



Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo

Caracterización instrumental y aplicación al análisis de
productos sólidos

Carlos Javier Cairós Barreto

Tesis Doctoral

Doctorado en Química

Directores: Jordi Coello Bonilla y Santiago MasPOCH Andrés

Departamento de Química.
Unidad de Química Analítica
Grupo de Quimiometría

2009



Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo
Caracterización instrumental y aplicación al análisis de
productos sólidos

Memoria presentada por **Carlos J. Cairós Barreto**
para optar al grado de Doctor en Química
Bellaterra, 2009



El Dr. *Jordi Coello Bonilla* y el Dr. *Santiago Maspoch Andrés*, catedráticos de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN: Que el presente trabajo de investigación titulado "*Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo. Caracterización instrumental y aplicación al análisis de productos sólidos*" que constituye la Memoria presentada por *Carlos Javier Cairós Barreto*, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, a nuestro parecer, reúne las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Química.

Y para que quede constancia, firmamos el presente certificado en Bellaterra a 15 de Diciembre de 2009.

Dr. Jordi Coello Bonilla

Dr. Santiago Maspoch Andrés

Agradecimientos

Me gustaría empezar esta memoria agradeciendo a todos los que han hecho posible la consecución de esta tesis. He de empezar, sin ninguna duda, por los profesores Jordi Coello Bonilla y Santiago Maspoch, directores del proyecto, así como al Profesor Marcelo Blanco y la profesora Hortensia Iturriaga, profesores del grupo, gracias a todos, por su ayuda y sus sabios consejos.

Seguiré por los compañeros del departamento, con los que he disfrutado trabajando, comiendo, fumando, divagando, viajando, durante estos 4 añitos. Muchas gracias pues a Ana, Mari, Miriam, Antonio, Miguel, Quim, Manel A, Manel B, Lisi, David, Rubén, Juan, Ricardo, Eva, y José, es decir, el Doctor José Manuel Amigo, al que he dejado para el final porque me gustaría agradecer especialmente, no sólo su amistad sino también su estrecha colaboración en muchas partes de esta tesis, aquí y en København. Muchas Gracias a todos.

También me gustaría agradecer a las personas que me acompañaron en las dos estancias que tuve la oportunidad de disfrutar, en la escuela de Farmacia de Londres, y en la Facultad de Ciencias de la Vida, de København. Thanks a lot, Robert Watt, my supervisor and my best help in London, thank you for your ideas, for your time, for your patience and for your sympathy. Also, thank you, Sulaf and Boom, my personal english teachers, my lab mates, my friends. THANKS. I also would like to thanks to København people, including Dr. Amigo again, Ms. Gilda, Professor Rasmus Bro, and specially Dr. Carsten Ravn. I really enjoy working together, chatting together, sharing ideas about chemometrics, imaging, Denmark, Spain or life. Thanks a lot!

También agradecer la colaboración prestada por el servicio de análisis de la universidad de Córdoba, en especial al Dr. Juan García Olmo, máximo responsable de la sección de espectroscopia NIR. Gracias por su tiempo y sus consejos.

Por supuesto, gracias a todos los que, aunque no hayáis tenido una relación directa con el trabajo, habéis estado apoyando alrededor, desde Barcelona o desde Tenerife. GRACIAS sobre todo a ti, Belén, sin tu apoyo y tu ayuda no habría tesis, lo sabes.

Por último, gracias a mi familia, claro, sin la insistencia de mi madre, (Gracias Mami) y los sabios consejos de mis hermanas (Dulce y Luzma) vete tú a saber dónde estaría yo. GRACIAS, todo lo bien que haga va dedicado a ustedes, ya lo saben.

GRACIAS a todos, a los que he nombrado y a los que faltan (que son algunos seguro), gracias a todos, porque las cosas que han pasado el transcurso, en el camino, han dado algo más de sentido a la meta.

Esta tesis ha sido realizada gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y tecnología, a través de una beca FPI, de 48 meses de duración, asociada a los proyectos CTQ2004-02013, “Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos a las nuevas tecnologías de análisis de proceso”, y y CTQ2007-62528, “Desarrollo de un sistema de imagen NIR hiperespectral y aplicación de métodos quimiométricos multidimensionales.

A mi padre y a mi madre,

ÍNDICE

RESUMEN	v
1.INTRODUCCIÓN	2
1.1 ¿En qué consiste la técnica de NIR-CI (<i>Near Infrared -Chemical Imaging</i>)?	2
1.2 Aplicaciones de NIR-CI en la Industria Farmacéutica	3
1.2.1 Aspecto regulatorio	3
1.2.2 NIR-CI en la industria farmacéutica	4
1.3 Modos de Registro en NIR	6
1.3.1 Transmisión	7
1.3.2 Reflectancia difusa	8
1.4 Tipos de Cámara	9
1.4.1 Imagen de registro por puntos.....	10
1.4.2 Imagen de registro por líneas.....	10
1.4.3 Imagen de registro por plano	11
1.5 Tratamiento de los datos	12
1.5.1 Pretratamientos.....	12
1.5.2 Método para obtener mapas de distribución de componentes.....	14
1.5.2.1 Análisis univariable	14
1.5.2.2 Análisis multivariable.....	15
1.6 Procesado de las imágenes	19
1.6.1 Análisis de histogramas	20
1.6.2 Obtención de imágenes binarias.....	20
2.OBJETIVOS	23
3.MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
3.1 Materiales.....	28
3.2 Instrumentación	29

3.2.1	Espectroscopia NIR clásica	29
3.2.2	Sistema de mapeo por puntos (mapping single point)	30
3.2.3	Sistema focal por planos	30
3.2.3.1	Malvern SyNIRgi. Servicio de análisis de la Universidad de Córdoba..	30
3.2.3.2	Prototipo (Think Spectrally & UAB)	31
3.3	Métodos	32
3.3.1	Calibración instrumental. Material de referencia.....	32
3.3.1.1	Espectroscopia NIR	32
3.3.1.2	Imagen NIR.....	32
3.3.2	Tamizado	33
3.4	Programas para el tratamiento quimiométrico de datos	34
4.	REFLECTANCIA DIFUSA Y FENÓMENOS DE DISPERSIÓN	35
4.1	Introducción	36
4.1.1	Teorías de Reflectancia Difusa	36
4.1.1.1	Teorías continuas.....	37
4.1.1.2	Teorías discontinuas. Teoría de la capa representativa	40
4.1.1.3	Ley de Lamber Beer modificada. Relación empírica.....	42
4.2	Objetivos.....	43
4.3	Metodología de trabajo.....	44
4.4	Resultados	44
4.4.1	Efecto del tamaño de partícula	44
4.4.1.1	Influencia del tamaño de partícula en los máximos de absorción.....	48
4.4.1.2	Camino óptico efectivo	53
4.4.2	Aplicación de la teoría de la capa representativa	55
4.4.2.1	Caracterización de la capa representativa	55
4.4.2.2	Cálculo de los coeficientes de absorción y dispersión	59
5.	PROFUNDIDAD DE PENETRACIÓN DE LA RADIACIÓN NIR	69
5.1	Introducción	70
5.2	Objetivos.....	73
5.3	Metodología de trabajo.....	74
5.4	Resultados	74
5.4.1	Penetración en muestras poco absorbentes	74

5.4.2	Número de capas teóricas según la teoría de la capa representativa	79
6.RESOLUCIÓN DE UNA IMAGEN QUÍMICA		83
6.1	Introducción	84
6.1.1	Resolución en Imagen Química hiperespectral.....	84
6.1.2	Resolución Química	85
6.2	Objetivos.....	87
6.3	Metodología de trabajo.....	88
6.4	Resultados	90
6.4.1	Variación de la resolución química con la longitud de onda.....	90
6.4.2	Resolución de los mapas de distribución	92
6.4.3	Señal de un material no absorbente	95
6.4.4	Resolución entre dos materiales en polvo.....	96
6.4.5	Comparativa Prototipo Think Spectrally – Malvern SyNIR.....	99
6.4.6	Imágenes de partículas poliméricas	102
6.4.7	Errores asociados a la determinación de la resolución. Replicado y utilización de todas las filas.....	105
7.MAPAS DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN CON CONTRASTE MEJORADO.....		107
7.1	Introducción	108
7.2	Objetivos.....	108
7.3	Metodología de trabajo.....	109
7.3.1	Estructura de la imagen: Pretratamientos	110
7.3.2	Visualización inicial: Análisis de componentes principales.....	111
7.3.3	Mapas de correlación	112
7.3.4	Mejora de contraste en los mapas de correlación.....	112
7.3.5	Imágenes Binarias.....	113
7.4	Resultados	114
7.4.1	Estudio de la sección transversal de un comprimido comercial de ibuprofeno.....	114
7.4.2	Análisis de componentes principales (PCA)	114
7.4.3	Mapa de coeficientes de correlación	115
7.4.4	Mapas de correlación de contraste mejorado.....	117
7.4.5	Efecto de la variación en el factor α	117

7.4.6	Obtención de imágenes binarias: Buscando un buen valor umbral.	120
7.4.7	Mapas de correlación de contraste mejorado utilizando espectros puros.....	122
8. ESTIMACIÓN DE LA UNIFORMIDAD EN MUESTRAS SÓLIDAS.....		125
8.1	Introducción	126
8.1.1	Teoría de mezclas sólidas	126
8.1.2	Análisis de uniformidad mediante espectroscopia NIR	128
8.1.3	Análisis de Macro-píxel.....	129
8.2	Objetivos.....	130
8.3	Metodología de trabajo.....	130
8.3.1	Obtención de la imagen NIR.....	131
8.3.2	Análisis de Macro-píxel.....	131
8.3.3	Curvas de uniformidad	133
8.3.3.1	Cálculo de las varianzas límite. Adaptación al análisis de imagen. ...	134
8.3.3.2	Intensidad y escala de segregación	135
8.3.3.3	Índice de uniformidad frente a tamaño de macro-píxel	137
8.3.3.4	Varianza de macro-píxel frente a inversa del tamaño de muestra ...	138
8.4	Comportamiento de la curva de uniformidad en sistemas binarios simulados. ...	139
8.4.1	Efecto de la concentración en las curvas de uniformidad	139
8.4.2	Efecto del tamaño de partícula en las curvas	141
8.4.3	Distribuciones no aleatorias con distinto tamaño de agregado	143
8.4.4	Cambios en la intensidad de segregación. Imágenes con segregación .	147
8.5	Aplicaciones en muestras reales	149
8.5.1	Estudio de una mezcla de productos farmacéuticos en polvo.	149
8.5.2	Uniformidad de comprimidos farmacéuticos	151
9. CONCLUSIONES		157
10. REFERENCIAS		163
11. ANEXOS.....		171

RESUMEN

La espectroscopia de imagen en el infrarrojo cercano (NIR-CI) combina la espectroscopia convencional con el tratamiento de imagen digital. La información espectral y espacial se registra simultáneamente proporcionando un espectro NIR por cada píxel de la imagen de la muestra. La característica más importante de esta técnica es que, además de la identificación y cuantificación de componentes químicos presentes en la muestra, se obtiene simultáneamente su distribución espacial y el tamaño y forma de agregados dentro de la misma, información que se puede relacionar con la calidad del producto.

Los productos sólidos estudiados están en el ámbito de la industria farmacéutica, la cual está estrechamente regulada. Los procesos de manufactura han sido tradicionalmente procesos poco flexibles y su control de calidad basado principalmente en el estudio de los productos finales. La complejidad que implicaba cualquier pequeño cambio, llevó a un cierto estancamiento y a un retraso en la incorporación al proceso productivo de innovaciones científicas y metodológicas. Con el propósito de mejorar tanto el conocimiento del proceso como su calidad y, obviamente, mejorar la garantía de la calidad del producto final, la administración de drogas y alimentación de los Estados Unidos (FDA) publicó un texto guía sobre el uso de la tecnología de control de procesos analíticos (PAT). El concepto PAT incide en la necesidad de controlar la calidad en todos los puntos del proceso, es decir la calidad en el diseño (Quality by Design, QbD) como alternativa a evaluar únicamente la calidad de los productos terminados. NIR-CI es una de las nuevas técnicas analíticas promovida por la iniciativa PAT para obtener un mejor entendimiento de los procesos y también para ser utilizada para el control de procesos.

Esta tesis tiene como objetivo principal la evaluación de una cámara de imagen en el infrarrojo cercano y su aplicación al análisis de productos farmacéuticos sólidos. La cámara está dotada de un sistema modulable de selección de longitudes de onda que permite registrar el espectro NIR en cada píxel de la imagen. Dado que, en cada imagen, se obtiene un enorme volumen de datos con estructura tridimensional, se necesita desarrollar métodos quimiométricos que permitan extraer el máximo de información.

La imagen NIR, como cualquier otra imagen, se obtiene normalmente en modo reflectancia difusa, y por tanto, se obtiene información tanto química como física de la muestra, información que se encuentra muy correlacionada, y que hace que la señal obtenida sea difícil de interpretar. Por esto, el proyecto contempla una primera fase en la que se realiza el estudio sistemático del efecto del tamaño de partícula sobre el espectro. Para ello se ha aplicado la teoría de la capa representativa, de nueva aparición, desarrollada por Dahm & Dahm en el año 1999. Esta teoría no había sido aplicada a muestras sólidas reales. En la tesis se ha estudiado un producto que presenta absorción en NIR (hidrógenoftalato de potasio) y otro que no absorbe (cloruro de sodio) y cuyo efecto principal es contribuir a la dispersión de la radiación en la absorción en NIR de la humedad que contiene. Se estudió la influencia en los espectros del tamaño de partícula (50-500 μm).

La radiación NIR tiene la capacidad de penetrar en una muestra sólida de una forma significativa, adquiriendo información importante de la muestra. Ésta es una de las características que hace especialmente útil a la radiación NIR para el estudio de sólidos, ya que se puede obtener información química de una forma no invasiva ni destructiva, de una cantidad de muestra relativamente grande, que no podría ser analizada de esta forma por ninguna otra técnica espectroscópica. En reflectancia difusa, los detectores registran la información obtenida de una cierta cantidad de muestra que es desconocida y que depende de diversos factores físicos y del poder de absorción de la muestra³. En esta tesis se ha realizado un estudio de la penetración de la radiación NIR en los dos productos mencionados anteriormente. Para cada longitud

de onda, se ha estudiado el efecto del tamaño de partícula y del grado de absorción del producto en la penetración de la radiación. En este trabajo, por primera vez, los valores obtenidos experimentalmente se han comparado con los estimados a partir de la teoría de Dahm.

Existen tres tipos de resolución en una imagen química, la resolución óptica del aparato, la resolución del espectral y la resolución química. Ligado a la evaluación de la cámara NIR, se ha estudiado su resolución química, es decir, qué cantidad de muestra contribuye a la medida que es registrada en una determinada superficie (píxel), o dicho con otras palabras, el grado de contaminación del espectro de un píxel por material de los píxeles vecinos. Para ello se ha estudiado la frontera entre distintos materiales puros (polímeros y materiales en polvo)⁴. El resultado se ha comparado con el obtenido con un instrumento comercial distribuido por Malvern S.L. Se ha estudiado la variación de la resolución con la absorción específica a cada longitud de onda y con las características de dispersión de la muestra.

En la actualidad existen muy pocas aplicaciones informáticas específicas para el tratamiento de imagen NIR⁵. Además, éstas suelen ser muy cerradas a la hora de ofrecer información al usuario de los algoritmos o funciones estadísticas o matemáticas que utilizan y, por otro lado, significan una inversión económica importante. La tendencia general es utilizar por separado algún software de tratamiento de imagen que permita realizar el desdoblamiento de la matriz tridimensional de datos y utilizar posteriormente algún software específico para el tratamiento de espectros NIR. Por lo tanto, de forma paralela a la puesta en marcha y evaluación del prototipo, se ha llevado a cabo el desarrollo de algunas herramientas para el tratamiento de datos obtenidos en NIR-CI. Estas herramientas han sido elaboradas en forma de rutinas programadas para ser ejecutadas en MatLab, dado que el programa de adquisición del prototipo genera una matriz de datos que puede abrirse directamente en dicho software. Se ha desarrollado una metodología para obtener información a partir de una imagen (o conjunto de imágenes) sin disponer de ninguna información previa sobre ella, a través del uso de coeficientes de correlación, análisis de componentes principales (PCA) y la aplicación de una función, propuesta

específicamente para mapas de coeficientes de correlación, que sirve para mejorar el contraste de los mapas. La segunda aplicación caracteriza el grado de uniformidad en muestras sólidas utilizando imagen NIR y análisis de macro-píxel.

Como resultado de los trabajos que conforman esta tesis se han publicado, hasta el momento, dos artículos, que han sido incluidos en la sección de anexos y que corresponden con los estudios detallados en el capítulo 4 (anexo 3) y capítulo 7 (anexo 4). Actualmente se está trabajando para la publicación de otros artículos, que incluirán los contenidos descritos en los capítulos 6 y 8.

1

INTRODUCCIÓN

1.1 ¿En qué consiste la técnica de NIR-CI (<i>Near Infrared -Chemical Imaging</i>)?	2
1.2 Aplicaciones de NIR-CI en la Industria Farmacéutica	3
1.3 Modos de Registro en NIR	6
1.4 Tipos de Cámara	9
1.5 Tratamiento de los datos	12
1.6 Procesado de las imágenes	19

1.1 ¿EN QUÉ CONSISTE LA TÉCNICA DE NIR-CI (NEAR INFRARED -CHEMICAL IMAGING)?

La espectroscopia de imagen en el infrarrojo cercano (NIR-CI) combina la espectroscopia convencional con el tratamiento de imagen digital. La información espectral y espacial se registra simultáneamente proporcionando un espectro NIR por cada píxel de la imagen de la muestra. El resultado consiste en un conjunto de datos tridimensional, que se denomina cubo de datos hiperespectral (figura 1). Los ejes x e y representan la información espacial, mientras que el eje z se corresponde con el eje de la longitud de onda (medida espectral). El cubo de datos hiperespectral se transforma en un conjunto de imágenes, que proporcionan información sobre la distribución de cada componente químico de la superficie de la muestra.

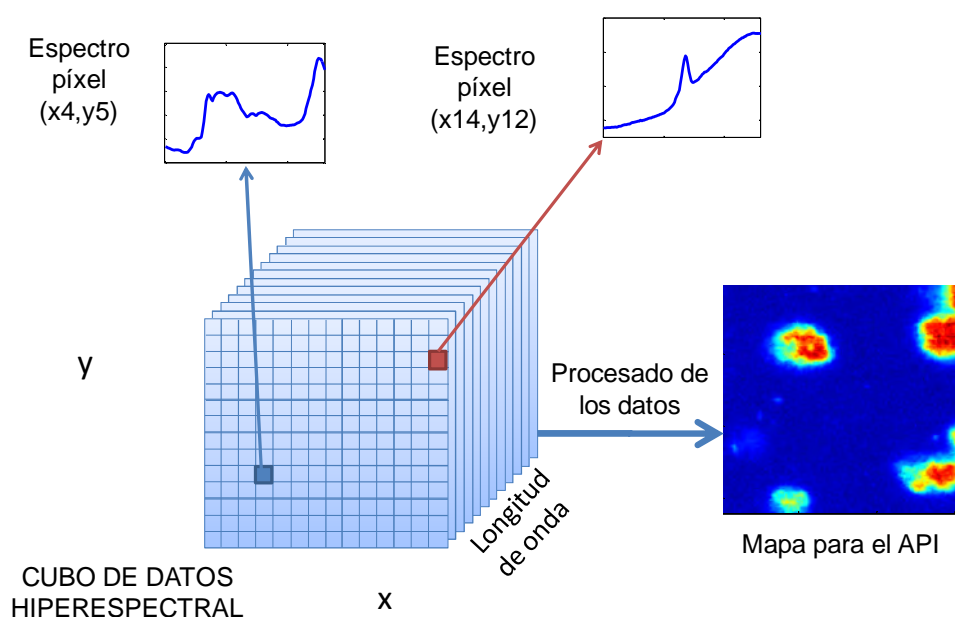


Figura 1. Cubo de datos hiperespectral NIR. Los espectros NIR están asociados con cada píxel y cada imagen asociada con cada número de onda (longitud de onda) NIR. Derecha: Una imagen química (CI) del principio farmacéutico activo (API = Active Pharmaceutical Ingredient) generado a partir del procesamiento de los datos del cubo.

