

Universitat Rovira i Virgili

Facultat de Química



Curs acadèmic: 2023/24

Assignatura: Treball de fi de Grau

**Desenvolupament i validació d'un
mètode per espectroscòpia
molecular d'infraroig**

Marc Pedrol Ribera

Tutors professionals: **Dra. Ariadna Campos**

Tutora acadèmica: **Dra. Maria Besora**

Empresa: **Clariant Ibèrica Producción, S.A.**

AUTORITZACIÓ

per al dipòsit de la memòria del Treball de Fi de
Grau per a la seva avaluació i defensa

Nom de l'alumne: Marc Pedrol Ribera

Títol del TFG: Desenvolupament i validació d'un mètode per espectroscòpia
molecular d'infraroig

Nom de la directora del treball: Dra. Ariadna Campos

Data: 13 de juny de 2024

Signatura:



Nom de la tutora acadèmica: Dra. Maria Besora Bonet

Data:

Signatura:

BESORA
BONET,
MARIA
(AUTENTICA
CIÓN)

Firmado
digitalmente por
BESORA BONET,
MARIA
(AUTENTICACIÓN)
Fecha: 2024.06.13
14:10:14 +02'00'



Índex:

1. RESUM.....	2
2. ABSTRACT	2
3. OBJECTIUS	3
4. INTRODUCCIÓ	4
5. FONAMENT TEÒRIC	5
5.1. Família de productes	5
5.2. Anàlisi de mètodes tradicionals	9
5.3. Espectroscòpia d'infraroig	10
5.3.1. FT-IR	12
5.3.2. NIR	13
5.4. Anàlisi de dades.....	14
5.4.1. Pretractament (o preprocessat)	15
5.4.2. Tècniques de calibratge	17
5.4.3. Validació externa.....	21
6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	22
6.1. Síntesi de productes	22
6.2. Mètodes Tradicionals.....	24
6.3. Mètode NIR	27
6.4. Mètode FT-IR	28
6.5. Desenvolupament del mètode analític	29
6.5.1 Precisió.....	33
6.5.2 Robustesa	33
6.5.3 Implementació.....	33
7. RESULTATS	33
8. CONCLUSIONS	45
9. BIBLIOGRAFIA	47
10. ANNEX	48

1. RESUM:

Clariant treballa dia a dia per optimitzar, millorar i modernitzar els processos i anàlisis al laboratori de qualitat per tal de reduir càrrega de treball, residus i augmentar l'eficiència en la producció. També s'encarrega de garantir al client que els productes o serveis que s'ofereixen compleixin amb els estàndards de qualitat establerts. Per aquest motiu, l'empresa ha decidit utilitzar tècniques d'infraroig per crear models estadístics que correlacionin els resultats de les anàlisis tradicionals amb els espectres obtinguts. Això permet obtenir un resultat igual de fiable i sobretot més ràpid que els que ofereixen les anàlisis tradicionals.

En aquest treball s'han creat calibracions amb mètodes multivariant lineal, com Partial Least Square (PLS), a partir d'una família de productes, resultants de la reacció entre un aminoàcid i un clorur d'acil. Les anàlisis tradicionals que es volen substituir són: quantitat de matèria seca (%), contingut de NaCl (%) i d'aminoàcid 2 (%).

2. ABSTRACT:

Clariant works day by day to optimize, improve, and modernize process and analyses in the quality laboratory to reduce workload, waste, and increase production efficiency. It also ensures that the products or services offered to the customers meet established quality standards. For this reason, the company has decided to use infrared techniques to create statistical models that correlate traditional analysis results with the spectra obtained. This allows for equally reliable and much faster results compared to traditional analyses.

In this work, calibrations have been created using linear multivariate methods, such as Partial Least Square (PLS), based on a family of products resulting from the reaction between an amino acid and an acyl chloride. The traditional analyses that are intended to be replaced are: percentage of dry matter, NaCl content (%), and amino acid 2 content (%).

3. OBJECTIUS:

El principal objectiu del meu treball de fi de grau és determinar la quantitat de matèria seca (%), el contingut de NaCl (%) i d'aminoàcid 2 (%) utilitzant una tècnica d'espectroscòpia molecular d'infraroig (IR), desenvolupant nous models multivariants (Partial Least Square, PLS) per a un grup de productes, amb l'objectiu de reduir el temps d'anàlisi i que en un futur l'empresa pugui utilitzar-los com anàlisis rutinàries.

Això ha implicat decidir quina tècnica d'espectroscòpia molecular d'infraroig, tant NIR com FTIR, és la més adequada per aquests productes, fent una comparació entre aquestes tècniques.

A més a més, un altre objectiu de la realització del treball de fi de grau és aprofundir i ampliar coneixements en el món de l'espectroscòpia molecular i la quimiometria.

4. INTRODUCCIÓ:

L'empresa en la qual he realitzat el treball de fi de grau és Clariant, veure il·lustració 1, aquesta multinacional va ser fundada l'any 1997 com a una *spin-off*, una empresa independent generada a partir d'una ja existent, l'empresa Hoechst que es va dividir en Sandoz i Clariant. Aquesta última ha anat adquirint diferents empreses del sector, com ara BTP, Rite Systems i Rincon Colors... Aquestes adquisicions han fet que avui en dia, Clariant s'hagi convertit en una empresa referent i líder mundial en el sector de la química, oferint solucions innovadores i sostenibles per a una gran varietat d'indústries.



Il·lustració 1. Logo de l'empresa on s'ha realitzat aquest treball.¹ ©

Actualment, l'empresa suïssa posseeix plantes de producció als cinc continents i amb seu central a Muttenz, Suïssa. A més a més, Clariant és un dels 33 membres de la AEQT (Associació Química Empresarial de Tarragona). Presenta tres àrees de negoci principalment, "Care Chemicals", Recursos Naturals i Catàlisis. Tots els productes que ofereix van des de matèries primeres per a la fabricació de productes per a la cura personal, metal·lúrgia, mineria i petroli, fins productes per a la llar, fitosanitaris i excipients farmacèutics.

El *site* de Tarragona, que es mostra en la il·lustració 2, es divideix en dues parts, la zona on es troben les 4 plantes de producció amb els seus reactors adjudicats i un laboratori on es fan anàlisis rutinàries. I la zona on hi ha l'edifici social on es troben les oficines i un laboratori de producte final.¹



Il·lustració 2. Infraestructures de l'empresa Clariant a Tarragona.¹ ©

El treball que es presenta en aquest document, s'ha desenvolupat en el laboratori del departament de Control de Qualitat, on he pogut utilitzar tot el material necessari. Aquest departament consta de dos laboratoris diferents, com s'ha explicat anteriorment. L'organigrama d'aquest departament consisteix en una cap de laboratori, que dirigeix

dues seccions, en una, on s'encarreguen de les anàlisis rutinàries, hi ha una supervisora i per sota d'aquesta tots els analistes, tant els que fan torns com els que només treballen a torn central. En l'altre, a una alçada més baixa horitzontalment que la supervisora en l'organigrama, hi ha dues tècniques de laboratori que s'encarreguen del control dels equips i mètodes, així com el desenvolupament de nous mètodes i posta a punt de nous equip al laboratori.

A continuació, es farà una petita introducció sobre la família de productes amb els quals s'ha treballat. Després es parlarà sobre l'espectroscòpia d'infraroig, detallant la tècnica NIR (Infraroig proper, de l'anglès, Near Infrared) i FTIR (Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier). Seguidament, es descriurà la manera de com s'ha desenvolupat el model multivariant, la metodologia experimental i finalment es comentaran els resultats obtinguts i les conclusions finals del treball de fi de grau.

5. FONAMENT TEÒRIC:

5.1. Família de productes:

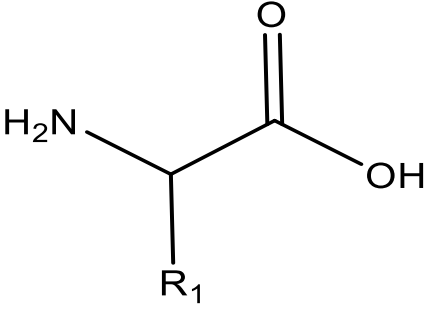
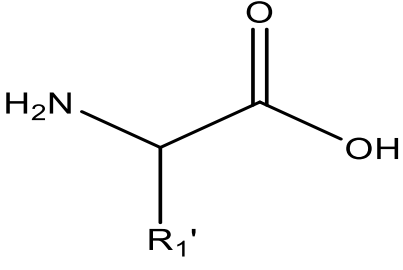
La família de productes amb els quals s'ha treballat s'obtenen a la planta de MPP (Planta Multi-Propòsitos), la qual, gràcies a les seves infraestructures, permet la producció de diversos productes. Aquests productes són tensioactius suaus, compostos que redueixen la tensió superficial entre un líquid i un líquid, gas o sòlid. S'utilitzen principalment en la cosmètica, i la seva principal funció és netejar la pell o els cabells sense causar irritació o sequedat excessiva. La seva principal aplicació és per la confecció de sabons, tant xampús com gels, i altres aplicacions del món de la cosmètica i la higiene personal.

Els productes en els quals s'ha centrat aquest treball són els següents:

- Producte A.
- Producte B.
- Producte C.
- Producte D.

Aquest grup de productes tenen en comú que es produeixen a partir de la mateixa reacció principal, una acilació d'amines. Concretament, una N-acilació, una reacció química orgànica que consisteix a fer reaccionar un aminoàcid i un clorur d'acil per produir una amida.

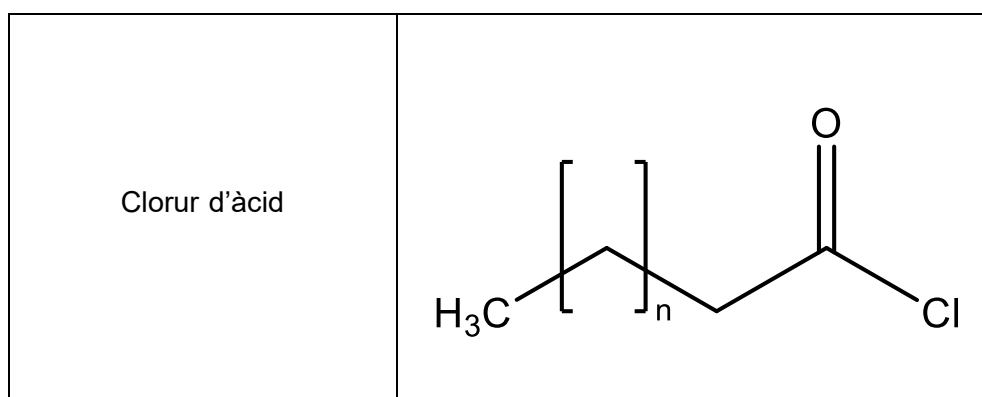
Els aminoàcids consten de dos grups funcionals diferents, un grup amino (NH_2) i un grup carboxílic ($-\text{COOH}$). Els quatre productes es poden dividir en dos grups, per un costat el producte A i B, i per l'altre, el producte C i D, i es diferencien principalment en l'aminoàcid utilitzat. El primer grup es produeix a partir de l'aminoàcid 1; en canvi, el segon grup per l'aminoàcid 2 (veure l'estructura química a la taula 1).

Aminoàcid 1	
Aminoàcid 2	

Taula 1. Tipus d'aminoàcids utilitzats.

Per altra banda, els clorurs d'acils són una classe de compostos orgànics que deriven dels àcids carboxílics. La seva fórmula general és RCOCl , on (COCl) és el grup funcional clorur d'acil, per altra part, tenim $(-\text{R})$ que representa una cadena alquíllica en el nostre cas. Una de les característiques més importants és que són compostos molt reactius i molt utilitzats en diferents síntesis degut a la seva capacitat per formar ràpidament altres derivats d'àcids carboxílics. No obstant això, cal manipular-los seguint els corresponents protocols de seguretat i s'ha de tenir molta precaució, per la seva perillositat i reactivitat.

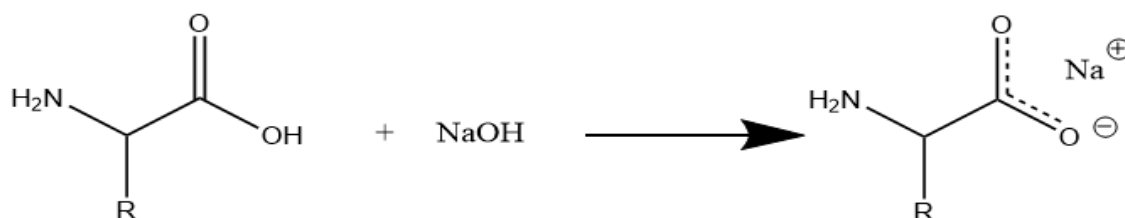
Els clorurs d'acil utilitzats per a la formació de cada producte consisteix en una barreja amb una concentració determinada de clorurs d'àcid, es pot observar la seva estructura general en la taula 2, que es diferencien bàsicament per la cadena d'alquils. Aquesta composició ve determinada pel CoA (*Certificate of Analysis*), i inclou el C8 clorur d'àcid caprílic), C10 (clorur d'àcid càpric), C12 (clorur d'àcid làuric), C14 (clorur d'àcid mirístic), C16 (clorur d'àcid palmític). Depenent de la composició de la barreja, tindrà un nom o un altre, com per exemple, *Cocoyl Chloride* ($n = 6$, a la taula 2) o *Lauric Chloride*.²



Taula 2. Estructura general dels clorurs d'àcids, $n=6$ – clorur d'àcid caprílic ; $n=8$ – clorur d'àcid càpric; $n=10$ – clorur d'àcid làuric; $n=12$ – clorur d'àcid mirístic; $n=14$ – clorur d'àcid palmític.

La reacció consisteix en dues etapes. En la primera etapa, es neutralitza l'aminoàcid amb hidròxid sòdic (esquema 1), i en la segona etapa, es produeix l'acilació (esquema 2).²

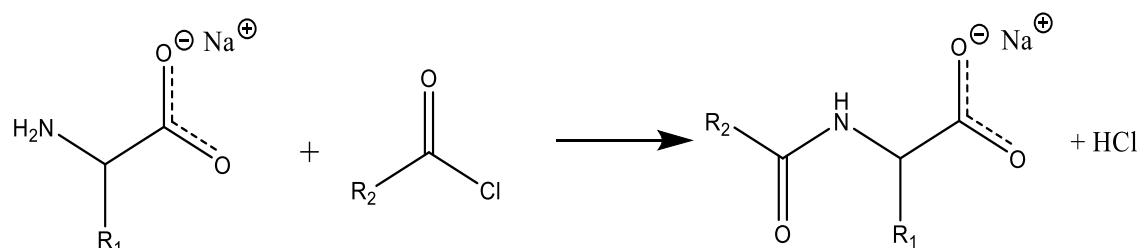
Primera Etapa:



Esquema 1. Reacció de neutralització de l'aminoàcid.

Aquesta etapa, que es pot observar a l'esquema 1, és la que neutralitza l'aminoàcid. Perquè la reacció pugui continuar endavant, ha de tenir lloc en un pH bàsic. En cas d'estar en un medi àcid, a l'entorn hi hauria una gran quantitat de protons (H^+), cosa que afectaria directament la reactivitat dels aminoàcids i el clorur d'àcid, especialment al grup amino, que es trobaria protonat (NH_3^+) i això fa que disminueixi la seva nucleofília. No obstant això, la reacció podria seguir el seu curs però amb menys efectivitat, ja que el grup (NH_3^+) no és tan bon nucleòfil com el grup (NH_2).²

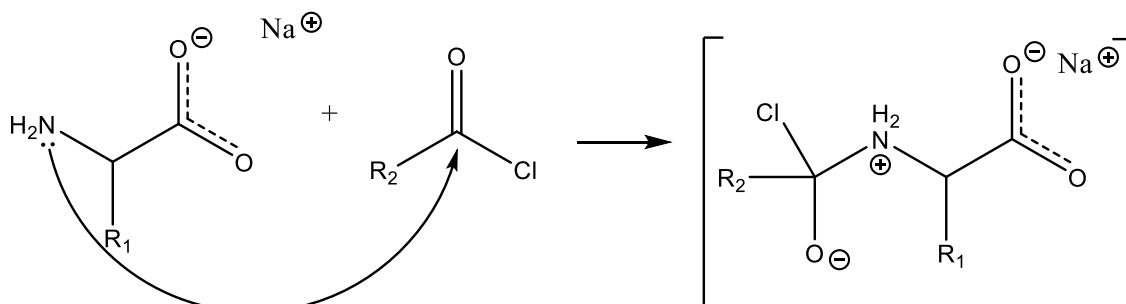
Segona Etapa: N-acilació



Esquema 2. Reacció general de N-acilació entre un aminoàcid i un clorur d'acil.

