptus grandis* de la línea B de blanqueo de la fábrica de pasta de Jacareí de la empresa Votorantim Celulose e Papel (Brasil). La pasta ya se ha sometido a una etapa de predeSIGNIFICACIÓN con oxígeno, etapa O. En las tablas Tabla 2-3 y Tabla 2-4, se muestran las fechas en que se recolectaron las muestras y las propiedades de las

pastas y los filtrados. Como se observa en la Tabla 2-4, las propiedades tanto de las pastas como de los efluentes varían según la fecha de toma de muestra.

**Tabla 2-3. Puntos y fechas de toma de muestra de las pastas de eucalipto.**

Código pasta	Punto de muestreo	Fecha de toma de muestra
Pasta A	Después de la torre almacenamiento	22/08/2006
Pasta B	Después de la torre almacenamiento	29/08/2006
Pasta C	Antes de la torre de almacenamiento	25/10/2006

**Tabla 2-4. Propiedades de las pastas de eucalipto y sus respectivos filtrados.**

	Pasta A	Pasta B	Pasta C		Filtrado A	Filtrado B	Filtrado C
Índice kappa	11,5	12,2	11,2	DQO (kgO <sub>2</sub> ·t <sup>-1</sup> )	30,8	41,3	53,3
Blancura (%ISO)	55,3	49,2	54,2	pH	11,3	10,9	12,5
Viscosidad (mL·g <sup>-1</sup> )	1080	1127	1068	Color (kgPtCo·t <sup>-1</sup> )	-	-	26,8
HexA (μmol·g <sup>-1</sup> )	60,6	71,7	65,7	Turbidez (kgformazida·t <sup>-1</sup> )	-	-	5,4

## 2.1.2 ENZIMAS

### 2.1.2.1 Enzima oxidativa: lacasa

La enzima oxidativa utilizada en este estudio es una lacasa comercial del hongo *Trametes villosa* proporcionada por Novozymes® (Ref. NS-51002; ONN0002; FS-002). La actividad de la lacasa se determina al inicio de cada estudio y se encuentra entre 47 U·mL<sup>-1</sup> y 39 U·mL<sup>-1</sup>, dependiendo de la fecha de análisis. La actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma 1 mmol de sustrato ABTS por minuto (ver apartado 2.4.4).

### 2.1.2.2 Enzima hidrolítica: xilanasa

Las nueve xilanasas comerciales que se aplicaron en el estudio bioquímico son suministradas por cinco empresas productoras y se codifican como enzA, enzB, enzC, enzD, enzE, enzL, enzB11, enz B14 y enzG. Debido a términos de confidencialidad entre las empresas implicadas en el estudio no se proporciona una mayor información sobre las características de estas xilanasas comerciales.

### **2.1.3 MEDIADOR HBT**

El mediador utilizado en el estudio es HBT (1-hidroxibenzotriazol). El HBT utilizado en el capítulo 4 se ha adquirido en Fluka, en el resto de capítulos el HBT se ha adquirido en Sigma.

## **2.2 ETAPAS DE BLANQUEO**

### **2.2.1 PREPARACIÓN DE LA PASTA INICIAL**

#### **2.2.1.1 Estudio del sistema lacasa mediador: Etapa W (lavado ácido)**

El objetivo de esta etapa es acondicionar la pasta al pH de actuación de la enzima, además de realizar un lavado de la pasta antes de someterla a la etapa L, con el fin de eliminar las impurezas y reducir el contenido en cationes metálicos de la pasta.

#### Experiencias realizadas en el equipo a presión atmosférica (Cap. 4)

El tratamiento se realiza sobre pasta a un 2 %odp de consistencia en un recipiente plástico. Se adiciona ácido sulfúrico 1N a temperatura ambiente hasta alcanzar un pH 4. Mediante un agitador se realiza el lavado durante 30 min. Posteriormente se filtra la pasta.

#### Experiencias realizadas en el reactor a presión (Cap. 5 a 9)

El tratamiento se realiza sobre pasta a un 3 %odp de consistencia en un recipiente plástico. Se adiciona ácido sulfúrico 1 N a temperatura ambiente hasta alcanzar un pH 4. Mediante un agitador se realiza el lavado durante 30 min. Posteriormente se lava la pasta con agua descalcificada y finalmente agua destilada y se filtra.

#### **2.2.1.2 Estudio xilanasa: lavado de pasta**

#### Experiencias realizadas con pasta lavada (Cap. 10, 11 y 12)

El objetivo de esta etapa es disminuir la DQO de la pasta, debida a la presencia de licor negro, a la vez que aumentar la consistencia de la pasta para posteriormente realizar la etapa X. La pasta se filtra en la centrífuga para extraer el filtrado. Seguidamente, la pasta se lava con abundante agua destilada hasta que el pH de los efluentes de lavado se encuentra por debajo de 9,2.

Experiencias realizadas con pasta sin lavar (Cap. 11)

El objetivo de esta etapa es aumentar la consistencia de la pasta para realizar posteriormente la etapa X. La pasta se filtra en la centrífuga y se recoge el filtrado. La pasta no se lava.

**2.2.2 ETAPA DE EXTRACCIÓN ALCALINA (ETAPA E)**

Esta etapa se realiza en el reactor individual oscilante “Easydye AHIBA” de Datacolor (Fig. 2-1). Las condiciones de aplicación se muestran en la Tabla 2-5. En el reactor de 100 mL se introducen 5 g de pasta y la cantidad suficiente de agua para que la reacción tenga lugar a un 5 %odp de consistencia. Cuando termina el tiempo de reacción, los reactores se enfrían en un baño de agua fría. Posteriormente se filtra la pasta, se recoge el filtrado y se congela. La pasta se lava con agua descalcificada y finalmente con agua destilada.

**Tabla 2-5. Condiciones de la etapa E.**

<b>Consistencia (%odp)</b>	5
<b>NaOH (%odp)</b>	1,5
<b>Temperatura (°C)</b>	90
<b>Tiempo (min)</b>	120
<b>Agitación (osc·min<sup>-1</sup>)</b>	50
<b>Rampa temperatura (°C·min<sup>-1</sup>)</b>	3



**Fig. 2-1. Reactor individual oscilante “Easydye AHIBA” de Datacolor.**

### 2.2.3 ETAPA REDUCTORA (ETAPA R)

La pasta se lleva a una determinada consistencia en una bolsa de polietileno, se introduce  $\text{NaBH}_4$  sólido, ya que éste se descompone en agua, y se cierra la bolsa de manera que no quede aire en su interior. Se agita manualmente la bolsa cada 5 min. Acabado el tiempo de reacción, se recogen las lejías, se comprueba que el pH es alcalino y se congelan. Finalmente, la pasta se lava con agua descalcificada y por último, con agua destilada. Las condiciones de la etapa reductora se muestran en la Tabla 2-6.

Tabla 2-6. Condiciones de la etapa R.

<b>Consistencia (%odp)</b>	5
<b><math>\text{NaBH}_4</math> (%odp)</b>	2
<b>Temperatura</b>	ambiente
<b>Tiempo (min)</b>	30
<b>Agitación</b>	manual cada 5 min

### 2.2.4 ETAPA DE DIÓXIDO DE CLORO (ETAPA D)

Todos los tratamientos de oxidación con dióxido de cloro se realizan en bolsas de polietileno sumergidas en un baño de agua. Las condiciones de las etapas D dependen del estudio realizado. Los tratamientos se realizan en las condiciones descritas en la Tabla 2-7. El pH inicial se ajusta con una disolución de  $\text{NaOH}$  1N. La muestra se agita manualmente cada 20 min. Al final del tratamiento, se enfrían las bolsas, se filtra la pasta, se recoge el filtrado y se determina la concentración de dióxido residual y el pH. Posteriormente, se lava la pasta con agua destilada y se centrifuga.

Tabla 2-7. Condiciones de la etapa D.

<b>Estudio de diversas xilanasas, influencia del pH y de la DQO (Cap. 10 y 11)</b>	
Dosis ClO <sub>2</sub> (kgCl <sub>2</sub> ·odt <sup>-1</sup> )	19,8
Temperatura (°C)	60
Consistencia (%odp)	10
pH	3,8
Tiempo (h)	1,5
Cantidad pasta (g)	20
<b>Estudio de dosificación de dióxido de cloro en la etapa D (Cap. 12)</b>	
Dosis ClO <sub>2</sub> (KgCl <sub>2</sub> ·adt <sup>-1</sup> )	12, 15, 20 y 23
Temperatura (°C)	80
Consistencia (%odp)	10
pH	4,0
Tiempo (min)	50
Cantidad pasta (g)	20
<b>Estudio de la secuencia OXZDP (Cap. 12)</b>	
Dosis ClO <sub>2</sub> (KgCl <sub>2</sub> ·adt <sup>-1</sup> )	18
Temperatura (°C)	80
Consistencia (%odp)	10
pH	4,0
Tiempo (min)	50
Cantidad pasta (g)	126

## 2.2.5 ETAPA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (ETAPA P)

### 2.2.5.1 Estudio del sistema lacasa mediador (Cap. 8)

Esta etapa se realiza en el reactor individual oscilante “Easydye AHIBA” de Datacolor (Fig. 2-1), en el reactor de 100 mL. Las condiciones de aplicación se muestran en la Tabla 2-8. Cuando finaliza el tiempo de reacción, los reactores se enfrían en un baño de agua fría. Seguidamente, se filtra la pasta, se recoge el filtrado y se congela. La pasta se lava con agua descalcificada y por último destilada.

Tabla 2-8. Condiciones de la etapa P en el estudio de lacasa.

<b>Consistencia (%odp)</b>	5
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%odp)</b>	3
<b>NaOH (%odp)</b>	1,5
<b>DTPA (%odp)</b>	1
<b>MgSO<sub>4</sub> (%odp)</b>	0,2
<b>Temperatura (°C)</b>	90
<b>Tiempo (min)</b>	120
<b>Agitación (osc·min<sup>-1</sup>)</b>	50
<b>Rampa temperatura (°C·min<sup>-1</sup>)</b>	3

### 2.2.5.2 Estudio xilanasas (Cap. 12)

Los tratamientos de oxidación con peróxido de hidrógeno se realizan en bolsas de polietileno sumergidas en un baño de agua. Al final del tratamiento, se enfrían las bolsas, se filtra la pasta, se recoge el filtrado y se determina la concentración de peróxido residual y el pH. Se lava la pasta con agua destilada y se centrifuga. Las condiciones de la etapa P dependen del estudio realizado (Tabla 2-9).

Tabla 2-9. Condiciones de la etapa P en el estudio de xilanasas.