La característica más importante de esta técnica es que, además de la identificación y cuantificación de componentes químicos presentes en la muestra, se obtiene simultáneamente su distribución espacial. Por consiguiente, las imágenes químicas

permiten visualizar la estructura y elucidar la distribución y tamaño de agregado de cada componente químico de la muestra (figura 1, derecha), parámetros que pueden relacionarse con la calidad del producto.

1.2 APLICACIONES DE NIR-CI EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

1.2.1 Aspecto regulatorio

La industria farmacéutica es una industria estrechamente regulada. Los procesos de manufactura han sido tradicionalmente procesos poco flexibles y su control de calidad se ha basado principalmente en el control de los productos finales. Todo cambio en un proceso debe ser gestionado con las debidas propuestas regulatorias. La complejidad que implicaba cualquier pequeño cambio, llevó a un cierto estancamiento y a un retraso en la incorporación al proceso productivo de innovaciones científicas y metodológicas. Ante ello, con el propósito de mejorar tanto el conocimiento del proceso como su calidad, y obviamente, mejorar la garantía de la calidad del producto final, la administración de drogas y alimentación de los Estados Unidos (FDA) publicó un texto guía sobre el uso de la tecnología de control de procesos analíticos (PAT)¹. El concepto PAT incide en la necesidad de controlar la calidad en todos los puntos del proceso, es decir la calidad en el diseño (Quality by Design, QbD) como alternativa a evaluar únicamente la calidad de los productos terminados. Las herramientas que sugiere la FDA en estos documentos son:

- Herramientas multivariantes para el diseño, adquisición y análisis de datos
- Analizadores de proceso
- Control de procesos
- Mejora continua y gestión de procesos

La imagen química en el infrarrojo próximo (NIR-CI) es uno de las nuevas técnicas analíticas promovida por la iniciativa PAT para obtener un mejor entendimiento de los procesos y también para ser utilizada para su control²⁻³.

La formulación de productos farmacéuticos es, básicamente, el trabajo científico que implica el diseño y desarrollo de la forma de dosificación adecuada para un determinado principio farmacéutico activo (API=Active Pharmaceutical Ingredient) teniendo en cuenta las propiedades físicas, químicas y farmacológicas del mismo, las rutas de administración, el proceso de manufactura y la forma de consumo del producto final. El objetivo es diseñar un producto de calidad, así como un proceso de manufactura robusto para la producción del mismo⁴.

Se ha de seleccionar la forma apropiada de dosis, el proceso de manufacturación, la composición, las etapas y los parámetros relevantes al proceso industrial al completo. Se estudia cómo las distintas variables, modos operativos y formulaciones afectan a la calidad y rendimiento del producto. Con ello se pretende identificar y monitorizar los *atributos de calidad crítica* (CQA) así como los *parámetros de proceso críticos* (CPP), lo que es perfectamente consistente con las directrices PAT.

1.2.2 NIR-CI en la industria farmacéutica

Dentro de este marco, la espectroscopia NIR ha demostrado su aplicabilidad e importancia en el control de calidad y de procesos de la industria farmacéutica; Hay numerosos trabajos que así lo indican^{5,6,7,8,9}.

En el repaso de la bibliografía sobre aplicaciones de NIR-CI en la industria farmacéutica se hace evidente una explosión de la técnica a partir del año 2000, coincidiendo con la aparición comercial de los dispositivos de registro por planos o imagen global. Son numerosos los trabajos que se han publicado desde entonces, con diversas aplicaciones.

En primer lugar, hay que destacar la reciente aparición de algunas revisiones que resumen la aplicabilidad de esta técnica en el campo farmacéutico^{8,10,11}, hecho que confirma el interés que ha despertado el NIR-CI en los últimos años. Este interés se ha plasmado en la aparición de numerosos trabajos centrados en las características de la técnica^{12,13,14,15,16} y del tratamiento de los datos obtenidos^{17,18,19,20,21,22}. En cuanto a sus aplicaciones directas en la industria farmacéutica, destaca su aplicación en la determinación de la uniformidad de mezclas sólidas en polvo o granulado y comprimidos^{3,23,24,25,26,27,28,29,30,31}. En este tipo de aplicaciones la técnica evidencia sus ventajas en el sentido de que es capaz de aportar información espacial de la muestra directamente relacionada con la uniformidad de un sólido. También se ha aplicado con éxito en el análisis cuantitativo de las muestras, así como en la determinación de parámetros de calidad relacionados con su composición^{3,22,23,32,33,34}. Otros estudios han demostrado su aplicación en formulación^{35,36}, tamaño y forma de partículas o agregados^{37,38,39}, detección de medicamentos falsos^{23,40,41}, espesor y homogeneidad de recubrimientos de comprimidos^{39,42}, trazas de contaminantes minoritarios²³, o poliformismos⁴³.

Con este amplio marco de aplicación sólo queda seguir trabajando tanto en desafíos tecnológicos que permitan medidas más exactas y precisas como en el desarrollo de métodos más fiables y rápidos para el tratamiento de los datos.

1.3 MODOS DE REGISTRO EN NIR

Un espectro NIR se puede registrar de tres modos diferentes: transmitancia, transflectancia y reflectancia. La diferencia básica entre los tres tipos de medidas es la posición de la muestra en el instrumento⁶, como se muestra en la figura 2.

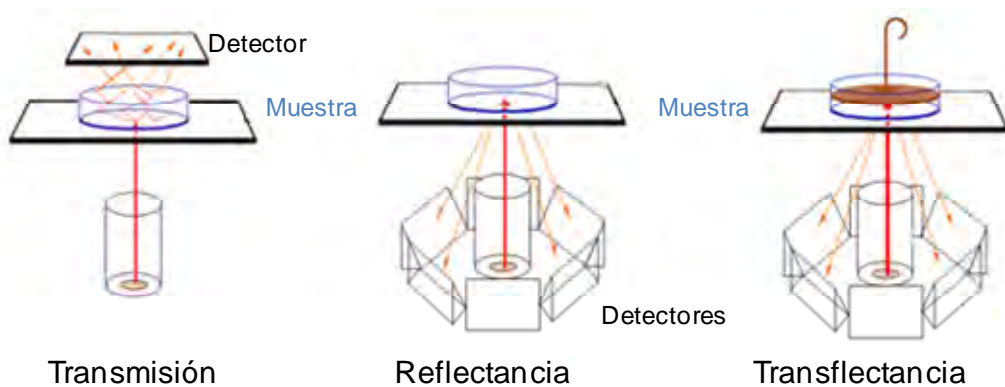


Figura 2. Modos de registro en NIR

Cuando la radiación (I_0) incide en la muestra (Figura 3) puede sufrir diferentes fenómenos: absorción (I_A), transmisión (I_T) y reflexión (I_R).

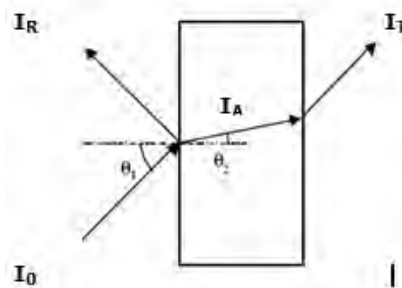


Figura 3. Fenómeno de absorción, transmisión y reflexión de la radiación electromagnética al interactuar con la materia.

$$I_0 = I_A + I_T + I_R \quad (1)$$

1.3.1 Transmisión

La transmitancia, T , se calcula como la fracción de radiación (I_T/I_0) transmitida a través de la muestra. La intensidad de absorción de la luz, absorbancia (A), se calcula asumiendo que $I_R = 0$, a través de la siguiente expresión.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_T} \quad (2)$$

La representación de la transmitancia o de la absorbancia como una función de la longitud de onda, λ , es lo que conforma el espectro de la muestra. La relación que existe entre la concentración y la absorbancia para cada longitud de onda está descrita por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

La absorción de la radiación por parte de la muestra es proporcional a la longitud del camino óptico (espesor de la celda en cm, l), a la concentración de la solución en mol/L y a una constante proporcional específica de cada muestra y para cada longitud de onda (λ), denominada absortividad molar, ε , [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Esta ley lineal se cumple únicamente para disoluciones diluidas. La pérdida en la linealidad a concentraciones muy elevadas se puede producir al variar ε como consecuencia de cambios en el índice de refracción de la disolución. Otras desviaciones de la linealidad tienen su origen en la propia instrumentación: presencia de radiación reflejada o dispersada, radiación no estrictamente monocromática o detectores de respuesta no lineal⁴⁴.

1.3.2 Reflectancia difusa

Cuando la radiación atraviesa una interfase entre medios con diferente índice de refracción se produce siempre una reflexión regida por las ecuaciones de Fresnel.

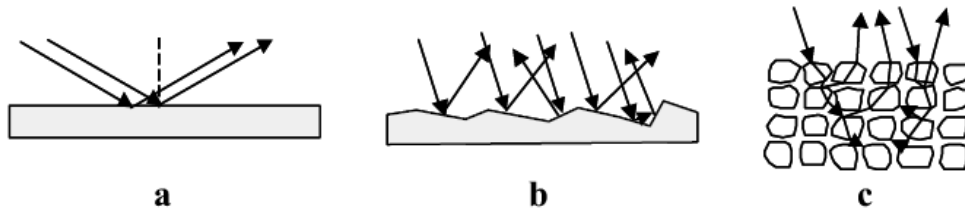


Figura 4. Procesos de reflexión en un material especular (a) o irregular (b). Fenómeno de reflectancia difusa (c).

La intensidad reflejada sobre el total incidente depende de los índices de refracción del aire y la muestra (n_1 , n_2). Para el caso de un ángulo de incidencia igual a cero y material no absorbente la expresión es⁵:

$$\frac{I_R}{I_0} = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2} \quad (4)$$

Cuando la radiación incide sobre una superficie irregular, se puede considerar que la frontera entre el medio y la muestra está formado por una serie de pequeñas interfases orientadas en todos los ángulos posibles (Figura 4b). De esta forma aunque cada una de estas pequeñas interfases refleja la radiación, el efecto global es una reflexión de la radiación en cualquier ángulo (radiación dispersa o irregular).

En muestras poco absorbentes, la radiación que se transmite a través de la primera interfase (figura 4c) sufrirá absorción por parte de la muestra, por lo que su intensidad se verá atenuada. Esta radiación que ha atravesado la primera capa de partículas se difunde a las siguientes capas a través de reflexiones, refracciones y dispersión y sufrirá nuevos fenómenos de atenuación al atravesar nuevas partículas. Al final del proceso dejará la muestra en cualquier dirección. La longitud de camino óptico seguido por la radiación es muy difícil de describir matemáticamente, sobre todo si las

partículas de la muestra tienen tamaños heterogéneos, por lo que no se ha desarrollado una teoría rigurosa de la reflectancia difusa.

La energía total reflejada por una muestra, es la suma de la reflexión especular (superficial o en forma de espejo) más la reflexión difusa, que es aquella que ha sufrido alguna absorción. Sólo esta última forma (reflexión difusa) entrega información útil acerca de la naturaleza o composición de la muestra⁴⁵.

Una ventaja de trabajar en la región NIR del espectro consiste en que la penetración de la radiación es mayor, debido a que la absorptividad es menor y disminuye en cada armónico sucesivo (en comparación con la banda de absorción fundamental en la zona del infrarrojo medio o MIR). Esto hace que sea posible analizar por reflectancia una muestra sólida de mayor grosor, obteniendo información más representativa, y al mismo tiempo sea posible trabajar en modo transmisión (o transmitancia) en muestras húmedas heterogéneas bastante más gruesas y con más facilidad de manejo que en la región MIR⁴⁶.

Las imágenes NIR-CI se obtienen de modo casi exclusivo en reflectancia, aunque comienzan a aparecer instrumentos que permiten obtener imágenes por transmisión.

1.4 TIPOS DE CÁMARA

Una cámara espectroscópica diseñada para obtener imágenes hiperespectrales está formada por los dispositivos necesarios para obtener la información espectral y espacial de la muestra. La información espacial se puede obtener utilizando tres configuraciones distintas: registro por puntos (scan point), registro por líneas (line scan) y registro por plano (focal plane scan).

1.4.1 Imagen de registro por puntos

La configuración de la cámara de registro por puntos es la que se muestra en la figura 5. Con esta disposición se puede obtener un espectro de una pequeña región de muestra. La muestra debe ser posicionada nuevamente, a través de un sistema mecánico-electrónico, para obtener un nuevo espectro. Del desplazamiento sistemático de la muestra en dos dimensiones se obtiene una imagen hiperespectral. Este sistema permite obtener espectros muy estables en alta resolución. Sin embargo, el desplazamiento de la muestra, que debe ser muy preciso para asegurar la repetitividad de la medida, hace que el tiempo de adquisición de imagen sea realmente alto (del orden de horas o incluso días). El tamaño de imagen sólo está limitado por el sistema de posicionamiento de la muestra.

1.4.2 Imagen de registro por líneas

Esta configuración, mostrada en la figura 5, se denomina de registro por líneas (line scan ó push broom en inglés) y utiliza un detector de dos dimensiones perpendicular al plano de la superficie escaneada. La muestra es iluminada por una estrecha línea de radiación o bien la radiación pasa por un hueco del tamaño de línea de camino a los detectores. Las imágenes hiperespectrales se generan al mover la muestra en la dirección del plano de la muestra perpendicular a la línea de detectores. El tiempo de adquisición de imagen se reduce de forma significativa, ya que la velocidad viene limitada únicamente por la capacidad de lectura de la cámara. Existen instrumentos comerciales disponibles con frecuencias de imagen superiores a los 90 Hz y de 320*256 píxeles por imagen. Estos valores hacen que se pueda obtener imágenes, en función del número de longitudes de onda escaneadas, en cuestión de minutos o incluso segundos. Este hecho hace que la técnica gane un especial valor en su aplicación en operaciones continuas para la monitorización online de procesos.

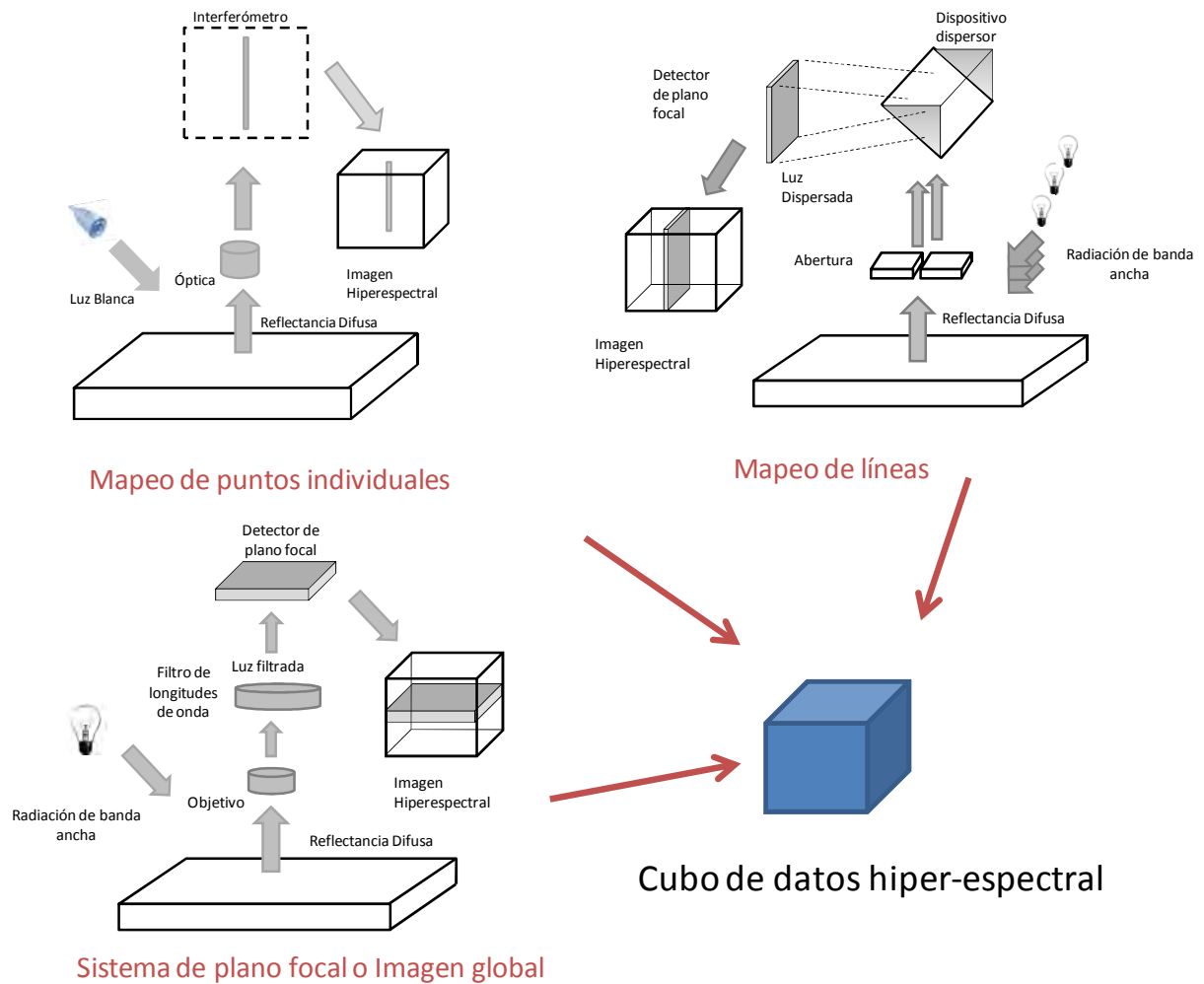


Figura 5. Tipos de configuraciones que permiten obtener una imagen química hiperespectral en el infrarrojo próximo

1.4.3 Imagen de registro por plano

La configuración del registro por planos o imágenes implica el posicionamiento del detector en un plano paralelo a la superficie de la muestra. Se obtiene una imagen para cada longitud de onda y se forma la imagen hiperespectral por la combinación de todas ellas a lo largo de la zona del espectro elegida. El tiempo de adquisición de imagen es relativamente corto, entre 1 y 5 minutos. Los problemas más importantes de esta configuración se derivan del hecho de que la muestra debe ser iluminada completamente durante el tiempo de adquisición, provocando su calentamiento, hecho que limita sus aplicaciones en proceso biológicos. Además, en función de las propiedades de los sólidos escaneados, este hecho puede producir problemas de

resolución lateral. Los instrumentos comerciales disponibles permiten obtener imágenes de 256x320 píxeles a resoluciones ópticas que alcanzan hasta los 10 μm por píxel, aunque normalmente se trabaja con resoluciones del orden de 30-100 μm .

1.5 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

El tratamiento de los datos obtenidos en análisis de imagen se divide en tres etapas fundamentales: el pretratamiento de los datos obtenidos, el tratamiento multivariable de los espectros obtenidos para obtener mapas de distribución de componentes y el procesado de estos mapas de componente (imágenes) para obtener información espacial, tanto estadística como cuantitativa.

1.5.1 Pretratamientos

Un paso necesario antes de realizar cualquier pre-tratamiento matemático sobre los espectros de una imagen química es el desdoblamiento de la matriz espectral. Este paso es crucial para aplicar cualquier tipo de algoritmo 2D (PCA, clustering, CLS, MCR-ALS) y en esencia lo que se hace es pasar de una matriz X' ($M \times N \times \lambda$) a otra matriz X ($MN \times \lambda$), según el esquema de trabajo de la figura 6. Una vez se tenga la matriz desdoblada, los espectros serán tratados de la misma forma en la que se trabaja en espectroscopia NIR clásica. Las principales diferencias radican en la cantidad de espectros a tratar, mucho mayor en NIR imagen, y en los distintos artefactos que deriven del instrumental.