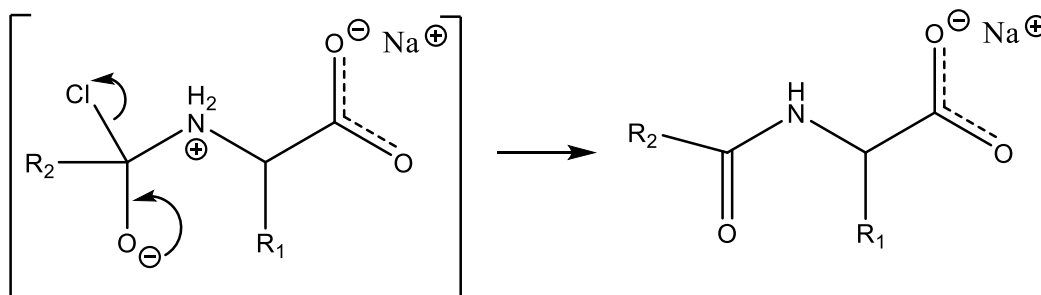
Mecanisme de la reacció:

1. Un cop s'hagi neutralitzat l'aminoàcid, es fa reaccionar amb un clorur d'àcid. Aleshores, es produeix un atac nucleòfil dels dos electrons lliures del grup amino al carboni carbonílic, que presenta un centre electròfil, com es pot observar en l'esquema 3.



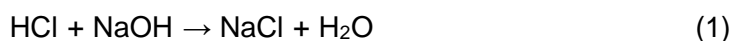
Esquema 3. Primera etapa de la reacció de N-acilació, atac nucleòfil.

2. Posteriorment, el clorur com que és un bon grup sortint és expulsat, per crear l'amida. Si la solució és aquosa els ions clorur i els hidrons (o oxonis/protons) no reaccionen, es troben com a cations i anions en solució, com es pot contemplar en l'esquema 4.



Esquema 4. Segona etapa de la reacció N-acilació, expulsió del grup sortint per obtenir el producte final.

Durant la reacció es forma HCl, i per aconseguir que el pH no baixi s'afegeix NaOH per mantenir la solució en medi bàsic, així produint la reacció secundària (equació 1):



5.1.1. Síntesi dels productes

Per a la construcció dels models es necessita un nombre de mostres bastant elevat i d'un interval ampli de concentracions. A causa de l'escassetat d'aquestes, ja que la seva obtenció depèn del ritme de producció i vendes dels productes, s'ha decidit solucionar aquest imprevist fent la reacció a un reactor pilot en el laboratori. Aquí es prenen mostres a intervals de temps determinats per obtenir diferents concentracions amb la mateixa matriu de la mostra, aconseguint així allargar el rang de concentració de la recta de calibratge.

5.2. Anàlisi de mètodes tradicionals:

5.2.1. NaCl

Aquest mètode s'utilitza per a la determinació de ions clorurs (Cl⁻) segons el mètode de Mohr. Consisteix en la determinació argentomètrica de l'ió clorur en solució aquosa per valoració potenciomètrica, és a dir, la determinació d'un ió en solució mitjançant la mesura del canvi de potencial elèctric durant la titulació/valoració. Es produeix la següent reacció (equació 2):



5.2.2. Matèria Seca

Aquest mètode es fa servir per a la determinació de la quantitat de substància seca. Podem definir substància seca com aquella part del producte, en %, que s'obté després d'assecar la mostra a unes condicions i un pes determinats. Amb unes altres paraules, s'analitza la quantitat de producte sense l'aigua continguda. Es fan tres repeticions per cada mostra, i es fa la mitja dels resultats obtinguts, a partir de la següent equació 3, per obtenir un resultat final.

$$S. Seca(\%) = \frac{P_f - P_i}{\Delta P_j} \times 100 \quad (3)$$

On:

P_f = Pes de la càpsula amb producte després de l'assecat

P_i = Pes de la càpsula sense l'assecat

ΔP_j = Pes de la xeringa plena – pes de la xeringa buida

5.2.3. Aminoàcid 2:

En el cas d'aquesta tècnica d'anàlisi, s'aplica per a la determinació de concentració de l'aminoàcid 2 en els productes A i B. Consisteix en la separació, identificació i quantificació d'un aminoàcid mitjançant HPLC (cromatografia líquida d'alta eficiència), utilitzant patrons externs per aconseguir una recta de calibratge que relacionin les àrees dels pics respectius amb la concentració.

5.3. Espectroscòpia d'infraroig:

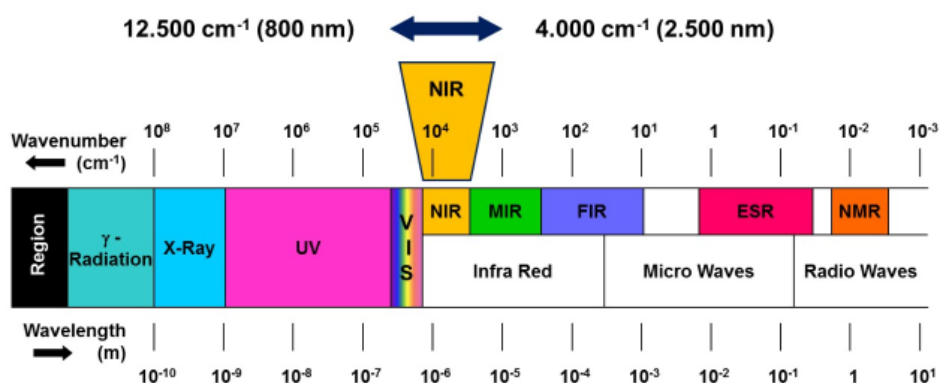
L'espectroscòpia d'infraroig és una tècnica utilitzada per analitzar mostres de manera qualitativa i quantitativa. Aquest mètode consisteix en l'aplicació de radiació infraroja sobre una mostra, les molècules d'aquesta absorbiran energia en funció dels enllaços que tenen, enllaços orgànics (usualment els enllaços: C-H, O-H i N-H). Explicat més detalladament, quan un raig de llum infraroja incideix amb la matèria, aquesta absorbeix la llum en la regió d'infraroig de l'espectre electromagnètic, així convertint-la en vibració molecular (vibració d'uns dels enllaços dins d'una molècula). A més a més, per tal que una molècula pugui absorbir radiació infraroja, la freqüència de la radiació ha de permetre la transició entre estats vibracionals. La freqüència de la radiació i la vibració de l'enllaç han de ressonar i la vibració ha de provocar una diferència en el moment dipolar de l'espècie amb enllaços covalents.³

El nombre de vibracions possibles per a una molècula depèn del nombre d'àtoms i la seva disposició en l'espai. Addicionalment, hi ha dos tipus de vibracions, les vibracions de tensió i les de flexió.

Segons la llei de Lambert Beert, equació 4, la quantitat d'energia absorbida és directament proporcional a la concentració dels components presents en la mostra. Amb unes altres paraules, la quantitat d'absorció (Abs) és determinada pel coeficient de l'absortivitat molar de les espècies absorbents (ϵ), la concentració de la mostra (c) i la longitud del camí òptic (l).

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

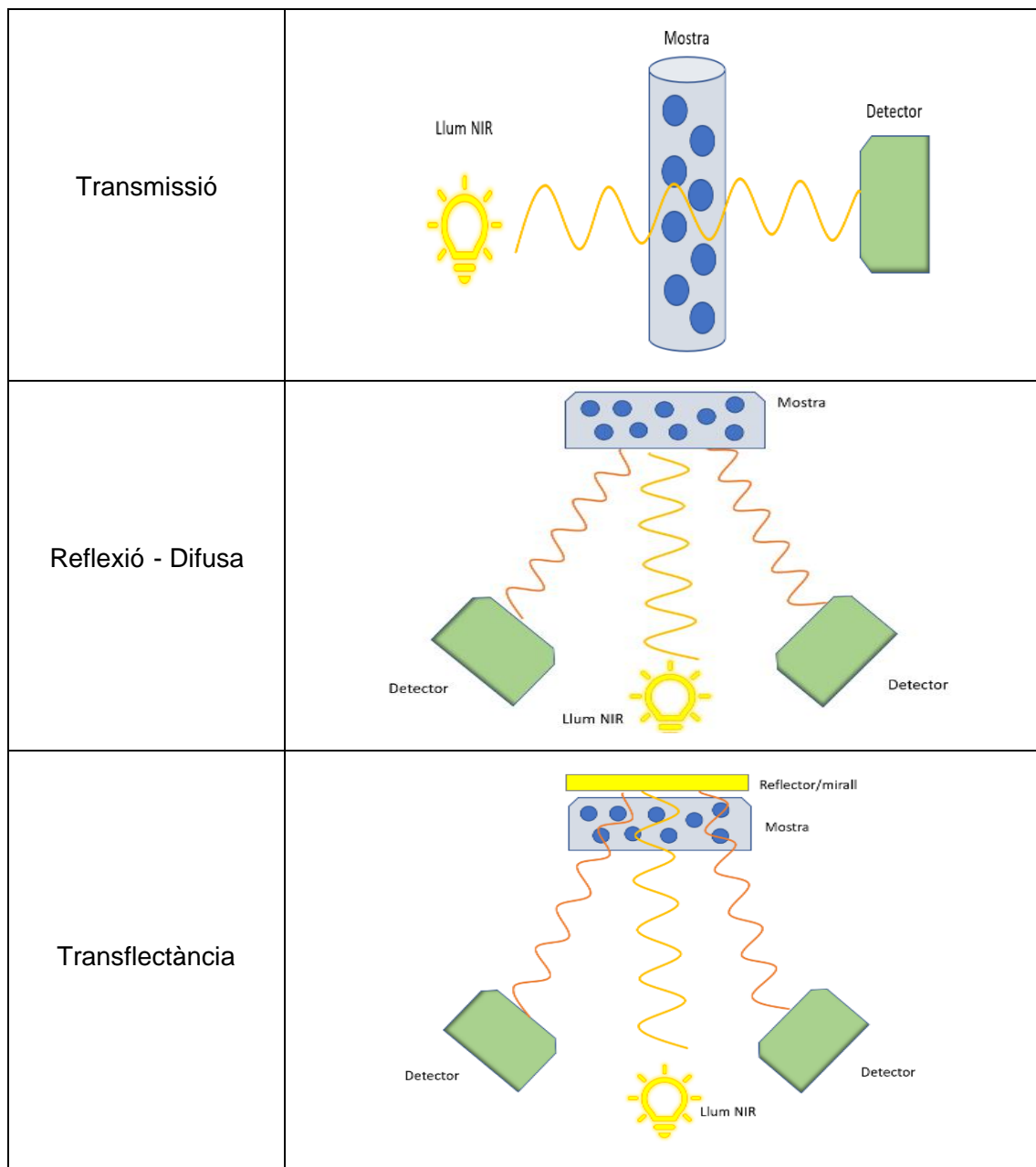
Mitjançant l'espectroscòpia, es pot descompondre la radiació electromagnètica en una varietat de longituds d'ona, així donant origen al que coneixem com espectre. Aquest espectre abasta diverses regions, com ara la llum visible (UV-visible), l'infraroig, els raigs X i les microones. Cada regió espectral ens ofereix una informació específica i aquestes



Il·lustració 3. Longituds d'ona d'on treballa el NIR.⁴ ©

tècniques s'adapten a diferents rangs de longitud d'ona. En les dues regions que s'ha centrat aquest treball són: el NIR, el qual treballa en un interval de longituds d'ona d'entre 12.500 a 4000 cm^{-1} , i el FTIR o MIR que treballen entre 4000 a 400 cm^{-1} , com es pot observar en la il·lustració 3.⁴

Depenent de l'instrument que s'utilitzi i el tipus de mostra, requerirà una classe de mesura o una altra. Existeixen tres tipus diferents de mesura, els quals són els següents: reflexió, transmissió i transflectància, i es pot observar un esquema de cadascuna en la taula 3.⁴



Taula 3. Tipus de mesures en l'espectroscòpia molecular d'infraroig.

En el cas d'aquest treball, s'ha utilitzat el mètode de mesura de transmissió pel NIR, ja que la família de productes amb els quals s'han treballat són líquids homogenis i

transparents. Per mesurar les mostres s'han fet servir cubetes de vidre. Pel que fa l'última tècnica, és la combinació de les altres dues i se sol utilitzar quan l'anàlisi amb les altres és molt difícil o per la monitorització de processos, ja que permet obtenir mesures ràpides i fiables amb una preparació mínima de les mostres.

Els equips estan formats per una font de llum, un monocromador (en cas del NIR) o interferòmetre (en cas del FT-IR) i un detector.

Avantatges: El mètode IR destaca per la seva versatilitat, la capacitat d'adaptar-se a diferents mostres sense necessitat de dissolvents, sent no destructiu i proporciona resultats ràpids i senzills, així estalviant temps i diners a les empreses. S'utilitza en agricultura, indústria alimentària, farmacèutica, biotecnologia polímeres i química, entre d'altres. A més a més, que aquesta tècnica permeti l'anàlisi multicomponent i l'anàlisi en línia de producció fan que sigui una de les tècniques més atractives del mercat.

Desavantatges: Tot i que aquesta tècnica aporta moltes facilitats al dia a dia de moltes empreses, també presenta alguns inconvenients. Per exemple, no és capaç de fer models amb mostres que continguin una concentració d'aigua superior al 30%, ja que satura l'espectre. També, requereix la necessitat d'eines/programaris (*software*) matemàtics i conseqüentment personal especialitzat. Altrament, també requereix un gran nombre de mostres i que hi hagi variabilitat entre elles per a obtenir un model precís i robust. Un inconvenient crític és el problema d'homogeneïtat, ja que en el cas de mostres no homogènies, pot portar a resultats inconsistents i poc fiables. Addicionalment, aquesta tecnologia té el límit de quantificació entorn a l'1%. Per acabar, la gran inversió inicial que s'ha de fer per al cost de l'aparell també pot ser un inconvenient.⁴

Els resultats s'avaluen mitjançant un *software* estadístic-matemàtic i quimiomètric. La identificació de molècules es basa en un únic espectre, mentre que la quantificació es realitza mitjançant canvis en la intensitat de les bandes vibratòries dels enllaços, com s'ha explicat anteriorment. Les excitacions de les molècules i les vibracions dels enllaços produeixen taules de distribucions, com per exemple la que es troba en l'*annex 1 i 2*.

5.3.1. FT-IR:

El FTIR, Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier, o Mid-IR forma part de la regió MIR (4000 i 400 cm^{-1}) veure il·lustració 3. La gran diferència amb l'espectroscòpia IR convencional és que aquesta utilitza un sistema monocromàtic, mentre que el FT-IR un interferòmetre, habitualment el de Michelson. La funció d'aquest interferòmetre és dividir la llum en múltiples longituds d'ona, permetent una recopilació de dades més ràpida i precisa.

La tècnica utilitzada per irradiar la mostra, a causa del tipus d'equip, ha estat l'ATR (*Attenuated Total Reflection*). Com diu el seu propi nom, pertany a la classe de mesura reflexió, veure taula 3, que se sol utilitzar per a mostres sòlides. Aquesta tècnica principalment analitza les vibracions fonamentals de les molècules, les bandes principals, donant informació precisa dels grups funcionals i l'estructura molecular. A més a més, té una sensibilitat i resolució més altes en comparació al NIR.