<b>Consistencia (%)</b>	10
<b>NaOH (%odp)</b>	depende del pH
<b>Temperatura (°C)</b>	90
<b>Tiempo (min)</b>	90
<b>Agitación</b>	manual cada 20 min
<b>MgSO<sub>4</sub> (%odp)</b>	3
<b>Estudio dosificación de peróxido de hidrógeno</b>	
<b>Cantidad de pasta (g)</b>	20
<b>Dosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kg·adt<sup>-1</sup>)</b>	8 - 10
<b>pH inicial</b>	11,0
<b>Estudio secuencia OXZDP</b>	
<b>Cantidad de pasta (g)</b>	70
<b>Dosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kg·adt<sup>-1</sup>)</b>	8
<b>pH inicial</b>	11,5

## 2.2.6 ETAPA SISTEMA LACASA MEDIADOR (ETAPA L)

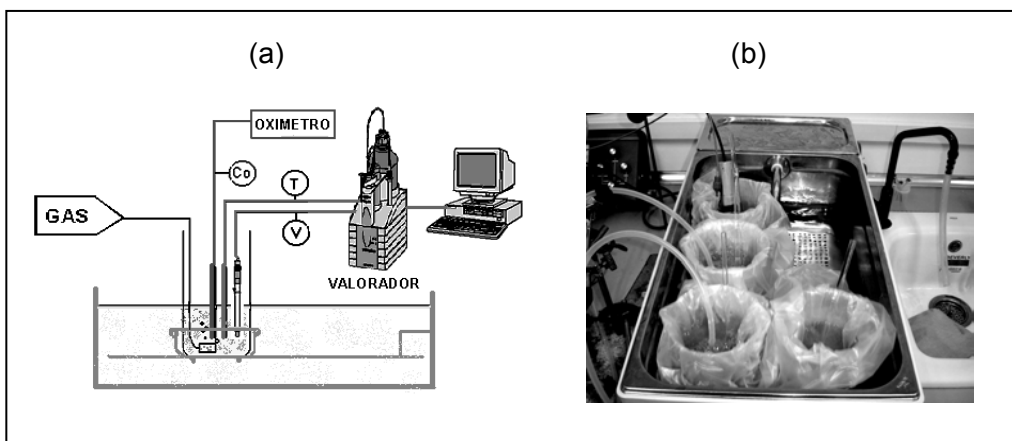
Se considera como pasta inicial, la pasta de lino después de haber realizado el lavado ácido. Todos los tratamientos se realizan a una temperatura constante de 30 °C en una solución tamponada de tartrato sódico a pH 4 a la que se añade el tensioactivo Tween 80. Las dosis de lacasa, la dosis de HBT, el tiempo y la presión de oxígeno varían en función del estudio realizado.

### 2.2.6.1 Equipo a presión atmosférica (Cap. 4)

Se dispone de un valorador automático "Titrande 809" que se ha programado para la determinación y el registro del potencial redox y de la temperatura en continuo. La concentración de oxígeno disuelto se mide con el oxímetro portátil "YSI model 54". En la figura Fig. 2-2 se presenta el equipo diseñado para realizar los tratamientos con el sistema lacasa mediador. Los tratamientos se llevan a cabo a baja consistencia en vasos de precipitados altos de 1 L, que se encuentran sumergidos en un baño de agua termostático. Todas las experiencias se realizan con el vaso abierto a presión atmosférica y con una agitación de vaivén. Se realizan tres tratamientos sistema lacasa mediador distintos dependiendo del tipo de gas que se introduce en la suspensión de pasta (Tabla 2-10). Las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla 2-11.

**Tabla 2-10. Tipos de tratamientos de la etapa L a presión atmosférica.**

<b>Ls</b>	sin introducción de gas
<b>Lair</b>	se introduce aire en el sistema
<b>Lo</b>	se introduce oxígeno húmedo en el sistema



**Fig. 2-2. Esquema (a) y fotografía (b) del equipo diseñado para el tratamiento enzimático a presión atmosférica.**



**Tabla 2-11. Condiciones de la etapa L a presión atmosférica.**

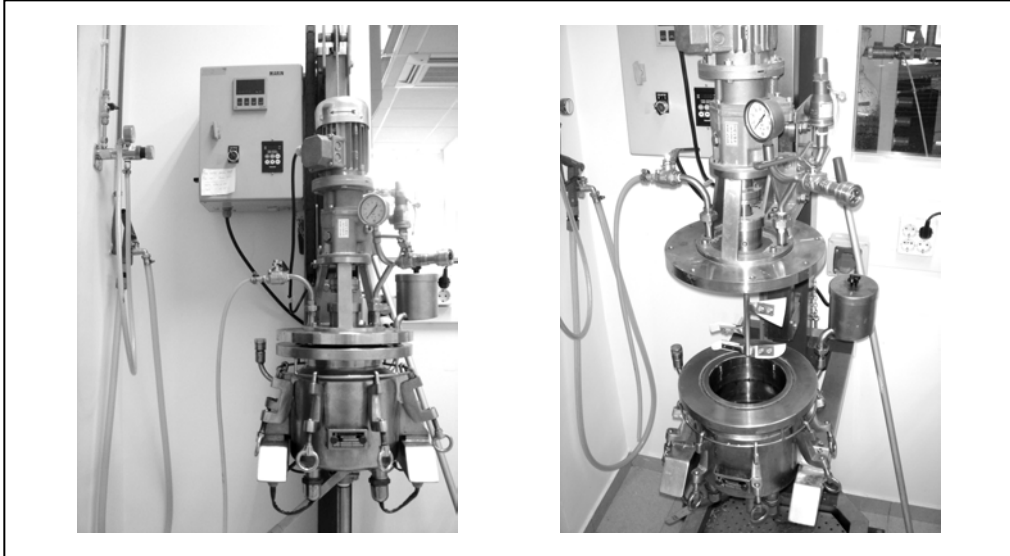
<b>Pasta lino inicial (g)</b>	10
<b>Concentración tartrato (mM)</b>	50
<b>Concentración Tween 80 (<math>\mu\text{V}^{-1}</math>)</b>	0,05
<b>Dosis lacasa (<math>\text{U}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	20
<b>Dosis HBT (%odp)</b>	2,6
<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	30
<b>Consistencia (%odp)</b>	1,5
<b>pH</b>	4
<b>Agitación</b>	vaivén

En primer lugar se acondiciona la pasta con el tartrato a la consistencia de trabajo y se introduce el tensioactivo Tween 80. Según el tratamiento se burbujea el gas (aire u oxígeno) mediante un difusor poroso. Se sumerge en la suspensión fibrosa el electrodo redox, la sonda de temperatura y el electrodo de medición de oxígeno disuelto. Se adiciona la enzima lacasa y el mediador HBT y se agita con una varilla de vidrio para conseguir una buena mezcla de los reactivos en la suspensión. Durante el proceso se agita de vez en cuando para asegurar la homogeneización. Al finalizar el tiempo de tratamiento se filtra la pasta, se recogen las lejías y se comprueba que el pH se encuentra entre 4 y 5. Seguidamente se lava la pasta con agua descalcificada y por último, destilada.

#### **2.2.6.2 Reactor a presión (Cap. 5 a 9)**

La etapa de tratamiento enzimático con presión de oxígeno se realiza en un reactor a presión y con agitación, desarrollado en el laboratorio del Grupo de Investigación Papelero y Gráfico (Fig. 2-3).

En la Tabla 2-12 se muestran las condiciones que se han mantenido constantes en los tratamientos de la etapa L realizada en el reactor a presión. La dosis de enzima, dosis de mediador, el tiempo de tratamiento y la presión de oxígeno dependen de cada experiencia y varían entre 1 a 20  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 0,1 a 2 %odp; 0,5 a 6,5 h y 0,2 a 0,6 MPa, respectivamente.



**Fig. 2-3. Reactor para la realización de tratamientos de blanqueo a presión.**

En primer lugar se introduce la pasta en el reactor a la consistencia deseada, una vez se alcanza la temperatura de 30 °C, se adiciona el Tween, el HBT y la enzima diluida en agua. Se cierra el reactor y se introduce la cantidad de oxígeno necesaria para llegar a la presión de trabajo. Una vez finaliza el tratamiento, se despresuriza el reactor, se recogen las leñas residuales y se congelan. La pasta se lava minuciosamente con agua descalcificada y, finalmente, con agua destilada.

**Tabla 2-12. Condiciones de la etapa L en el reactor a presión.**

<b>Pasta lino inicial (g)</b>	40
<b>Concentración tartrato (mM)</b>	50
<b>Concentración Tween 80 (p·V<sup>-1</sup>)</b>	0,05
<b>Temperatura (°C)</b>	30
<b>Consistencia (%odp)</b>	3
<b>pH</b>	4
<b>Agitación (rpm)</b>	60

### **2.2.7 ETAPA XILANASA (ETAPA X)**

Se han realizado diversos tratamientos con xilanasas dependiendo de la cantidad de pasta a tratar. En todos los casos se realiza una experiencia control en las mismas condiciones que la etapa X pero sin la adición de enzima, para determinar el efecto individual de la enzima en la pasta. En los tratamientos con enzima se dosifica la enzima a la pasta a partir de soluciones de enzima diluida de 1 g·L<sup>-1</sup> preparada a partir

de la solución comercial. Transcurrido el tiempo de reacción, se enfría y se filtra la pasta y se recoge el filtrado para la realización de los posteriores análisis. Seguidamente, se lava la pasta con abundante agua destilada y se centrifuga.

### **2.2.7.1 Estudio de diversas xilanasas y de la influencia del pH y de la DQO (Cap. 10 y 11)**

Los tratamientos se realizan en bolsas de polietileno sumergidas en un baño de agua en las condiciones descritas en la Tabla 2-13.

**Tabla 2-13. Condiciones de la etapa X en el estudio de diversas xilanasas, influencia pH y DQO.**

<b>Dosis xilanasa (kg·adt<sup>-1</sup>)</b>	0,3
<b>Temperatura (°C)</b>	80
<b>Consistencia (%odp)</b>	10
<b>Tiempo (h)</b>	2
<b>Agitación</b>	manual cada 15 min

#### Estudio de diversas xilanasas y de la influencia del pH (Cap. 10 y 11)

Las experiencias se realizan a partir de 70 g de la pasta A lavada. La consistencia se ajusta con agua destilada, en estas condiciones el pH de tratamiento es de 9,5. Para la realización de las experiencias a pH 10,5 y 8,5, se ajusta el pH al inicio de los tratamientos con sosa o con ácido sulfúrico, respectivamente.

#### Estudio de la influencia de la DQO (Cap. 11)

Tratamiento DQO-46: Se realiza a partir de 280 g de la pasta B sin lavar, se divide la pasta en dos bolsas de 140 g. La consistencia se ajusta con el filtrado recolectado con la pasta B. El pH de tratamiento es de 10,5. La DQO inicial en este tratamiento es de 46 kgO<sub>2</sub>.t<sup>-1</sup>.

Tratamiento DQO-16: Se realiza a partir de 70 g de la pasta B sin lavar. La consistencia se ajusta con agua destilada. El pH de tratamiento es de 9,9. La DQO inicial en este tratamiento es de 16 kgO<sub>2</sub>.t<sup>-1</sup>.

Tratamiento DQO-6: Se realiza a partir de 70 g de la pasta B lavada. La consistencia se ajusta con agua destilada. El pH de tratamiento es de 9,9. La DQO inicial en este tratamiento es de 6 kgO<sub>2</sub>.t<sup>-1</sup>.