El pretratamiento de los espectros es un paso esencial para evitar la influencia de fenómenos no deseables en la señal encontrados en cualquier espectroscopia NIR de reflectancia difusa⁴⁷ y sus beneficios pueden ser extrapolados de los obtenidos para espectroscopia NIR clásica, donde el pretratamiento de los datos se lleva a cabo para facilitar la extracción de información química en el posterior análisis de los espectros, por medio de la minimización de componentes de la señal indeseables como pueden

ser el efecto de la dispersión de la radiación debido a diferencias en el tamaño o en la forma de las partículas, y artefactos producidos por la iluminación o los detectores.

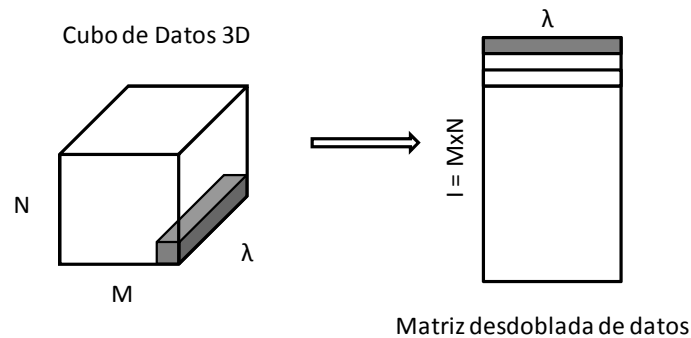


Figura 6. Desdoblamiento de la matriz. Etapa fundamental en el tratamiento de las imágenes con las técnicas habituales de espectroscopia NIR

Han sido propuestos numerosos métodos para espectroscopia clásica, como los suavizados o las derivadas (Algoritmo de Savitzky-Golay o de Norris), el SNV (Standard Normal Variate)⁴⁸, MSC y EMSC (Multiplicative scattering correction y Extended multiplicative scattering correction)³⁷. Todos estos métodos son empleados frecuentemente en NIR imagen, siguiendo la regla no escrita que implica utilizar el mínimo preprocesamiento, manteniendo así la mayor cantidad de información posible con respecto a la matriz original y evitando el riesgo de introducir en ella artefactos matemáticos que puedan falsear los resultados. Esta es una de las razones por las que SNV y suavizado ha sido elegido en este trabajo como pre-procesamiento general, ya que estos métodos preservan la forma original de los espectros.

El SNV es un tratamiento muy habitual en espectroscopia NIR que minimiza los efectos de línea base producidos por la dispersión de la luz. El SNV transforma cada espectro en un espectro con intensidad media 0 y desviación estándar igual 1. Precisamente otra de las ventajas en su aplicación en imagen es que se aplica a cada espectro individualmente, hecho fundamental en imagen debido al gran número de espectros que conforman una imagen y a la posible presencia de píxeles muertos o con mucho ruido.

Las técnicas de suavizado permiten la reducción del nivel de ruido de los espectros. El algoritmo más utilizado es el de Savitzky-Golay que utiliza una ventana polinomial

alrededor de un punto dato para minimizar el ruido de esa ventana. Dos parámetros deben elegirse para su aplicación; el grado del polinomio y el ancho de la ventana. Generalmente se utiliza polinomios de 2^o o 3^{er} grado, que rinden resultados similares⁴⁹. La elección de la ventana adecuada es importante y puede resultar necesario optimizarla^{50,51}.

1.5.2 Método para obtener mapas de distribución de componentes

Los componentes químicos de una muestra son localizados a partir de la obtención de los mapas de distribución. Muchos métodos han sido desarrollados o simplemente asimilados de la espectroscopia NIR clásica (Figura 7). La elección del método más apropiado está basada en el tipo de información disponible, si se conoce el número de componentes de la muestra y su espectro puro, y el ruido experimental. La principal clasificación de estos métodos los divide en métodos univariados y métodos multivariados.

1.5.2.1 Análisis univariable

Existen posibilidades de que los datos obtenidos, debido a las características espectrales de los componentes de la muestra en estudio puedan tratarse de forma sencilla para obtener información de una sola longitud de onda^{52,53,54}. Otra alternativa es utilizar relaciones de longitud de ondas sencillas como el área bajo un determinado pico o el cociente entre dos picos. De esta forma una sola imagen puede aportar la información necesaria y no es necesaria la aplicación de métodos multivariados para extraer información del conjunto 3D de datos.

En la mayoría de los casos, y debido a las características de la radiación NIR, es necesario obtener la información trabajando con el espectro completo de longitudes

de onda, o con una parte de él, y se hace inevitable la aplicación de métodos de calibración multivariable.

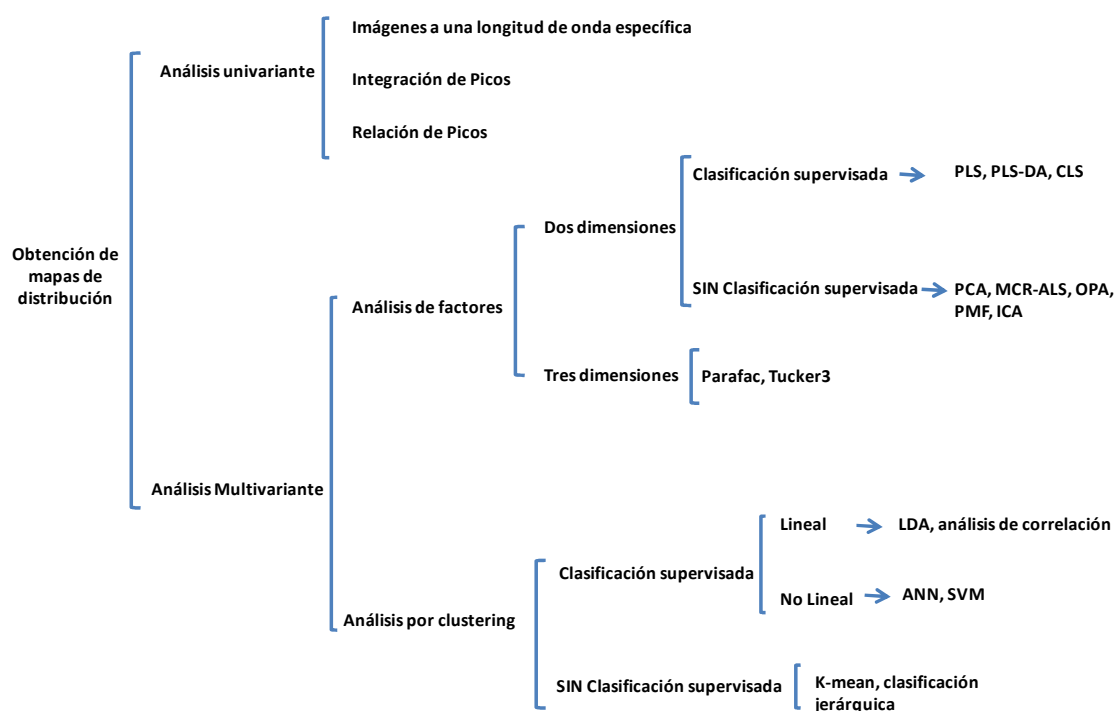


Figura 7. Clasificación de los métodos utilizados en NIR-CI para extraer información en forma de mapas de distribución de componentes

1.5.2.2 Análisis multivariable

La aplicación de métodos multivariados en espectroscopia NIR está muy bien documentada^{5,8,9}. Existen diferentes clasificaciones en función de su aplicación, de la información necesaria para aplicarlos o de los resultados que se obtienen. Después del creciente número de publicaciones que ha habido en los últimos años todo parece indicar que todos los métodos conocidos en espectroscopia NIR clásica son aplicables también en NIR-CI, realizando las consideraciones necesarias, en función de la información que se espera obtener.

La gran variedad de posibilidades queda plasmada en varias publicaciones de reciente aparición que describen con gran precisión el estado de la materia al respecto^{11,22}. Ravn *et al* han hecho una interesante comparación de los diferentes métodos de

calibración en las imágenes obtenidos con un NIR-CI de espectros en línea sobre comprimido farmacéuticos y como se ven afectados los valores finales de concentración en función del método de calibración utilizado⁵⁵.

Dado que el objetivo de esta tesis se aleja de realizar un análisis exhaustivo de los métodos existentes para la obtención de mapas de distribución, que en opinión del autor está suficientemente documentada, a continuación se describen únicamente los métodos utilizados durante la preparación de la presente memoria: el análisis de componentes principales (PCA), la utilización de coeficientes de correlación y la regresión lineal clásica (CLS). Para obtener un mayor detalle de los distintos métodos empleados se invita al lector al repaso de algunos manuales de quimiometría o NIR⁹.

Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis, PCA)

Es el método de análisis de factores más utilizado en química analítica. Descompone la matriz inicial en componentes principales que explican la variabilidad del sistema y que son ortogonales entre sí. El PCA descompone la matriz X según la ecuación 5, donde T es la matriz de *scores* ($MN \times F$), P es la matriz de *loadings* ($\lambda \times F$) y E es la matriz residual para F componentes principales. Cada vector de *scores* puede formar un mapa de distribución para cada componente principal (PC). Cada vector loading en combinación con cada mapa de distribución de *scores* puede utilizarse para asociar fuente de variabilidad con distribución. Este modo de descomposición de imágenes hiperespectrales es también conocido como algoritmo Multiway-PCA o MPCA^{56,57,58}.

$$X = TP^T + E \quad (5)$$

El análisis de componentes principales ha sido aplicado previamente en análisis de imagen para el estudio de texturas⁵⁹, determinación de la homogeneidad^{29,60,61,62,63}, y localización de contaminantes en la superficie de comprimidos⁶⁴, así como para la determinación de parámetro de calidad en procesos de manufacturación de comprimidos^{22,65}.

El PCA presenta algunos problemas fundamentales a la hora de su aplicación, lo que hace que algunos autores se hayan planteado que no es una técnica adecuada para la extracción de información en análisis de imagen⁶⁶. La realidad es que el PCA es una técnica que busca fuentes de variabilidad y que una imagen adquirida en reflectancia difusa puede presentar numerosas fuentes de variabilidad de origen físico (dispersión de la luz, defectos de iluminación, irregularidades en la superficie, sombras, etc). De esta forma, la asociación de *loadings* con espectros puros suele ser una tarea complicada. Otro problema importante es la rotación que pueden sufrir los *loadings* y que puede complicar más la interpretación de los resultados.

Coeficiente de correlación (C.C.)

El coeficiente de correlación es una técnica bien conocida para medir la similitud entre espectros²¹. En el caso de análisis de imagen, se calcula el coeficiente de correlación entre un espectro objetivo (generalmente el espectro puro de algún componente) y el espectro de cada uno de los píxeles de la imagen, obteniéndose de esta manera un mapa de correlación que es una representación visual de la abundancia del componente en estudio. El coeficiente de correlación se calcula con la ecuación 6, donde b_{xy} representa el espectro puro del componente y a_{xy} es el espectro medido en las coordenadas espaciales xy . La mayor similitud entre espectros viene indicada por un coeficiente de correlación 1. Los coeficientes de correlación son un parámetro básicamente cualitativo, aunque existen referencias que indican su posible utilización como parámetro cuantitativo si es utilizado con la debida calibración^{21,67}.

$$\rho_{xy} = \frac{Cov(a_{x'y'}, b_{xy})}{\sigma_{a_{x'y'}} \sigma_{b_{xy}}} \quad (6)$$

En análisis de imagen presenta ventajas en cuanto a su sencilla utilización, ya que no necesita del desdoblamiento de la matriz, y, lo que es más importante, se aplica a cada píxel por separado, por lo que es insensible a valores outliers, píxeles muertos, o

posibles artificios producidos por la iluminación irregular, en el sentido de que la presencia de éstos no influye en el cálculo de los ordinarios.

Regresión lineal clásica (Classical Least-Squares, CLS)

La regresión lineal clásica (CLS) es un método muy empleado para cuantificación, que asume que cada medida es una suma de dos señales independientes (por ejemplo, en NIR-CI, CLS asume que, en la ausencia de interacción entre los componentes de la muestra, el espectro de cada píxel es la suma de todos los componentes puros, combinación lineal de sus concentraciones relativas^{21,22,68}).

$$x = c \cdot S + E \quad (7)$$

Esencialmente el algoritmo descompone la matriz X según la ecuación 7, donde x es el vector respuesta medido, c es el vector concentración y S es el espectro del componente puro. El interés real del algoritmo CLS radica en que cuando se conoce todos los espectros puros de los componentes, c puede ser calculado de forma sencilla siguiendo la ecuación 8, donde S^+ denota la matriz pseudo inversa de S (ecuación 9).

$$c = xS^+ \quad (8)$$

$$S^+ = S^T(SS^T)^{-1} \quad (9)$$

El algoritmo CLS tiene dos problemas principales, es muy sensible a variaciones no sistemáticas y los espectros puros no están siempre disponibles, al menos en las mismas condiciones en los que se ha de registrar la muestra.

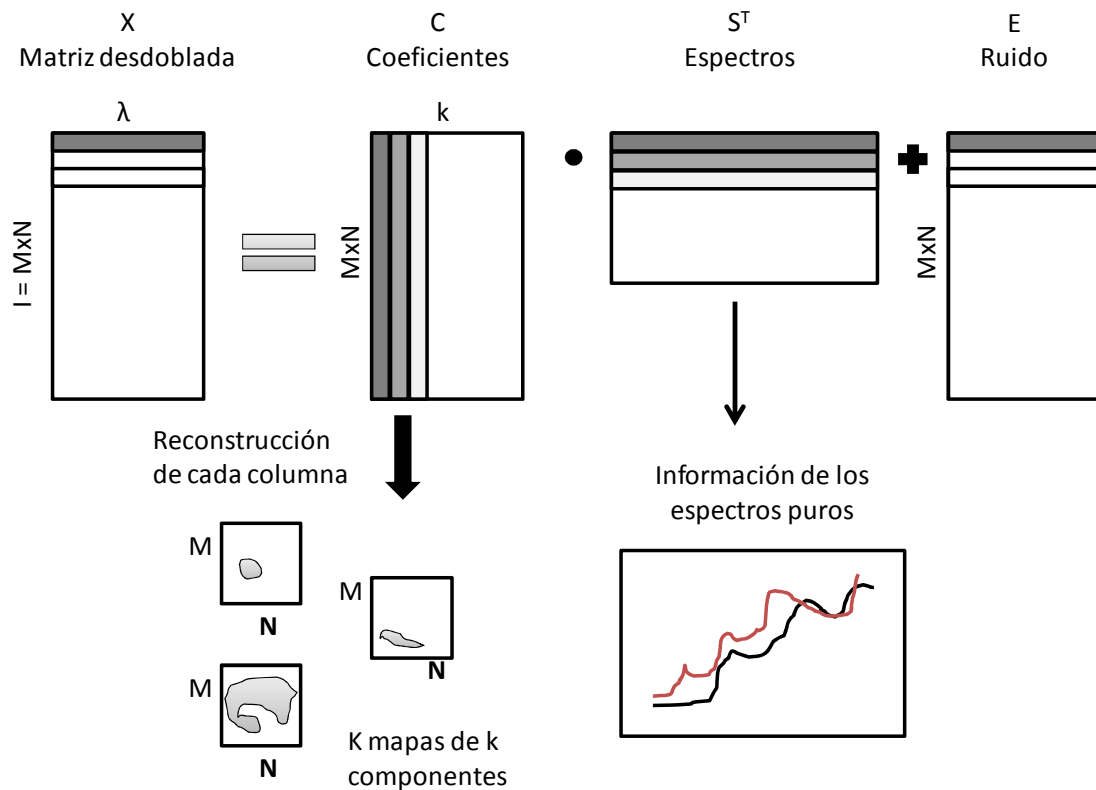


Figura 8. Modelo Bilineal en el que se basa la descomposición en la regresión lineal clásica (CLS)

1.6 PROCESADO DE LAS IMÁGENES

El tratamiento de imágenes está ampliamente desarrollado en numerosas ramas de la ciencia moderna. Medicina, biología, astronomía, artes visuales, son algunas de las disciplinas en las que se ha venido aplicando análisis de imagen desde la aparición y desarrollo de las técnicas de imagen digital. Uno de los retos más importantes para la investigación de la imagen química es, precisamente, la adopción y adaptación de las técnicas ya existentes que sean de utilidad en esta disciplina. De este modo, técnicas de filtrado, mejoramiento de contraste, reconocimiento de pautas, etc. han de ser estudiadas y valoradas las posibilidades de su aplicación en NIR-CI. Unas de las técnicas que, inicialmente, han despertado más interés en NIR-CI son el análisis de histogramas y el estudio de imágenes binarias, técnicas que se describen brevemente a continuación.

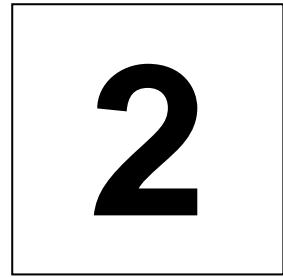
1.6.1 Análisis de histogramas

Los histogramas son una representación del número de píxel frente al valor de intensidad que tienen en una imagen o mapa de distribución. El máximo relativo del histograma da una idea de la composición media de la muestra, mientras que la desviación estándar de la distribución da información sobre su homogeneidad. De esta forma, si un histograma muestra una distribución estrecha y simétrica evidencia una distribución de intensidades similares y, por tanto, una muestra homogénea. Inversamente, si la distribución del histograma es asimétrica y ancha, la muestra presentará heterogeneidades. Se suele utilizar otros dos valores numéricos para definir la distribución de un histograma, además de la media y la desviación estándar⁶⁹: el coeficiente de asimetría, que informan sobre las colas de la distribución y el coeficiente de curtosis, que aporta información de la forma que toma el pico de los histogramas. Los histogramas de mapas de distribución han sido ampliamente utilizados en el estudio de la distribución espacial de componentes en muestras farmacéuticas.^{18,70,71,21}

1.6.2 Obtención de imágenes binarias

La obtención de imágenes binarias surge de la necesidad de simplificar los cálculos a la hora de obtener información espacial sobre la distribución de un componente, normalmente en valores estadísticos (como proporción, diámetro máximo o mínimo de partícula o de agregado.) La manera más habitual de obtener estas imágenes binarias es estableciendo un valor o un intervalo de valores umbral en la escala del mapa de distribución y asignando a estos píxeles valor 1. El resto de píxeles tendrá valor 0. La selección de este valor umbral (threshold) es una tarea subjetiva que depende del sistema en estudio, sin que exista, a juicio del autor de este trabajo, ningún método objetivo de eficacia probada. Existen varios trabajos en el que la selección del punto de corte ha sido realizada subjetivamente por los autores y ha

resultado eficaz a la hora de obtener, principalmente, información estadística del tamaño y forma de los agregados de muestras farmacéuticas^{23,72}. De esta forma, y en función de las características de las muestras en estudio, puede llegar a relacionarse estos valores estadísticos con proporción o concentración de componentes.



OBJETIVOS

En la introducción se ha presentado una técnica analítica aparentemente asentada, con un gran número de trabajos publicados que hablan de su diversa aplicación en el mundo farmacéutico. Sin embargo las técnicas NIR-imagen siguen en continuo desarrollo, tanto en cuestiones instrumentales, como en conocimiento práctico de sus aplicaciones, ventajas, y limitaciones.

El hecho de que las medidas en NIR-CI se realicen en modo reflectancia difusa hace que los fenómenos que ocurren alrededor de la medida sean difíciles de controlar, de la misma forma que en espectroscopia clásica. La dispersión de la radiación aparece como un fenómeno que domina la medida frente a la absorción. La penetración de la radiación, relativamente alta, es otro fenómeno que hace especial este tipo de medidas.

Existe, por tanto, una necesidad de conocer el comportamiento de estas técnicas en función de la muestra, determinando cómo pueden afectar ciertos parámetros físicos o químicos (inherentes a la muestra) al conjunto de datos que se obtiene en imagen química, donde se introducen por primera vez las coordenadas espaciales en una medida NIR.

En este sentido, el grupo de quimiometría aplicada del departamento de química analítica de la UAB, en el marco de los proyectos: CTQ2004-02013, "Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos a las nuevas tecnologías de análisis de proceso" y CTQ2007-62528, "Desarrollo de un sistema de imagen NIR hiperespectral y aplicación de métodos quimiométricos multidimensionales, ha acometido el diseño y la construcción de un prototipo de cámara NIR hiperespectral.

Uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido la puesta en marcha y el desarrollo de métodos adecuados para la evaluación del prototipo. En este sentido, uno de los objetivos fundamentales en el inicio de este proyecto fue conocer mejor cómo afectan las características de la muestra a los espectros obtenidos. Para ello se

consideró necesario profundizar previamente en el conocimiento de cómo afectan las características físicas de la muestra al espectro NIR convencional, tanto en su aspecto experimental como en el de su desarrollo teórico.

El **primer objetivo** de ampliar conocimiento sobre el efecto de la naturaleza física de la muestra se ha concretado en:

- Estudio del efecto del tamaño de partícula de una muestra molturada en el espectro NIR convencional. Para ello se ha estudiado una muestra muy poco absorbente (NaCl), en la que sólo absorbe la humedad presente, y donde deben predominar los efectos de dispersión física de la radiación. Se ha comparado con el estudio de una muestra en cuyo espectro se detectan bandas de absorción baja, media y alta (hidrógenoftalato de potasio, KHP) en la que tanto los fenómenos de dispersión física como de absorción de la radiación han de ser importantes.
- Estudio de la cantidad de muestra que contribuye a la señal registrada.
- Aplicación de la teoría de la capa representativa, recientemente publicada, para modelar los fenómenos anteriormente descritos y poder predecir el comportamiento de una medida NIR registrada en modo reflectancia difusa.

El **segundo objetivo** de caracterización de un prototipo de cámara hiperespectral se ha concretado en:

- El desarrollo de protocolos de trabajo que permiten la estimación experimental de la resolución química, utilizando para ello tanto muestras cristalinas, como partículas, bloques o láminas poliméricas, lo que ha posibilitado el estudio del efecto de la dispersión física de la radiación sobre dicha resolución.
- Comparación de los resultados obtenidos con el prototipo TS con un sistema comercial de calidad contrastada (Malvern S.L.)

- Detección de los aspectos instrumentales clave, con el objetivo de seguir mejorando las prestaciones del prototipo TS.

El **tercer objetivo** planteado ha sido el de mejorar y ampliar los sistemas de tratamiento de las imágenes registradas, facilitando la interpretación de los resultados. Aunque el objetivo es aplicable a cualquier campo, este estudio se ha enfocado a la aplicación de sistemas NIR-CI en el análisis farmacéutico. Se han desarrollado en el entorno MATLAB dos herramientas informáticas que se han aplicado a distintos ejemplos, utilizando tanto imágenes obtenidas con el prototipo TS, como utilizando sistemas de mapeo por puntos:

- La primera de esas herramientas tiene como objetivo la obtención de mapas de distribución de componentes y facilitar la interpretación de los histogramas de los coeficientes de correlación.
- En la segunda aplicación se ha hecho una extensión al análisis de imagen de las teorías clásicas de mezcla de sólidos, a través del uso de las denominadas curvas de uniformidad se consigue expresar la uniformidad de una imagen en función de dos factores numéricos: intensidad y escala de segregación.

3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales.....	28
3.2 Instrumentación	29
3.3 Métodos	32
3.4 Programas para el tratamiento quimiométrico de datos	34

3.1 MATERIALES

A lo largo de este trabajo experimental se han utilizado diferentes sustancias relacionadas con el mundo farmacéutico, ya sea directamente o porque el producto presenta características similares. A continuación, se muestra una lista detallada de todos los productos utilizados.

- Hidrógenoftalato de potasio ($C_8H_5KO_4$) de la marca Fluka y calidad Assay (>99.5%). El hidrógenoftalato de potasio absorbe en el infrarrojo próximo. A lo largo de esta memoria se utilizará el acrónimo KHP (Potassium hydrogen phtalathe) para referir esta sustancia.
- Cloruro de sodio (NaCl) de la marca Panreac y calidad p.a. El NaCl no absorbe en infrarrojo próximo.
- Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) de la marca Panreac y calidad p.a. La sacarosa absorbe en el infrarrojo próximo.
- Ibuprofeno ($C_{13}H_{18}O_2$) puro, cedido por laboratorios Menarini S.A.
- Celulosa Microcristalina (mcc) pura, cedida por laboratorios Menarini S.A.
- Comprimidos comerciales de ibuprofeno Sainsbury's S.A (200 mg). Adquiridos en una farmacia.
- Polímero de la familia de los vinilos. Goma de borrar (Milán[®]). Sólido compacto en una sola pieza. Medidas, $50*25*20\text{ mm}^3$
- Copoliéster extruido marca comercial Vivak. 40 láminas de 0.5 mm de grosor y superficie $50*25\text{ mm}^2$
- Acetato de vinilo. 200 láminas de 0.1 mm de grosor y superficie $50*25\text{ mm}^2$

3.2 INSTRUMENTACIÓN

Para la adquisición de los espectros e imágenes NIR se han utilizado diversos instrumentos. A continuación se exponen las características principales de cada uno de ellos.

3.2.1 Espectroscopia NIR clásica

Espectrofotómetro de infrarrojo próximo FOSS NIRSystem 6500, conectado a un módulo Rapid-Content™ Analyser (RCA). La muestra se coloca en una cubeta de vidrio o cuarzo y se registra el espectro por la parte de abajo, de forma que la radiación atraviesa el fondo de la cubeta. El registro espectral se realiza en un tiempo aproximado de 1 minuto, siendo cada espectro el promedio de 32 scans, registrado en el intervalo 1100-2500nm con una resolución de 2 nm.

En la figura 9 se puede observar la batería de detectores que se encuentran en el modulo RCA; encima de estos detectores se encuentra una ventana sobre el que se coloca la muestra en una cubeta para realizar la medida. Una vez depositada la cubeta, se puede ajustar el iris. Los espectros se registran en modo reflectancia y se han utilizado cubetas de vidrio y cubetas de cuarzo.

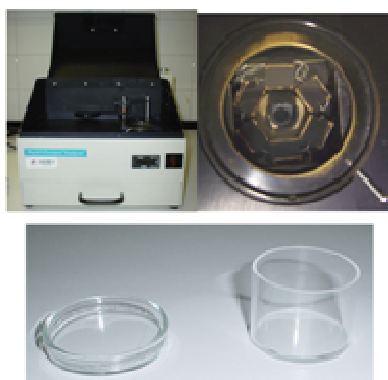


Figura 9. Espectrómetro NIR FOSS 6500, módulo RCA, a la derecha detectores del RCA, abajo cubetas empleadas para medir en este módulo.

3.2.2 Sistema de mapeo por puntos (mapping single point)

Sistema de imagen formado por un microscopio y un sistema mecánico de desplazamiento, acoplado a un espectrómetro Perkin-Elmer NIR-FT, disponible en el departamento de quimiometría de la Escuela de Farmacia de Londres, ligada a la universidad de Londres (LU) . Intervalo de números de onda entre $7500-4000\text{ cm}^{-1}$, con una resolución espectral de 2nm . El tamaño de píxel utilizado fue $70\text{ }\mu\text{m}$ (lado de píxel cuadrado) realizando un compromiso entre el tiempo de adquisición y la superficie requerida de imagen. No obstante, para obtener una imagen de $4.2 * 4.2\text{ mm}^2$ se necesita un tiempo de adquisición de aproximadamente 16 horas.



Figura 10. Sistema de adquisición de imagen NIR de mapeo por puntos.

3.2.3 Sistema focal por planos

3.2.3.1 Malvern SyNIRgi. Servicio de análisis de la Universidad de Córdoba

El equipo Malvern SyNIRgi fue el primer equipo en comercializarse y el más extendido en la actualidad. Este dispositivo consta de una cámara CCD con un sensor de InGaAs que permite obtener espectros NIR entre $1000-1700\text{ nm}$, con una resolución espectral de hasta 10 nm . Existen varias posibilidades a la hora de seleccionar la óptica. En

nuestro caso, la resolución de trabajo fue de 320*256 píxeles con un tamaño de píxel aproximado de 100 μm . En la figura 11 (izquierda) se muestra una fotografía del equipo utilizado en el que se indican las partes que componen el dispositivo de adquisición de imagen química.

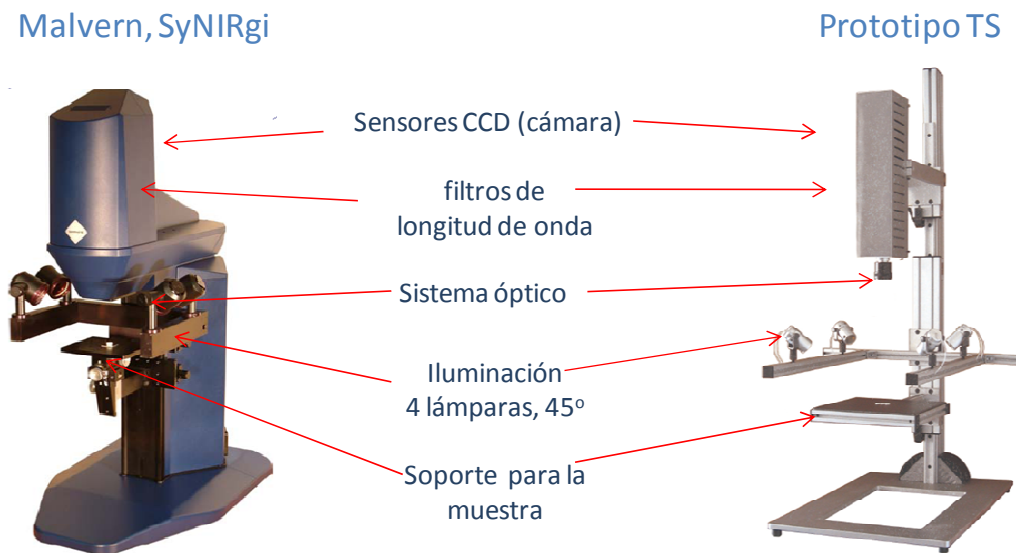


Figura 11. Sistemas de plano focal o imagen global. A la izquierda dispositivo comercial de la compañía Malvern SyNIRgi. a la derecha prototipo desarrollado por la empresa Think Spectrally y el grupo de quimiometría aplicada de la UAB.

3.2.3.2 Prototipo (Think Spectrally & UAB)

En la figura 11 (derecha) se muestra en prototipo para la adquisición de imágenes químicas elaborado por la empresa Think Spectrally (Valencia, España) en colaboración con el grupo de quimiometría de la Universidad Autónoma de Barcelona. Como vemos el equipo consta de las mismas partes que el Malvern SyNIRgi, siguiendo un diseño y un funcionamiento similar. La cámara CCD está equipada con sensores de HgCdTe que permiten obtener el espectro NIR comprendido entre los 1200 y los 2500 nm, con una resolución espectral de 7 nm.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Calibración instrumental. Material de referencia

3.3.1.1 Espectroscopia NIR

Cada vez que se utilizó el instrumento FOSS 6500, es decir, en espectroscopia NIR clásica, se empleó una referencia estándar spectralon®, de 80% de reflectancia, para obtener los espectros NIR en absorbancia relativa o aparente, $A' = -\log (R/R_{referencia})$.

3.3.1.2 Imagen NIR

Instrumento Malvern SyNIRgi: Cada vez que se utilizó el instrumento comercial de Malvern se calibró los espectros obtenidos para obtener valores de reflectancia relativa, utilizando un mosaico de cerámica no estándar, pero de reflectancia conocida, cercana al 80 %, y los valores de reflectancia para una imagen tomada con el objetivo cubierto (R_{dark}), según la ecuación 10.

$$R = \frac{(R_{muestra} - R_{dark})}{(R_{referencia} - R_{dark})} \quad (10)$$

Prototipo TS: Las imágenes obtenidas con el prototipo TS fueron calibradas según regresión lineal múltiple, siguiendo un modelo cuadrático, empleando para ello diferentes platos estándar de spectralon®, de 2%, 20%, 40%, 80% y 99% de reflectancia. Este tipo de calibrado se implantó en el prototipo TS, ya que es el tipo de calibración más apropiada para imagen NIR hiperespectral, siguiendo el modelo propuesto por Geladi *et al*⁷³.

3.3.2 Tamizado

El método de referencia para obtener las fracciones de tamaño del NaCl, KHP y sacarosa fue el tamizado. Dado que fue el único método de referencia empleado y que las muestras fueron utilizadas durante todo el trabajo, se acometió un tamizado especialmente meticuloso.

Las muestras se han tamizado con unos tamices CISA, usando una tamizadora CISA RP15 de la empresa CISA CEDACERIA INDUSTRIAL S.L. En la tabla 1 se describen los tamices empleados, la medida de la fracción que se obtiene si queda en aquel tamiz y la media esperada para el producto retenido en cada tamiz o marca de clase.

Tabla 1. Tamices empleados

Luz tamiz (μm)	Intervalo tamaños (μm)	Marca de clase (μm)
plato	0-50	<50 ó 25
50	50-75	63
75	75-100	88
100	100-125	113
125	125-150	138
150	150-175	163
175	175-200	188
200	200-250	225
250	250-300	275
300	300-400	350
400	400-500	450
500	500-1000	750
1000	>1000	>1000

El tamizado se realizó en series de 4 platos cada una. Se tamizaron aproximadamente 25 g durante 90 minutos. Se sigue el mismo procedimiento para todas las muestras. Posteriormente, y con objeto de mejorar la eficacia de tamizado, se realizó un tamizado con sólo un plato para cada uno de los tamaños durante un tiempo de 30 minutos.

3.4 PROGRAMAS PARA EL TRATAMIENTO QUIMIOMÉTRICO DE DATOS

El tratamiento de los espectros NIR y los datos de referencia se ha realizado mediante los siguientes programas informáticos:

- Vision v2.20 – 2.51 (Foss, Silver Spring, USA). Programa que permite el control del instrumento NIR y el diseño de rutinas de análisis. Ha sido utilizado para el registro de espectros NIR.
- The Unscrambler v7.0 - 9.1 (Camo Process, Trondheim, Norway). Específico para el tratamiento de datos multivariantes, incorpora los algoritmos de pretratamiento de datos y de calibración multivariable más habituales. Se ha utilizado para la aplicación de pretratamientos espectrales (SNV, MSC y derivadas Savitzky-Golay, entre otros)
- Matlab v6.5 - 7.0 (The Mathworks, MA, USA). Programa base para el desarrollo de códigos o *scripts* que permiten el tratamiento de datos. En nuestro caso, ha sido utilizado para el desarrollar códigos para el tratamiento de imagen y para la implementación de códigos y/o *software* que utilizan Matlab como base.
- PLS Toolbox v3.5 (Eigenvector Research, WA, USA). Conjunto de códigos implementados en entorno Matlab para el tratamiento de datos multivariable.

4

REFLECTANCIA DIFUSA Y FENÓMENOS DE DISPERSIÓN

4.1	Introducción	36
4.2	Objetivos.....	43
4.3	Metodología de trabajo.....	44
4.4	Resultados	44

4.1 INTRODUCCIÓN

Las medidas NIR de reflectancia difusa presentan unas características especiales. En muchos casos, la disminución de la señal que llega al detector (que es lo que realmente se está midiendo en reflectancia difusa) es debida, en su mayor parte, a características físicas de la muestra, en lugar de a su composición química. En otras palabras, en muchas ocasiones el proceso está dominado por la dispersión de la radiación y no por la absorción. Si hacemos un balance alrededor del proceso de medida vemos como, la radiación penetra en la muestra, se dispersa en todas las direcciones y vuelve a salir de la muestra con información química, tras sufrir repetidos procesos de absorción, reflexión y dispersión.

Naturalmente, los fenómenos de dispersión vendrán controlados principalmente por las características de la muestra. La mayoría de muestras que se encuentran en la industria farmacéutica son un medio altamente dispersivo, muestras en polvo, compactadas o no, con tamaños de partícula relativamente pequeños.

El conocimiento teórico de los fenómenos que ocurren durante una medida en reflectancia difusa continúa siendo limitado. En esta introducción se pretende hacer una revisión de los modelos teóricos propuestos para el tratamiento de la información obtenida para las medidas realizadas en reflectancia difusa en la zona correspondiente al infrarrojo cercano.

4.1.1 Teorías de Reflectancia Difusa

Las distintas teorías desarrolladas pueden ser clasificadas como continuas o discontinuas. Las primeras consideran el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión como una propiedad de la muestra analizada como un todo, es decir considera la muestra analizada continua. Las teorías discontinuas consideran que la

muestra está compuesta por una serie de capas que tienen un espesor igual al de las partículas que dispersan y absorben la radiación. Las constantes de absorción y dispersión están relacionadas con las de las partículas individuales. Las primeras referencias a una teoría discontinua fueron dadas por Kortüm⁷⁴, que junto con Wendlandt and Hecht⁷⁵ presentaron las primeras soluciones estadísticas para la ecuación de transferencia de energía, considerando muestras discontinuas. En 1999, D. Dahm enuncia la teoría de la capa representativa⁷⁶.

4.1.1.1 Teorías continuas

Estas teorías están basadas en la ecuación general de transferencia de radiación. Distintos autores han derivado dicha expresión, realizando distintas simplificaciones o suposiciones. Todas estas aproximaciones tienen en común la definición de dos coeficientes que explican la atenuación de señal en este tipo de medidas. Uno de ellos es el denominado coeficiente de absorción, que depende fundamentalmente de la longitud de onda y del poder de absorción de la muestra, aunque como veremos más adelante depende también de otros factores. El otro es el coeficiente de dispersión o de *scattering* que depende fundamentalmente del índice de refracción de la muestra, del número de superficies reflectoras, y también del poder de absorción de la muestra.

Schuster

A principios del siglo XX Schuster hizo el primer intento por encontrar una solución simplificada a la ecuación general de transferencia de energía. Para ello asume dos flujos de radiación opuestos, I y J, uno en la misma dirección del haz de radiación, y otro justo en la opuesta, y siempre perpendiculares a la superficie en estudio. Considera que la dispersión de la radiación es isotrópica.

Schuster derivó esta expresión para espesor infinito, espesor para el cual las medidas realizadas se estabilizan (se puede suponer $I_T=0$), obteniendo la siguiente expresión.

$$\frac{(1-R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} = \frac{k}{s} = \frac{2\alpha}{\sigma} \quad (11)$$

$$k = \frac{2\alpha}{\alpha + \sigma}; \quad s = \frac{\sigma}{\alpha + \sigma} \quad (12,13)$$

Donde σ y α son los coeficientes de dispersión y de absorción del material, obtenidos en transmisión, y s y k los coeficientes para medidas en reflectancia difusa, referidos a una partícula individual⁷⁷.

Kubelka y Munk

Esta es la expresión más aceptada y utilizada. Para obtenerla, Kubelka y Munk⁷⁸ realizaron numerosas simplificaciones de la ecuación de transferencia de energía:

- El flujo de radiación viaja en dos direcciones opuestas (I, J)
- La radiación que ilumina la muestra es radiación monocromática de intensidad I_0 .
- La radiación dispersada se distribuye isotrópicamente de forma que se ignora la reflexión especular.
- Las partículas de la muestra se encuentran distribuidas aleatoriamente.
- Las partículas son mucho más pequeñas que el espesor en estudio.
- La muestra está expuesta, únicamente, a radiación difusa.
- Las partículas son mayores que la longitud de onda irradiada (esto hace el coeficiente de dispersión independiente de la longitud de onda)
- La superficie en estudio será grande en comparación con la profundidad de la muestra y el diámetro del haz incidente (minimizar efecto puente)
- Las partículas dispersoras se distribuyen homogéneamente por la muestra.

La expresión obtenida por Kubelka y Munk (ecuación 14), similar a la obtenida por Schuster, presenta la diferencia fundamental de la definición de los coeficientes.

$$\frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} = \frac{K}{S} \quad (14)$$

Si bien Schuster los definía para una partícula individual, Kubelka y Munk los definen para la muestra completa. El coeficiente de absorción, K, para una muestra formada por partículas es distinto del poder de absorción del material que compone la muestra por varias razones, entre las que se encuentran:

- Huecos: Una muestra dispersiva es normal que contenga huecos, con el consiguiente descenso en la absorción para un espesor dado de muestra.
- Reflexión en la superficie: Cada partícula refleja una cantidad de energía que incide en ella. Esta energía no sufre absorción.
- Distancia recorrida: El coeficiente lineal de absorción depende de la distancia real que la radiación viaje a través de la muestra (por unidades de espesor de muestra). Esta distancia es diferente para una muestra formada por partículas ordenadas al azar que para la recorrida a través de una muestra homogénea. La radiación dispersada es difusa y se mueve a través de la muestra en todas las direcciones. En todas estas direcciones puede sufrir otros procesos de absorción o reflexión. Por tanto cada haz de radiación dispersado y reflejado llegará al detector habiendo recorrido caminos distintos. Esta distancia dependerá del número y del tamaño de cada partícula que el haz se haya encontrado a su paso.