No obstant això, també té inconvenients, ja que encara que hi hagi poca quantitat de mostra, és possible que es requereixi una dilució. També, la forta absorció tant del CO₂ atmosfèric com de l'aigua, tot i que, per solucionar aquests problemes, se sol fer un blanc anteriorment i prepara la mostra per tindre-la tan seca com sigui possible.⁵

5.3.2. NIR

La tècnica Near InfraRed treballa en un rang de longituds d'ona d'entre 12500 a 4000 cm⁻¹, com s'ha esmentat anteriorment. Aquesta tècnica proporciona informació sobre sobretons i combinacions de vibracions moleculars, tot i que generalment aquests senyals no són tan intenses com les obtingudes amb el FTIR. No obstant això, el senyal que ofereix es repeteix en diverses parts de l'espectre, la qual cosa significa que en cas de tenir una regió saturada o amb informació poc clara, una altra part de l'espectre sí que pot proporcionar la informació necessària sobre aquestes vibracions.

Aquesta tècnica té la capacitat de poder mesurar mostres mitjançant reflexió, transmissió i transfectància. Un avantatge que té el NIR respecte del FTIR és que, en cas de tenir una mostra no homogènia, es pot treballar amb reflexió o transfectància mitjançant un *Sample Cup Spinner*, que permet estendre la mostra sobre una superfície prou gran. Això possibilita que els *scans* realitzats es facin en diverses parts de la mostra, obtenint una mitjana dels espectres per regular l'homogeneïtat.

A més a més, un gran avantatge en comparació al FTIR és que en el NIR es pot instal·lar *online*. Això permet la seva integració en les línies de producció i el monitoratge continu durant la fabricació per detectar desviacions, a més de reduir costos.

No obstant això, a causa de la informació que proporciona, la tècnica NIR té menys sensibilitat i resolució que la tècnica FTIR.

NIR vs FTIR

Les principals diferències esmentades anteriorment en els apartats 5.3.1 i 5.3.2, es poden observar resumides en la taula 4:

	NIR	MIR (FT-IR)
Longitud d'ona	4000 a 12000 cm^{-1}	400 a 4000 cm^{-1}
Temps de mesura	15 segons	15 segons
Tipus de mesura	Transmissió/Reflexió/Transflectància	Reflexió
Quantitat	15 gr. aprox	< 1 gr. aprox (Una gota en cas d'un líquid)
Heterogeneïtat	Sí (<i>sample spinner</i>)	No
Què mesura	Sobretons i Combinacions de les bandes principals	Bandes principals
Online	Sí	No
Destructiu	No	No

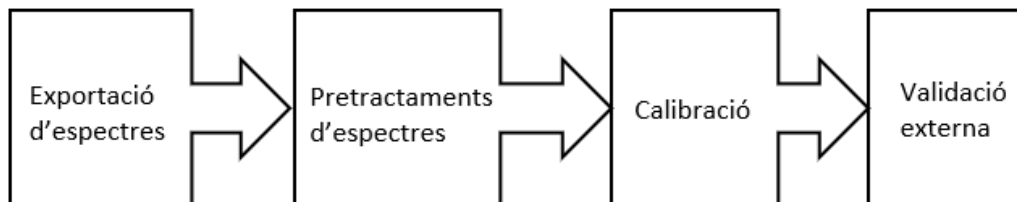
Taula 4. Comparació entre NIR i FTIR.

5.4. Anàlisi de dades: ^{6 i 7}

Per poder analitzar les dades generades es necessita una de les branques de la química, la quimiometria. Aquesta disciplina metrològica aplica coneixements matemàtics, especialment estadístics, als processos químics per extreure la màxima quantitat d'informació possible de les dades experimentals i ampliar el coneixement en la determinació simultània de diversos anàlits o d'un únic anàlit en presència d'una matriu complexa que participa en el senyal analític.

Aquesta disciplina va aparèixer cap als anys 70 del segle passat, a causa del desenvolupament de la instrumentació i el gran auge de la microinformàtica que permet emmagatzemar i tractar a altes velocitats un elevat nombre de dades analítiques.

El seguiment per a realitzar un mètode de calibració (*workflow*) es mostra en l'esquema 5, on un cop exportats els espectres, són sotmesos a un pretractament, com es detalla a l'apartat 5.4.1. Seguidament, es procedeix a la calibració mitjançant la tècnica de Partial Least Square (PLS), incloent-hi una validació interna, *Cross-Validation*. Per acabar, es fa una validació externa amb mostres externes del model de calibració, Aquest *workflow* s'explica detalladament en els següents apartats.



Esquema 5. *Workflow a seguir per crear un bon model PLS.*

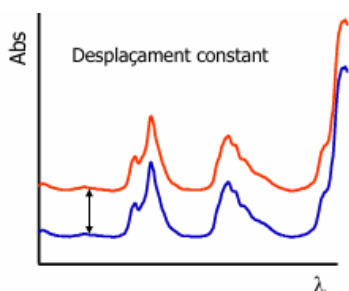
5.4.1. Pretractament (o preprocessat):

El pretractament (o processat) consisteix a canviar les dades per fer-les més adequades per l'anàlisi i eliminant fonts de variació no relacionades amb la propietat a determinar. El simple fet d'escollir el pretractament idoni pot causar facilitat en la interpretació de les dades i no empitjorar el model, és a dir, el pretractament s'utilitza per millorar el senyal instrumental obtingut. A partir del conjunt d'espectres obtinguts s'utilitzarà un pretractament o un altre, aquestes variacions entre els espectres poden vindre degut al tipus de mostra, al *background* fet anteriorment i a més variables. A continuació, es fa un breu resum dels pretractaments que he utilitzat i els més comuns.

5.4.1.1. Primera derivada:

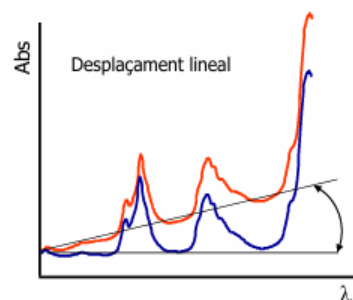
Aquest pretractament és comú en dades espectroscòpiques. El seu principal objectiu és la correcció de la línia base, és a dir, tenir una línia base comuna a totes les dades. La variació o desplaçament que pot haver-hi entre el conjunt dels espectres, pot ser constant, gràfic 1, o lineal, gràfic 2.

Constant:



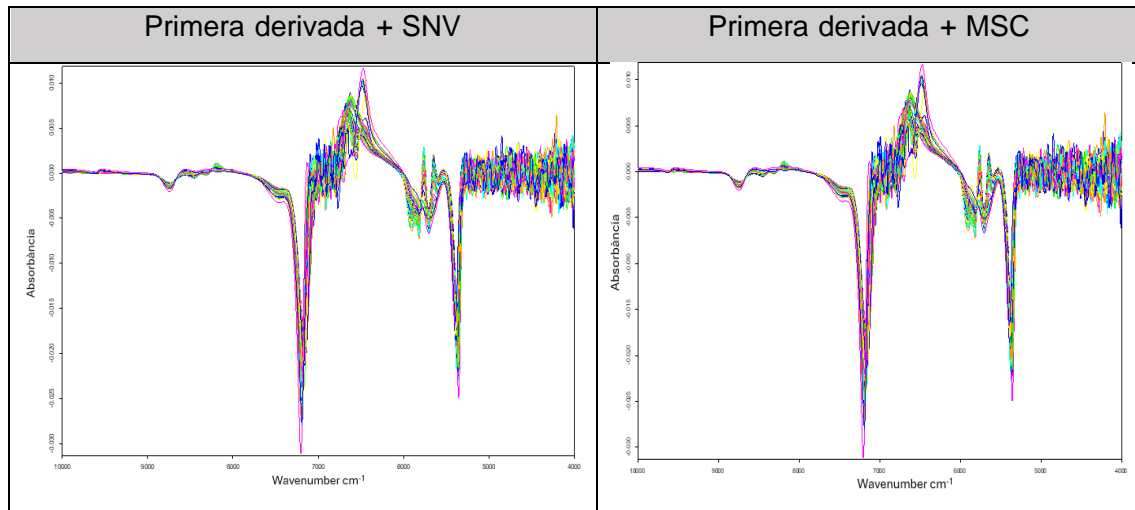
Gràfic 1. *Desplaçament constant.*

Lineal:



Gràfic 2. *Desplaçament lineal.*

Tant si el desplaçament és constant o lineal, es pot aplicar aquesta tècnica. A més a més, aquest pretractament es pot utilitzar amb el *Normal Standard Variation*, SNV, i *Multiplicative Scatter Correction*, MSC, com es veu en la taula 5.

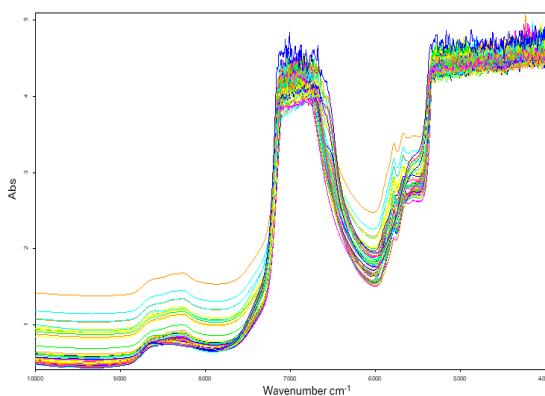


Taula 5. Diferents combinacions de pretractament per al model que determina el % de matèria seca.

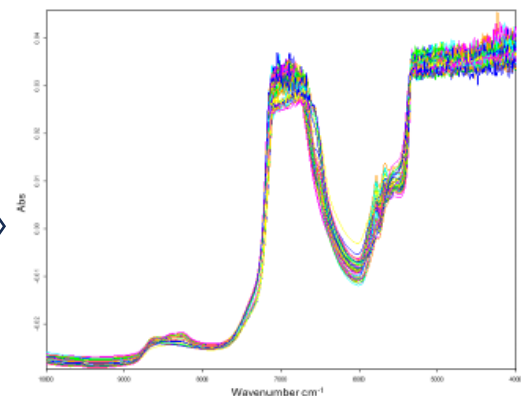
Les següents dues tècniques de pretractament s'utilitzen per a la millora del senyal instrumental i eliminar la reflectància espectral. Un dels desavantatges de les mesures espectroscòpiques, és que sovint pateixen d'efectes associats a la dispersió de la llum per causes físiques, com per exemple, partícules en suspensió. També s'utilitzen per problemes d'escala, i n'hi ha de dos tipus, per efecte multiplicatiu, en la que cada espectre té una escala diferent, o per efecte additiu, el qual pateix un desplaçament vertical de l'espectre.

5.4.1.2. SNV (*normal Standard variation*):

Aquesta tècnica se sol utilitzar per corregir efectes d'escala entre mostres. A més a més, a diferència del MSC, SNV s'aplica individualment a cada espectre, sense dependre de cap espectre promig, d'aquesta manera s'obté una escala comuna per a tots els espectres. La correcció consisteix a centrar cada espectre restant el valor promig de l'absorbància de l'espectre a cada un dels valors d'absorbància a cada longitud d'ona,



Gràfic 3. Conjunt d'espectres del model que determina el % de matèria seca sense SNV.



Gràfic 4. Conjunt d'espectres del model que determina el % de matèria seca amb SNV.

dividint el resultat per la desviació estàndard de l'espectre, és a dir, un autoescalat per files. A més a més, una característica del SNV és que produeix estructures corbades en el plot, com es pot observar en els gràfics 3 i 4.

5.4.1.3. MSC (*multiplicative scatter correction*):

Igual que el pretractament SNV, aquesta tècnica també té com a objectiu corregir desplaçaments espectrals a causa de la diferent mida de partícula de mostres. És un pretractament molt utilitzat per la tècnica NIR, ja que aquest efecte sol presentar-se en mesures de reflectància. Aquesta correcció consisteix a crear un espectre promig/ "ideal" /referència no afectat per la dispersió, per seguidament fer una regressió entre cada espectre i l'espectre "ideal".

Una característica d'aquest pretractament és que accentua els valors anormals o *outliers*, que pot ser que utilitzant SNV no ho siguin.

S'han fet estudis que demostren que existeix una relació lineal entre MSC i SNV, aleshores, aplicats correctament, proporcionen resultats equivalents.

5.4.2. Tècniques de calibratge:

El principal objectiu d'una tècnica de calibratge és intentar trobar una relació entre una resposta analítica amb una propietat d'interès d'una mostra. Aleshores, per poder predir un resultat d'alguna variable o variables a partir d'un espectre NIR o FTIR, hi ha dos mètodes que es poden utilitzar: la calibració univariant lineal i la calibració lineal multivariant.

5.4.2.1. *Calibració multivariant lineal*

A diferència de la calibració univariant, aquesta tècnica consisteix a predir una concentració/resultat a partir de l'absorbància en un rang de longituds d'ona, aquesta considera múltiples variables independents simultàniament. Aquesta característica li permet una millor discriminació de les mostres i una millor robustesa davant d'interferències o variacions en les condicions experimentals. Tot i això, no totes les variables són importants, és a dir, és possible que hi hagi una quantitat de variables que no donin cap mena d'informació i que siguin menyspreables. La predicció de mostres es basa en el càlcul de l'equació (5) de la recta:

$$y_{\text{mostra}} = X_{\text{mostra}} \cdot b; \quad Y_{\text{mostra}} = X_{\text{mostra}} \times b\lambda_0 + b\lambda_1 + b\lambda_2 + \dots \quad (5)$$

On:

$$y_{\text{mostra}} = \text{els resultats de referència (vector)}$$

En comparar els resultats de cada anàlisi amb la informació original, es pot calcular l'error de predicció de tot el sistema, RMSECV (*Root Mean Error of Cross Validation*) amb la fórmula de l'equació 6.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (Y_i^{meas} - Y_i^{pred})^2} \quad (6)$$

On:

n = número de mostres

Y_i^{meas} = valor de concentració real

Y_i^{pred} = valor predit

Aquest resultat dona una idea quantitativa de la diferència en la capacitat predictiva del model quimiomètric. Bàsicament, ajuda a entendre com és de bo el model per a predir noves mostres i a saber quantes variables latents s'utilitzaran en el model.

Per tindre un model PLS òptim s'ha de considerar uns quants paràmetres per a avaluar els diferents models i així veure si poden predir de forma idònia, aquests paràmetres són els següents:

R² (coeficient de regressió):

El coeficient de regressió és un paràmetre que proporciona el percentatge de variació present en els valors dels components, el qual són predits pel model. Com major sigui aquest coeficient, millor és la correlació entre els valors espectrals i les dades de referència. Un mal valor pot ser degut a seleccionar paràmetres del model inapropiats, a una precisió insuficient dels valors de referència, o l'existència de punts discrepants.

A més a més, segons el R² resultant es pot aplicar per un àmbit o un altre, depenent de la taula 6:

R ²	Classificació	Interpretació
< 0,25	Molt pobre	No utilitzable
0,26 – 0,49	Pobre	Baixa correlació
0,50 – 0,64	Imparcial	Aplicacions probes preliminars
0,65 – 0,82	Raonable	Acceptable, adequat per aplicacions de probes preliminars
0,83 – 0,90	Bo	QC
0,91 – 0,96	Molt bo	QA

0,97 – 0,998	Excel·lent	Qualsevol aplicació
> 0,998	Superior	Tan bo com el mètode de referència

Taula 6. Interpretació de l'avaluació del coeficient de regressió segons Clariant.

LV (variables latents):

Les variables latents són no observables que es deriven de variables observables per capturar l'estructura subjacent de les dades. En el cas del model PLS, les LV la seva funció és trobar components principals que maximitzin la relació entre les variables predictorres (X) i les variables de resposta (Y). En conclusió, per a tindre un model òptim s'intenta combinar un número baix de LV, ja que si s'agafa un número alt aquest model tindrà sobre ajustament (*overfitting*), i un RMSECV (*Root Mean Error of Cross Validation*) el més baix possible, tal com s'ha explicat anteriorment de manera detallada.