### 2.2.7.2 Estudio de la secuencia de blanqueo OXAZDP (Cap. 12)

Los tratamientos se realizan en el reactor de blanqueo “Quantum Mark V” en las condiciones descritas en la Tabla 2-14.

**Tabla 2-14. Condiciones de la etapa X en el estudio de la secuencia de blanqueo OXAZDP.**

<b>Cantidad de pasta (g)</b>	280
<b>Dosis xilanasa (kg·adt<sup>-1</sup>)</b>	0,3
<b>Temperatura (°C)</b>	80
<b>Consistencia (%odp)</b>	10
<b>tiempo (h)</b>	1
<b>Presión</b>	atmosférica
<b>Agitación</b>	cada 3 min se agita 30 s a 13,0 Hz
<b>pH inicial</b>	9,5
<b>DQO inicial (kgO<sub>2</sub>·t<sup>-1</sup>)</b>	16
<b>Relación volumen filtrado C y agua</b>	1 a 5

Las experiencias se realizan a partir de 280 g de pasta C lavada. Se adicionan 1000 mL de agua destilada y 420 mL de filtrado para conseguir una relación 1 a 5 de filtrado C y agua. El pH de tratamiento se ajusta con sosa hasta 9,5. Se recogen 5 mL de filtrado inicial y se comprueba que la DQO inicial es la misma en todos los tratamientos. Cuando la pasta se encuentra a 80 °C se adiciona la enzima diluida en el agua necesaria para ajustar la consistencia al 10 %odp.

## 2.2.8 ETAPA DE OZONO (ETAPA Z)

### 2.2.8.1 Estudio de xilanasas: secuencia OXAZDP en pasta de eucalipto

La etapa Z en la secuencia industrial de la línea B se lleva a cabo a media consistencia, 10 %. Debido a que el generador de la planta piloto de ozonización a alta consistencia no se encuentra disponible, se realiza la etapa Z a alta consistencia en las instalaciones del Departamento de Ciencias Forestales de la ESALQ-USP (Brasil). Se muestra el esquema del equipo en la figura Fig. 2-4. El generador de ozono empleado es un modelo “Trailigaz” de la empresa Air Products. Se alimenta con una corriente de oxígeno con un caudal de 100 L·h<sup>-1</sup> a una presión de 0,55 bar. A una intensidad de 0,6 A produce unos 50 mg·min<sup>-1</sup> de ozono. La reacción tiene lugar en un matraz de vidrio de 4 L.

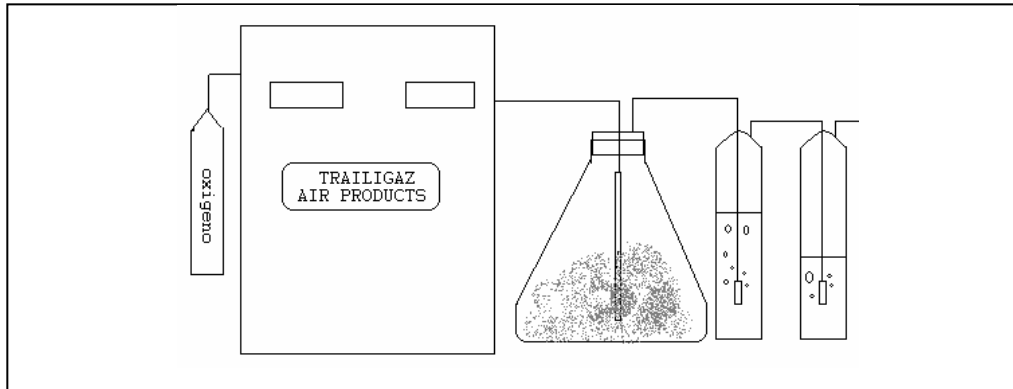


Fig. 2-4. Esquema del equipo de ozonización de la ESALQ-USP (Brasil).

#### Preparación de muestra para la etapa Z

Antes de realizar el tratamiento con ozono se realiza un lavado ácido con ácido sulfúrico a la pasta a pH 2,5 y una consistencia de 10 % durante 10 min. Posteriormente la pasta sin lavar se centrifuga hasta adquirir una consistencia entre 33 y 35 %odp y se “fluflea” (se esponja con un molinillo).

#### Tratamiento con ozono (etapa Z)

La etapa Z se realiza en un matraz erlenmeyer de 4 L, la corriente de ozono se introduce por una manguera agujereada. El gas de salida que contiene ozono residual se hace pasar por dos frascos lavadores, que contienen KI, en los que se determina la cantidad de ozono que no reacciona con la muestra. El erlenmeyer se agita de forma manual durante el blanqueo. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se adicionan a la pasta 800 mL de agua, se homogeniza la muestra y se recoge el filtrado. La pasta se lava con agua destilada y se centrifuga. El tiempo de reacción se calcula a partir de la producción de ozono del generador, la cantidad de pasta y la dosis de ozono a aplicar, Ec. 2-1 y la carga de ozono que realmente reacciona con la muestra se calcula mediante la Ec. 2-2. Todos los tratamientos se realizan en las condiciones descritas en la Tabla 2-15.

$$\text{tiempo (s)} = \frac{\text{peso pasta (g)} \cdot \text{dosis O}_3 \text{ (%odp)} \cdot 1000}{\text{caudal másico O}_3 \text{ (mg}\cdot\text{s}^{-1})} \quad \text{Ec. 2-1}$$

$$\text{carga O}_3 \text{ (%odp)} = \text{carga O}_3 \text{ aplicada (%odp)} - \text{carga O}_3 \text{ residual (%odp)} \quad \text{Ec. 2-2}$$

**Tabla 2-15. Condiciones de la etapa Z en el estudio de xilanasa.**

<b>Dosis ozono (%odp)</b>	0,35
<b>Temperatura (°C)</b>	ambiente
<b>Consistencia (%odp)</b>	35
<b>Presión (bar)</b>	atmosférica
<b>pH</b>	2,5
<b>Tiempo (h)</b>	depende de la producción de ozono del generador
<b>Cantidad pasta (g)</b>	117,5

Determinación de la producción de ozono y del ozono residual

El caudal másico de ozono que produce el generador se determina mediante el método yodimétrico. La corriente de gas que contiene ozono se hace pasar durante 30 s por dos frascos lavadores de 1 L. Ambos contienen solución de KI al 5 %, el primero contiene 700 mL y el segundo 300 mL, dándose lugar la reacción 2-1. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se recoge el volumen de un litro de solución de KI contenida en los dos frascos lavadores. Se agita la solución y se toman 200 mL. Este volumen se acidifica con 10 mL de ácido sulfúrico 4 N y se valora el yodo formado con solución de tiosulfato sódico 0,1 N e indicador almidón (reacción 2-2). La cantidad de ozono formada se calcula mediante la Ec. 2-3 y la producción de ozono del generador se calcula mediante la Ec. 2-4.



$$\text{cantidad O}_3(\text{mg}) = \frac{\text{volumen Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{mL}) \cdot 0,1\text{N} \cdot 24}{\text{volumen muestra (mL)}} \cdot 1000 \text{ mL} \quad \text{Ec. 2-3}$$

$$\text{caudal másico O}_3(\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{\text{cantidad O}_3(\text{mg})}{0,5(\text{min})} \quad \text{Ec. 2-4}$$

La determinación del ozono residual se realiza de igual manera. Durante el blanqueo de pasta se hace pasar la corriente de gas de salida del matraz erlenmeyer por los dos frascos lavadores anteriores, al finalizar el tiempo de reacción se valora el yodo formado.

### 2.2.8.2 Estudio del equipo de ozonización: secuencias ZE y ZP en pasta de lino

La etapa Z en la secuencia de blanqueo ZE y ZP se realiza en la planta piloto de ozonización del Grupo de Investigación Papelero y Gráfico en Terrassa, cuyo esquema se muestra en la Fig. 2-5. La instalación de tratamiento con ozono está formada por un generador de ozono, dos analizadores de ozono, un caudalímetro, un reactor, un conjunto de electroválvulas y un ordenador para el control del equipo mediante una tarjeta de adquisición de datos y un software en Labview®. El sistema permite conocer a cada segundo la cantidad de ozono generado y residual; a partir de estos datos se calcula el tiempo de reacción en función de la dosis de ozono a aplicar.

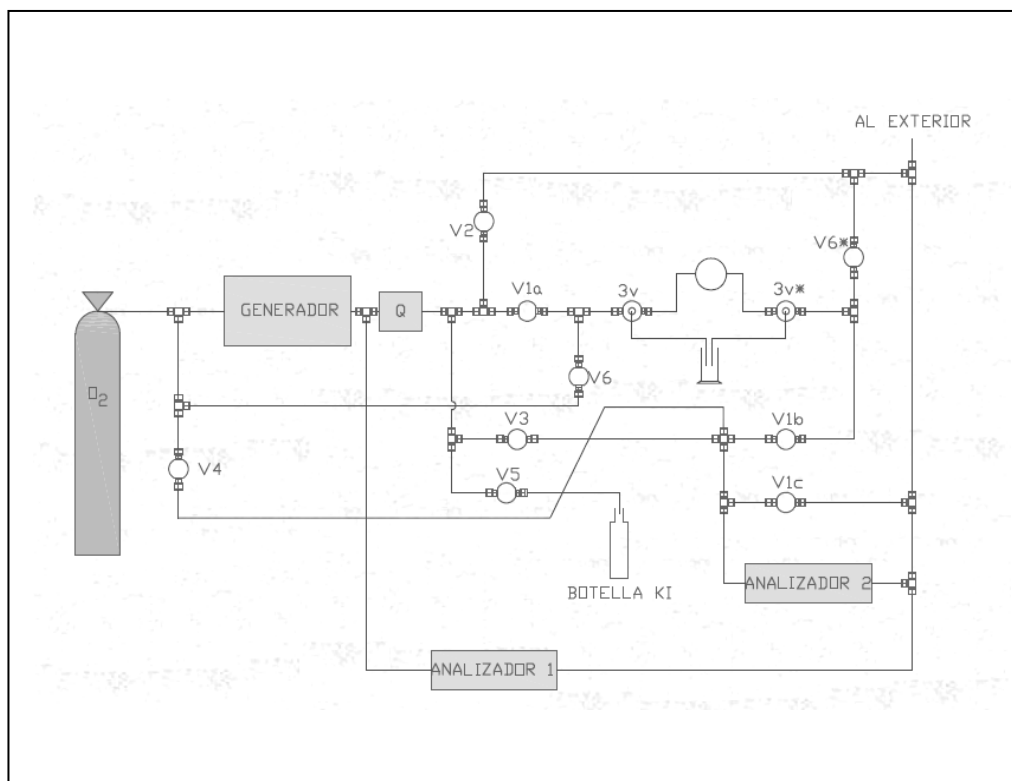


Fig. 2-5. Esquema de la instalación de ozono del Laboratorio de la Especialización Papelera y Gráfica.