4.1.1.2 Teorías discontinuas. Teoría de la capa representativa

Las matemáticas de las teorías presentadas anteriormente implican la suposición de que las muestras son homogéneas y que las partículas son de tamaño infinitesimal, de forma que no haya una pérdida importante de energía causada por una partícula individual, ya sea por absorción o por dispersión. En numerosos sistemas reales, las partículas de forma individual absorben o dispersan la radiación de una forma significativa. En este caso, las teorías planteadas en el apartado anterior son meras aproximaciones. Las teorías discontinuas son, por tanto, las que tienen en cuenta los fenómenos de absorción y dispersión que ocurren en superficies individuales, ya sean partículas, capas paralelas, etc.; Dahm y Dahm⁷⁹ han desarrollado una teoría, denominada, *la teoría de la capa representativa*, a partir del trabajo previo de Benford⁸⁰.

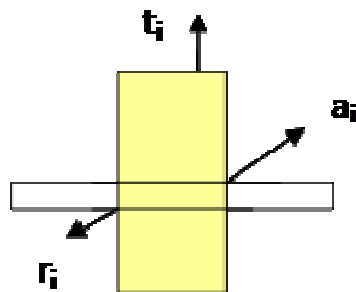


Figura 12. Esquema de una capa representativa.

Éste asume que cada capa de material está formada por dos planos paralelos infinitos. De la radiación que penetra en esta capa, el flujo total que va hacia delante se denomina t_i , la fracción total que retrocede se denomina r_i , y la fracción absorbida a_i . En t_i se ha incluido, por tanto, la radiación transmitida y la dispersión que se produce hacia delante (forward scatter). En r_i se incluye las reflexiones tanto internas como externa y la dispersión que se produce hacia detrás (back scatter). Las ecuaciones de Benford permiten calcular estos términos en función de una capa individual. De esta forma, las propiedades de un material compuesto por dos capas descritas por las

ecuaciones 15, que simplificadas para capas idénticas se transforman en las ecuaciones 16.

$$t_{i+j} = \frac{t_i t_j}{(1-r_i r_j)} \quad r_{i+j} = r_i + \frac{t_i^2 r_j}{(1-r_i r_j)} \quad (15)$$

$$t_{i+1} = \frac{t_i t_1}{(1-r_i r_1)} \quad r_{i+1} = r_i + \frac{t_i^2 r_1}{(1-r_i r_1)} \quad (16)$$

La expresión general de la teoría de la capa representativa se enuncia a continuación.

$$A(R, T) = \frac{(1-R)^2 - T^2}{R} = (1 + T - R) \frac{A}{R} = (2 - A - 2R) \frac{A}{R} \quad (17)$$

Donde A, R y T son, respectivamente, las fracciones absorbida, remitida y transmitida para cualquier espesor de muestra. A(R,T) es la forma elegida por Dahm para representar la función que permanece constante para cualquier número de capas y que es base de su *teoría de la capa representativa*.

Dahm y Dahm obtienen la expresión mostrada en la ecuación 18 para un número infinito de capas, donde cada una de ellas presenta las propiedades t_i , r_i y a_i , antes mencionadas.

$$A(R,0) = \frac{(1-R_\infty)^2}{R_\infty} = \frac{a_i}{2r_i} (2 - a_i - 2r_i) \quad (18)$$

En resumen, existen numerosos obstáculos para la determinación directa de las propiedades fundamentales desde datos de reflectancia difusa. Sin embargo, es relativamente sencillo ajustar los datos experimentales a un determinado conjunto de propiedades particulares. Hacer esto requiere el uso de teorías discontinuas ya que las muestras reales son discontinuas.

La aplicación de teoría de la capa representativa necesita:

- Un modelo para asignar las propiedades de absorción y dispersión a una partícula individual. De entre ellas, la más utilizada es la teoría de Stokes para dispersión de la radiación por capas paralelas⁷⁶.
- Una serie de suposiciones y asociaciones matemáticas para determinar las propiedades de absorción y remisión de una capa compuesta por esas partículas. Uno de los requisitos que debe cumplir es que la capa tenga el espesor de una partícula.
- Una teoría para trasladar las propiedades de una capa a una muestras compuesta con de cualquier número de capas. Como las ecuaciones de Bendford modificadas por Dahm.

La teoría de la capa representativa ha creado grandes expectativas y se espera que sea de utilidad en el tratamiento de partículas de tamaño finito.

4.1.1.3 Ley de Lamber-Beer modificada. Relación empírica

En la práctica, es habitual que la reflectancia difusa se mida respecto a un estándar no absorbente y, a continuación, se calcule el logaritmo para llegar a una relación lineal con la concentración:

$$A' = \log \frac{R_{std}}{R} = \log R + \log R_{std} \propto kcb \quad (19)$$

$$A' = \log \frac{R_{std}}{R} = \log R + \log R_{std} \propto kcb_{efectivo} \quad (20)$$

Donde R y R_{stand} representan la reflectancia de la muestra y del estándar, respectivamente.

Con lo que, como en el caso de la ley de Beer, existe una relación entre la concentración y la radiación medida en el espectro. Ni el coeficiente de absorción, k , (distinto al obtenido por medidas en transmisión) ni el coeficiente de dispersión, s , son constantes; dependen de varias propiedades de la muestra, como el tamaño de partícula. Esta expresión tiene, por tanto, importantes limitaciones, aunque es fácil de utilizar y aplicar por analogía a la ley de Lambert-Beer.

En orden de simplificar aún más esta expresión, se puede definir también el término camino óptico efectivo, con lo que la absorbancia se obtiene a partir de la ecuación 20. El término camino óptico efectivo, viene a sustituir, de alguna manera, la presencia del coeficiente de dispersión. Aunque no queda claro que las ecuaciones y los coeficientes definidos en cada ecuación sean los mismos, es habitual el uso de ambas para definir la proporcionalidad entre la concentración y la absorbancia relativa. Parece claro que esta linealidad, existente en la práctica sólo en determinadas condiciones, es lo realmente importante para la aplicación la técnica.

4.2 OBJETIVOS

El trabajo expuesto en este capítulo tiene como objetivo principal conocer en profundidad la dependencia entre un espectro NIR de reflectancia difusa y el tamaño de partícula de la muestra. También se desea establecer los intervalos de linealidad en los que el tamaño de partícula puede ser predicho mediante esta técnica y conocer la relación de este efecto con la absorción de la muestra. Para ello se ha realizado una revisión de las distintas teorías propuestas y se ha aplicado la teoría más reciente, la teoría de la capa representativa, enunciada por Dahm en 1999, que prácticamente no había sido aplicada a muestras reales.

4.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO

Para llevar a cabo este experimento se obtuvo las distintas fracciones de tamaño de dos sustancias cristalinas, NaCl e Hidrógenoftalato de potasio, a través de un tamizado, obteniendo el rango de tamaños de partícula indicados en el apartado de métodos (apartado 3.4). Los espectros se registraron con el instrumento de NIR convencional FOSS 6500, descrito en el apartado 3.2. Se realizó un total de 5 réplicas para cada tamaño, extrayendo la muestra entre cada réplica, para minimizar los posibles errores de distribución de las partículas en la muestra.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Efecto del tamaño de partícula

En la figura 13 se muestran los espectros en absorbancia de las diferentes fracciones de tamaño de partícula que se obtienen al tamizar el NaCl empleando como referencia una placa de spectralon y registrados para espesor infinito. De la misma forma, en la figura 14 se muestran los espectros para las distintas fracciones de KHP, que han sido registrados de forma idéntica al NaCl.

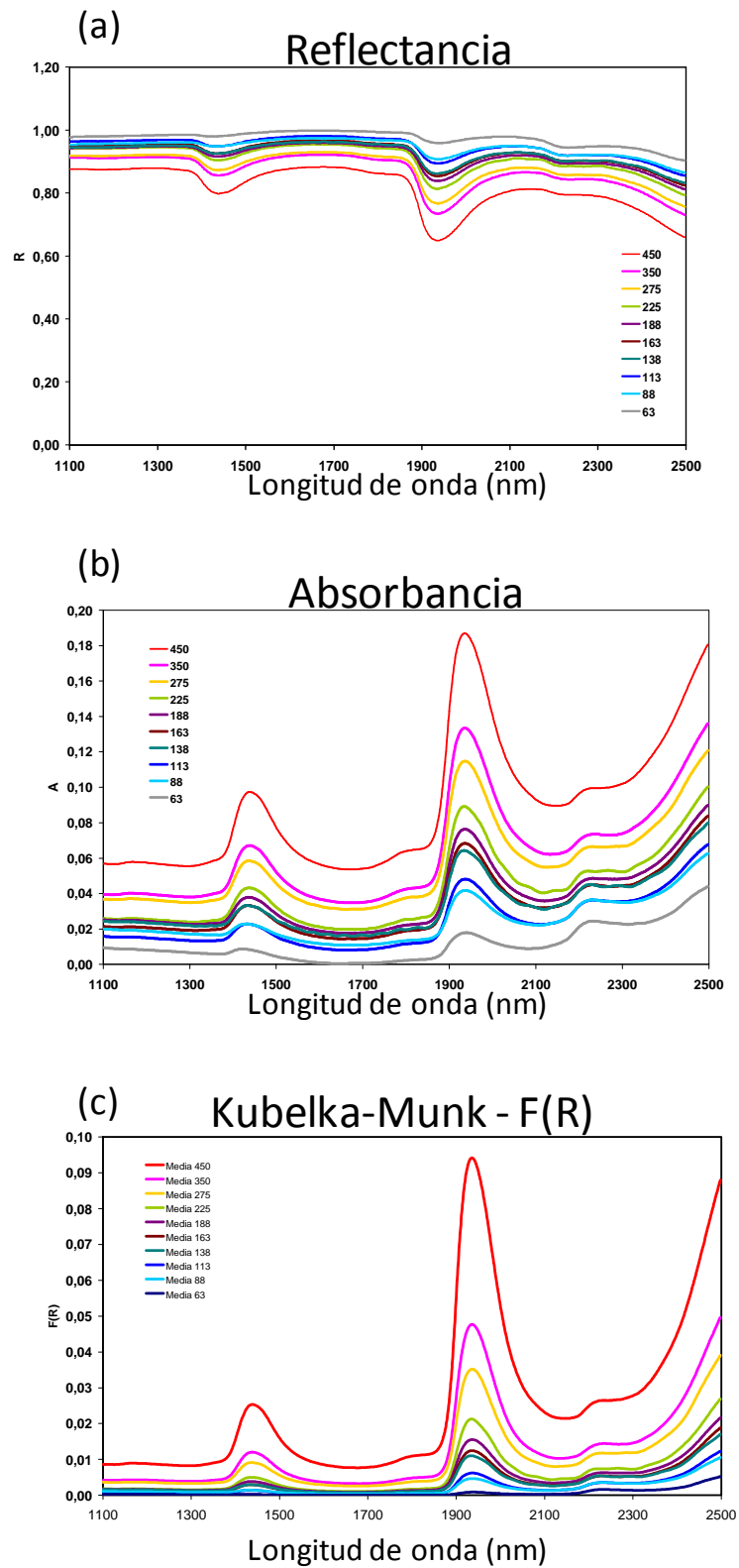


Figura 13. Espectros registrados para el agua retenida en el NaCl, representados en: a) Reflectancia, b) $\log(R/R_0)$, c) $F(R) = (1-R)^2/2R$

A lo largo de la introducción a este capítulo se ha discutido las distintas teorías y la ecuación empírica con la que se trabaja normalmente con datos obtenidos mediante reflectancia difusa. La instrumentación actual, más concretamente, el software con el que se administra este instrumental, suele representar las medidas obtenidas en absorbancia aparente (A'), que como se deduce de la ecuación empírica 19, se corresponde con el $-\log (R/R_0)$.

Todas las expresiones restantes, ya sean las derivadas de la ecuación general de transferencia de energía, como la obtenida a partir de la matemática discontinua representan los resultados en una expresión proporcional a la expresión $(1-R)^2/R$, siendo la más utilizada la expresión de Kubelka y Munk. Por tanto, estas dos transformaciones serán utilizadas a lo largo de todo este trabajo.

La utilización de una referencia conlleva que si el material analizado posteriormente refleja más que la propia referencia se obtiene una escala de absorbancia en las que aparecen valores negativos, lo que complica la aplicación de algunas transformaciones. Entre ellas el paso de $-\log R$ a función de Kubelka-Munk, $F(R)$. Por tanto, para hacer posible las transformaciones se han escalado los datos, sumando a todos los valores de reflectancia obtenidos el mínimo necesario para que todos los valores sean positivos.

De esta forma se puede observar el rango real de absorbancia (de reflectancia) con el que se está trabajando. Para el H_2O en NaCl (absorbente diluido), el valor total de absorbancia no supera los 0.2 con respecto al valor de reflectancia de la referencia. En el caso de KHP (con un poder de absorción mayor) se obtienen absorbancias relativas de hasta 1.3. Transformando estos valores en reflectancia, se observan valores de reflectancia muy altos (cercaos al 1) en el caso del NaCl y valores de reflectancia próximos a 0 en las zonas de máxima absorción del KHP. El máximo de reflectancia, escalado de esta forma, está referido a la referencia. Por lo tanto, para trabajar con valores absolutos de reflectancia, hay que multiplicar los valores obtenidos por un coeficiente que introduzca en los valores ambos efectos nombrados. En este caso se dispone de una referencia calibrada de $R_{ref} = 0.8$. Por tanto la reflectancia absoluta de la muestra es $R_{registrada} \cdot 0.8$.

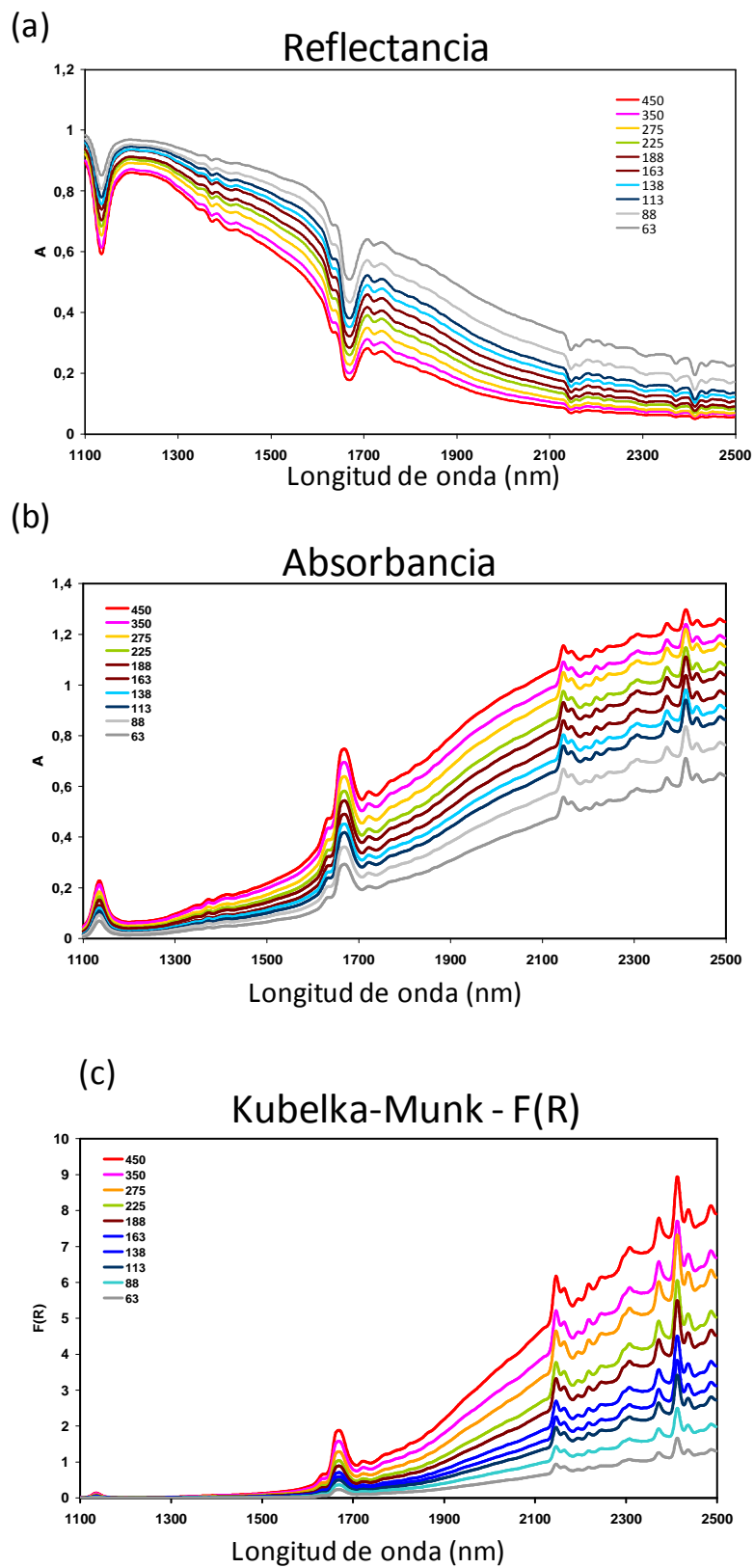


Figura 14. Espectros registrados para el KHP, representados en: a) $\log(R_{\text{ref}}/R_0)$, b) $F(R) = (1-R)^2/2R$, c) R

De un simple análisis visual de los espectros mostrados en las figuras 13 y 14 se puede obtener las primeras conclusiones. El tamaño de partícula produce, tanto en matrices absorbentes, como en no absorbentes, cambios muy significativos en los espectros registrados. A mayor tamaño de partícula menos radiación llega a los detectores, es decir, menor reflectancia. Esto se refleja en un aumento de absorbancia aparente o de función $F(R)$. Esta última representación parece, a simple vista, reducir las diferencias en línea base que aparecen entre distintos tamaños en las otras representaciones.

4.4.1.1 Influencia del tamaño de partícula en los máximos de absorción

En este apartado se estudia la variación de la absorbancia aparente y de la función de Kubelka y Munk, (ecuación 14) en las zonas de máxima absorción, es decir, para los picos más característicos. Cada pico, así como su máximo de absorbancia, se identifica con su longitud de onda correspondiente, de esta forma los cuatro picos se identifican como 1136, 1668, 2146, 2412 (nm) en el caso del KHP y 1440 y 1936 (nm) para el caso del H_2O . Se representa esta absorbancia aparente frente a los distintos tamaños medios de partícula.

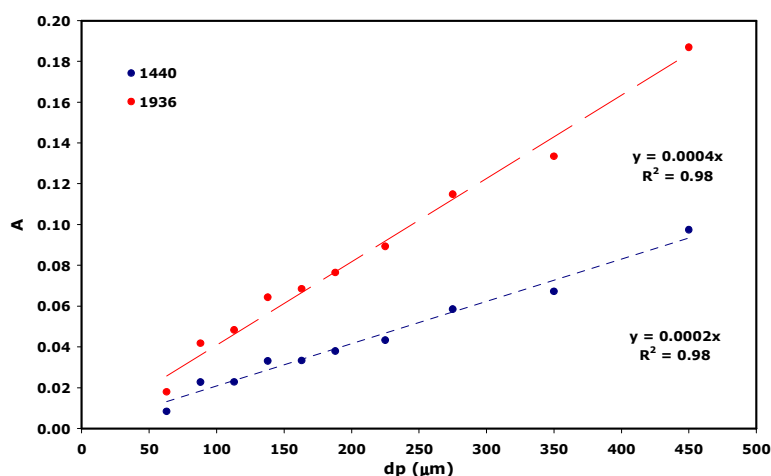


Figura 15. Absorbancia aparente para los máximos de absorción del H_2O para los distintos tamaños de partícula.