Distància de Mahalanobis (MD):

Aquesta distància es pot definir com la diferència entre l'espectre mitjà i el valor mitjà de tots els espectres de calibració utilitzats en reconstruir la matriu de dades espectrals pel nombre donat de mostres. La distància de Mahalanobis augmenta a mesura que augmenta aquesta diferència, aquesta pot ser deguda a factors externs, com ara la possible contaminació de les mostres o canvis de la temperatura, que porten a la distorsió de la simetria del pic. En resum, la MD és una mesura quantitativa per la credibilitat de l'anàlisi, perquè tant els punts discrepants com les mostres amb valors de referència fora de l'interval de concentracions vàlides són detectades. Les mostres que estiguin per sobre d'aquesta distància no poden ser predits amb certesa, és a dir, són possibles valors anormals o *outliers*.

RPD (Ratio of Performance Deviation):

És la mesura estadística que parteix de la divisió entre la desviació estàndard del valor de referència de la calibració (SD_{ref}) i el SEP (*Standard Error of Prediction*), com es pot observar en l'equació 7.

$$RPD = \frac{SD_{ref}}{SEP} \quad (7)$$

El resultat d'aquesta divisió és un valor qualitatiu sobre la mesura de l'avaluació de la validació del resultat. A més a més, a partir d'aquest resultat podem saber com estan distribuïdes les mostres dins del rang de calibració, ja que les calibracions amb un RPD alt, tindran un rang de mostres distribuït homogèniament. Segons el resultat obtingut, el model podrà ser classificat per un ús o un altre.

RPD	Classificació	Interpretació
< 1	Molt pobre	No recomanable
1,0 – 2,4	Pobre	No recomanable
2,5 – 2,9	Imparcial	Projecció aproximada
3,0 – 3,9	Raonable	Control
4,0 – 5,9	Bo	QC
6,0 – 7,9	Molt bo	QA
8,0 – 10,0	Excel·lent	Qualsevol aplicació
> 10,0	Superior	Tan bo com el mètode de referència

Taula 7. Interpretació de l'avaluació del Ratio of Performance Deviation segons Clariant.

5.4.3. Validació externa:

Un cop s'ha creat un model de calibració, és imprescindible fer una validació, és a dir, demostrar com és de bo el nostre model per a predir noves mostres que no s'han utilitzat per fer el model.

La validació externa requereix la necessitat d'un gran nombre de mostres. Com a mínim un 20 o 40% del nombre de mostres de la calibració. Per saber l'error de la predicció, es calcula el RMSEP (*Root Mean Error of Prediction*), la mesura quantitativa de la precisió amb què la mostra es prediu durant la validació externa. Ha de ser similar al RMSECV de la calibració. Es pot calcular el valor RMSEP mitjançant la següent fórmula (equació 8):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{M} \cdot \sum_{i=1}^M (Y_i^{meas} - Y_i^{pred})^2} \quad (8)$$

On:

M = número de mostres

Y_i^{meas} = valor de concentració real

Y_i^{pred} = valor predit

6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Per desenvolupar les calibracions tant de NIR com de FTIR, es busca la correlació entre els espectres procedents de la tècnica d'espectroscòpia (matriu X) i els resultats dels mètodes de referència (vector Y), tal com s'ha explicat anteriorment. S'han analitzat els anàlits d'interès de les mostres obtingudes durant les síntesis dels diferents productes, mitjançant els mètodes de referència (quantitat de matèria seca (%), contingut de NaCl (%) i aminoàcid 2 (%)), i s'han registrat els espectres per l'equip NIR i FTIR per intentar construir models per a cada anàlit. Posteriorment, s'ha seleccionat la tècnica d'espectroscòpia més adequada i s'ha complementat amb mostres de procés per tenir uns models més robustos i precisos, com s'ha esmentat anteriorment.

A més a més, s'han cercat els resultats de referència de mostres de procés en una base de dades interna de Clariant per completar els models de calibració un cop ja escollida la tècnica d'espectroscòpia a utilitzar. En aquesta recerca de mostres, es requereixen dos requisits importants: disposar de l'espectre i dels seus resultats de referència respectius. Un cop es tenen aquests dos elements, se selecciona quina mostra és útil i quina no, intentant buscar-ne amb diferents resultats per ampliar la recta de calibratge i tindre un model amb un rang ampli, centrant la cerca a obtenir la quantitat més gran possible de mostres als extrems, degut l'efecte *leverage*. Una característica important observada en els espectres NIR és la saturació en una part d'aquest que es troba saturat, concretament saturat d'aigua, un dels principals inconvenients del NIR, com s'ha explicat prèviament. A més a més, es relacionen els pics obtinguts amb els grups funcionals respectius.

6.1. Síntesi de productes

Com s'ha explicat anteriorment, s'ha realitzat la síntesi de diversos productes per obtenir diferents mostres amb resultats diferents, repartits per tota la recta de calibratge. S'utilitza uns reactius i material específic, com s'observa en la taula 8.

Reactius	Material
<ul style="list-style-type: none"> • Aigua desmineralitzada. • Aminoàcid. • Hidròxid de Sodi al 27.5%. • Clorur d'àcid. • Glicerina o Monopropilenglicol "MEG" (agent solubilitzant). 	<ul style="list-style-type: none"> • Reactor pilot amb agitador. • Granetari. • Espàtula. • Vas de precipitats (150 i 600 mL). • Embuts d'addició. • pH-metre. • Bany termostàtica.

	<ul style="list-style-type: none"> • Agitador magnètic. • Imant.
--	--

Taula 8. Reactius i materials utilitzats per a la síntesi en el reactor.

Mètode Operatiu:

El procediment utilitzat és el mateix que utilitzen els operaris en el dia a dia per fabricar aquest producte, però a escala més petita. Com he explicat anteriorment en l'apartat 5.1, la reacció té dues etapes, la primera es realitzarà sota campana en un agitador magnètic dins d'un vas de precipitats de 600 mL i la segona, en el reactor encamisat petit de vidre (2L), com es pot observar en la il·lustració 4.

Per a començar la fabricació d'aquests productes s'han seguit els següents passos:

Sota la campana, es tara un vas de precipitats de 600 mL amb un imant en



Il·lustració 4. Reactor pilot.

el granetari, per després afegir una quantitat determinada d'aigua desmineralitzada. Un cop s'ha posat la quantitat necessària, s'afegeix a poc a poc l'aminoàcid, és un sòlid. Quan s'ha afegit tota la quantitat necessària, es porta el vas a l'agitador magnètic on es dissol, quedant una solució homogènia. Mentrestant, es tara un vas de precipitats de 150 mL al granetari i s'afegeix hidròxid de sodi al 27,5%, que es traspasarà al vas de precipitat de 600 mL, que es troba en agitació constant. Per acabar, s'afegeix, si escau, glicerina o monopropilenglicol, que actua com a agent solubilitzant, ja que no en tots els productes és necessari.

Per donar pas a la segona etapa, s'ha condicionat la temperatura del reactor, posant el bany a una temperatura determinada. La solució de la primera etapa es porta dins del reactor i amb agitació constant. A més a més, s'ha de calibrar i instal·lar l'elèctrode del pH-metre dins del reactor, per anar controlant el pH, com s'ha explicat anteriorment. Finalment, s'afegeix mitjançant un embut d'addició el clorur d'àcid determinat, mentre que en un altre embut d'addició, hidròxid de sodi al 27,5%, per anar controlant el pH,

com s'ha explicat en l'apartat final de 5.1. Aleshores, ja es pot anar addicionant a poc a poc el clorur d'àcid i l'hidròxid de sodi, controlant el pH i amb agitació constant.

6.2. Mètodes Tradicionals:

6.2.1. NaCl

En el cas de la determinació de NaCl, un cop s'entén que s'analitza, s'ha de seguir un procediment i utilitzar un material i reactius específics, veure taula 9.

Reactius	Material:
<ul style="list-style-type: none"> • Aigua desmineralitzada. • Solució AgNO_3 0.01 N. • Mostra d'interès. • HNO_3 al 20%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vas de precipitats. • Balança analítica. • Imant. • Agitador magnètic. • Valorador automàtic. • Espàtula.

Taula 9. Reactius i materials utilitzats per a la determinació de NaCl.

Mètode operatiu:

Es tara un vas de precipitats amb un imant en una balança analítica, seguidament es pesa una quantitat determinada de producte, indicada en el mètode analític. Després s'afegeix prou volum d'aigua desmineralitzada perquè l'elèctrode estigui ben submergit. Per acabar, s'afegeixen unes gotes de HNO_3 al 20% i es deixa agitant en un agitador magnètic. Per altra banda, es prepara el valorador automàtic (il·lustració 5), on s'ha de purgar la solució d' AgNO_3 . Un cop està purgada la solució, s'escull el mètode amb el qual es vol treballar, en aquest cas, la determinació de



Il·lustració 5. Valorador automàtic.

clorurs. Se submergeix l'elèctrode i la canonada que proporciona el nitrat de plata, s'introdueix el pes que s'ha pesat anteriorment i es clica en el botó *start*. Finalment, al cap d'uns segons, el valorador automàtic et dona el resultat en %.¹¹

6.2.2. Matèria Seca:

Per analitzar aquesta anàlisi s'ha d'utilitzar material i reactius determinats, veure en la taula 10. També s'ha de seguir un procediment explicat seguidament.

Reactius	Material
<ul style="list-style-type: none"> Mostra d'interès. 	<ul style="list-style-type: none"> Balança analítica. Càpsula d'alumini. Xeringa d'1 mL. Estufa. Dessecador.

Taula 10. Reactius i material utilitzat per a la determinació de la matèria seca.

Mètode operatiu:

Aquesta anàlisi consisteix a pesar una càpsula d'alumini en la balança analítica i anotar el pes. Seguidament, es pesa una quantitat determinada de producte sobre la càpsula d'alumini, aquesta quantitat ve determinada pel mètode analític, mitjançant una xeringa d'1 mL. On s'omple la xeringa i es tara en una balança analítica, després es posa tota la mostra a la càpsula d'alumini i es torna a pesar la xeringa per saber quanta quantitat de producte s'ha posat. Seguidament, es porta a l'estufa, a una temperatura i un temps determinat, que depèn de la naturalesa del producte. Un cop ha acabat el temps, deixar refredar en un dessecador i es pesa la càpsula d'alumini amb la mostra. Finalment, el resultat final s'obté per la mitja de l'equació 3.¹²

6.2.3. Aminoàcid 2

En el cas d'aquesta anàlisi, el més complex en comparació els altres, el material i reactius utilitzat se nomenen detalladament a continuació, veure taula11. Seguidament, s'explica el procediment seguit.

Reactius	Material
<ul style="list-style-type: none"> Àcid o-Fosfòric p.a.,85%. Dihidrogenfosfat sòdic monohidratat (NaH₂PO₄). Metanol grau HPLC, mín. 99.8%. Agua desionitzada, filtrada a través de un filtre de 0.45 µm. (ó Agua grau HPLC). Àcid clorhídric 0.5N. 	<ul style="list-style-type: none"> Cromatògraf HPLC (il·lustració 6). 3 ampolles d'1L per els canals. pH-metre. Agitador magnètic. Granetari. Espàtula. Matràs aforat de 50 mL. Balança analítica.

<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol Isopropílic (IPA) grau HPLC, $\geq 99.8\%$. • Mostra d'interès. 	
---	--

Taula 11. Reactius i material utilitzat en la determinació d'aminoàcid 2..

Mètode Operatiu:

Per començar, el primer que s'ha de preparar són els tres canals per al cromatògraf, un per a la fase mòbil i els altres dos de neteja. En el cas dels canals de neteja, el canal C és per metanol, el qual s'ha d'omplir tres quartes parts mínim de l'ampolla aproximadament de metanol HPLC. El canal D s'utilitza per a l'aigua HPLC, el qual s'ha de seguir el mateix procediment. En canvi, per aquest mètode, la fase mòbil (canal B) és 75/25 (v/v) metanol-aigua, 0.035 M en NaH_2PO_4 a un pH de 2,9 aproximadament.

Aleshores, en una vitrina es tara l'ampolla amb un imant en un granetari, per després pesar-hi una quantitat determinada de NaH_2PO_4 . Seguidament, s'afegeix la quantitat indicada en el mètode analític d'aigua HPLC i metanol HPLC, i es porta a l'agitador magnètic perquè es barregi de forma correcta. Un cop ha estat un temps en agitació constant, introduir un pH-metre i anar afegint àcid o-Fosfòric fins a tindre un pH pròxim a 2,9. Per acabar, es filtra al buit la fase mòbil per un filtre de 0,45 μm .



Il·lustració 6. Cromatògraf HPLC.

Un cop es tenen els 3 canals preparats, s'ha de preparar el cromatògraf (en primer assegurar-se que la columna que s'ha d'utilitzar estigui connectada). El segon pas a seguir, és purgar els 3 canals, afegint en el programa un flux i obrint una vàlvula. En el cas que la purga d'aigua doni una pressió molt alta, mirar l'estat de la frita, ja que pot ser s'ha de canviar. Quan els tres canals estan purgats i no hi ha bombolles d'aire en els canals, es preparen les mostres.

En la preparació de les mostres, es tara el matràs aforat de 50 mL en una balança analítica, s'afegeix una quantitat determinada de producte i s'anota el pes. Seguidament, cal afegir una quantitat petita de fase mòbil perquè es dissolgui la mostra, un cop dissolta

afegir la quantitat indicada de HCl 0.5 N i isopropanol (IPA), i després enrasar amb fase mòbil i agitar fins homogeneïtat. Finalment, es filtra a través d'un filtre de xeringa de 0.45 µm en un vial de cromatografia.

Es prepara en el programa la seqüència o mostra simple que es vol analitzar, amb un previ condicionament de columna i una neteja final.

Abans d'injectar les mostres, s'ha hagut de fer una recta de calibratge, en la qual s'han fortificat uns patrons amb diferents quantitats d'aminoàcid 2, i a més a més, s'ha programat el mètode per a una integració automàtica i el càlcul perquè surti el resultat final.¹³

6.3. Mètode NIR:¹⁵

L'equip amb el qual s'ha treballat ha estat amb el Tango FT-NIR de la marca Bruker. Per obtenir els espectres s'han necessitat els reactius i materials que s'observen en la taula 12 i s'han seguit els següents passos:

Reactius	Material
<ul style="list-style-type: none"> Mostra d'interès. 	<ul style="list-style-type: none"> Vial/cubeta de vidre transparent amb tap de plàstic Pipeta Pasteur FT-NIR Tango (veure il·lustració 7) Paper

Taula 12. Reactius i material utilitzat per a passar mostres per l'equip NIR.

Mètode Operatiu:

El primer que s'haurà de fer es seleccionar les condicions de mesura, veure taula 13.

Temperatura	Temps	Resolució	Mesures per mostra
70°C	16 Scans	8 cm ⁻¹	1

Taula 13. Condicions de l'equip NIR Tango.

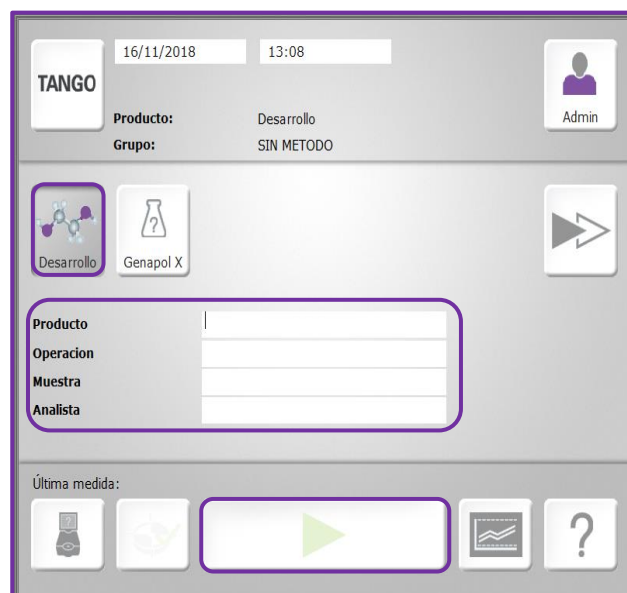


Il·lustració 7. Equip NIR Tango.