#### Preparación de muestra

Antes de realizar el tratamiento con ozono se realiza un lavado ácido con ácido sulfúrico a la pasta a pH 4 a consistencia de 1,5 %odp durante 30 min. Se lava la pasta con agua y se acondiciona de nuevo la pasta a pH 2. La pasta se centrifuga sin

lavar hasta adquirir una consistencia del 40 %odp y se “fluffa” (se esponja con un molinillo).

#### Blanqueo con ozono

Se realizan tres tratamientos a distintas dosis de ozono (0,4, 0,5 y 0,6 %odp). Se efectúan sobre 20 g de pasta al 40 %odp “fluffada” a temperatura ambiente. Al acabar el tratamiento se realiza un lavado de la pasta al 3 %odp de consistencia y se recogen las lejías de este lavado para el posterior análisis de efluentes de blanqueo. Posteriormente se lava la pasta con agua descalcificada y finalmente, con agua destilada.

## **2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA PASTA**

### **2.3.1 ÍNDICE KAPPA**

Se ha seguido la norma ISO 302. En las determinaciones de índice kappa en pasta de lino, debido a las características de la pasta, se han realizado modificaciones en la medida respecto a la norma. La cantidad de pasta utilizada en el ensayo es de 0,6 g y se añaden unos 600 mL de agua destilada a la muestra antes de comenzar la valoración con tiosulfato sódico.

### **2.3.2 BLANCURA**

La blancura se define como el factor de reflectancia difusa medido a una longitud de onda efectiva de 457 nm. Se ha seguido la norma ISO 2470, la fuente de luz es C(ISO) y el iluminante/observador C(ISO)/2°. Los espectrofotómetros utilizados son “Technyndine PC Color Touch” en las medidas de blancura en lino y “Elrepho 3000” de Datacolor en las de eucalipto. En las determinaciones de blancura en pasta de lino, debido a las características de la pasta de lino se han realizado modificaciones en la medida respecto a la norma. La cantidad de pasta utilizada en la realización de la formeta es de 0,8 g. La suspensión de pasta se filtra en primer lugar a presión atmosférica, se debe agitar la pasta para lograr una buena formación. Posteriormente se filtra al vacío, se prensa y se seca en el formador de hojas durante 5 min a 90 °C.

### **2.3.3 VISCOSIDAD**

En las determinaciones de viscosidad se ha seguido la norma ISO 5351-1 y SCAN-CM 15:88. Debido a las características de la pasta de lino se han realizado modificaciones en la medida de viscosidad respecto a la norma. El tiempo de reacción entre la pasta y



la cuprietilendiamina es de al menos 20 h y el tiempo de agitación de la muestra antes de la medida de viscosidad es de 4 h.

### 2.3.4 COLOR

El color de un objeto viene determinado por el porcentaje de radiación reflejada en cada una de las longitudes de onda del espectro visible, entre 400 y 700 nm. El factor de reflectancia intrínseca se define como la relación, expresada en tanto por ciento, entre la radiación reflejada por la formeta opaca y la radiación reflejada por un difusor reflector perfecto en las mismas condiciones. Si se representa la reflectancia frente a la longitud de onda se obtiene la curva de reflectancia o curva espectrofotométrica (Fig. 2-6). Tanto en las medidas de reflectancia, como las de coordenadas cromáticas se ha utilizado la fuente de luz C(ISO) y el iluminante/observador C(ISO)/2°.

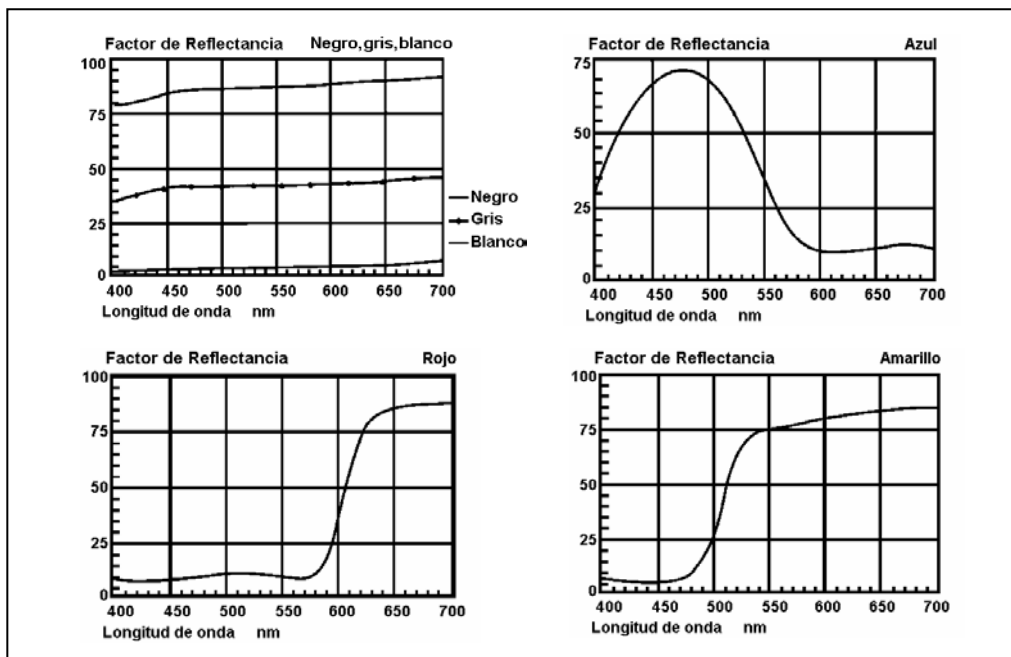


Fig. 2-6. Curvas de reflectancia de diversos colores.

El espacio CIE  $L^*a^*b^*$  se define como un espacio tridimensional donde cada uno de los puntos está asociado a un determinado color. Las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  varían entre -60 y 60 y el eje  $L^*$  de 0 a 100. Todos los colores se pueden caracterizar por sus coordenadas  $L^*a^*b^*$  (Fig. 2-7). La coordenada  $L^*$  (luminosidad o “lightness”) indica la cantidad de luz que tiene un determinado color y oscila entre 0 (negro absoluto) y 100 (blanco perfecto), por lo que define si el color es claro u oscuro.

En el espacio CIE  $L^*C^*h$  se puede caracterizar un color mediante tres variables: la luminosidad ( $L^*$ ), el chroma ( $C^*$ ) y el ángulo hue ( $h$ ). Estos parámetros se basan en el sistema CIEL\*a\*b anterior. El valor de C (Chroma) viene determinado por el módulo del vector que formado por  $a^*$  y  $b^*$ , define la intensidad del color y su valor oscila entre 0 y 60. El ángulo  $h$  (Hue) es aquel que forma el vector definido por las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  e indica el matiz del color que presenta un material. El ángulo  $0^\circ$  corresponde al eje  $a^*$  positivo.

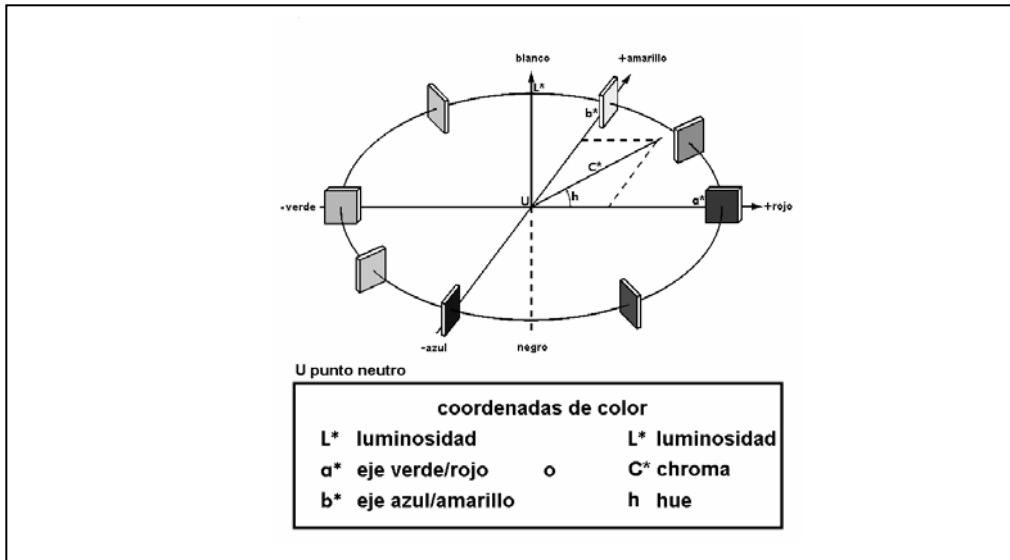


Fig. 2-7. Espacios cromáticos CIE  $L^*a^*b^*$  y CIE  $L^*C^*h$ .

### 2.3.5 CONTENIDO EN ESTEROLES

El contenido en esteroides se determina por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), mediante un método desarrollado previamente en el IRNAS (Sevilla, España) (Gutiérrez et al. 1998).

Los análisis se llevan a cabo en el equipo Agilent 6890N Network GC System, en una columna capilar de sílica (DB-5HT; 5 m x 0,25 mm I.D., 0,1  $\mu\text{m}$  film thickness) de J&W Scientific. El programa de temperaturas empieza a 100  $^\circ\text{C}$ , se mantiene 1 min, y se eleva la temperatura hasta 350  $^\circ\text{C}$  a 15  $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , se mantiene durante 3 min. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de llama (FID) se mantienen a 300 y 350  $^\circ\text{C}$ , respectivamente. El gas portador es helio a una velocidad de 5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y la inyección se realiza en el modo splitless. Los picos se cuantifican según el área en el cromatograma.

Los análisis GC/MC se realizan en un modelo Varian Star 3400 GC equipado con una trampa detectora de iones (modelo Varian Saturn 2000) utilizando una columna capilar de 12 m con las mismas características que la columna descrita anteriormente. El horno se calienta de 120 °C (1 min) hasta 380 °C a 10 °C·min<sup>-1</sup> y se mantiene 5 min. Se utilizan columnas más largas (30 m) si es necesario. La línea de transferencia se mantiene a 300 °C. El inyector se programa a la temperatura de 120 °C (0,1 min) hasta 380 °C a la velocidad de 200 °C·min<sup>-1</sup> y se mantiene hasta el final del análisis. El gas utilizado es helio a una velocidad de 2 mL·min<sup>-1</sup>. Los componentes se identifican comparando su peso en el espectro con el de las bibliotecas NIST, por fragmentografía de masas, y por comparación con los estándares.

### **2.3.6 ÁCIDOS HEXENURÓNICOS (HEXA)**

Los ácidos hexenurónicos se forman en las cadenas de xilanos durante la cocción kraft. Se determinan por espectrofotometría, después de realizar la hidrólisis de los HexA de la pasta en una solución de acetato de sodio y de cloruro de mercurio (Chai et al. 2001; Gutiérrez et al. 1998).