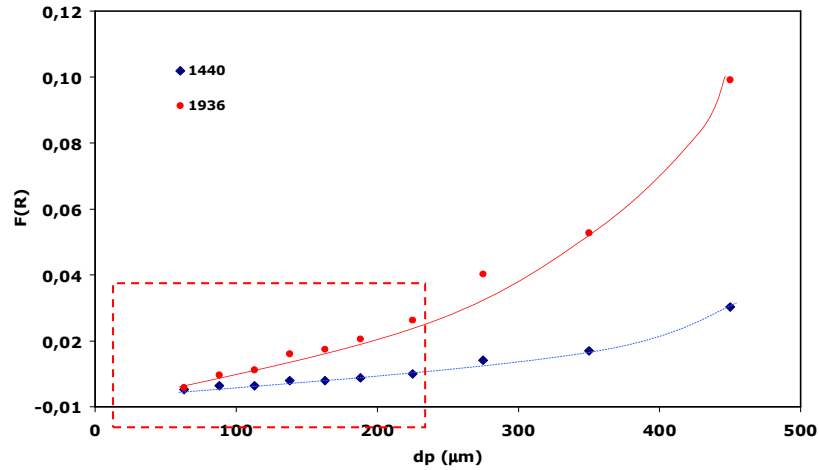


Figura 16. F(R) para los máximos de absorción del H₂O para los distintos tamaños de partícula.

En el caso del H₂O (absorbente muy diluido) al aumentar el tamaño de partícula, la absorbancia aumenta en estos picos de forma lineal, como se observa en la figura 15. La función de Kubelka y Munk presenta una zona lineal, aproximadamente hasta las 250 μm, y para los tamaños restantes valores mayores de los que corresponderían a esa recta (figura 16).

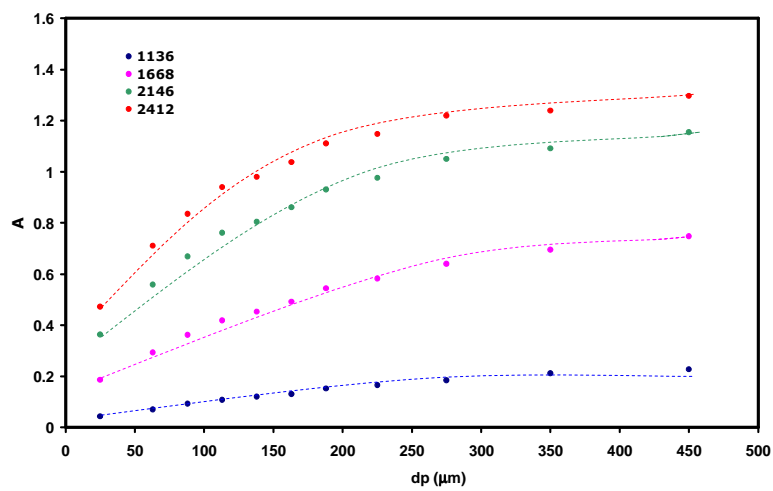


Figura 17. Absorbancia aparente para los máximos de absorción del KHP para los distintos tamaños de partícula.

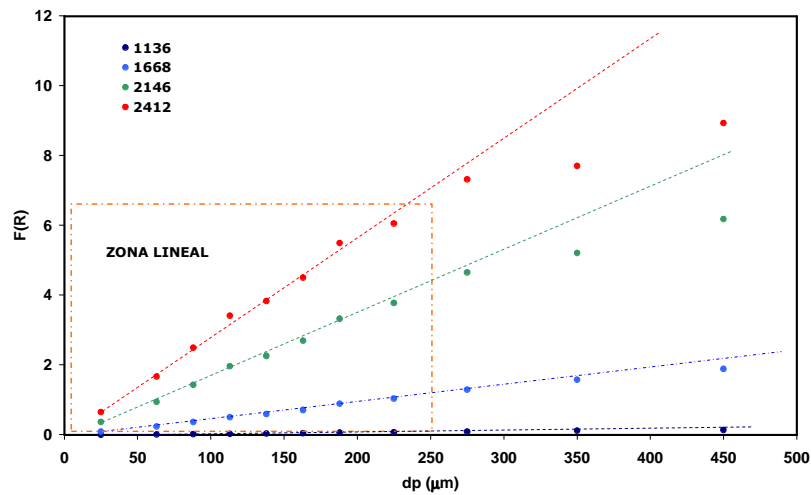


Figura 18. F(R) para los máximos de absorción del KHP para los distintos tamaños de partícula.

Para el caso del KHP la relación es no lineal, apreciándose una estabilización de la señal al aumentar el tamaño de partícula. Esto es apreciable tanto en la representación de los datos en absorbancia como en la representación de la función F(R), aunque en esta última existe una región de tamaños donde el comportamiento es prácticamente lineal, sobre todo para las longitudes de ondas más cortas. Para longitudes de onda mayores la pérdida de linealidad es apreciable (figura 18). En la figura 19 se muestra una visión ampliada del rango de tamaños donde el KHP muestra un comportamiento lineal para todas las longitudes de onda. De esta forma, por medio de la regresión lineal simple, se han obtenido rectas para estas relaciones por medio de un ajuste por mínimos cuadrados. En la figura 20 se muestra los valores correspondientes a la longitud de onda menor (1136nm), para la que el rango de linealidad puede ser ampliado hasta las 350 μm.

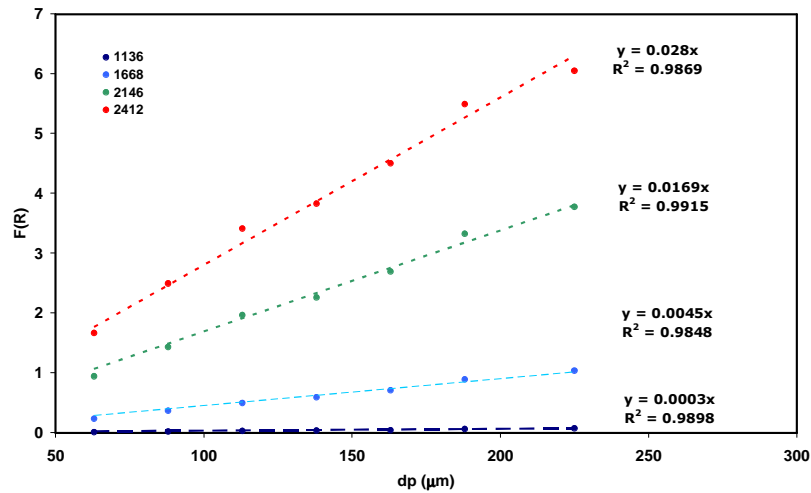


Figura 19. F(R) para los máximos de absorción del KHP. Zona de comportamiento lineal.

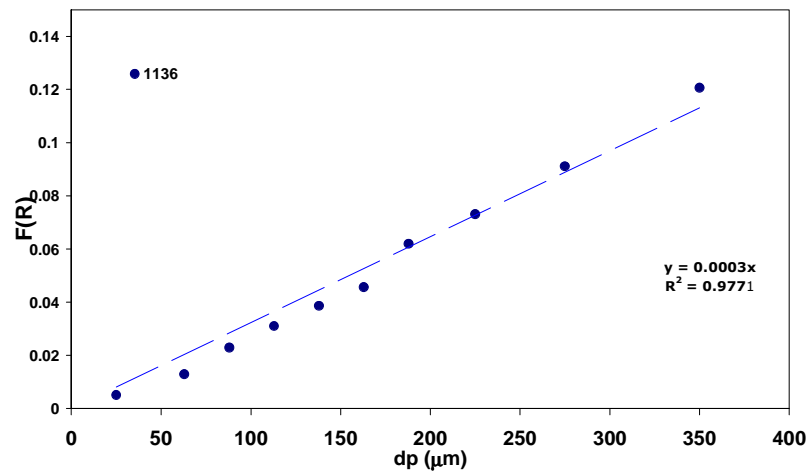


Figura 20. F(R) del KHP para $\lambda = 1136$ nm. Recta de regresión.

Para muestras diluidas, con un poder de absorción muy pequeño, caso del NaCl con H₂O absorbida, la absorbancia aparente (-log R), muestra una linealidad más que aceptable para el rango de tamaños estudiados. Las rectas de regresión obtenidas, con R² superiores al 0.98, son útiles para predecir el tamaño medio de partícula de una muestra de estas características. La representación de Kubelka y Munk, sin embargo, presenta desviaciones positivas para los tamaños mayores. Esta pérdida de señal será objeto de estudio más adelante.

El KHP presenta a lo largo de su espectro NIR distinta capacidad de absorción. El pico situado a 1136 nm presenta una absorción débil, aunque notablemente mayor que la

estudiada para el NaCl. El pico situado a 1668 nm presenta una absorción que denominaremos media, y los dos picos restantes que han sido estudiados, a 2146 nm y 2412 nm, una absorción que en este caso llamaremos alta y muy alta, con valores cercanos al valor mínimo de reflectancia que detecta el instrumento. Por tanto, su espectro ilustra de forma adecuada la influencia que tiene este factor en la relación estudiada, absorbancia frente a tamaño de partícula.

De esta forma, se observa cómo el $-\log R$ no parece una forma adecuada para representar esta relación para muestras con una absorción apreciable. Existe un rango de tamaños en los que la relación es lineal, aunque es sensiblemente menor al que muestra la representación de Kubelka y Munk, como se observa en las figura 17 y 18. Al aumentar la capacidad de absorción de la muestra la relación se hace menos lineal. Este efecto será estudiado también con posterioridad.

En todo caso, para valores moderados y altos de absorción, la función de Kubelka y Munk consigue una relación lineal con partículas que se encuentren entre las 50 μm y las 250 μm . Para valores de absorción débiles el rango de linealidad se extiende hasta las 450 μm . De esta forma las rectas obtenidas por regresión son expresiones útiles para predecir de forma sencilla el tamaño de partícula medio de una muestra formada por partículas de KHP del rango de tamaños estudiado.

Las expresiones obtenidas, tanto para el NaCl, como para el KHP, junto al rango de tamaños en las que son válidas se muestran en la Tabla 2

Tabla 2. Rectas de regresión para el NaCl y el KHP. dp indica el tamaño de partícula.

Muestra	Grado de absorción	Longitud de onda (nm)	Rango de tamaños (μm)	Expresión	Recta
NaCl	Muy débil	1440	50-450	-log R	-log R = 0.0002*dp
NaCl	Muy débil	1936	50-450	-log R	-log R = 0.0004*dp
KHP	Débil	1136	50-450	F(R)	F(R)=0.0003*dp
KHP	Medio	1668	50-250	F(R)	F(R)=0.045*dp
KHP	Alto	2146	50-250	F(R)	F(R)= 0.0169*dp
KHP	Muy Alto	2412	50-250	F(R)	F(R)=0.058*dp

4.4.1.2 Camino óptico efectivo

Normalmente, los datos recogidos en modo reflectancia difusa se tratan utilizando una ecuación empírica similar a la ley de Beer. Se puede definir el término *camino óptico efectivo*, el cual depende del tamaño de partícula, del tipo de muestra, de la compactación, etc. Esta definición está acorde con la ecuación empírica que se utiliza normalmente para la realización de la calibración multivariable (ecuación 20).

Tomando la relación de absorbancias relativas para los dos picos del H₂O, es decir A_{1440}/A_{1936} , se busca obtener información de la variabilidad de este *camino óptico efectivo* con la longitud de onda, para cada tamaño de partícula. Si el camino óptico fuese independiente de la longitud de onda la relación entre absorbancias sería una constante que correspondería con la relación de absorptividades molares, tal como muestra en la ecuación 21:

$$\frac{A_{1440}}{A_{1936}} = \frac{\varepsilon_{1440} b_{1440} c}{\varepsilon_{1936} b_{1936} c} = \frac{\varepsilon_{1440} b_{1440}}{\varepsilon_{1936} b_{1936}} \quad (21)$$

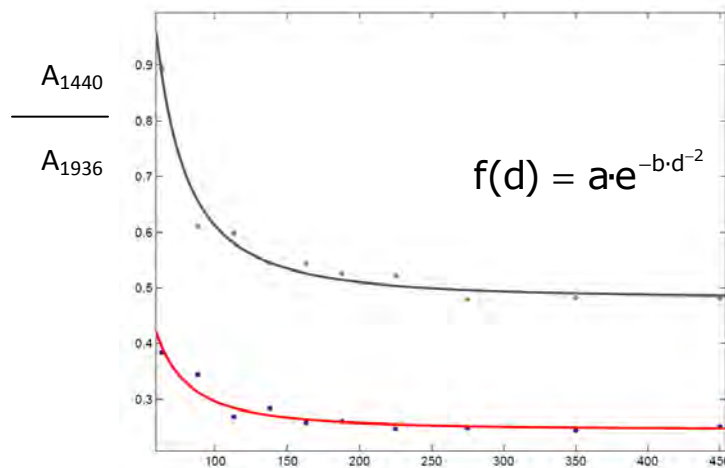


Figura 21. Relación de absorbancia corregida para los máximos de pico A_{1440}/A_{1936} , arriba, y relación de $F(R)_{1440}/F(R)_{1936}$, abajo, representadas frente al tamaño de partícula.

En la figura 21 se aprecia que el camino óptico efectivo para cada longitud de onda se hace constante para tamaños de partícula grandes, mientras que para tamaños de partícula pequeños la relación de caminos ópticos crece. Este resultado muestra que el camino óptico así definido depende de la longitud de onda para tamaños de partícula inferiores a 200 μm , hablando siempre en valores aproximados.

Los datos bibliográficos existentes para el H_2O indican una relación de absorptividades, $\frac{\epsilon_{1440}}{\epsilon_{1936}} = \frac{26}{114} = 0.228^{81}$. El valor que se obtiene de la relación de $F(R)$ cuando se estabiliza el

efecto del tamaño de partícula es 0.2667, similar a este valor. La relación de absorbancia aparente se estabiliza al doble de este valor.

4.4.2 Aplicación de la teoría de la capa representativa

4.4.2.1 Caracterización de la capa representativa

Para la aplicación de la teoría enunciada por Dahm, las propiedades de la muestra se refieren a una capa representativa cuyo espesor coincide con el diámetro de partícula. Estas propiedades se relacionan con las de capas sucesivas a través de las ecuaciones de Bendford. De esta forma, es posible estimar la reflectancia que llega al detector para cualquier espesor de muestra, siempre que sea múltiplo del espesor de muestra de la primera capa. Cuando la $T_n=0$ esta expresión se convierte en la ecuación de Kubelka y Munk para espesor infinito.

Para calcular estas propiedades, Dahm aplica la ecuación que Stokes obtiene para capas paralelas. Se basan en la ley de Bouger-Lambert, que dice que las pérdidas de transmisión debidas a la absorción que se producen al atravesar una capa que se sitúa entre dos planos paralelos pueden ser calculadas mediante la expresión $1-e^{-kd}$, donde k es el coeficiente de absorción del material que compone la capa, y d es el espesor de la misma. Stokes obtiene el conjunto de ecuaciones 22 derivando a partir de la suposición de múltiples reflexiones en el interior de la capa representativa. Todas ellas cumplen la ley de Bouger-Lambert y, por tanto, se atenúan con un factor $(1-e^{-kd})$. La r_0 se refiere a la reflexión que sigue las leyes de Fresnel, que se calcula a partir de los índices de refracción de la muestra y el medio según la ecuación 23.

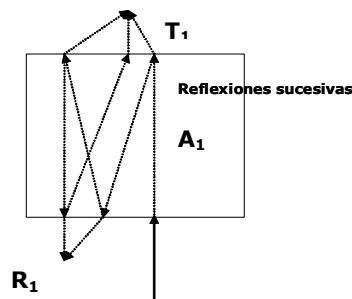


Figura 22. Múltiples reflexiones internas en el seno de una partícula. Stokes.

$$R_1 = r_0 + \frac{(1-r_0)^2 r_0 e^{(-2kd)}}{1-r_0^2 e^{(-2kd)}}$$

$$T_1 = \frac{(1-r_0)^2 e^{(-kd)}}{(1-r_0^2 e^{(-2kd)})} \quad (22)$$

$$A_1 = 1 - R_1 - T_1$$

$$r_0 = \frac{(n_0-n_1)^2}{(n_0+n_1)^2} \quad (23)$$

Una vez obtenidas las propiedades de la primera capa, aplicando las ecuaciones de Bendford para capas sucesivas (conjunto de ecuaciones 24), se obtiene la evolución de la absorción, remisión y transmisión a lo largo de capas idénticas. De esta forma, cuando la transmisión llega a estabilizarse alrededor de un valor límite previamente fijado, cercano al cero, se considera espesor infinito.

$$T_{n+1} = \frac{T_n T_1}{(1-R_n R_1)}$$

$$R_{n+1} = R_n + \frac{T_n^2 R_1}{(1-R_n R_1)} \quad (24)$$

$$A_{n+1} = 1 - T_{n+1} - R_{n+1}$$

Las propiedades de la primera capa, como se observa, pueden calcularse a partir de tres variables, los índices de refracción del medio (normalmente conocidos: aire y muestra), el diámetro de partícula (en nuestro caso conocido), y el coeficiente de absorción k , expresado en cm^{-1} . El índice de refracción es función de la longitud de onda. Esta variación en NIR es débil y, para el cálculo de las propiedades de la capa representativa, será considerado constante. El índice de refracción de un material absorbente es función de su coeficiente de absorción. Se define el índice de refracción complejo, expresado como un número complejo, $m = (n+ki)$, cuya parte real es el índice de refracción y k el coeficiente de extinción o absorción. La variación de este índice producirá cambios en la r_0 calculada y, por tanto, en las propiedades de la capa

representativa. Sin embargo, como una primera aproximación, se mantendrá constante, $n_{\text{NaCl}}=1.55$, $n_{\text{KHP}}=1.6$ ⁸².

Conociendo el resto de variables se puede estimar el valor de k , minimizando las diferencias existentes entre el valor obtenido experimentalmente para reflectancia a espesor infinito y el modelo teórico, para cada tamaño de partícula. Se representa la función $A(R, 0)$ (ecuación 20) para los distintos tamaños y se hacen coincidir en valores con la obtenida experimentalmente haciendo variar k . El valor de k obtenido se relaciona con el coeficiente de absorción (transmisión) que define Bouguer-Lambert en su teoría y es independiente del tamaño de partícula.

En la figura 23 se muestran los valores obtenidos por el modelo y los obtenidos experimentalmente para cada tamaño de partícula y cada longitud de onda característica. Los valores estimados de k para el KHP, siguiendo el procedimiento descrito, se muestran en la tabla 3.

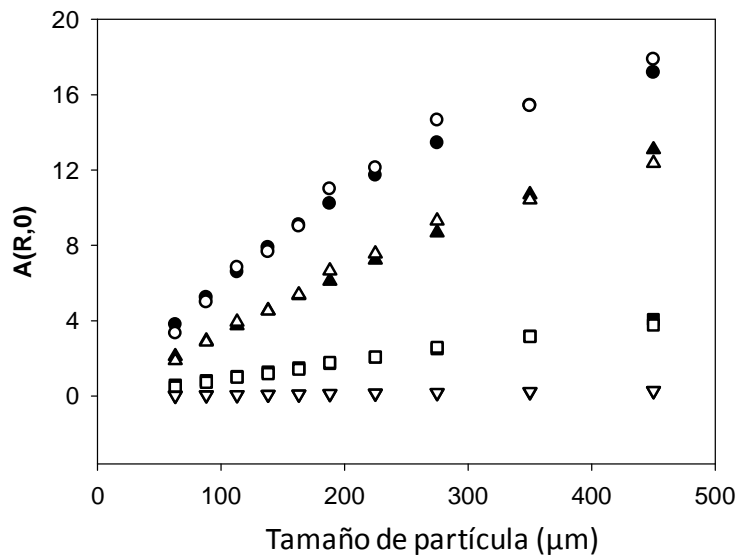


Figura 23. Valores experimentales (símbolos huecos) comparados con los valores obtenidos por medio de la teoría de la capa representativa (símbolos sólidos), para $\lambda=1136$, $\lambda=1668$, $\lambda=2146$, $\lambda=2412$.