Un cop definida les condicions, apareixerà una plantilla, il·lustració 8, on s'haurà de posar la següent informació:

- Nom del producte
- Operació (i etapa) o lot de la mostra
- Nombre de mostra
- Nom de l'analista o persona que estigui utilitzant l'equip.

A propòsit d'això, prèviament s'haurà configurat que l'equip estigui en les condicions establertes, veure taula 13.



Il·lustració 8. Pantalla principal en l'equip NIR TANGO.

Quan ja està tota la informació introduïda i les condicions són les adequades, s'agafa una cubeta/vial de vidre, i amb una pipeta Pasteur s'introdueix la mostra dins de la cubeta i es tapa amb un tap de plàstic i s'ha d'intentar no emplenar-la tota. S'ha de vigilar de no contaminar la cubeta, en cas d'embrutiment, s'haurà de netejar-la amb un tros de paper. A més a més, cal fixar-s'hi que la mostra que s'ha utilitzat estigui ben homogeneïtzada, ja que en cas que no ho estigui, el resultat o espectre obtingut no és correcte ni precís. L'equip disposa d'una cavitat, lloc on s'haurà de col·locar la cubeta. Un cop estigui introduïda, s'ha de clicar al botó de *start*, com es pot observar en la il·lustració 8.

6.4. Mètode FT-IR:¹⁴

L'equip amb el qual s'ha treballat ha estat amb el model Spectrum 100 de la firma PerkinElmer. Per obtenir els espectres s'han utilitzat els reactius i materials que es mostren en la taula 14, i el procediment fet s'explica detalladament a continuació.

Reactius	Material
<ul style="list-style-type: none"> • Mostra d'interès. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeta Pasteur • Spectrum 100 – equip FT-IR • Paper • Isopropanol (IPA) de neteja

Taula 14. Reactius i material utilitzat per a registrar espectres per l'equip FT-IR.

Un cop està engegat l'ordinador amb el programari i l'equip obert, assegurar-se que el diamant ATR estigui net, en cas de no estar-ho, netejar-ho amb IPA. Seguidament, es realitza una mesura de fons (*background*). Quan s'ha acabat de fer el fons, s'agafa una

quantitat de mostra amb una pipeta Pasteur i s'afegeix una gota al diamant sense la necessitat d'utilitzar la premsa. Finalment, s'introdueix tota la informació necessària de la mostra, i aleshores, ja es pot fer la mesura. Es guarden els espectres en el format determinat perquè sigui compatible amb el *software* per crear els models.

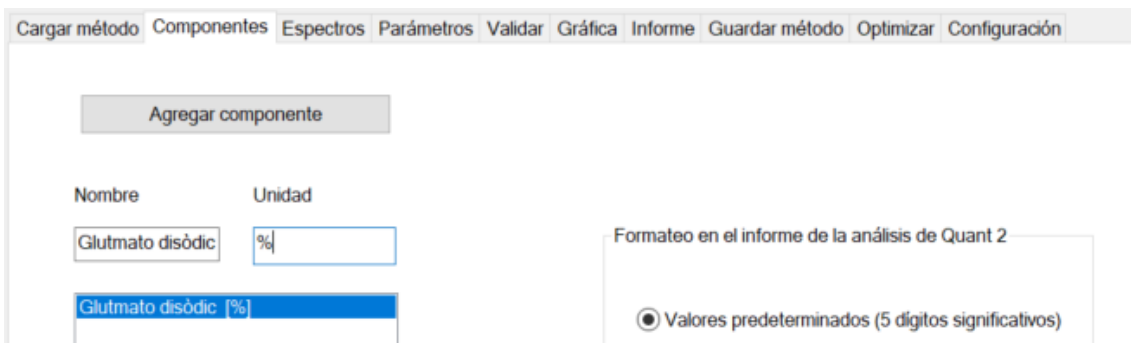
6.5. Desenvolupament del mètode analític: ¹⁵

Per a la creació dels models NIR com FTIR, s'ha utilitzat un *software* estadístic anomenat OPUS, de la marca Bruker, pel processament de les dades, veure il·lustració 9.



Un cop es tenen els espectres carregats a l'ordinador i establerts en una carpeta determinada i ben clara, a més a més dels resultats dels mètodes tradicionals en un full de *Il·lustració 9. Software utilitzat.* © càlcul, ja es pot començar a desenvolupar els models.

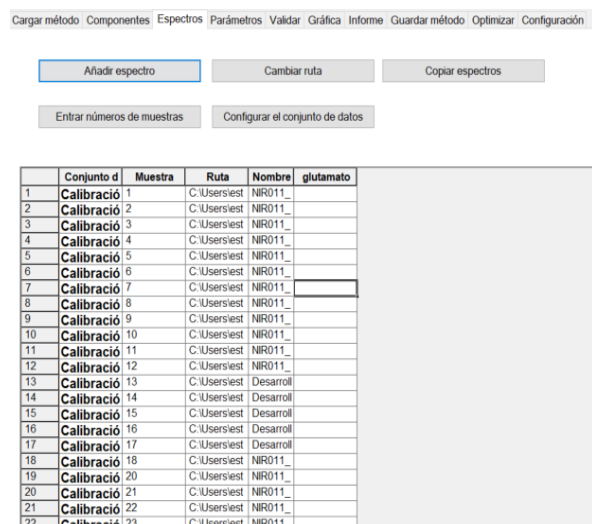
Primer de tot s'ha d'establir el component del qual volem fer el model i la seva unitat de mesura, com es pot observar en la il·lustració 10.



Il·lustració 10. Pestanya "Componentes".

Seguidament, s'han d'afegir els espectres al *software*, un cop s'han afegit s'agrega una columna on s'haurà de posar el resultat de cada mostra de l'anàlisi de referència com es pot veure en la il·lustració 11.

Un cop tots els espectres tenen els seus resultats respectius, es dirigeix a la pestanya *Configuración*, on s'escullen els pretractaments que el *software* utilitzarà i combinarà per saber quin és el més adequat pel model.



Il·lustració 11. Pestanya "Espectros".

Posteriorment, cal dirigir-se a la pestanya “Optimizar”, veure il·lustració 12, i clicar “Optimizar”, on el programari ofereix tots els models possibles, ordenats de menor RMSECV a major, sense tindre en compte les variables latents (Rango) i el pretractament que s'utilitza.

Núm.	RMSE	Rango	Regiones	Preprocesamiento
63	0.836	6	9400 - 7500	Primera derivada + Normalizació...
95	0.877	6	8452 - 7500	Primera derivada + Normalizació...
94	0.893	4	9400 - 8448	Primera derivada + Normalizació...
1	0.93	8	9400 - 7500	Normalización vectorial (SNV)
5	0.997	3	9400 - 7500 6100 - 5448	Normalización vectorial (SNV)
4	1.06	4	6100 - 5448	Normalización vectorial (SNV)
21	1.17	3	9400 - 7500 6100 - 5448 4600 - 424	Normalización vectorial (SNV)
32	1.18	6	9400 - 7500	Primera derivada
3	1.2	4	9400 - 6100	Normalización vectorial (SNV)
67	1.24	4	9400 - 7500 6100 - 5448	Primera derivada + Normalizació...
13	1.29	3	9400 - 7500 6100 - 4600	Normalización vectorial (SNV)
54	1.35	4	9400 - 5448 4600 - 4248	Primera derivada
69	1.35	3	9400 - 5448	Primera derivada + Normalizació...
34	1.35	4	9400 - 6100	Primera derivada
53	1.36	4	7500 - 5448 4600 - 4248	Primera derivada
68	1.36	3	7500 - 5448	Primera derivada + Normalizació...
33	1.36	4	7500 - 6100	Primera derivada
38	1.37	3	9400 - 5448	Primera derivada

Il·lustració 12. Pestanya “Optimizar”.

Una vegada seleccionat el model, el següent pas, és validar el model amb una *cross-validation*, explicada anteriorment, on s'haurà d'escollir un nombre de mostres per fer aquest tipus de validació, com s'observa en la il·lustració 13.

	Component	Rango máx.	Usar
1	glutamato	10	<input checked="" type="checkbox"/>

Validación cruzada

N° de muestras excluidas: 6

Validar

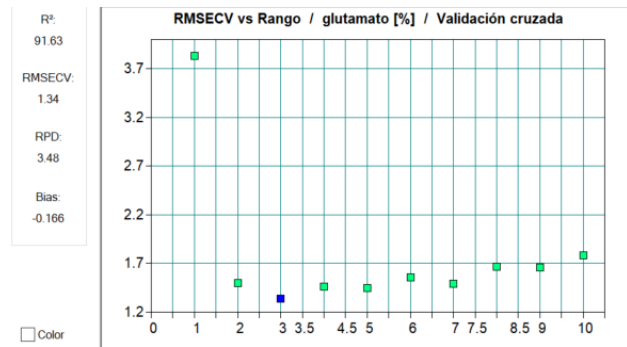
Il·lustració 13. Pestanya “Validar”.

Aleshores, ja està fet el model multivariant, però s'han de seguir un parell de passos per acabar d'optimitzar el model creat, eliminant *outliers* i trobant el que sigui més fiable.

- **LV:**

El primer que s'ha de fer un cop s'ha fet la validació interna, *cross-validation*, és dirigir-se al gràfic de RMSECV/Rango, gràfic 5, on es mostren els LV. La funció d'aquest gràfic és analitzar quants factors/variables són les adequades pel model, intentant escollir el

nombre més baix possible tant de RMSECV com de factors, ja que no interessa tindre un model amb un error de predicció alt ni un model amb *overfitting*. La decisió d'escollir les variables latents és subjectiva, perquè no sempre hi ha una única solució, pot haver-hi més d'una si existeix una bona justificació.

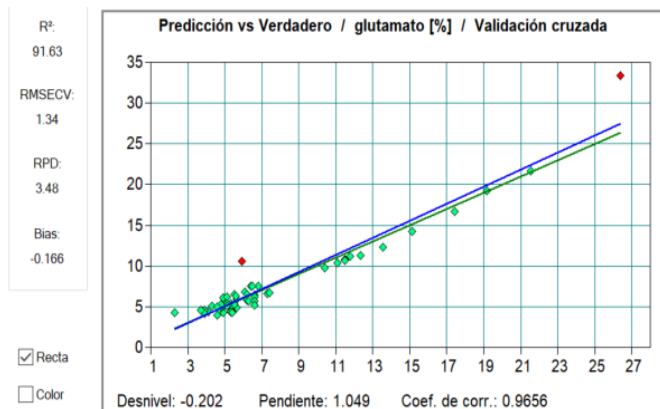


Gràfic 5. Gràfic de RMSECV vs Rango.

Un cop s'han escollit les variables latents, es torna a fer una validació interna i el següent pas a mirar és la possibilitat d'eliminació de punts discrepants.

- **Punts discrepants (*outliers*)**
 - Predicció vs Resultat real:

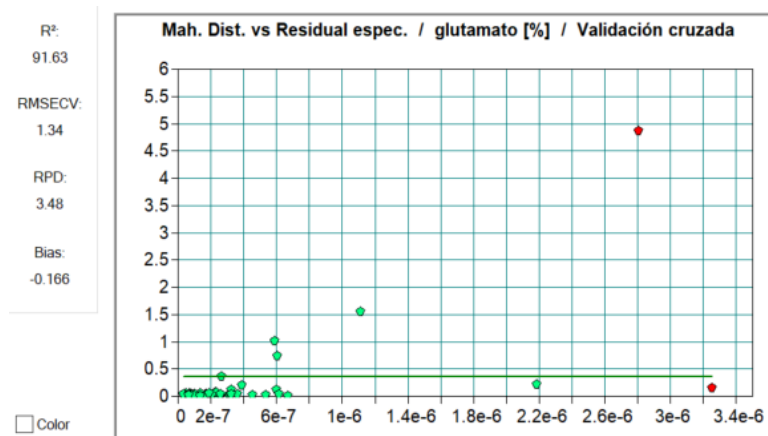
Es pot observar en el gràfic 6 la correlació entre el resultat predit i el de referència de les mostres d'una calibració. S'observa si hi ha una calibració, on apareixen paràmetres com R^2 , RPD, RMSECV, que s'han explicat anteriorment en l'apartat 5.4.2.1.1. Addicionalment, el *software* indica possibles *outliers* marcats en vermell, tot i que no han de per què ser *outliers*. No obstant això, en aquest gràfic és molt probable que ho siguin.



Gràfic 6. Resultat del gràfic de Predicció vs Referència.

- Distància Mahalanobis:

El gràfic 7, també informa de possibles valors anormals, mitjançant la distància de Mahalanobis i el residual espectral. En cas de tindre una distància alta i un residual alt, es considera *outlier*, com és el cas de les mostres situades en la part superior dreta.



Gràfic 7. Distància de Mahalanobis vs Residual espectral.

A més a més, cal destacar que és un gràfic oportú per mostrar els punts atípics i diferents en el model, ja que la línia verda que s'observa és la distància límit.

Després de la validació interna, *cross-validation*, i considerant que el model és òptim, es fa una validació externa. Per realitzar-la, es necessiten mostres que no hagin format part del mètode, com s'ha explicat en l'apartat 5.4.3. Seguidament, es recopilen el màxim de mostres espectrals junt amb els resultats dels valors de referència respectius.

De forma experimental, s'ha de dirigir a la pestanya "*multievaluación*". Seguidament, se selecciona el mètode o mètodes que es volen validar. A continuació, s'afegeixen els espectres de les mostres que serviran per fer la validació externa i els resultats de referència respectius. Finalment, es clica en el botó analitzar, on apareixeran els resultats, el valor de referència, el resultat predit, la distància de Mahalanobis, i finalment el RMSEP.

Una vegada s'ha fet la validació externa, Clariant considera la precisió i robustesa paràmetres de qualitat apropiats per acabar de validar els mètodes.⁸

L'estudi de precisió i robustesa es realitzarà a partir de la mateixa mostra, aleshores, com anteriorment s'han separat en dos grups, s'agafarà una mostra del producte A i una altra del D, intentant que estiguin en els extrems de la recta.

6.5.1 Precisió:

Es preparen 10 cubetes de la mateixa mostra, ordenats de l'1 al 10. Es faran dues mesures de cada cubeta però amb un ordre completament aleatori i a 70 °C, per evitar errors acumulatius.

6.5.2 Robustesa:

En el cas de la robustesa, aprofitant les cubetes utilitzades en l'estudi anterior, s'efectuarà una mesura a 65 °C i un altre a 75 °C, i igual que en l'estudi de precisió, de forma a l'atzar.

Un cop s'han gravat tots els espectres, aquests es passen pel programari per obtenir els valors predits i així trobar: la màxima diferència entre valors, la desviació estàndard i la desviació estàndard relativa (equació 9). En cas que aquesta última anomenada sigui inferior a un 2%, (segons Clariant) es poden considerar resultats apropiats i, per tant, que el model és precís, robust i que prediu de forma correcta.

$$RSD (\%) = \frac{des.estàndard}{promig} \cdot 100 \quad (9)$$

En resum, ja està preparat per ser implementat.

6.5.3 Implementació

Un cop el model s'ha validat i s'ha considerat fiable per predir noves mostres futures, cal escriure el procediment i els resultats obtinguts, és a dir, preparar el que s'anomena mètode analític. En aquest document es mostra el llistat d'espectres utilitzats, amb els seus resultats predits com els de referència respectius. Així mateix, els gràfics del model i les característiques més importants. En últim lloc, apareixen els resultats de la validació externa i l'estudi de precisió i robustesa.

També s'ha de fer el que s'anomena xerrada curta, que és similar a una breu formació, en la qual s'informa, als analistes i a les tècniques de laboratori, que el mètode s'ha implementat i s'explica quin és el procediment que s'ha de seguir a partir d'aquell moment. Per acabar, s'intercanvia en el programari de l'equip, el model que quantifica i que dona un resultat, pel model que només grava l'espectre.