### **2.3.7 COMPUESTOS ORGÁNICOS HALÓGENADOS ADSORVIBLES (AOX)**

Se definen como aquellos compuestos orgánicos halogenados que se adsorben sobre carbón activo. El procedimiento de determinación se basa en la norma PTS-RH 01. La pasta se pone en contacto con agua para disolver los compuestos orgánicos halogenados. Posteriormente, los AOX presentes en este lixiviado se adsorben sobre carbón activado a un pH entre 1,5 y 2,0 ajustado con ácido nítrico. Este carbón se lava con KNO<sub>3</sub> para eliminar los compuestos halogenados inorgánicos. La muestra de carbón activado se calcina en el horno y se analiza el cloro gas liberado por microcoloumetría en el equipo "ECS 3000" de Thermo Euroglas.

### **2.3.8 SOLUBILIDAD DE LA PASTA EN SOSA AL 5 %**

Se determina mediante un procedimiento interno del laboratorio del CDTC-VCP (Brasil) basado en la norma SCAN-C2: 61. Se adiciona solución de hidróxido de sodio a la pasta; la materia orgánica disuelta se oxida con dicromato potásico, que se valora posteriormente.

### **2.3.9 PORCENTAJE DE HIDRATOS DE CARBONO**

Se determina mediante un procedimiento interno del laboratorio del CDTC – VCP (Brasil). La muestra se hidroliza con ácido sulfúrico al 72 % a 30 °C durante una hora. Posteriormente, la muestra se diluye y se coloca en el autoclave a 125 °C durante una

hora. La muestra se filtra y se analiza por HPLC mediante el equipo “Class LC 10” de Shimadzu, la fase fija es la columna “HPX 87 H” y la fase móvil ácido sulfúrico 0,01N. Las condiciones de operación son: presión de 50 psi, flujo de 0,6 mL·min<sup>-1</sup> y temperatura de 45 °C. Se utiliza como detector el índice de refracción.

### 2.3.10 MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS

La morfología de las fibras se determina mediante el equipo “Fiber Lab V3.5.3” de Kaajani.

### 2.3.11 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS PAPELES

Se realiza el refinado de las pastas en el molino “PFI - Mark VI” de Hamjern Maskin A/S Hamar Norway a 1000 rev, 2000 rev y 3000 rev (ISO 5264-2). Se determina el grado Schopper de las pastas refinadas, mediante la norma SCAN C19 (ISO 5267-1). Los equipos utilizados para la determinación de propiedades físicas son de Lorentzen & Wettre. En la Tabla 2-16 se muestran las propiedades analizadas y la norma correspondiente; donde la Rigidez a la tracción (Tensile stiffness), se define como la pendiente, en la zona elástica, de la curva de resistencia a la tracción respecto al alargamiento unitario y el Índice de rigidez a la tracción (Tensile stiffness index) se define como la rigidez a la tracción dividida entre el gramaje.

**Tabla 2-16. Propiedades físicas de los papeles y norma SCAN e ISO utilizada.**

<b>Ensayos no destructivos</b>	<b>Gramaje</b>	SCAN P07	ISO 536
	<b>Volumen específico</b>	SCAN P07	ISO 534
	<b>Opacidad</b>	SCAN P08	ISO 2471
	<b>Coefficiente de dispersión de luz</b>	SCAN P08	ISO 2471
	<b>Espesura</b>	SCAN P 19	ISO 534
	<b>Resistencia al paso del aire</b>	SCAN P19	ISO 5636
	<b>Rugosidad Bendtsen</b>	SCAN P19	ISO 8791-2
<b>Ensayos destructivos</b>	<b>Índice de tracción</b>	SCAN P38	ISO 1924-2
	<b>Elasticidad</b>	SCAN P38	ISO 1924-2
	<b>Índice de TEA (Tensile energy absorption)</b>	SCAN P38	ISO 1924-2
	<b>Índice de rigidez a la tracción</b>	-	-
	<b>Longitud de rotura</b>	SCAN P38	ISO 1924-2
	<b>Índice de reventamiento</b>	SCAN P24	ISO 2758
	<b>Índice de desgarro</b>	SCAN P11	ISO 1974
	<b>Capilaridad Klemm</b>	SCAN P13	ISO 8787
<b>Índice de retención de agua</b>	Tappi um 256	ISO 535	

## **2.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS EFLUENTES**

Para la medida de DQO, color y turbidez se utiliza el procedimiento basado en la medición de absorbancia mediante espectrofotómetro. Las diferentes longitudes de onda que se utilizan son 600 nm para la DQO, 465 nm para el color y 450 nm para la turbidez. Los resultados se corrigen con el factor de dilución utilizado en cada muestra y con la consistencia correspondiente de cada etapa.

### **2.4.1 DEMANADA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO) Y COLOR**

#### **2.4.1.1 Estudio del sistema lacasa mediador (Cap. 4 y 9)**

Se determina la DQO y el color en los efluentes según las normas ASTM D1252-00 y ASTM D1209-00, respectivamente. Para ello se ha utilizado el espectrofotómetro "UV-1603" de Shimadzu.

#### **2.4.1.2 Estudio de aplicación de xilanasas (Cap. 10 a 12)**

Se determina la DQO, el color y la turbidez según las normas, SMEWW 5220 D, CETESB NT-07/L5.117 y IPT-ABTCP-E14-1994, respectivamente. Para ello se ha utilizado el espectrofotómetro "DR/2000" de HACH.

### **2.4.2 CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC)**

Se determina el TOC mediante el método de oxidación por combustión catalítica y detección por NDIR según la norma SMEWW 5310. Para ello se utiliza el equipo "TOC-V CPN" de Shimadzu.

### **2.4.3 TOXICIDAD**

La toxicidad se determina por el método Microtox que se basa en la medida de reducción de luz que produce el microorganismo *Vibrio fischeri* en contacto con tóxicos. La norma utilizada es la UNE-EN ISO 11348-3. Se define un equitox·m<sup>3</sup> como la inversa de la dilución del agua residual (expresada como partes por uno) que provoca una inhibición del 50 % en 15 minutos en las condiciones del bioensayo. La corrección del color en las medidas de toxicidad se realizó según la norma del equipo utilizado, "MicrotoxOmni" de Azur Environmental.

### **2.4.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LACASA**

La actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma 1 mmol de sustrato ABTS por minuto. La actividad lacasa se mide en el espectrofotómetro

“UV-1603” de Shimadzu en ABTS 5 mM en tampón acetato sódico 100 mM a pH 5 a 24 °C.; a partir de medidas de absorbancia a una longitud de onda de 436 nm.

Para la determinación de actividad se utiliza una disolución de ABTS 10 mM en tampón acetato sódico 200 mM a pH 5. Esta disolución de ABTS y la de enzima se encuentran sumergidas en un baño termo estático a 24 °C. Se realiza el autocero en el espectrofotómetro con la solución de tampón acetato a pH 5. Para medir la actividad en la cubeta de metacrilato, se debe añadir primero el volumen de agua destilada, luego el de solución de ABTS y finalmente el volumen de enzima, vertiendo éste último en la pared interior de la cubeta sin tocar el resto del líquido (ya que la reacción empieza al añadir la solución enzimática); rápidamente se tapa con el parafilm, se agita una vez y se lleva al espectrofotómetro para la medición. Se mide la absorbancia en función del tiempo, entre 0 y 60 s. La actividad lacasa se calcula mediante la Ec. 2-5.

$$\text{actividad lacasa (U}\cdot\text{L}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta\text{Abs} \cdot D_{SE} \cdot D_C \cdot 1000000}{29300} \quad \text{Ec. 2-5}$$

Donde:  $\Delta\text{Abs}$  es el incremento de absorbancia calculado como la diferencia de absorbancia medida a 60 s y 0 s;  $D_{SE}$  es la dilución realizada de enzima;  $D_C$  es la dilución en la cubeta de medición; 1000000 es el factor para expresar la actividad en  $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$  y 29300 es el coeficiente de extinción molar ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) del radical catiónico del ABTS (es decir, lo que absorbe a una concentración 1 M a través de un paso óptico de 1 cm a esta longitud de onda).

**Tabla 2-17. Relación de volúmenes a adicionar en la medida de actividad lacasa.**

Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	ABTS ( $\mu\text{L}$ )	Enzima ( $\mu\text{L}$ )	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )	Dilución cubeta ( $D_C$ )
490	500	10	1000	100
475	500	25	1000	40
450	500	50	1000	20

**El volumen final en la cubeta debe ser de 1 mL. En la**

Tabla 2-17 se sugieren unas relaciones de volúmenes a adicionar en la cubeta. Se debe tener en cuenta que el valor de absorbancia no puede ser superior a 1 a los 60 segundos, si no es así, se debe utilizar otra relación de volúmenes o diluir la solución stock de enzima. El incremento de absorbancia de 0 a 60 segundos debe ser lineal, en el caso de que no lo fuera, se toma el valor a 30 segundos y se extrapola a 60 s.

## 2.5 PLAN ESTADÍSTICO

El sistema lacasa mediador, etapa L, se optimiza mediante el análisis estadístico de un diseño de experimentos. Las condiciones óptimas de aplicación de la etapa L se obtienen a partir de modelos matemáticos que permiten estimar la dependencia entre las propiedades de las pastas y los efluentes obtenidos después de cada secuencia y las variables de proceso de la etapa L. El diseño de experimentos permite obtener la máxima información del proceso con el mínimo esfuerzo experimental.

### 2.5.1 DISEÑO DE EXPERIENCIAS

En la realización de diseño se deben llevar a cabo las siguientes etapas:

- Especificar la región experimental. Los criterios para escoger los límites máximos y mínimos de cada factor en la experimentación son dos. En primer lugar debe existir una diferencia razonable entre la respuesta de la experiencia con los factores a nivel alto y la respuesta de la experiencia con los factores a nivel bajo. El segundo criterio es que las respuestas se encuentren en la zona de máxima pendiente de cambio de respuesta al pasar de uno a otro nivel.
- Escoger el número de niveles para los factores. En este caso se estudiarán tres niveles (alto, medio y bajo)
- Elegir el diseño experimental y la secuenciación. Se estudia un diseño secuencial basado en el diseño factorial  $2^4$  con tres repeticiones en el centro y una estrella de experiencias.
- Aleatorización de experimentación. Una vez se han decidido las experiencias que se van a realizar se aleatoriza la experimentación para que el orden en la realización de las experiencias no influya en las respuestas.

### 2.5.2 MODELO LINEAL

La técnica estadística que permite estimar la dependencia funcional entre la respuesta de un proceso y los factores de control es el Modelo Lineal, también denominado Regresión o Mínimos cuadrados. El modelo lineal debe cumplir los siguientes requisitos:

- El modelo que se ajusta a los datos experimentales es una función polinómica de los factores, una combinación lineal de funciones de los factores. El usuario debe definir el modelo a ajustar.