Tabla 3. Coeficientes de absorción estimados para el KHP

Longitud de onda (nm)	$k(\text{cm}^{-1})$
1136	0.3
1668	4.5
2146	14
2412	30

Como se observa para los valores más altos de absorción (véase figura 23), esta teoría predice la estabilización de la señal que se observa experimentalmente al aumentar el tamaño de partícula de la muestra en presencia de una absorción alta, en contra del resto de teorías, tales como la ecuación de Kubelka y Munk, que no es capaz de predecirla⁸³. Esta estabilización, producida por la estabilización del camino óptico efectivo, se hace más patente en zonas de alta absorción, produciendo la curvatura descrita.

De la misma forma, se ha estimado los coeficientes para el NaCl con agua absorbida, haciendo coincidir los valores experimentales que corresponden con la zona de linealidad con el modelo teórico. La teoría de la capa representativa predice un comportamiento totalmente lineal para muestras con una absorción débil. No es capaz de predecir, por tanto, la curvatura detectada en los datos experimentales para muestras poco absorbentes. Por tanto, el ajuste se ha realizado utilizando la zona lineal de los datos obtenidos experimentalmente.

En la figura 24 se muestran los valores obtenidos por el modelo y los obtenidos experimentalmente para cada longitud de onda característica. Los valores estimados de k para el agua retenida en el NaCl, siguiendo el procedimiento descrito, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de absorción estimados para el agua retenida en el NaCl

Longitud de onda (nm)	$k(\text{cm}^{-1})$
1440	0.038
1936	0.16

La relación de coeficientes de absorción $k_{1440}/k_{1936}=0.235$, se aproxima a la relación teórica de coeficientes de absorción molar mostrada previamente en el apartado 4.2.3.

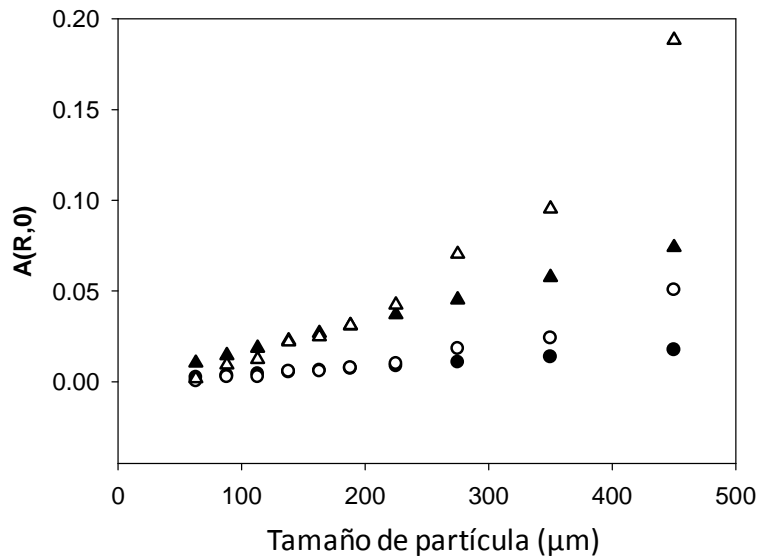


Figura 24. Valores experimentales (símbolos huecos) comparados con los valores obtenidos por medio de la teoría de la capa representativa (símbolos sólidos) para $\lambda=1936$ nm

4.4.2.2 Cálculo de los coeficientes de absorción y dispersión

A partir de las propiedades de la capa representativa se puede obtener los coeficientes de absorción y dispersión. Para ello se utilizará el procedimiento descrito en la introducción.

Para realizar estos cálculos es necesario conseguir datos a dos espesores de muestra inferiores al espesor infinito. Estos valores se pueden obtener, bien empíricamente, midiendo dos espesores de muestra, bien a través del modelo teórico, creado a partir

de la capa representativa y partiendo de medidas para espesor infinito. A lo largo de este apartado se realizará el cálculo mediante los dos procedimientos, con objeto de comparar los resultados.

Coefficientes obtenidos a partir de la capa representativa

A partir de las propiedades de la capa representativa, se puede obtener el valor de R para cualquier capa. Por tanto se calcula el valor de R_d y R_{2d} , para dos capas teóricas que tengan el doble de espesor.

Una vez calculados R_d y R_{2d} , se aplica las ecuaciones de Bendford para mitad de espesor ($R_{d/2}$) de forma iterativa, hasta que se obtiene un valor estable de R (r_0), y A (a_0), que coincidirá con un valor de T muy próximo a 1. Por cada iteración realizada se divide el espesor de la capa por 2. Por tanto, se conoce el diámetro de la capa infinitesimal ficticia que corresponde con los valores de a_0 , y r_0 , determinados. El valor de los coeficientes de absorción y dispersión de la muestra, según la definición aportada por Dahm y Dahm en su teoría⁷⁸, corresponde con el valor de a_0 y r_0 dividido por la magnitud de ese diámetro infinitesimal (ecuación 26).

$$\begin{aligned}
 R_{d/2} &= R_d(1 + T_d) \\
 T_{d/2} &= \frac{T_d^2}{(1 - R_{d/2})} \\
 A_{d/2} &= 1 - T_{d/2} - R_{d/2}
 \end{aligned} \tag{25}$$

$$\begin{aligned}
 K &= \lim_{x \rightarrow 0} \left(\frac{A_{dx}}{dx} \right); \longrightarrow K = \frac{a_0}{d_i} \left(\frac{1}{cm} \right) \\
 S &= \lim_{x \rightarrow 0} \left(\frac{R_{dx}}{dx} \right); \longrightarrow S = \frac{r_0}{d_i} \left(\frac{1}{cm} \right)
 \end{aligned} \tag{26}$$

Se han obtenido los coeficiente de absorción del KHP para las cuatro longitudes de onda características, 2412, 2146, 1668, 1136 nm (ver tabla 5), y se han representado para cada tamaño de partícula. El gráfico resultante se muestra en la figura 25a. De la misma forma los valores obtenidos para el coeficiente de dispersión (tabla 5) se muestran representados en la figura 25b.

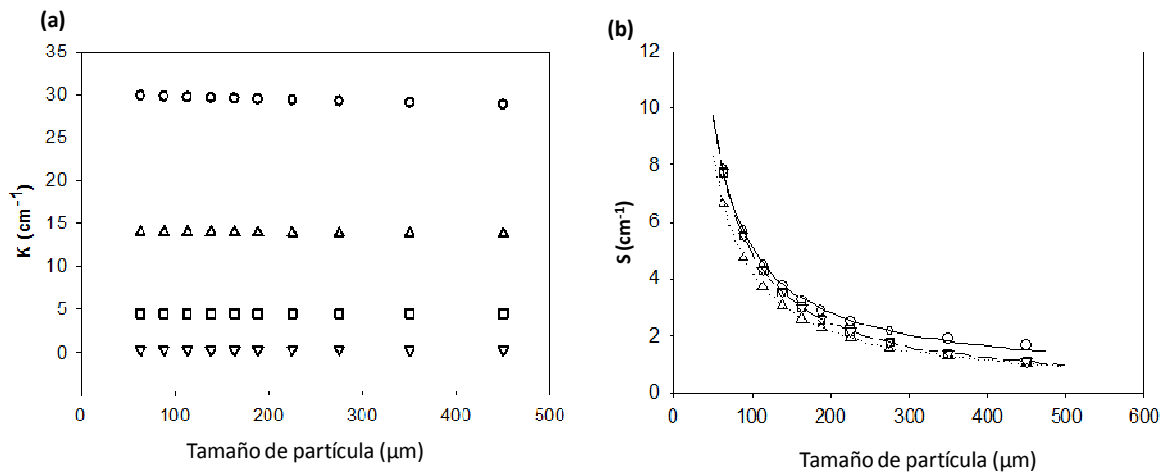


Figura 25. (a) Coeficiente de absorción del KHP para cuatro longitudes de onda, 2412, 2146, 1668, 1136 nm. Relación con el tamaño de partícula. (b) Coeficiente de dispersión del KHP para cuatro longitudes de onda, 2412, 2146, 1668, 1136 nm. Relación con el tamaño de partícula.

Tabla 5. Coeficiente de absorción y dispersión para el KHP

dp(μm)	1136 nm		1668 nm		2146 nm		2412 nm	
	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})
450	0.30	1.08	4.48	1.10	13.77	1.05	28.87	1.68
350	0.30	1.39	4.49	1.41	13.82	1.29	29.08	1.88
275	0.30	1.77	4.49	1.79	13.87	1.60	29.26	2.18
225	0.30	2.17	4.50	2.18	13.89	1.92	29.39	2.51
188	0.30	2.60	4.50	2.61	13.92	2.28	29.49	2.89
163	0.30	2.99	4.50	3.00	13.93	2.61	29.57	3.25
138	0.30	3.54	4.51	3.54	13.95	3.07	29.64	3.76
113	0.30	4.32	4.51	4.33	13.96	3.73	29.72	4.51
88	0.30	5.54	4.51	5.55	13.98	4.77	29.80	5.70
63	0.30	7.74	4.51	7.75	14.00	6.64	29.88	7.87

También se ha obtenido los coeficientes de absorción y dispersión para el NaCl. Sus valores se muestran en la tabla 6, y su relación con el tamaño de partícula se muestra gráficamente en las figuras 26.

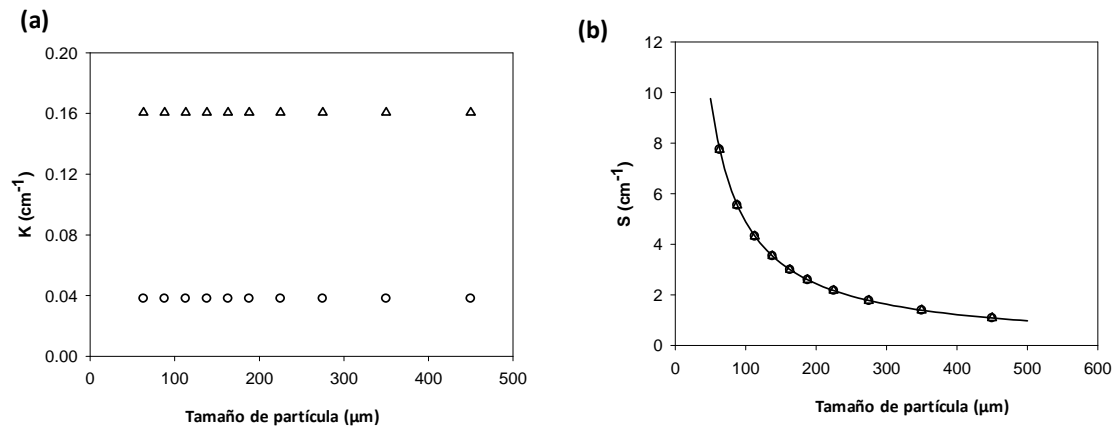


Figura 26. (a) Coeficiente de dispersión del agua retenida en el NaCl para dos longitudes de onda, 1440 nm, 1936 nm. Relación con el tamaño de partícula. (b) Coeficiente de absorción del agua retenida en el NaCl para dos longitudes de onda, 1440 nm, 1936 nm. Relación con el tamaño de partícula.

Tabla 6. Coeficiente de absorción y dispersión para el agua retenida en NaCl

dp(μm)	1440 nm		1936 nm	
	K (cm^{-1})	S(cm^{-1})	K(cm^{-1})	S(cm^{-1})
450	0.04	1.08	0.16	1.08
350	0.04	1.39	0.16	1.39
275	0.04	1.77	0.16	1.77
225	0.04	2.17	0.16	2.17
188	0.04	2.60	0.16	2.60
163	0.04	2.99	0.16	2.99
138	0.04	3.54	0.16	3.54
113	0.04	4.32	0.16	4.32
88	0.04	5.54	0.16	5.54
63	0.04	7.74	0.16	7.74

Las primeras conclusiones que se puede sacar al observar estos coeficientes son que el coeficiente de absorción de la muestra permanece constante para el intervalo de tamaños de partícula estudiados; y que el coeficiente de dispersión aumenta, como era de esperar, al disminuir el tamaño de partícula. Al aumentar éste la dispersión tiende a estabilizarse.

Coefficientes obtenidos a partir de dos espesores de muestra

Una alternativa a este cálculo es obtener los valores de R_d y R_{2d} a partir de datos empíricos. Para realizar estos cálculos es necesario obtener datos a dos espesores de muestra inferiores al espesor infinito. En este caso se ha elegido 1.5 y 3 mm de espesor. Se registró espectros para dichos espesores de muestra (alturas de cubeta) a los distintos tamaños de partícula.

Es necesario obtener R_d y R_{2d} , en reflectancia absoluta. El software del espectrómetro utilizado transforma directamente los valores obtenidos en absorbancia aparente (A'), o lo que es lo mismo, en $-\log(R/R_{ref})$. Por tanto se ha de realizar el cambio de logaritmo y multiplicar por el valor de la reflectancia de R_{ref} para obtener los valores de reflectancia absoluta. La R_{ref} del dispositivo utilizado es 0.8.

Una vez obtenidos R_d y R_{2d} , se calcula el resto de variables de la capa representativa, mediante las ecuaciones de Bendford:

$$\begin{aligned} T_{2d} &= \frac{R_{2d}}{R_d} - 1; & A_{2d} &= 1 - T_{2d} - R_{2d} \\ T_d &= \sqrt{T_{2d} \cdot (1 - R_{2d}^2)}; & A_d &= 1 - T_d - R_d \end{aligned} \quad (27)$$

Una vez caracterizada la capa, se aplica las ecuaciones de Bendford para mitad de espesor y se obtienen los coeficientes tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

En la figura 27 se muestra el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión obtenidos mediante este procedimiento para $dp=188 \mu\text{m}$ en todo el rango de longitudes de onda. Como se observa, a partir de un espectro de reflectancia, y a través de la metodología desarrollada por Dahm, se obtiene un espectro que representa el poder de absorción de la muestra, para cualquier espesor, en unidades de inversa de longitud (cm^{-1}). También se muestra el coeficiente de dispersión

obtenido que, como se observa, mantiene valores aproximadamente constantes a lo largo de todo el rango de longitudes de onda, con una ligera variación en los picos de absorción.

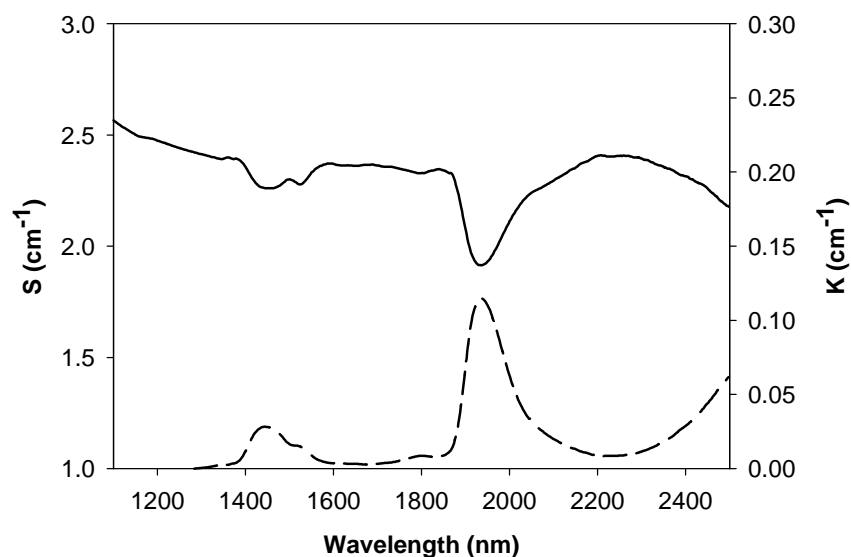


Figura 27. Coeficiente de absorción (discontinua) y dispersión (continua) para el agua retenida en el NaCl con $dp=188 \mu\text{m}$ calculados mediante la teoría de la capa representativa.

De la misma forma se ha determinado ambos coeficientes para el resto de tamaños y se han representado frente al tamaño de partícula. Debido a los valores de absorción tan bajos a los que se trabaja con esta muestra, ha sido imposible determinar estos coeficientes para los tamaños de partícula menores, debido a que los espectros obtenidos para estos tamaños al espesor de 1.5 mm presentaban ondulaciones que se ven amplificadas al aplicar la metodología de Dahm para obtener los coeficientes, por lo que no es posible determinar los máximos de pico. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28.

El coeficiente de dispersión disminuye al aumentar el tamaño de partícula. Para los tamaños de partícula mayores, el valor del mismo se ha estabilizado. Como se observa en la figura 28, estos datos concuerdan con los obtenidos en el apartado anterior. Este método, si no se dispone de un dispositivo para medir las alturas de forma exacta conlleva un mayor error experimental.

Tabla 7. Coeficiente de absorción y dispersión para el agua retenida en NaCl

dp(μm)	1440 nm		1936 nm	
	K(cm^{-1})	S(cm^{-1})	K(cm^{-1})	S(cm^{-1})
750	0.042	0.91	0.17	0.765
450	0.042	1.43	0.19	1.44
350	0.047	1.46	0.24	1.285
275	0.042	1.81	0.17	1.53
188	0.037	2.27	0.15	2.17

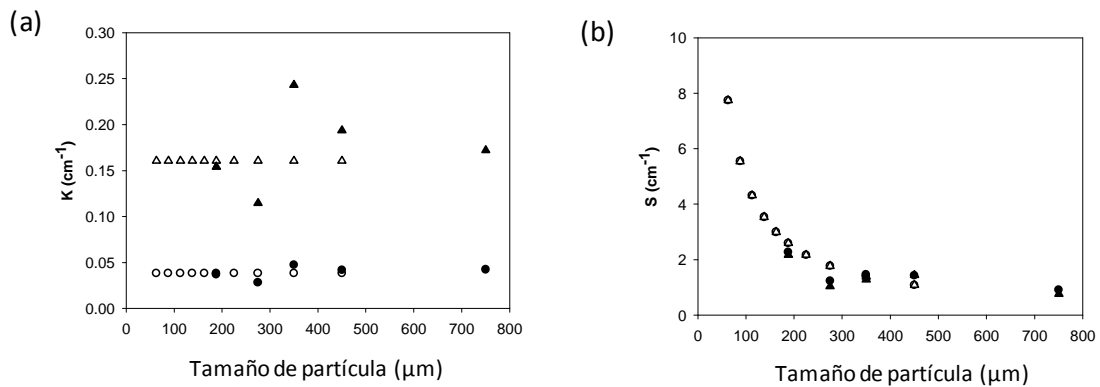


Figura 28. Coeficientes de absorción (izquierda) y dispersión (derecha) para el agua retenida en el NaCl vs tamaño de partícula, comparativa de los dos métodos utilizados para obtenerlos. Con símbolos llenos, método que utiliza dos espesores de muestra.

Para el KHP se ha realizado el mismo experimento con los mismos tamaños de partícula. La absorción disminuye la capacidad de penetración de la radiación NIR, de modo que el espesor infinito se alcanza a espesores menores a 1 mm. Esta circunstancia ha impedido calcular mediante este procedimiento los coeficientes de absorción y dispersión para las longitudes de onda donde la absorción es grande, ya el espesor infinito se alcanza a espesores que, con el dispositivo experimental disponible es imposible de controlar. Por tanto se ha calculado estos coeficientes para las longitudes de onda que el método permite, de los 1100 nm hasta los 1500 nm. Se muestran los resultados para el tamaño de partícula $dp=225 \mu\text{m}$.

Como se observa en la figura 29 el coeficiente de dispersión presenta un mínimo que coincide con el máximo de absorción, manteniéndose aproximadamente constante para el resto del espectro estudiado. También se observa la aparición de ondulaciones

en el coeficiente de dispersión. Este efecto, observado también para el NaCl, aparece en la aplicación de esta metodología, y se puede deber a una amplificación del ruido espectral.