7. RESULTATS:

Comparació NIR vs FTIR:

Els primers resultats obtinguts van ser l'estudi realitzat per saber quina tècnica d'espectroscòpia era més adient utilitzar. Es van fer models de calibració per a tots els components d'interès amb el mateix nombre de mostres, obtingudes a partir de les

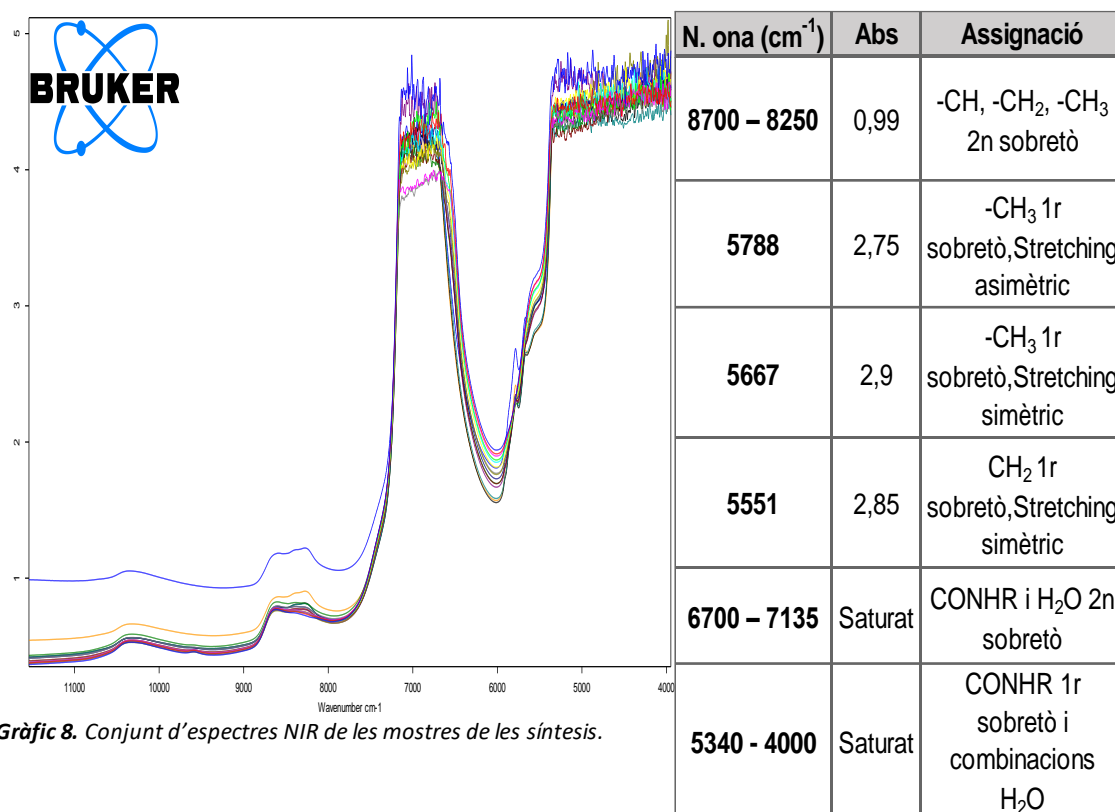
síntesis explicades en l'apartat 6.1. Els resultats de cada model per a cada tècnica es poden observar en la taula 15:

	NIR				FTIR			
	RMSECV	R ²	LV	RPD	RMSECV	R ²	LV	RPD
NaCl	0,192	98,59	4	8.55	0,322	97,73	4	6.47
MatèriaSeca	0,951	99,18	4	11,1	0,913	99,63	3	11.94
Aminoàcid 2	0,22	99,79	3	22,5	0,321	99,78	3	11,1

Taula 15 . Comparació de resultats dels models tant per tècnica NIR com FTIR.

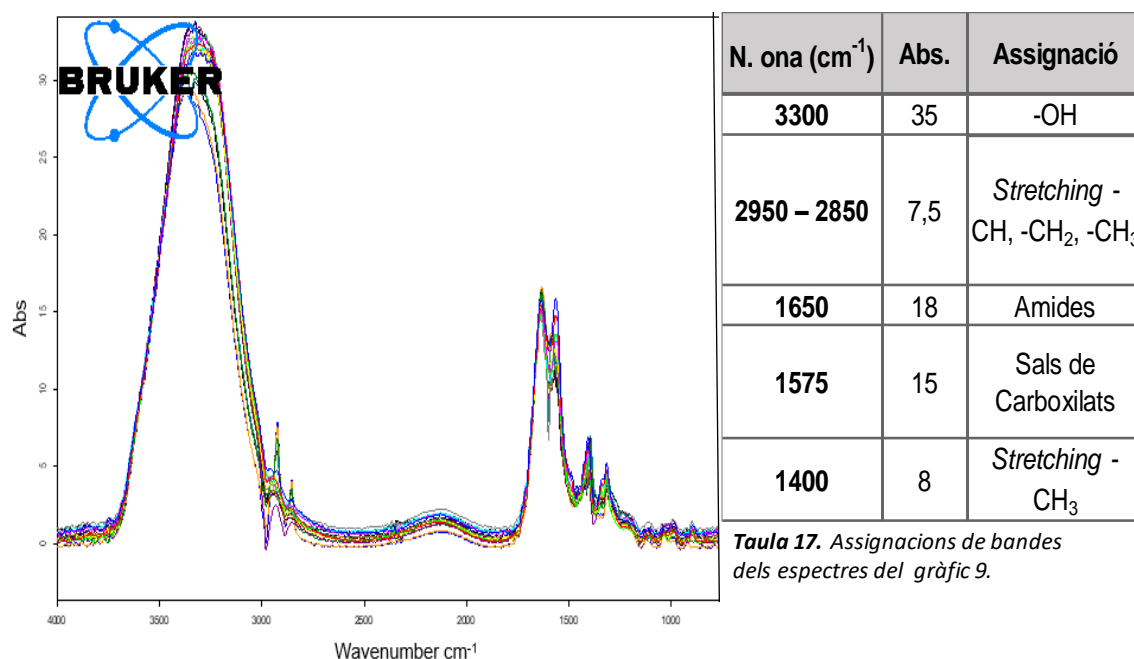
En la taula es pot observar com els models creats tant per NIR com FT-IR són molt similars, és a dir, que es pot utilitzar tant una tècnica com una altra. Malgrat això, s'opta per continuar amb la tècnica NIR. Aquesta decisió es deu al fet que té l'avantatge que en un futur existeixi un NIR *online*, on es podria col·locar una sonda directament al reactor, eliminant la necessitat d'extreure mostres al laboratori, tal com s'explica a l'apartat 5.3.2.

A continuació es mostren els espectres NIR i FTIR obtinguts per fer aquest estudi:



Gràfic 8. Conjunt d'espectres NIR de les mostres de les síntesis.

Taula 16. Assignacions de bandes dels espectres del gràfic 8.



Taula 17. Assignacions de bandes dels espectres del gràfic 9.

Gràfic 9. Conjunt d'espectres FTIR de les mostres de les síntesis.

Es pot concloure que els espectres NIR obtinguts de les mostres de les síntesis amb les quals s'han creat els models, per comparar quina tècnica d'espectroscòpia és millor utilitzar (tal com es mostra al gràfic 8), coincideixen amb la seva estructura final. Aquest fet s'ha aconseguit mitjançant la comparació dels pics amb taules d'assignació de pics¹⁶ (veure annex 1). Es mostra un resum dels pics més destacats dels productes a la taula 16.

També es poden deduir els rangs de longituds d'ona que s'utilitzaran per crear els models multivariants, els quals es troben entre 11000 a 7500 cm⁻¹, i entre 6500 a 5500 cm⁻¹. En els espectres, s'observen dues zones saturades, presumiblement degut a la presència d'aigua, que coincideix amb les bandes dels àcids carboxílics, amides i amines. Tot i això, aquesta saturació, es considera que hi ha informació suficient per crear els models de calibració.

En canvi, en els espectres de les mostres de les síntesis que s'han obtingut a partir de la tècnica FT-IR, es poden observar diversos pics (tal com es mostra en el gràfic 9), els quals es poden relacionar amb els seus grups funcionals respectius mitjançant taules d'assignació de pics (veure annex 2). Es mostra un resum dels pics més destacats a la taula 17.

Altrament, els grups funcionals que apareixen en la taula 17 són totalment coherents amb l'estructura del producte final i els espectres del gràfic 9. A més a més, els models creats han utilitzat un interval de longituds d'ona de 2950 fins a 900 cm⁻¹. En el cas del FT-IR, l'impacte de l'aigua es pot observar en el rang de 3000-3700 cm⁻¹.

Característiques dels models creats:

Una vegada escollida la tècnica (NIR), es procedirà a construir i validar els models de calibració pels diferents paràmetres.

- Matèria seca:

Per a desenvolupar el mètode de matèria seca, s'han utilitzat un total de 90 mostres amb els seus respectius espectres. La classificació de les mostres es pot veure reflectida en la següent taula (taula 18):

Síntesis	Procés	Producte acabat	Outliers	Total
23	43	16	8	90

Taula 18. Tipus de mostres utilitzades per al model que determina el % de matèria seca.

El límit de detecció va des de 15,418 fins a 44,5% de matèria seca. Un cop es tenen exportats tots els espectres, en aquest cas 90 amb els seus resultats respectius, es pot crear el model com s'ha explicat anteriorment en l'apartat 5.5.

A continuació, s'ha optimitzat i s'ha realitzat una *cross-validation*. El *software* ha proposat uns quants punts discrepants, han sigut eliminats, s'ha seguit el mateix procediment anterior, fins al punt en el que l'eliminació de punts discrepants no presenta diferències significatives. Finalment, s'han descartat un total de 8 *outliers*, així quedant un model amb els valors estadístics següents (taula 19):

Anàlisi	R ²	RMSECV	RPD	LV	Regió	Pretractament
Matèria seca	99,47	0,581	13,8	3	9400 – 7500 cm ⁻¹	Primera derivada

Taula 19. Paràmetres estadístics del model que determina el % de matèria seca.

Es pot dir que la regió utilitzada per aquest model coincideix amb l'assignació del segon sobretò dels següents enllaços: -CH, -CH₂ i -CH₃.

A més a més, es pot observar el model final (gràfic 10) i confirmar que sí existeix una correlació. També, es pot veure com tot i que el *software* ha suggerit 3 *outliers*, s'ha decidit no eliminar-los, ja que sinó en la part baixa de la recta es tindria un baix nombre de mostres. Altrament, són mostres que no destaquen com les que tenen al costat i tenen una distància de Mahalanobis no molt gran, tal com es pot veure en el gràfic 11. En aquest, hi ha mostres que no es reconeixen com punts discrepants, però tenen una distància de Mahalanobis superior a la dels possibles *outliers*.

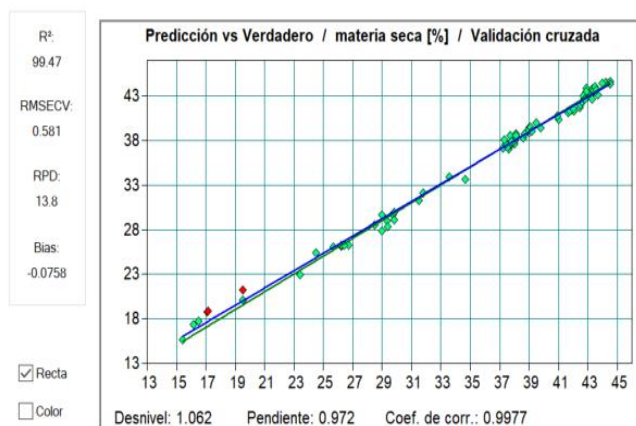
Adicionalment, l'eliminació d'aquestes mostres no mostrava una millora significativa en el model, així que és preferible mantenir-les al model perquè així és més robust.

Per la part de la **validació externa**, es pot observar en la taula 20 la diferència obtinguda entre el resultat predit pel model creat i el resultat de referència.

Anàlisi	Nº total de mostres	Mostres de (A/B)	Mostres de (C/D)	RMSEP	Dif. Màx	Rango de concentració
Matèria Seca	54	17 / 13	13 / 11	0,573	1,332	25,8 a 45,3%

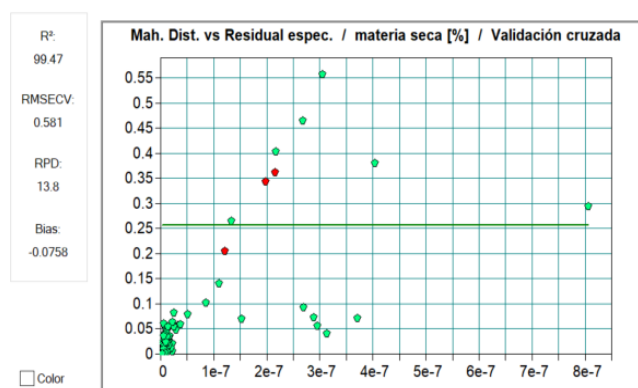
Taula 20. Resum de la validació externa del model creat per a la determinació de % de matèria seca.

El RMSEP obtingut ha sigut de 0,573 amb un total de 54 mostres, 13 de les quals pertanyen als productes B i C, en canvi, 17 mostres pel producte A i 11 pel D. La màxima diferència que hi ha és d'1,332% tenint en compte que l'interval del model creat és de 15 a 45% aproximadament. En comparació al RMSECV, que correspon al valor de 0,581, es pot afirmar que el model és adequat arran que el RMSEP és inferior a 1,5 x



Gràfic 10. Gràfic del resultat predit vs referència en el model per a la matèria seca.

Mah. Dist. / Res. espec. materia seca Rango: 3 Rec: 3



Gràfic 11. Gràfic de la distància de Mahalanobis respecte el residu espectral per al model que determina el % de matèria seca.

RMSECV. Per tant, es conclou que és un model correcte i prediu de forma òptima a l'espera d'acabar de validar per l'estudi de precisió i robustesa. A més a més, segons la taula 6, el RPD podem aplicar aquest mètode com el mètode de referència.

- NaCl:

En el cas del contingut de NaCl, s'ha seguit el mateix procediment que l'explicat anteriorment, però per aquest model s'han utilitzat un total de 105 mostres, on la seva classificació de mostres es mostra en la taula 21:

Síntesis	Procés	Producte acabat	Outliers	Total
26	49	25	5	105

Taula 21. Tipus de mostres utilitzades per al model que determina el contingut de NaCl.

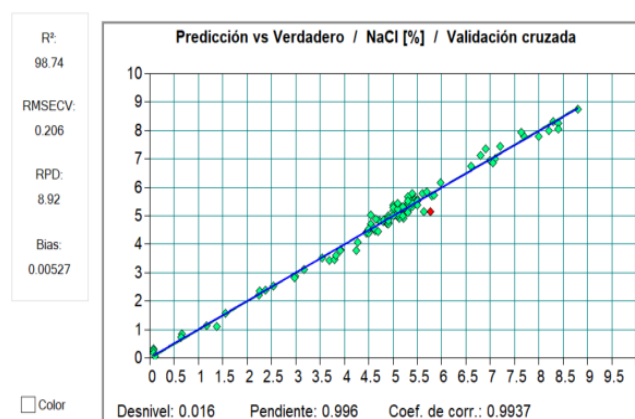
El límit de detecció va des de 0,07 fins a 8,8% de NaCl. Igual que en el model anterior, s'ha optimitzat i s'ha fet una *cross-validations*, eliminant els punts discrepants, obtenint els següents resultats (taula 22):

Anàlisi	R ²	RMSECV	RPD	LV	Regió	Pretractament
NaCl	98,74	0,206	8,92	6	9400 – 7500 5776 – 5448 cm ⁻¹	Primera derivada

Taula 22. Paràmetres estadístics del model que determina el contingut de NaCl.

Es pot dir que la regió utilitzada per aquest model coincideix amb l'assignació del segon sobretò d'enllaços -CH, -CH₂ i -CH₃, a més del 1r sobretò de *stretching* asimètric i simètric de l'enllaç -CH₃ i del 1r sobretò de *stretching* simètric de l'enllaç -CH₂.