- El número de términos del modelo ( $p$ ) debe ser igual o inferior al número de puntos experimentales distintos ( $n$ )
- El máximo grado o exponente de un factor en el modelo deber ser inferior al número de niveles ( $k$ )

La ecuación del modelo a ajustar en forma matricial corresponde a la ecuación Ec. 2-6. El vector columna  $Y$  es el vector de respuestas. El vector columna  $b$  es un vector de coeficientes de regresión ( $b_0$  a  $b_{p-1}$ ) que deben ser estimados a partir de los datos experimentales. Los vectores  $X_1$  a  $X_{p-1}$  son vectores de niveles de los factores o sus combinaciones lineales. De manera que se construye una matriz del modelo  $X$  y un vector  $b$  de coeficientes a partir de las  $n$  experiencias realizadas. El vector  $\varepsilon$  es un vector de componente aleatorio, de variabilidad de las respuestas con los factores bajo control (Peña 2002).

$$Y = Xb + \varepsilon$$

Ec. 2-6

$$(n \times 1) = (n \times p)(p \times 1) + (n \times 1)$$

La significación del ajuste del modelo se realiza mediante un ANOVA de la regresión, análisis de variancia, (Tabla 2-18 y ecuaciones Ec. 2-8 a Ec. 2-14). Para ello se supone que el componente aleatorio  $\varepsilon$  es Normal de media cero, variancia constante e independiente en cada una de las distintas experiencias.

### 2.5.2.1 Prueba de significación de la regresión múltiple

Se investiga la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que las variables no influyen en la respuesta (Montgomery 2005), los efectos de los tratamientos son idénticos, los regresores o coeficientes del modelo son cero por tanto las medias de cada grupo de respuestas son iguales (Ec. 2-7). Los residuos del modelo se definen como la diferencia entre el valor de la respuesta y el valor previsto por el modelo. La verificación del modelo se basa en comparar la variabilidad explicada por el modelo y la variabilidad experimental, a partir de la suma de cuadrados explicada y la suma de cuadrados residual, respectivamente (ecuaciones Ec. 2-8 a Ec. 2-10).

$$H_0: b_j = 0; j=1, \dots, p-1$$

Ec. 2-7

$$H_1: \text{al menos un } b_j \neq 0$$

El cociente  $F_{\text{calc}}$  entre la variancia explicada y la variancia residual (Ec. 2-16) sigue una distribución de Fisher-Snedecor con  $\nu_{\text{Ex}}$  y  $\nu_{\text{R}}$  grados de libertad. El criterio para



rechazar la hipótesis  $H_0$ , que supone aceptar el modelo, es que  $F_{\text{calc}} \geq F\alpha$ , con un riesgo  $\alpha=0,05$ ; o que el nivel de significación o valor p sea inferior a 0,05.

**Tabla 2-18. Tabla ANOVA (análisis de variancia)**

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalc
Regresión	$\nu_{\text{Ex}}$	SCEx	CMEx	CMEx / CMR
Residuos	$\nu_{\text{R}}$	SCR	CMR	
Total	n-1	SCT		

$$\bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n} \quad \text{Ec. 2-8}$$

$$\text{SCEx} = \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \quad \text{Ec. 2-9}$$

$$\text{SCR} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad \text{Ec. 2-10}$$

$$\text{SCT} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \quad \text{Ec. 2-11}$$

$$\text{CMEx} = \frac{\text{SCEx}}{\nu_{\text{Ex}}} \quad \text{Ec. 2-12}$$

$$\text{CMR} = \frac{\text{SCR}}{\nu_{\text{R}}} \quad \text{Ec. 2-13}$$

$$\nu_{\text{Ex}} = p - 1 \quad \text{Ec. 2-14}$$

$$\nu_{\text{R}} = n - p \quad \text{Ec. 2-15}$$

$$F_{\text{calc}} = \frac{\text{CMEx}}{\text{CMR}} = \frac{\hat{\sigma}_{\text{Ex}}^2}{\hat{\sigma}_{\text{R}}^2} \quad \text{Ec. 2-16}$$

Donde,

$\bar{Y}$  media de respuestas

$Y_i$  valores experimentales de las respuestas

$\hat{Y}_i$  valores de respuesta del modelo

SCEX suma de cuadrados explicada

SCR suma de cuadrados residual

SCT suma de cuadrados total

CMEx cuadrado medio explicado

CMR cuadrado medio residual

$v_{\text{Ex}}$  grados de libertad del modelo

$v_{\text{R}}$  grados de libertad de los residuos

$\hat{\sigma}_{\text{Ex}}^2$  variancia explicada

$\hat{\sigma}_{\text{R}}^2$  variancia residual

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es una medida relativa de la variabilidad total explicada por el ajuste (Ec. 2-17).

$$R^2 = \frac{\text{SCEX}}{\text{SCT}} \quad \text{Ec. 2-17}$$

### **2.5.2.2 Prueba de significación de los coeficientes del modelo**

El estudio de significación de los coeficientes se basa en la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que la variable ( $b_j$ ) no influye en la respuesta, el regresor o coeficiente del modelo asociado a esa variable es cero (Ec. 2-18).

$$H_0: b_j = 0 \quad \text{Ec. 2-18}$$

$$H_1: b_j \neq 0$$

El cociente  $T_{\text{calc}}$  (Ec. 2-19) entre el coeficiente estimado por el modelo ( $\hat{b}_j$ ) y su error típico ( $\sigma_{\hat{b}_j}$ ) sigue una distribución t de Student con  $\nu_R$  grados de libertad. El criterio para rechazar la hipótesis  $H_0$ , que supone que el coeficiente  $\hat{b}_j$  es significativo, es que  $|T_{\text{calc}}| \geq t_{\alpha/2}$ , con un riesgo  $\alpha=0,05$ ; o que el nivel de significación del valor p es inferior a 0,05.

$$T_{\text{calc}} = \frac{\hat{b}_j}{\hat{\sigma}_{\hat{b}_j}} \quad \text{Ec. 2-19}$$

$$\hat{\sigma}_{\hat{b}_j} = \sqrt{\sigma_R^2 \cdot d_{j+1}} \quad \text{Ec. 2-20}$$

Donde,

$d_{j+1}$  término de la diagonal  $(X'X)^{-1}$  asociado a  $b_j$

El procedimiento para obtener la regresión definitiva a partir del modelo inicial es la “regresión paso a paso hacia atrás (Backward Stepwise Regression)”. Se realiza la prueba de significación de los coeficientes y se elimina del modelo aquel coeficiente que presenta un nivel de significación mayor. Se calcula de nuevo la regresión y se repite este procedimiento hasta que todos los coeficientes presentan un nivel de significación inferior a 0,05. La estimación de la ecuación del modelo y el cálculo de los distintos parámetros estadísticos se realiza mediante la “Herramienta de Función para Análisis Regresión” de “Excel”.

### 2.5.3 REGIÓN EXPERIMENTAL

En primer lugar se plantea el problema a estudiar. En esta tesis se pretende realizar la optimización de las secuencias bioquímicas (L, LE, LRE, LP y LRP). Las respuestas que se obtienen son las propiedades de las pastas (índice kappa, blancura y viscosidad) y las propiedades de los efluentes (color, espectro de absorbancia, DQO, toxicidad y actividad residual) después de cada secuencia de bioblanqueo.

Los factores a estudiar en la etapa L son la dosis de lacasa, la dosis de HBT, el tiempo de tratamiento y la presión de oxígeno. Después de haber analizado estudios previos y de haber realizado algunas preexperiencias se establecen los márgenes de variación de dichos factores, la dosis de lacasa se varía entre 1 y 20  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ , la dosis de HBT entre 0,1 y 2 %odp, el tiempo de tratamiento entre 0,5 y 6,5 h y la presión de oxígeno entre 0,2 y 0,6 MPa.

Los niveles de las variables son equidistantes por lo que se pueden codificar y convertir en números enteros, lo más pequeños posibles y de suma cero. Para la realización del diseño factorial se codifican las variables en factores de nivel codificados -1, 0 y 1 mediante la ecuación Ec. 2-21. En la Tabla 2-19 se presentan los valores de las variables para cada uno de los niveles.

$$X_f = \frac{V - V_m}{\frac{V_{\max} - V_{\min}}{2}} \quad \text{para } f = 1,2,3,4 \quad \text{Ec. 2-21}$$

Donde,

$X_f$  nivel del factor codificado

V valor de la variable

$V_m$  valor de la variable en el nivel 0

$V_{\max}$  valor de la variable en el nivel 1

$V_{\min}$  valor de la variable en el nivel -1

**Tabla 2-19. Valor de las variables para cada nivel.**

Variables	Factores	Niveles		
		-1	0	1
<b>dosis lacasa (U·g<sup>-1</sup>)</b>	x <sub>1</sub>	1	10,5	20
<b>dosis HBT (%odp)</b>	x <sub>2</sub>	0,1	1,05	2
<b>tiempo (h)</b>	x <sub>3</sub>	0,5	3,5	6,5
<b>presión oxígeno (MPa)</b>	x <sub>4</sub>	0,2	0,4	0,6

### 2.5.4 DISEÑO FACTORIAL 2<sup>4</sup>

En el diseño factorial 2<sup>4</sup> se realizan 16 experiencias con el sistema lacasa mediador que corresponden a 4 factores y 2 niveles. La matriz de diseño es una matriz de dimensión n (número total de experiencias) x f (número de factores). Se construye a partir de la combinación de niveles de los factores para cada experiencia. Las filas tienen un orden estándar. La primera columna empieza en el nivel -1 y se alternan los niveles, el resto de columnas se obtienen replicando la anterior en -1 y 1, tal como se muestra en la matriz de diseño del factorial 2<sup>4</sup> en la Tabla 2-20.

Tabla 2-20. Matriz de diseño del factorial  $2^4$ .

$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1
-1	1	-1	-1
1	1	-1	-1
-1	-1	1	-1
1	-1	1	-1
-1	1	1	-1
1	1	1	-1
-1	-1	-1	1
1	-1	-1	1
-1	1	-1	1
1	1	-1	1
-1	-1	1	1
1	-1	1	1
-1	1	1	1
1	1	1	1

El modelo inicial a ajustar corresponde a la Ec. 2-22. La matriz del modelo es una matriz de dimensión  $n$  (número total de experiencias)  $\times$   $p$  (número de términos del modelo). Se construye a partir de la matriz de diseño, la primera columna corresponde al vector identidad, las columnas restantes de la matriz se calculan por combinación lineal de las columnas anteriores, tal como se muestra en la matriz del modelo del diseño factorial  $2^4$  en la Tabla 2-20.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \sum_{z=j+1}^4 b_{ijz} X_i X_j X_z + b_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 \quad \text{Ec. 2-22}$$

Donde,

$Y$  respuesta

$b_i$  coeficiente individual

$b_{ij}$  coeficiente de la interacción doble

$b_{ijz}$  coeficiente de la interacción triple

$b_{1234}$  coeficiente de la interacción cuarta

$X_1, X_2, X_3, X_4$  factores codificados

**Tabla 2-21. Matriz de modelo del diseño factorial  $2^4$ .**

Y	1	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_1X_2$	$X_1X_3$	$X_1X_4$	$X_2X_3$	$X_2X_4$	$X_3X_4$	$X_1X_2X_3$	$X_3X_2X_4$	$X_1X_2X_4$	$X_1X_3X_4$	$X_1X_2X_3X_4$
$Y_1$	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
$Y_2$	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1
$Y_3$	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
$Y_4$	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1
$Y_5$	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
$Y_6$	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1
$Y_7$	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
$Y_8$	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
$Y_9$	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
$Y_{10}$	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
$Y_{11}$	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
$Y_{12}$	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
$Y_{13}$	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1
$Y_{14}$	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
$Y_{15}$	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
$Y_{16}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

En el diseño factorial  $2^4$  se puede estimar el efecto individual de los factores, las interacciones dobles, triples y la interacción cuarta. Experimentalmente cabe esperar que no todos los términos del modelo tengan la misma significación o sean tecnológicamente interpretables. Por lo que se puede establecer un orden jerárquico de efectos principales, interacciones dobles, triples y de la interacción cuarta. Esta jerarquización permite estudiar los mismos factores y disminuir el esfuerzo experimental mediante el estudio del diseño factorial fraccionado.