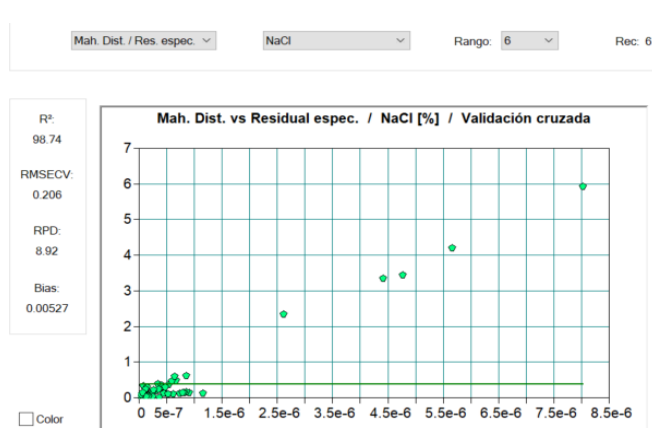
En aquest model es pot observar que també existeix una bona correlació (observar el gràfic 12), a més de concloure que hi ha una gran quantitat de mostres al centre de la recta. Igual que en el model anterior, el programari també suggereix un *outlier*, però s'ha decidit no eliminar-lo, pel fet que no té una distància de Mahalanobis molt alta, com s'observa en el gràfic 13. Tampoc és un *outlier* perquè la



Gràfic 12. Gràfic del resultat predit vs referència en el model per a NaCl.

diferència entre el valor predit i el resultat de referència no és molt gran, i a més, té una altra mostra molt propera.

També, com en el model anterior, l'eliminació del possible *outlier*, no mostra una millora significativa en el model.



Gràfic 13. Gràfic de la distància de Mahalanobis respecte el residual espectral per al model que determina el contingut de NaCl.

Per la **validació externa**, es pot observar en la taula 23 la diferència obtinguda entre el resultat predit pel model creat i el resultat de referència.

Anàlisi	Nº total de mostres	Mostres de (A/B)	Mostres de (C/D)	RMSEP	Dif. Màx	Rango de concentració
NaCl	59	17 / 14	14 / 14	0,226	0,634	4,4 a 6%

Taula 23. Resum de la validació externa del model creat per a la determinació de NaCl.

El RMSEP obtingut ha sigut de 0,226 amb un total de 59 mostres, de les quals 14 pertanyen als productes B, C i D, en canvi, 17 mostres pel producte A. La màxima diferència que hi ha és de 0,634%, tenint en compte que l'interval del model va des de 0 fins a 9% aproximadament. En comparació al RMSECV 0,206 es pot afirmar que el model prediu de forma òptima a l'espera de l'estudi de precisió i robustesa, pel motiu que s'ha explicat en el resultat del model anterior. Addicionalment, amb el RPD obtingut, es pot concloure que es pot ser aplicat per a qualsevol àmbit.

- Aminoàcid 2:

Per acabar, en el model d'aminoàcid 2 s'han utilitzat un total de 57 mostres, on la seva classificació ha sigut la que es mostra en la següent taula (taula 24):

Síntesis	Procés	Producte acabat	Outliers	Total
11	33	10	3	57

Taula 24. Tipus de mostres utilitzades per al model que determina el contingut d'aminoàcid 2.

El límit de detecció va des de 3,7 fins a 21,535% d'aminoàcid 2. El fet que només per dos dels quatre productes es faci aquesta anàlisi, fa que el nombre de mostres sigui bastant inferior en comparació als anteriors. Un cop s'ha optimitzat, s'ha fet la *cross-validation* i s'han eliminat els *outliers* respectius. A continuació, s'han obtingut a partir de les 57 mostres els següents resultats (taula 25):

Anàlisi	R ²	RMSECV	RPD	LV	Regió	Pretractament
Aminoàcid 2	98,39	0,498	7,9	4	9400 – 7500 6100 – 5448 cm ⁻¹	Primera derivada

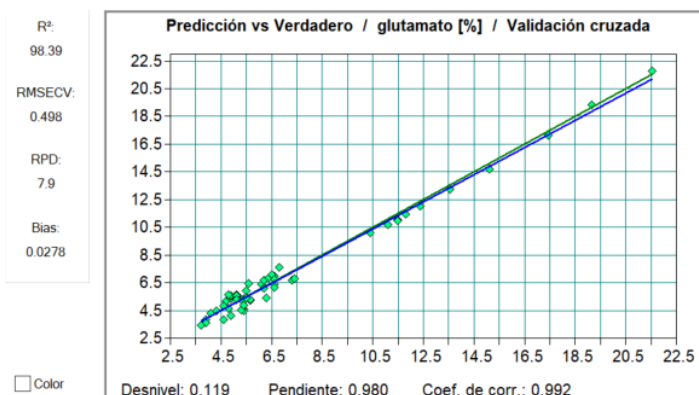
Taula 25. Paràmetres estadístics del model que determina el contingut d'aminoàcid 2.

Es pot dir que la regió utilitzada per aquest model coincideix amb l'assignació del segon sobretò d'enllaços -CH, -CH₂ i -CH₃, a més del 1r sobretò de *stretching* asimètric i simètric de l'enllaç -CH₃ i del 1r sobretò de *stretching* simètric de l'enllaç -CH₂.

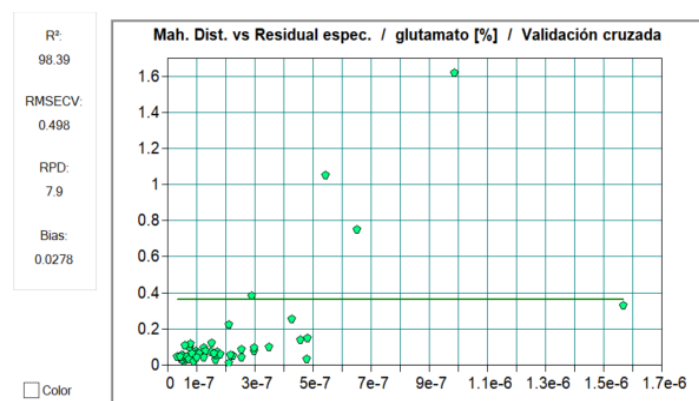
Dels resultats obtinguts, es pot observar l'existència d'una correlació (veure gràfic 14). El conjunt de mostres situades a la part baixa, formen part de les mostres de procés, mentre que les de la part superior són les mostres de les síntesis. A més a més, en aquest model el *software* no suggereix cap *outlier* i els paràmetres estadístics són bons, però millorables.

En el gràfic 15 es pot observar com hi ha alguna mostra amb una distància de Mahalanobis alta, però el *software* no ha decidit marcar-lo com a *outlier*, a més que tampoc té un residual espectral molt alt com per ser un possible punt discrepant.

Per la part que toca a la validació externa, es pot observar en la taula següent (taula 26) un petit resum dels resultats dels paràmetres estadístics, dels quals s'ha parlat anteriorment.



Gràfic 14. Gràfic del resultat predit vs referència en el model per a l'aminoàcid 2.



Gràfic 15. Gràfic de la distància de Mahalanobis respecte el residual espectral per al model que determina el contingut d'aminoàcid 2.

Anàlisi	Nº total de mostres	Mostres de A	Mostres de B	RMSEP	Dif. Màx	Rango de concentració
Aminoàcid 2	31	14	17	0,534	0,869	4,1 a 8%

Taula 26. Resum de la validació externa del model creat per a la determinació d'aminoàcid 2.

El RMSEP obtingut ha sigut de 0,534 amb un total de 31 mostres, dels quals pertanyen 17 mostres al producte B i 14 al A. La màxima diferència que hi ha és de 0,869%. En comparació al RMSECV 0,498, podem afirmar que el model és adequat, pel que s'ha explicat anteriorment. Per tant, podem dir que és un model correcte i prediu de forma òptima a l'espera d'acabar de validar per l'estudi de precisió i robustesa. També es pot afirmar que com es veu reflectit en la taula 6, el RPD obtingut del model ens indica que té una aplicació per a QA (Assegurament de qualitat).

Precisió i Robustesa:

Com s'ha explicat anteriorment en l'apartat 6.5.1 i 6.5.2, s'ha realitzat un estudi de precisió i robustesa, les mostres escollides han sigut mesurades a l'atzar el mateix dia, en la taula 27 es pot observar l'ordre que s'ha escollit per mesurar les 10 cubetes.

Quan s'han obtingut tots els espectres seguint l'ordre de les taules anteriors, s'apunten els resultats en les taules següents (28, 29, 30, 31 i 32) per poder veure el seu comportament.

CCG/SLG	M1 – 70 °C	M2 – 70 °C	65 °C	75 °C
1	6	8	3	7
2	3	4	8	6
3	9	7	1	10
4	10	5	9	4
5	1	3	10	9
6	4	1	7	2
7	8	10	2	1
8	2	9	4	5
9	5	6	5	8
10	7	2	6	3

Taula 27. Ordre seleccionat per passar les mostres pel NIR

- Matèria seca:

En les taules 28 i 29 es poden observar els resultats per al model que determina el % de matèria seca, la taula 28 per a una mostra del producte A i la 29 per una del D.

Mostra	Precisió			Robustesa		
	Promig (1 y 2)	Medición 1	Medición 2	70°C	65°C	75°C
1	38,706	38,812	38,600	38,706	40,213	37,653
2	38,886	38,766	39,006	38,886	40,157	37,891
3	38,787	38,736	38,838	38,787	39,807	37,918
4	38,775	38,714	38,835	38,775	40,122	37,812
5	38,750	38,699	38,800	38,750	40,187	37,776
6	38,832	38,747	38,916	38,832	40,089	37,783
7	38,936	38,810	39,062	38,936	40,114	37,778
8	38,782	38,774	38,790	38,782	40,043	37,740
9	38,832	38,740	38,924	38,832	39,911	37,886
10	38,989	38,897	39,081	38,989	40,173	37,901
Min.	38,706	38,699	38,600	38,706	39,807	37,653
Màx.	38,989	38,897	39,081	38,989	40,213	37,918
Màx - Mín	0,283	0,198	0,481	0,283	0,406	0,265
Promig	38,827	38,770	38,885	38,827	40,082	37,814
Desv. Est.	0,087	0,058	0,145	0,087	0,130	0,085
RSD (%)	0,225	0,150	0,373	0,225	0,323	0,224

Taula 28. Resultats de precisió i robustesa per al producte A pel model de matèria seca.

Mostra	Precisió			Robustesa		
	Promig (1 y 2)	Medición 1	Medición 2	70°C	65°C	75°C
1	25,997	25,969	26,025	25,997	27,685	25,433
2	26,009	26,077	25,941	26,009	27,437	25,338
3	25,965	26,008	25,922	25,965	27,444	25,172
4	25,962	25,951	25,972	25,962	27,536	25,088
5	25,906	25,979	25,833	25,906	27,780	25,068
6	26,040	25,995	26,084	26,040	27,834	25,078
7	26,023	26,166	25,880	26,023	27,293	24,923
8	25,974	25,945	26,003	25,974	27,628	25,319
9	26,123	26,173	26,073	26,123	27,521	25,307
10	26,171	26,152	26,189	26,171	28,296	25,035
Min.	25,906	25,945	25,833	25,906	27,293	24,923
Màx.	26,171	26,173	26,189	26,171	28,296	25,433
Màx - Mín	0,265	0,228	0,356	0,265	1,003	0,510
Promig	26,017	26,042	25,992	26,017	27,645	25,176
Desv. Est.	0,079	0,092	0,106	0,079	0,282	0,164
RSD (%)	0,303	0,353	0,407	0,303	1,019	0,652

Taula 29. Resultats de precisió i robustesa per al producte D pel model de matèria seca.

En el cas de l'estudi de la robustesa, en el qual s'estudia l'efecte de la temperatura, mesurant a una temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ del valor de temperatura establert (taula 13). Tant en el cas del producte B i D s'obté un RSD (%) d'un 0,323 i 1,019 respectivament. Això correspon a una diferència màxima de 0,406 i 1,003, i resultat inferior al 2%, que significa que no hi ha efecte de temperatura, és a dir, per molt que variï la temperatura no hi ha diferències significatives.

A partir de les taules anteriors es pot extreure que la repetibilitat de l'equip és bona, ja que s'obté un RSD (%) d'un 0,373% en el cas del producte B i un 0,407% en del D, en tots dos casos molt inferior a un 2%. Això es tradueix a una diferència màxima observada de 0,481 per la mostra del B i 0,356 per la de D en el resultat de % de matèria seca. Com s'ha explicat en l'apartat 6.5., si s'obté un RSD (%) inferior al 2% significa que és un model precís i dona resultats fiables.

En conclusió, aquest model queda validat i preparat per ser implementat en el laboratori per anàlisis rutinàries, un cop s'hagi redactat la documentació necessària.

- NaCl:

En canvi, en les taules 30 (A) i 31 (D), es mostren els resultats de precisió i robustesa

Mostra	Precisió			Robustesa		
	Promig (1 y 2)	Medición 1	Medición 2	70°C	65°C	75°C
1	4,731	4,699	4,764	4,731	4,822	4,705
2	4,730	4,809	4,650	4,730	4,791	4,676
3	4,632	4,663	4,602	4,632	4,677	4,626
4	4,701	4,648	4,755	4,701	4,897	4,664
5	4,764	4,764	4,765	4,764	4,758	4,782
6	4,824	4,925	4,723	4,824	4,768	4,614
7	4,708	4,650	4,766	4,708	4,865	4,645
8	4,777	4,768	4,786	4,777	4,782	4,728
9	4,715	4,676	4,753	4,715	4,729	4,765
10	4,680	4,671	4,769	4,680	4,736	4,586
Min.	4,632	4,648	4,602	4,632	4,677	4,586
Màx.	4,824	4,925	4,786	4,824	4,897	4,782
Màx - Mín	0,192	0,277	0,184	0,192	0,220	0,196
Promig	4,726	4,727	4,733	4,726	4,782	4,679
Desv. Est.	0,053	0,089	0,060	0,053	0,065	0,065
RSD (%)	1,130	1,891	1,263	1,130	1,368	1,394

Taula 30. Resultats de precisió i robustesa per al producte A pel model de NaCl.

Mostra	Precisió			Robustesa		
	Promig (1 y 2)	Medición 1	Medición 2	70°C	65°C	75°C
1	4,393	4,273	4,513	4,393	4,383	4,234
2	4,536	4,635	4,436	4,536	4,416	4,439
3	4,335	4,279	4,390	4,335	4,361	4,683
4	4,402	4,388	4,416	4,402	4,679	4,578
5	4,423	4,395	4,451	4,423	4,441	4,466
6	4,553	4,473	4,633	4,553	4,731	4,544
7	4,502	4,563	4,441	4,502	4,615	4,638
8	4,410	4,311	4,508	4,410	4,817	4,668
9	4,549	4,794	4,304	4,549	4,532	4,440
10	4,401	4,344	4,458	4,401	4,645	4,510
Min.	4,335	4,273	4,304	4,335	4,361	4,234
Màx.	4,553	4,794	4,633	4,553	4,817	4,683
Màx - Mín	0,218	0,521	0,328	0,218	0,457	0,449
Promig	4,450	4,446	4,455	4,450	4,562	4,520
Desv. Est.	0,077	0,171	0,086	0,077	0,159	0,135
RSD (%)	1,740	3,847	1,932	1,740	3,475	2,986

Taula 31. Resultats de precisió i robustesa per al producte D pel model de NaCl.

del mètode que determina el contingut de NaCl.

A partir d'aquestes taules, es pot extreure que la repetibilitat de l'equip és acceptable per un tipus de producte, la A, ja que s'obté un RSD (%) d'un 1,891% inferior a un 2%. Tot i això, per la mostra del producte D s'observa un RSD (%) d'un 3,847%, però la mitja de les dues mesures és d'un RSD (%) de 1,740%.

Consegüentment, aquests resultats es tradueix a una diferència màxima observada de 0,277 i 0,521, pels productes A i D respectivament, en el resultat de contingut de NaCl.

En el cas de l'estudi de la robustesa, el qual s'estudia l'efecte de la temperatura, mesurant a una temperatura de ± 5 °C del valor de temperatura establert (taula 13). Tant en el cas dels productes A i D s'obté un RSD (%)

d'un 1,382 i 3,475% respectivament. Això correspon a una diferència màxima del 0,22 i 0,457, i resultat inferior al 2% en el cas del producte A, que significa que no hi ha efecte de temperatura, és a dir, per molt que variï la temperatura no hi ha diferències significatives. No obstant això, en el cas del producte D dona un resultat superior al 2%, aleshores en aquest model per al compost D si afecta la temperatura.

En conclusió, la desviació estàndard és molt similar entre productes i inclús amb el model anterior, el que varia és el promig, el qual en treballar amb valors més baixos, donarà un RSD (%) més baix.

- Aminoàcid 2:

En últim lloc, en la taula 32, es pot observar els resultats de precisió i robustesa del mètode que determina el contingut d'aminoàcid 2 (%).

A partir de la taula 32, es pot extreure que la repetibilitat de l'equip no és bona, ja que s'obté una RSD (%) d'un 5,113% molt superior a un 2%, i això es

Mostra	Precisió			Robustesa		
	Promig (1 y 2)	Medición 1	Medición 2	70°C	65°C	75°C
1	5,610	5,870	5,351	5,610	7,865	4,229
2	5,830	5,796	6,303	5,830	7,954	4,577
3	5,961	5,834	5,913	5,961	7,084	4,316
4	5,815	5,748	5,767	5,815	7,721	4,387
5	5,857	5,846	6,066	5,857	7,861	4,295
6	5,938	5,907	5,931	5,938	7,855	4,199
7	5,963	5,772	6,241	5,963	7,385	4,366
8	5,903	5,864	5,733	5,903	7,566	4,342
9	5,845	5,789	5,992	5,845	7,285	4,383
10	6,080	6,170	6,367	6,080	7,608	4,499
Min.	5,610	5,748	5,351	5,610	7,084	4,199
Màx.	6,080	6,170	6,367	6,080	7,954	4,577
Màx - Mín	0,469	0,422	1,017	0,469	0,870	0,378
Promig	5,880	5,859	5,967	5,880	7,618	4,359
Desv. Est.	0,124	0,120	0,305	0,124	0,289	0,114
RSD (%)	2,110	2,043	5,113	2,110	3,798	2,620

Taula 32. Resultats de precisió i robustesa per al producte A pel model d'aminoàcid 2.

tradueix a una diferència màxima observada d'1,017 en el resultat de % d'aminoàcid 2. Tot i això, amb la mitja de les dues mesures, s'obté un RSD (%) d'un 2,11% una mica superior al 2% i la diferència màxima és de 0,469, és probable que hi hagi alguna mostra de la segona ronda de mesura que sigui un punt discrepant, probablement el punt més baix, ja que eliminant aquest punt baixa el RSD (%) fins al 3%.

Per l'altra banda, en l'estudi de la robustesa, es pot veure que la diferència de temperatura màxima observada és de 0,870. El que correspon a una RSD (%) de 3,798%, superior a un 2%. A més a més, es pot observar com a mesura que augmenta la temperatura dona un resultat més baix, així concloent que si afecta la temperatura.

En conclusió, s'observa una desviació estàndard una mica més alta que els models anteriors i doncs un RSD (%) més alt, a sobre de què s'està treballant amb valors baixos.

8. CONCLUSIONS:

Les conclusions extretes d'aquest treball són:

- S'ha après el funcionament detallat tant de l'equip NIR i FT-IR com del software estadístic OPUS, així com entendre els resultats obtinguts dels models, i també a seleccionar models per obtenir el més fiable i amb millor capacitat predictiva.
- També s'ha après a analitzar els productes mitjançant els mètodes tradicionals. Així com, dur a terme les síntesis dels productes finals que posteriorment es fan a producció a major escala.
- Tant la tècnica NIR com FTIR són molt similars i comparables en aquest cas, no obstant això, s'ha preferit utilitzar la tècnica NIR, mirant al futur, ja que es podria posar un NIR online en un reactor per a aquests productes.
- S'ha desenvolupat i validat el contingut de NaCl (%), aminoàcid 2 (%) i el % de matèria seca en productes amb la mateixa química, una reacció N-acilació entre un aminoàcid i un clorur d'àcid.
- Dels 3 models multivariants creats, es pot dir que els models presenten un bon RPD i R^2 , a part d'un RMSECV i RSEMP baix. També, es pot afirmar que el model de % de matèria seca és precís i robust per a qualsevol mena de productes amb els quals s'ha treballat. Aquesta afirmació es pot justificar amb els paràmetres estadístics obtinguts.
- A més a més, gràcies a l'estudi de precisió i robustesa per als tres models, es pot afirmar que els models de % de matèria seca i NaCl són precisos i robusts, en canvi, en el model que determina el contingut de d'aminoàcid 2 sí que es veu afectat per la temperatura, però l'equip disposa de control intern de temperatura, que permet minimitzar aquest efecte.

Per molt que ja s'hagi desenvolupat i validat aquests mètodes, queden altres temes oberts a millorar i treballar, com per exemple:

- Poder fer un estudi de la cinètica de reacció per aquests productes mitjançant una fibra NIR (simulant el NIR online) amb l'objectiu d'optimitzar el temps de reacció i avaluar el final de la reacció que és té avui dia.
- Afegir més productes de la mateixa química als models.
- Afegir altres paràmetres com la glicina i àcids grassos lliure que no s'han pogut desenvolupar en aquestes pràctiques.

CONCLUSIONS:

The conclusions drawn from this work are:

- Detailed understanding of both NIR and FT-IR equipment operation as well as OPUS statistical software, and comprehending the results obtained from the models, including selecting models to achieve the most reliable and predictive capacity.
- Learning to analyze products using traditional methods, as well as carrying out the synthesis of final products that are subsequently produced on a larger scale.
- Both NIR and FTIR techniques are very similar and comparable in this case; however, the NIR technique has been preferred for future use, as an online NIR could potentially be installed in a reactor for these products.
- The content of NaCl (%), amino acid 2 (%), and % dry matter in products with the same chemistry, an N-acylation reaction between an amino acid and an acid chloride, has been developed and validated.
- Of the 3 multivariate models created, it can be stated that the models exhibit good RPD and R^2 , along with low RMSECV and RSEMP. It can also be affirmed that the % dry matter model is precise and robust for any kind of products worked with. This statement can be justified with the obtained statistical parameters.
- Furthermore, thanks to the precision and robustness study for the three models, it can be affirmed that the % dry matter and NaCl models are accurate and robust, while in the model determining the amino acid 2 content, it is affected by temperature, but the equipment has internal temperature control, which allows minimizing this effect.

Despite having developed and validated these methods, there are other open topics to improve and work on, such as:

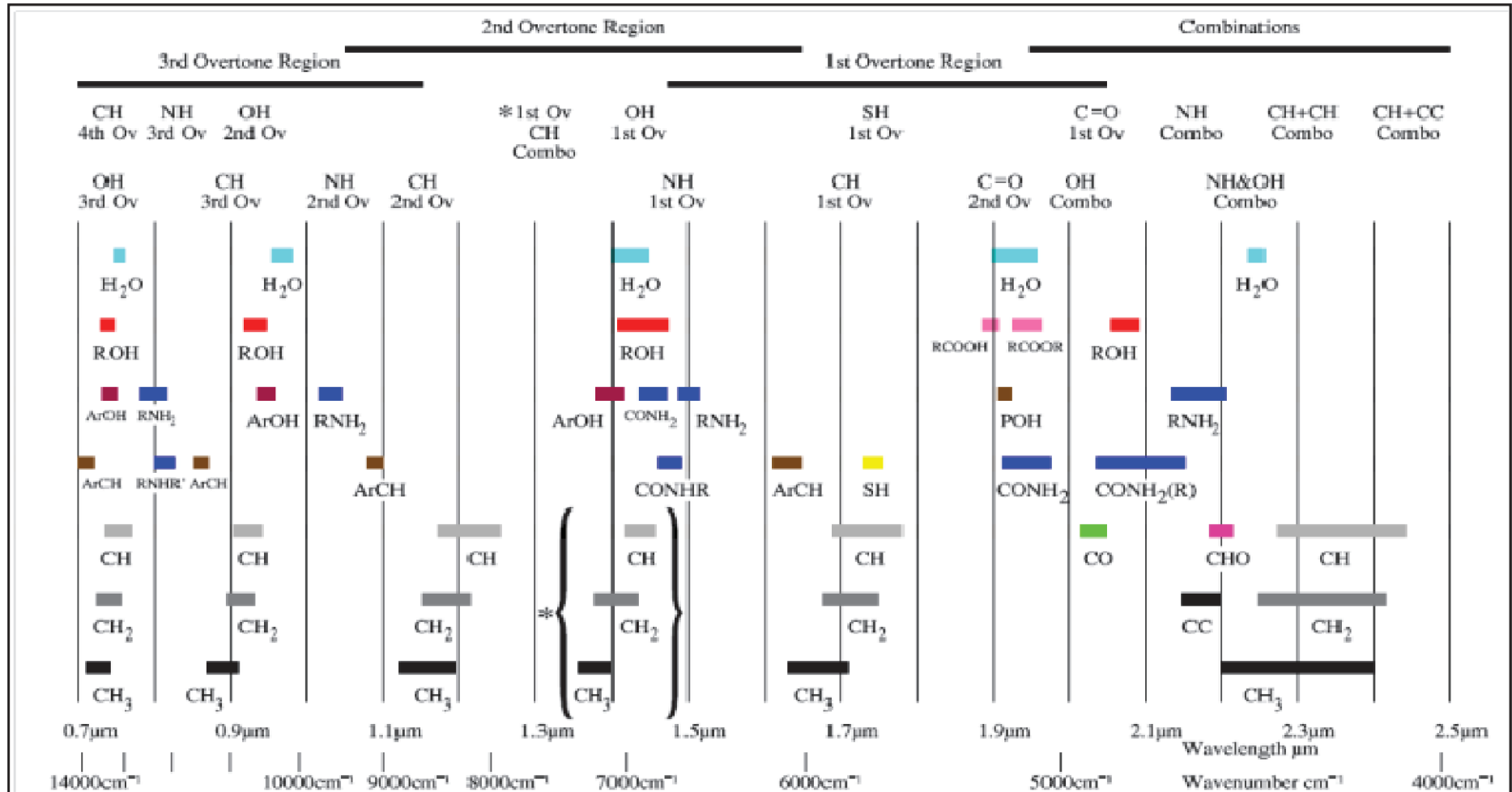
- Conducting a reaction kinetics study for these products using a NIR fibre (simulating online NIR) with the aim of optimizing reaction time and evaluating the end of the reaction as of today.
- Adding more products with the same chemistry to the models.
- Adding other parameters such as glycine and free fatty acids that could not be developed in these practices.

9. BIBLIOGRAFIA:

- (1) CLARIANT. (s. f.). Un futuro en verde para la química a través de la investigación Inqualitas. <https://inqualitas.net/reportajes/un-futuro-en-verde-para-la-quimica-a-traves-de-la-investigacion/> (Accessed April 26, 2024).
- (2) Cabildo, Miranda, M. Del P.; García, Fraile, A.; López, García, C.; Santa María, Gutiérrez, M^a. D. Química Orgánica. *UNED*. **2008**, 530 – 532.
- (3) Piqué, T. M.; Vázquez, A. Uso de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y Cemento. Investigación y Desarrollo*. **2012**, 3, 62–71.
- (4) Bruker. ¿Por qué la espectroscopía FT-NIR? https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-nir-spectrometers/What_is_FT-NIR_spectroscopy.html (Accessed May 15, 2024).
- (5) Mohamed, M.; Jaafar, J.; Ismail, A.; Othman, MHD; Rahman, MA.; Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In *Membrane characteritaton*. Elsevier. 2017; pp 3–29.
- (6) Miller, J. N. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*; Pearson Education.; Madrid, 2002.
- (7) Riu, J. Quimiometria 2022-23 Tema 2 – Anàlisi multivariant, Calibratge multivariant i exploració de dades; Tarragona, 2024.
- (8) Bruce, P.; Minkinen, P.; Riekkola, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Microchim.* **1998**, 128, 93 – 106. <https://doi.org/10.1007/BF01242196>
- (9) Moffat, A.; Trafford, A.; Jee, R.; Analyst, P. G.-.; Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation of Analytical Procedures: quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets. *Analyst*. **2000**, 7. <https://doi.org/10.1039/B002672G>.
- (10) Swarbrick, B. Advances in instrumental technology, industry guidance and data management systems enabling the widespread use of near Infrared Spectroscopy in the pharmaceutical/ biopharmaceutical sector. *J. Near. Infrared. Spectrosc.* **2014**, 22 (3), 157–168. <https://doi.org/10.1255/JNIRS.1121>
- (11) AC-TH029 – Método interno QC/QA Clariant Tarragona, 2007, Versión 4.
- (12) AC-TH002 – Método interno QC/QA Clariant Tarragona, 2000, Versión 3.
- (13) AC-TH484 – Método interno QC/QA Clariant Tarragona, 2018, Versión 7.
- (14) Campos, A. Instrucción de uso y control del FT-IR, TA-INCE-35. 2023, Versión 3.
- (15) Campos. A. Instrucción de Uso y Control del NIR, TA-INCE-34. 2023, Versión 2.
- (16) Workman, Jr. , J.; Weyer, L. *Practical guide to interpretive Near-Infrared Spectroscopy*. CRC Press; 2007. <https://doi.org/10.1201/9781420018318>.

10. ANNEX:

10.1. Annex 1. Taula d e freqüències NIR



10.2. Annex 2. Taula de freqüències FTIR:

Typical Infrared Absorption Frequencies

Functional Class	Stretching Vibrations			Bending Vibrations		
	Range (cm⁻¹)	Intensity	Assignment	Range (cm⁻¹)	Intensity	Assignment
Alkanes	2850-3000	str	CH ₃ , CH ₂ & CH 2 or 3 bands	1350-1470 1370-1390 720-725	med med wk	CH ₂ & CH ₃ deformation CH ₃ deformation CH ₂ rocking
Alkenes	3020-3100 1630-1680 1900-2000	med var str	=C-H & =CH ₂ (usually sharp) C=C (symmetry reduces intensity) C=C asymmetric stretch	880-995 780-850 675-730	str med med	=C-H & =CH ₂ (out-of-plane bending) cis-RCH=CHR
Alkynes	3300 2100-2250	str var	C-H (usually sharp) C≡C (symmetry reduces intensity)	600-700	str	C-H deformation
Arenes	3030 1600 & 1500	var med-wk	C-H (may be several bands) C=C (in ring) (2 bands) (3 if conjugated)	690-900	str-med	C-H bending & ring puckering
Alcohols & Phenols	3580-3650 3200-3550 970-1250	var str str	O-H (free), usually sharp O-H (H-bonded), usually broad C-O	1330-1430 650-770	med var-wk	O-H bending (in-plane) O-H bend (out-of-plane)
Amines	3400-3500 (dil. soln.) 3300-3400 (dil. soln.) 1000-1250	wk wk med	N-H (1°-amines), 2 bands N-H (2°-amines) C-N	1550-1650 660-900	med-str var	NH ₂ scissoring (1°-amines) NH ₂ & N-H wagging (shifts on H-bonding)
Aldehydes & Ketones	2690-2840(2 bands) 1720-1740 1710-1720 1690	med str str str	C-H (aldehyde C-H) C=O (saturated aldehyde) C=O (saturated ketone) aryl ketone	1350-1360 1400-1450 1100	str str med	α-CH ₃ bending α-CH ₂ bending C-C-C bending

	1675 1745 1780	str str str	α , β -unsaturation cyclopentanone cyclobutanone			
<u>Carboxylic Acids & Derivatives</u>	2500-3300 (acids) overlap C-H 1705-1720 (acids) 1210-1320 (acids)	str str med-str	O-H (very broad) C=O (H-bonded) O-C (sometimes 2-peaks)	1395-1440	med	C-O-H bending
	1785-1815 (acyl halides) 1750 & 1820 (anhydrides) 1040-1100 1735-1750 (esters) 1000-1300 1630-1695(amides)	str str str str str str	C=O C=O (2-bands) O-C C=O O-C (2-bands) C=O (amide I band)	1590-1650 1500-1560	med med	N-H (1°-amide) II band N-H (2°-amide) II band
Nitriles	2240-2260	med	C \equiv N (sharp)			