### 2.5.5 DISEÑO COMPUESTO

El diseño factorial  $2^4$  sólo permite utilizar dos niveles para cada una de las variables, permite determinar los efectos individuales y sus interacciones, pero no permite determinar los efectos cuadráticos. Para determinar estos efectos sería necesaria la utilización de tres niveles para cada variable. Si se realizara el estudio mediante un diseño factorial,  $3^4$  o  $3^{4-1}$ , se incrementaría de forma importante la experimentación.

El diseño compuesto permite estudiar las posibles curvaturas en el modelo mediante la realización de un diseño factorial, un determinado número de réplicas en el centro ( $r$ ) y una estrella de experiencias. El diseño compuesto estudiado es un diseño factorial  $2^4$  con tres réplicas en el centro y una estrella de ocho experiencias con el que se puede obtener el modelo Ec. 2-23 y la matriz de modelo compuesto de la Tabla 2-25.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \sum_{z=j+1}^4 b_{ijz} X_i X_j X_z + b_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i X_i \quad \text{Ec. 2-23}$$

En la matriz del modelo  $2^4$  (Tabla 2-21) se deben añadir las filas correspondientes a las tres experiencias centrales (Tabla 2-22) y una columna representativa de los términos cuadráticos (Tabla 2-23). A partir de esta matriz se obtiene un modelo (Ec. 2-24) en el que los términos cuadráticos están confundidos, de manera que las columnas de la matriz correspondientes a los términos cuadráticos son iguales,  $X_1 X_1 = X_2 X_2 = X_3 X_3 = X_4 X_4$ . Debido a esto, si en el análisis estadístico este término es significativo, a partir de las experiencias realizadas no se puede determinar cual de los factores es el que influye de forma cuadrática en la respuesta por lo que se deben realizar un mínimo de cuatro experiencias más (estrella de experiencias) para desconfundir los términos cuadráticos. En estas nuevas experiencias se deben disponer niveles a los factores  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  (Tabla 2-24) de manera que las columnas de la matriz del modelo correspondientes a los términos cuadráticos sean distintas, tal como se observa en la matriz modelo del diseño compuesto en la Tabla 2-25.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \sum_{z=j+1}^4 b_{ijz} X_i X_j X_z + b_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + b_{11} X_1 X_1 \quad \text{Ec. 2-24}$$

Tabla 2-22. Niveles de los factores en las repeticiones en el centro.

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
0	0	0	0

Tabla 2-23. Matriz del diseño 2<sup>4</sup> con repeticiones en el centro.

Y	-	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> X <sub>4</sub>
Y <sub>1</sub>	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
Y <sub>2</sub>	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1
Y <sub>3</sub>	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1
Y <sub>4</sub>	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>5</sub>	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	1	1
Y <sub>6</sub>	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	1
Y <sub>7</sub>	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>8</sub>	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
Y <sub>9</sub>	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1
Y <sub>10</sub>	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1
Y <sub>11</sub>	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>12</sub>	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
Y <sub>13</sub>	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
Y <sub>14</sub>	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	1
Y <sub>15</sub>	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1
Y <sub>16</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>17</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y <sub>18</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y <sub>19</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 2-24. Niveles de los factores en la estrella de experiencias.

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
-1	0	0	0
0	-1	0	0
0	0	-1	0
0	0	0	-1
1	0	0	0
0	1	0	0
0	0	1	0
0	0	0	1



Como se puede observar en la matrices modelo del diseño compuesto (Tabla 2-25) para la determinación del modelo con términos cuadráticos Ec. 2-23 a partir del diseño factorial  $2^4$  se deben realizar 27 experiencias.

**Tabla 2-25. Matriz de modelo del diseño compuesto  $2^4$ , repeticiones en el centro y estrella.**

Y	-	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	v.	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> X <sub>4</sub>	
Y <sub>1</sub>	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>2</sub>	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>3</sub>	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>4</sub>	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>5</sub>	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>6</sub>	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>7</sub>	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>8</sub>	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>9</sub>	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>10</sub>	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>11</sub>	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>12</sub>	1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>13</sub>	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>14</sub>	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>15</sub>	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>16</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y <sub>17</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y <sub>18</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y <sub>19</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y <sub>20</sub>	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Y <sub>21</sub>	1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Y <sub>22</sub>	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Y <sub>23</sub>	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Y <sub>24</sub>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Y <sub>25</sub>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Y <sub>26</sub>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Y <sub>27</sub>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

### 2.5.6 DISEÑO SECUENCIAL

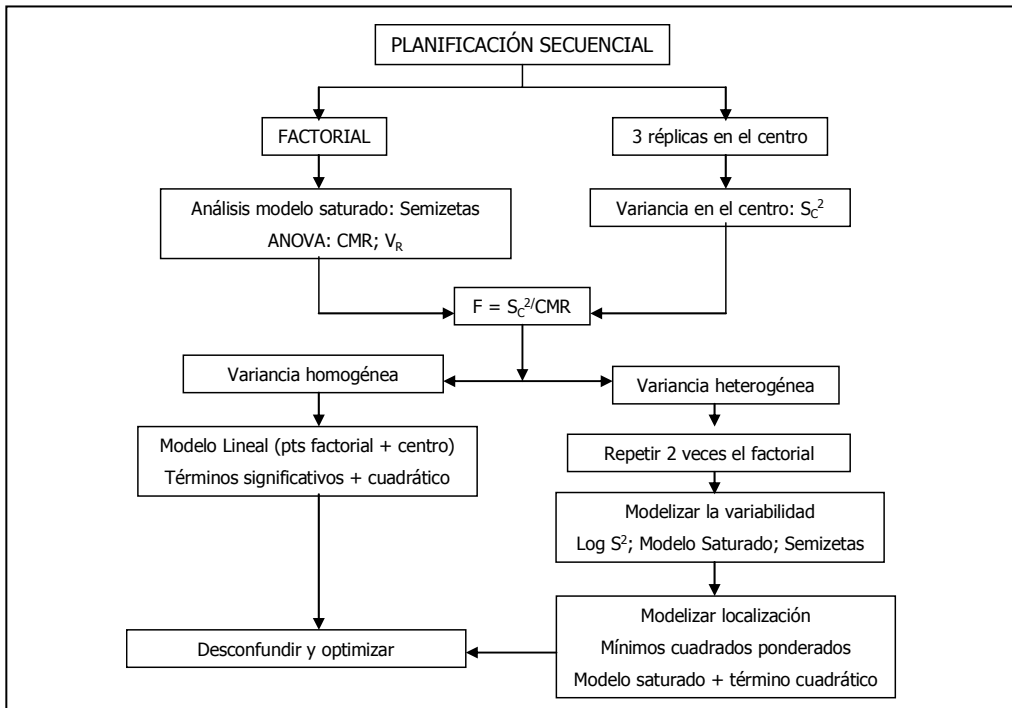
La planificación secuencial de las experiencias permite reducir el esfuerzo experimental. El diseño secuencial se basa en la realización de las experiencias por etapas hasta completar el diseño. Después de cada una de las etapas se analizan los resultados obtenidos y se decide si es necesario realizar la siguiente etapa.

**2.5.6.1 Planificación del diseño secuencial**

Como se puede observar en la Fig. 2-8, la primera etapa en una planificación secuencial es el estudio del diseño factorial (Etapa 1). Se requiere encontrar un modelo lineal que evalúe los efectos principales y sus interacciones.

Se realiza la prueba de homocedasticidad a partir de la variancia en el centro y el cuadrado medio residual del diseño factorial (Etapa 2). Si la variancia es heterogénea, el modelo es heterocedástico, lo que significa que la variancia no es constante en la región experimental estudiada. Se debe replicar dos veces el diseño factorial para modelizar la variabilidad, por lo que la experimentación se incrementa de forma considerable.

Si la variancia es homogénea, el modelo es homocedástico, es decir, la variancia es constante en la región experimental estudiada. Se prosigue con el estudio de las curvaturas (Etapa 3). Para ello se estima un modelo lineal a partir de los términos declarados significativos en el diseño factorial anterior y las repeticiones del centro. Si el término representativo cuadrático es significativo se amplía el diseño y se añade la estrella de experiencias para desconfundir los términos cuadráticos (Etapa 4). Por último se realiza la verificación del modelo obtenido (Etapa 5).



**Fig. 2-8. Esquema de la planificación secuencial (Pepió and Polo 2005).**

### 2.5.6.2 Análisis matemático del diseño secuencial

#### Etapas 1: Diseño factorial

A partir de las dieciséis experiencias correspondientes al diseño factorial  $2^4$  (Tabla 2-21) se estima el modelo lineal (Ec. 2-22) por mínimos cuadrados.

En este primer modelo el número de parámetros ( $p$ ) es igual al número de experiencias realizadas ( $n$ ). Es un modelo saturado que pasa por todos los puntos experimentales, por lo que no se pueden estudiar los residuos, las diferencias entre la respuesta estimada y la respuesta experimental. En los diseños factoriales, completos o fraccionados, las columnas de las matrices del modelo son ortogonales, lo que permite realizar un análisis simultáneo de la significación de los coeficientes mediante procedimientos gráficos, como el gráfico de las semizetas o gráfico seminormal. El gráfico probabilístico de los efectos está basado en los valores absolutos de la Ley Normal centrada (seminormal, normal plegada, semizeta).

El valor de las semizetas ( $S_z$ ) se obtiene en tablas o por cálculo a partir del número  $q$  de coeficientes explicativos (efectos e interacciones) una vez ordenados en valor absoluto de menor a mayor. En este caso, el valor de las semizetas se obtienen en el programa Excel, para ello, a partir de una frecuencia corregida ( $p_i'$ , Ec. 2-25) se estiman las probabilidades acumuladas asociadas a los coeficientes del modelo lineal y se calculan las semizetas a partir de la distribución Normal según la Ec. 2-26.

$$p_i' = \frac{i - 0,5}{q} \quad \text{Ec. 2-25}$$

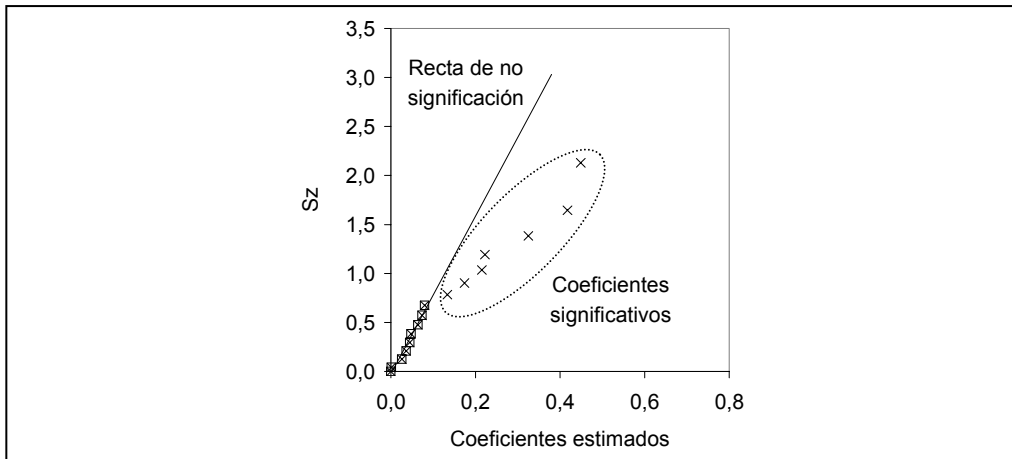
$$S_z = \text{DISTR.NORM.ESTAND.INV}\left(\frac{p_i' + 1}{2}\right) \quad \text{Ec. 2-26}$$

Donde,

$i$  orden de los coeficientes

Se representan gráficamente en el eje de abscisas los coeficientes estimados del modelo en valor absoluto en orden ascendente y en el eje de ordenadas las semizetas. Se estima una recta de no significación, que pasa por el origen de coordenadas y recubre a los puntos más cercanos al eje de semizetas. Todos aquellos puntos que se alejan de la recta y se encuentran a su derecha se consideran significativos. De manera que si un punto es significativo lo son todos los que están

situados a su derecha. Se eliminan del modelo los términos asociados a los coeficientes no significativos. En la Fig. 2-9 se puede ver un ejemplo de un gráfico de semizetas.



**Fig. 2-9. Gráfico de semizetas a partir de un diseño  $2^4$ .**

Una vez obtenido el modelo lineal y la ANOVA con los  $p$  términos declarados significativos en el análisis gráfico se comprueba si el gráfico de los residuos frente al valor de la respuesta estimada muestra homogeneidad de la variancia, es decir, si los puntos se disponen de forma aleatoria.

Si el gráfico de residuos frente al valor previsto o la distribución de puntos en el gráfico de semizetas no son satisfactorios, puede ser debido a un problema de heterocedasticidad (variancia no constante), a la poca influencia de los factores en la respuesta, a un exceso de ruido experimental o a que se dispone de poca información para evaluar cambios muy pequeños en la respuesta.

Etapa 2: Estudio de homocedasticidad

Se verifica si la variancia es constante en todo el campo experimental. Para ello, se compara la estimación de la variancia, supuestamente común estimada con el cuadrado medio residual (CMR), con la variancia del centro ( $S_c^2$ ) estimada a partir de las tres repeticiones en este punto y que es independiente de la anterior (Ec. 2-27 a Ec. 2-30).

El estadístico de la prueba es el cociente entre  $S_c^2$  y CMR (Ec. 2-31) que sigue una ley de  $\nu_1 = r - 1$  y  $\nu_2 = \nu_R$  (Ec. 2-32 y Ec. 2-33).

$$\bar{Y}_C = \frac{\sum_{i=1}^r Y_{ic}}{r} \quad \text{Ec. 2-27}$$

$$S_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^r (Y_{ic} - \bar{Y}_C)^2}{r-1} \quad \text{Ec. 2-28}$$

$$\text{SCR} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad \text{Ec. 2-29}$$

$$\hat{\sigma}_R^2 = \text{CMR} = \frac{\text{SCR}}{U_R} \quad \text{Ec. 2-30}$$

$$F_{\text{calc}} = \frac{S_c^2}{\text{CMR}} \quad \text{Ec. 2-31}$$

$$\nu_R = n - p \quad \text{Ec. 2-32}$$

$$\nu_C = r - 1 \quad \text{Ec. 2-33}$$

Donde,

$\bar{Y}_C$  media de las repeticiones en el centro

$Y_{ic}$ , valores experimentales de las respuestas en el centro

SCR suma de cuadrados media residual

$Y_i$  valores experimentales de las respuestas

$\hat{Y}_i$  respuesta del modelo

$\hat{\sigma}_R^2$  variancia residual

$\nu_C$  grados de libertad de las repeticiones del centro

$\nu_R$  grados de libertad de los residuos

p número de coeficientes significativos del modelo

r número de repeticiones en el centro

Los valores de  $F_{\text{calc}}$  o su valor p permiten determinar si la variancia es homogénea o heterogénea, Ec. 2-34 y Ec. 2-35. El criterio para determinar si la variancia se mantiene constante es que  $F_{\text{calc}}$  se encuentre entre los valores de  $F_{1-\alpha/2}$  y  $F_{\alpha/2}$  de Fisher-Snedecor con  $v_C$  y  $v_R$  grados de libertad o que la nivel de significación valor p, sea superior al riesgo  $\alpha$  de 0,05. El valor del nivel de significación se obtiene mediante la ecuación Ec. 2-35

$$F_{1-\alpha/2} \leq F_{\text{calc}} \leq F_{\alpha/2} \quad \text{Ec. 2-34}$$

$$\text{valor p} = 2 \cdot \min(p', 1 - p') \quad \text{Ec. 2-35}$$

Donde,

$$p' = P(F_{v_1, v_2} \leq F_{\text{calc}})$$

Si la variancia en el modelo obtenido en el análisis del diseño  $2^4$  es homogénea, el modelo es homocedástico. Se continúa con el estudio de las posibles curvaturas. Si la variancia es heterogénea, el modelo es heterocedástico, se debe replicar la experimentación del diseño factorial dos veces y modelizar la variancia para proseguir con el estudio.

### Etapa 3: Estudio de posibles curvaturas

Para realizar el estudio de las posibles curvaturas, en el modelo obtenido en el estudio del diseño factorial se incluyen los p coeficientes ya declarados significativos en el estudio del diseño factorial  $2^4$  y el coeficiente representante de los términos cuadráticos, todos los términos cuadráticos están en alias (Ec. 2-24).

Para ello se parte de la matriz del modelo obtenido, se introduce en esta matriz una columna correspondiente al representante de los términos cuadráticos y las filas correspondientes a las tres réplicas centrales (Tabla 2-22). Se obtiene el modelo por regresión lineal a partir de esta matriz modelo y del vector de respuestas correspondientes al factorial  $2^4$  y las tres centrales.

Si el término cuadrático no es significativo, se elimina este coeficiente del modelo. Las respuestas del centro en la matriz del modelo sólo afectan a la ordenada en el origen, se elimina la columna correspondiente al término cuadrático. Se estiman los coeficientes del modelo por regresión lineal y se verifica el modelo obtenido.

Si en el análisis estadístico del modelo lineal el término cuadrático es significativo, no se puede determinar a partir de las experiencias realizadas qué factor influye de forma cuadrática en la respuesta.

#### Etapa 4: Desconfusión de términos

Si el término representativo cuadrático es significativo, se amplía el diseño añadiendo la estrella de experiencias (Tabla 2-24) para desconfundir los términos cuadráticos. La matriz del modelo compuesto (Tabla 2-25) incorpora las cuatro columnas correspondientes al efecto cuadrático de cada factor, de manera que contiene 27 filas, las 16 del factorial  $2^4$ , las tres de las experiencias centrales y las ocho correspondientes a la estrella de experiencias.

Se estiman los coeficientes del modelo y su significación por el modelo lineal y ANOVA a partir de la matriz del modelo compuesto y del vector de 27 respuestas. Se continúa con el análisis estadístico mediante la técnica de regresión paso a paso hacia atrás.

#### Etapa 5: Verificación del modelo obtenido

Una vez obtenido el modelo definitivo se evalúa la normalidad de los residuos mediante el gráfico Probabilístico Normal en el que se representa la función de distribución acumulada de los residuos en una escala transformada  $Z:N(0,1)$  para que bajo normalidad, sigan aproximadamente una recta. Para ello se calcula la Frecuencia acumulada corregida ( $p'_i$ ), según la ecuación Ec. 2-36, con la que se estiman las probabilidades asociadas al valor de los residuos una vez ordenados de menor a mayor, a partir de ésta se obtiene el valor  $z_i$  de la  $N(0,1)$  con una probabilidad acumulada igual a  $p'_i$ , es decir,  $z_i$  es tal que  $P(Z < z_i) = p'_i$ . Si el error del modelo sigue la Ley Normal los puntos representados se deberían ajustar a una recta.

$$p'_i = \frac{i - 0,5}{n} \quad \text{Ec. 2-36}$$

Se observa si en el gráfico de residuos frente al valor estimado por el modelo los puntos se disponen de forma aleatoria. Se representan gráficamente las respuestas experimentales frente a las respuestas estimadas que predice el modelo. Los puntos representados se deben ajustar a una recta del tipo  $y=x$ .

### 2.5.7 INTERVALO DE PREDICCIÓN

El intervalo de predicción ( $Int_0$ ) de una respuesta  $Y_0$  permite determinar si alguna de las respuestas utilizadas en el estudio estadístico es errónea. Si el valor de la respuesta experimental no se encuentra dentro del intervalo de predicción de la respuesta, esta respuesta se considera errónea, se puede eliminar del estudio y obtener de nuevo el modelo. El intervalo de predicción de una respuesta se calcula a partir de las ecuaciones Ec. 2-37, Ec. 2-38 y Ec. 2-39.

$$X_0 = (1 \ X_{01} \ \dots \ X_{0j} \ \dots \ X_{0p-1})' \quad \text{Ec. 2-37}$$

$$S^2 = \text{CMR} \quad \text{Ec. 2-38}$$

$$Int_0 = \hat{Y}_0 \pm t_{\frac{\alpha}{2}; n-p} \cdot \sqrt{S^2 \cdot \sqrt{1 + X_0' \cdot (X' \cdot X)^{-1} \cdot X_0}} \quad \text{Ec. 2-39}$$

Donde,

$X_0$  vector fila de la matriz del modelo correspondiente al punto experimental  $Y_0$

$X$  matriz del modelo, la primera columna es un vector identidad

$S^2$  variancia común estimada del modelo

CMR cuadrado medio residual del modelo

$\hat{Y}_0$  estimación del modelo del punto experimental  $Y_0$

## 2.6 BIBLIOGRAFÍA

Chai, X.-S., Zhu, J.E. and Li, J. (2001) A simple and rapid method to determine hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 27, 165-170.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., Gonzalez-Vila, F.J. and Martín, F. (1998) Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography* 823, 449-455.

Montgomery, D. C. (2005) *Design and analysis of experiments*. New York: John Wiley & Sons.

Peña, D. (2002) *Regresión y diseño de experimentos*. Alianza Editorial.



Pepió, M. and Polo, C. (2005) Diseño de experimentos y optimización de procesos. Apuntes de la asignatura. LESTAD. ETSEIAT-UPC.