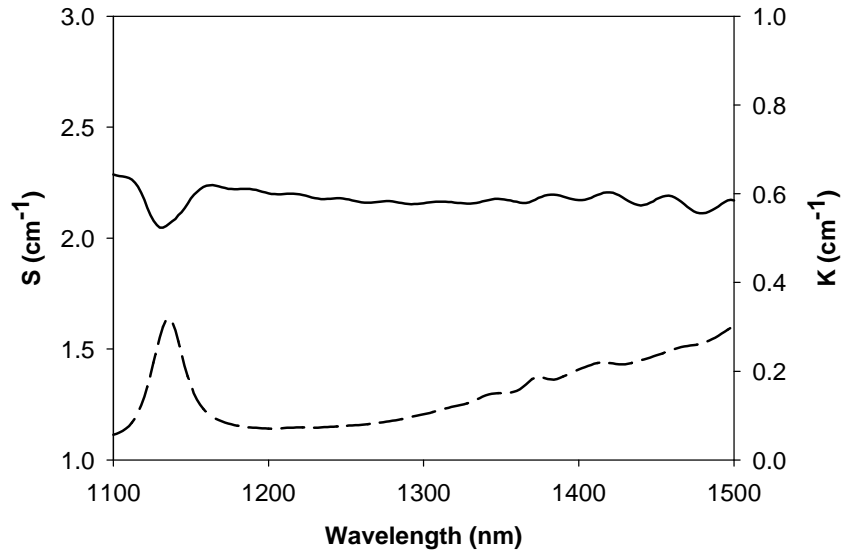


Figura 29. Coeficiente de absorción(a) y dispersión (b) para el KHP con $dp=225 \mu\text{m}$ calculados mediante la teoría de la capa representativa

A continuación, se ha calculado para el resto de tamaños y se ha representado el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión frente al tamaño de partícula para la longitud de onda correspondiente con el primer máximo de pico (1136nm). Los resultados, comparados con los obtenidos en el apartado anterior se muestran en la figura 30.

Tabla 8. Coeficientes de absorción y dispersión para el KHP

$d_p(\mu\text{m})$	$K(\text{cm}^{-1})$	$S(\text{cm}^{-1})$
450	0.31	1.01
350	0.34	1.48
275	0.34	1.54
225	0.30	2.12
188	0.32	2.33
163	0.31	2.59
138	0.29	3.13
113	0.32	3.75
88	0.30	4.56

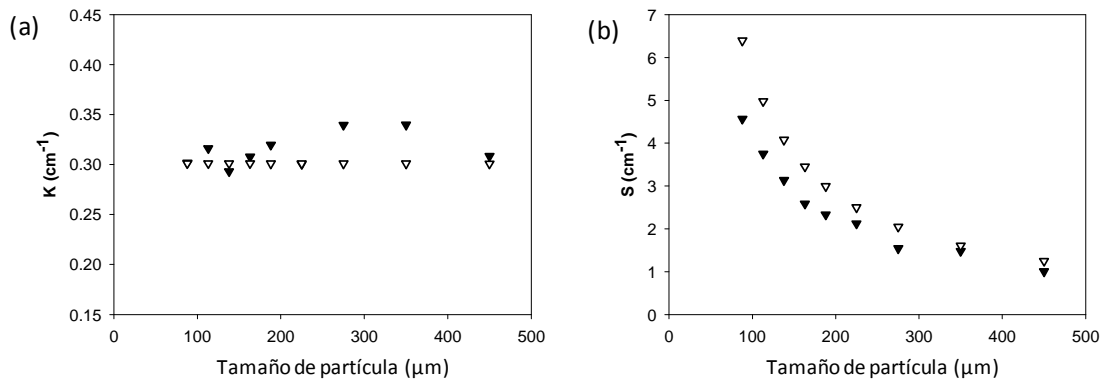


Figura 30. Coeficientes de absorción (derecha) y dispersión (izquierda) para el KHP representado frente al tamaño de partícula. Comparativa de ambos métodos utilizados para obtener los coeficientes. Con símbolos llenos, método que utiliza espectros registrados para dos espesores de muestra.

Los valores obtenidos por ambos métodos coinciden, salvando los errores experimentales. La metodología de Dahm para el cálculo de los coeficientes de absorción y dispersión produce resultados satisfactorios. Existen diferencias en los datos obtenidos a través del modelo y los registrados a distintos espesores de muestra. Una pequeña variación en la medida del espesor produce un gran cambio en los valores obtenidos mediante las ecuaciones de Dahm.

No existen referencias para el rango de tamaños estudiados, si bien, para tamaños menores, los datos existentes hablan de un aumento del coeficiente de absorción con el tamaño de partícula⁸⁴. En el rango de tamaños de partícula estudiados éste se mantiene prácticamente constante.

El coeficiente de dispersión disminuye con el aumento del tamaño de partícula, debido fundamentalmente a que el número de reflexiones disminuye. En función de la absorción que presenta la muestra, la radiación penetra más o menos en ella y, por tanto, el número de reflexiones depende también del grado de absorción al que se esté trabajando. Sin embargo, el coeficiente de dispersión obtenido no disminuye proporcionalmente con el grado de absorción, como se puede observar en la figura 21. Esto es debido a que el coeficiente de dispersión varía inversamente con el grado de absorción de la muestra, como indican las figuras 27 y 29. Este resultado coincide con el encontrado por Dahm y Dahm para láminas de plástico y por Burger a partir de valores de reflectancia y transmisión⁸⁵.

5

PROFUNDIDAD DE PENETRACIÓN DE LA RADIACIÓN NIR

5.1 Introducción	70
5.2 Objetivos.....	73
5.3 Metodología de trabajo.....	75
5.4 Resultados	75

5.1 INTRODUCCIÓN

La radiación NIR tiene la capacidad de penetrar en una muestra sólida de una forma significativa adquiriendo información importante de la muestra. Esta es una de las características que hace de la radiación NIR especialmente útil en el estudio de sólidos, ya que se puede obtener información química de una forma no invasiva ni destructiva, de una cantidad de muestra relativamente grande, que no podría ser analizada de esta forma por ninguna otra técnica espectroscópica.

La principal diferencia de los distintos modos de registros en NIR es la posición de los detectores con respecto a la muestra (figura 2). Mientras que en transmisión está claro el volumen de muestra analizado (la radiación atraviesa toda la muestra, aunque el camino óptico efectivo debido a las reflexiones en el interior del sólido particulado es superior al tamaño de la muestra) en modo reflectancia no está en absoluto claro la cantidad de muestra realmente analizada. De esta forma, el camino total que recorre la radiación en el interior de la muestra, es decir, el camino óptico efectivo, difiere significativamente entre ambos métodos. Se define, también, el término cantidad de muestra efectiva, que es aquella que contribuye con información, ya sea física o química, a la medida.

Los factores que afectan de forma determinante a la cantidad de muestra efectiva en reflectancia difusa son:

- Características de absorción de la muestra
- Tamaño de partícula de la muestra
- La densidad real de la muestra (compactación y huecos)
- Índice de refracción de la muestra (reflectancia especular)
- Longitud de onda (fenómenos de dispersión)

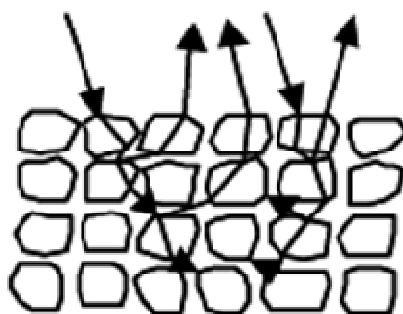


Figura 31. Posibles caminos ópticos seguidos por la radiación en una medida en reflectancia difusa sobre una muestra particulada.

En espectroscopia NIR clásica un haz de radiación llega a la muestra y se refleja en todas las direcciones, incluyendo la de los detectores (normalmente situados en un ángulo de 45° para minimizar los efectos de la reflectancia especular). Estos detectores registran la radiación que ha sido capaz de penetrar y reflejar en las diferentes capas de la muestra, tomando una información que puede ser considerada como información media (p.e. concentración media) de la cantidad de muestra efectivamente analizada. La reproducibilidad en registros sucesivos de submuestras de una misma muestra depende fundamentalmente de la homogeneidad del volumen de muestra efectivo. A semejanza del concepto clásico de toma de muestra en análisis, una de las formas de evitar heterogeneidades es disminuir el tamaño de partícula lo máximo posible, de modo que la cantidad de muestra efectiva contenga el mayor número de partículas. Suponiendo la homogeneidad de la muestra, a mayor penetración, mayor reproducibilidad en los resultados.

En primer lugar es necesario definir algunos términos para comprender los estudios de penetración. Es importante distinguir entre la penetración máxima que puede alcanzar la radiación NIR en una muestra (penetration depth) del espesor de información (information depth), que es el que contribuye con información a la medida. La primera sólo depende de la intensidad de la radiación incidente y la muestra, mientras que el espesor de información depende también de la sensibilidad del sensor empleado y es la que realmente importa, ya que es la que afecta a la medida. Otros autores estudian el camino óptico efectivo que recorre la radiación dentro de la muestra, que no

necesariamente ha de coincidir con el espesor de información en muestras formadas por partículas, ya que la radiación puede tomar distintos caminos. Todos estos valores pueden relacionarse con la cantidad de muestra efectiva que contribuye a la medida.

Muchas son las aplicaciones de la espectroscopia NIR que dependen de la capacidad de penetración de la radiación. Entre ellas destacan, por su importancia, todas las aplicaciones médicas, donde el carácter no invasivo de la medida cobra una relevancia evidente.⁸⁶

También es importante su aplicación en la industria alimentaria, donde gracias a la penetración de la radiación es posible determinar componentes en frutas o grasas de animales a través de la piel o del embalaje, etc.⁸⁷

En la determinación de materiales en polvo o comprimidos, la penetración de la radiación está directamente relacionada con la cantidad de muestra analizada y, por tanto, con la reproducibilidad y representatividad de la medida. La penetración de la radiación NIR en productos farmacéuticos ha sido ampliamente estudiada, encontrándose en la bibliografía numerosos trabajos que podemos ver clasificados en función de la penetración de información en la tabla 9. Destaca el amplio rango de valores de espesor de información que se encuentra.

Tabla 9. Referencias bibliográficas en el estudio de la penetración de información en el Infrarrojo Próximo

Referencia	Material	Longitud de onda	Espesor de información
Clarke et al,200212	Celulosa en láminas de papel	1145nm-1675 nm	≈120 μm
Andersson et al, 199988	Comprimidos farmacéuticos	1450-1650nm&2050-2200nm	100-200 μm
Hammond et al,199889	Mezcla farmacéutica en polvo	1800 nm	>500 μm
Hammond et al,199844	Mezcla farmacéutica en polvo	1400-1800 nm	500 μm
Haanstra et al, 199890	Láminas de polietileno	1800-2000 nm	600 μm
Berntsson et al, 199991	Celulosa microcristalina	1600 nm	670 μm
Clarke et al, 200212	Celulosa en láminas de papel	1100 nm	≈700 μm
Berntsson et al, 199892	Mezcla farmacéutica en polvo	> 1600 nm	>750 μm
Berntsson et al, 199946	Comprimidos con recubrimiento	1600 nm	900 μm
Olinger and Griffiths, 199293	Mezcla en polvo de carbazole, grafito y cloruro sódico	1672 nm	≈ 1mm
Hammond et al, 199844	Mezcla farmacéutica en polvo	< 1400 nm	>1mm
Iyer et al, 2002113	Comprimidos farmacéuticos	1189-1276 nm	1.99-2.7 mm
Berntsson et al, 199927	Celulosa microcristalina	900 nm	2.33 mm
Haanstra et al, 199826	Láminas de polietileno	900 nm	4.6 mm
MacDonald and Prebble, 199394	Muestras Farmacéuticas	1100-2500 nm	> 5mm

5.2 OBJETIVOS

El conocimiento de la penetración de la radiación NIR en la muestra cobra especial relevancia en las técnicas de imagen NIR, donde se pretende predecir distribuciones o concentraciones dentro de unas coordenadas espaciales muy definidas. Una imagen NIR está formada por espectros que representan una posición en una superficie

escaneada. El área representada por cada espectro se denomina píxel, por analogía con las técnicas de imagen convencionales. Esta área corresponde en realidad a un volumen de muestra, cuya tercera dimensión es el espesor que contribuye con información a la medida. Por tanto, la penetración de la radiación es un factor limitante a la hora de establecer la resolución real de un dispositivo de imagen NIR.

Dada la complejidad de la señal, antes de abordar este problema en imagen, se ha estudiado la penetración de la radiación en espectroscopia NIR convencional.

5.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO

Para estudiar el efecto del tamaño de partícula y la absorción de la muestra en el espesor de información o cantidad de muestra efectiva que contribuye a una medida NIR de reflectancia difusa, se preparó el siguiente experimento. Se tomó una cubeta de cuarzo y se rellenó con diferentes cantidades de dos sólidos puros en polvo, NaCl y KHP a diferentes alturas controladas, entre 1 y 15 mm.

5.4 RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados de los experimentos realizados, con la intención de determinar el espesor de información de dos sistemas de partículas, NaCl y KHP.

5.4.1 Penetración en muestras poco absorbentes

En la figura 32 se muestra los espectros registrados para cada tamaño de partícula, a diferentes espesores de muestra, para el agua retenida en el NaCl. Como vemos, los

espectros registrados con un espesor de muestra menor presentan, en esta muestra tan poco absorbente, un $-\log R$ mayor a lo largo de todo el espectro de longitudes de onda estudiadas (figura 32 (a), (b), (c)).

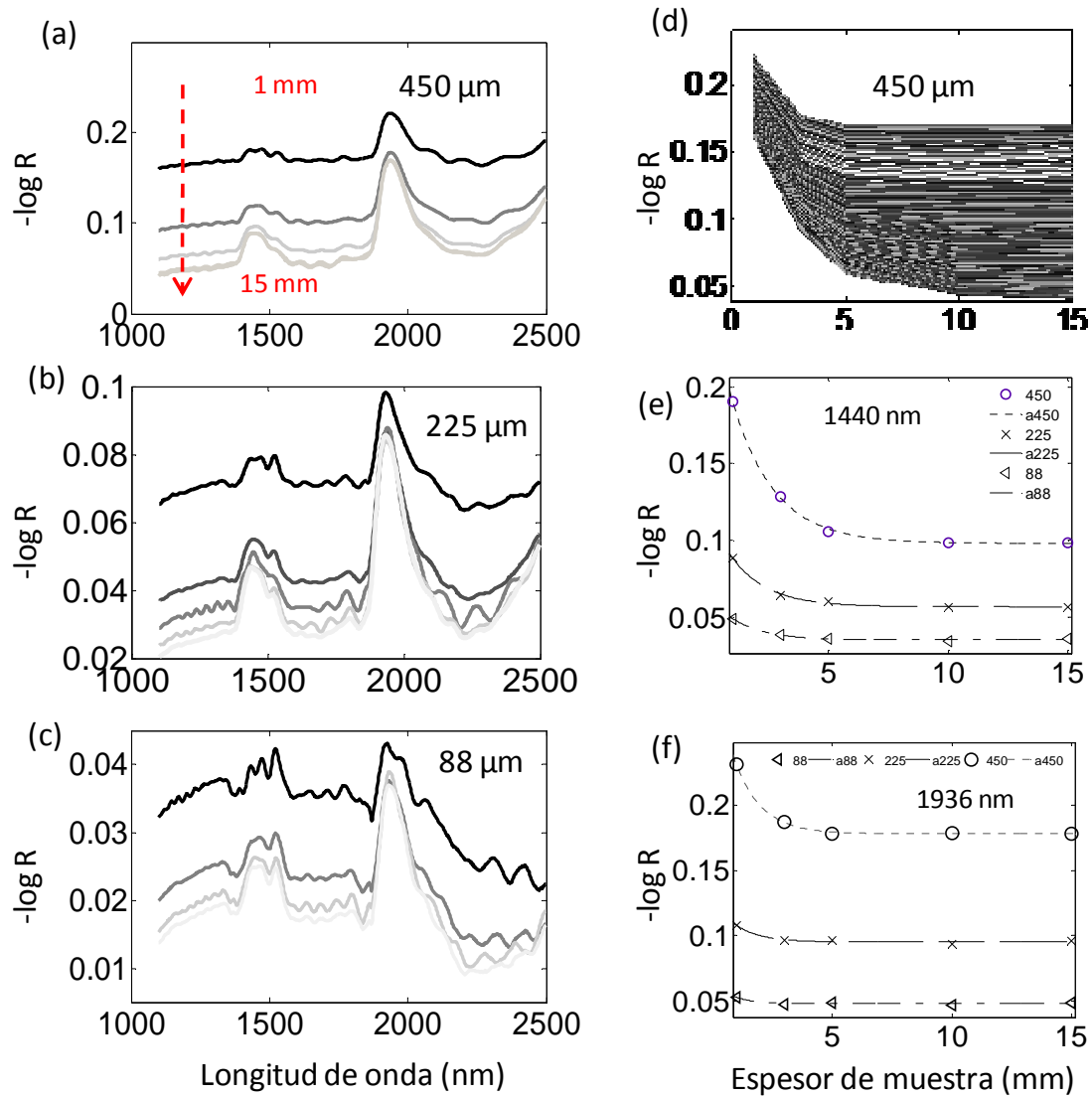


Figura 32. Espectros de agua retenida en NaCl registrados a espesores diferentes para 3 tamaños de partícula. (a) 450 μm , (b) 225 μm y (c) 88 μm ; de arriba hacia abajo 5 espectros que corresponden con 5 espesores de muestra (1, 3, 5, 10 y 15 mm). (d) Representación del $-\log R$ con respecto al espesor de muestra para todas las longitudes de onda y para el tamaño mayor, 450 μm . (e) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1440 \text{ nm}$ y para los tres tamaños de partícula ($\circ = 450 \mu\text{m}$, $\times = 225 \mu\text{m}$, $\nabla = 88 \mu\text{m}$). (f) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1936 \text{ nm}$ y para los tres tamaños de partícula ($\circ = 450 \mu\text{m}$, $\times = 225 \mu\text{m}$, $\nabla = 88 \mu\text{m}$). Las líneas en la figuras (e) y (f) representan los ajustes de cada relación a una ecuación similar a la ecuación X.

Esto queda patente también en la figura 32 (d) donde se ha representado el $-\log R$ frente a el espesor de muestra para todas las longitudes de onda del espectro. La

figura 32 (e) y 32(f) muestra esta relación para los tres tamaños de partícula y para las dos longitudes de onda relacionadas con la absorción característica del agua en la estructura del NaCl (1440 nm y 1936 nm). La estabilización de la señal al aumentar el espesor de muestra está indicando, en todos los casos, el momento en que se alcanza el espesor infinito, también denominado espesor de información. Todas las relaciones se ajustan a una función del tipo mostrado en la ecuación 28, que coincide en forma con la obtenida por Bertsson *et al*⁹¹ y Clarke *at al*¹², en sus investigaciones sobre masa efectiva o espesor de información en otras muestras NIR.

$$y = a * e^{-bx} + c \quad (28)$$

Esta ecuación permite obtener de forma numérica el valor de espesor infinito, estableciendo el valor límite cuando la señal llega a un valor de estabilización (con límite de confianza del 95%). En la tabla 10 se muestran los valores obtenidos para las constantes de la ecuación, valor de R² y espesor de información obtenido para cada tamaño de partícula y las dos longitudes de onda características.

Tabla 10. Constantes y penetración de información para el agua retenida en el NaCl

NaCl-1440	a	b	c	R	Adj R	espesor muestra (mm)
88	0.029	0.733	0.036	0.999	0.998	3.8
225	0.061	0.664	0.057	0.999	0.996	4.8
450	0.163	0.569	0.098	0.999	0.996	6.4
NaCl-1936						
88	0.019	1.419	0.048	0.999	0.967	1.6
225	0.035	0.984	0.095	0.998	0.952	2.4
450	0.132	0.912	0.178	0.995	0.911	3.0

En la figura 33 se muestra los espectros registrados para cada tamaño de partícula a diferentes espesores de muestra para la muestra de KHP. Como vemos, los espectros registrados con un espesor de muestra menor presentan un $-\log R$ mayor sólo en unas pocas longitudes de onda (figura 33 (a), (b), (c)).

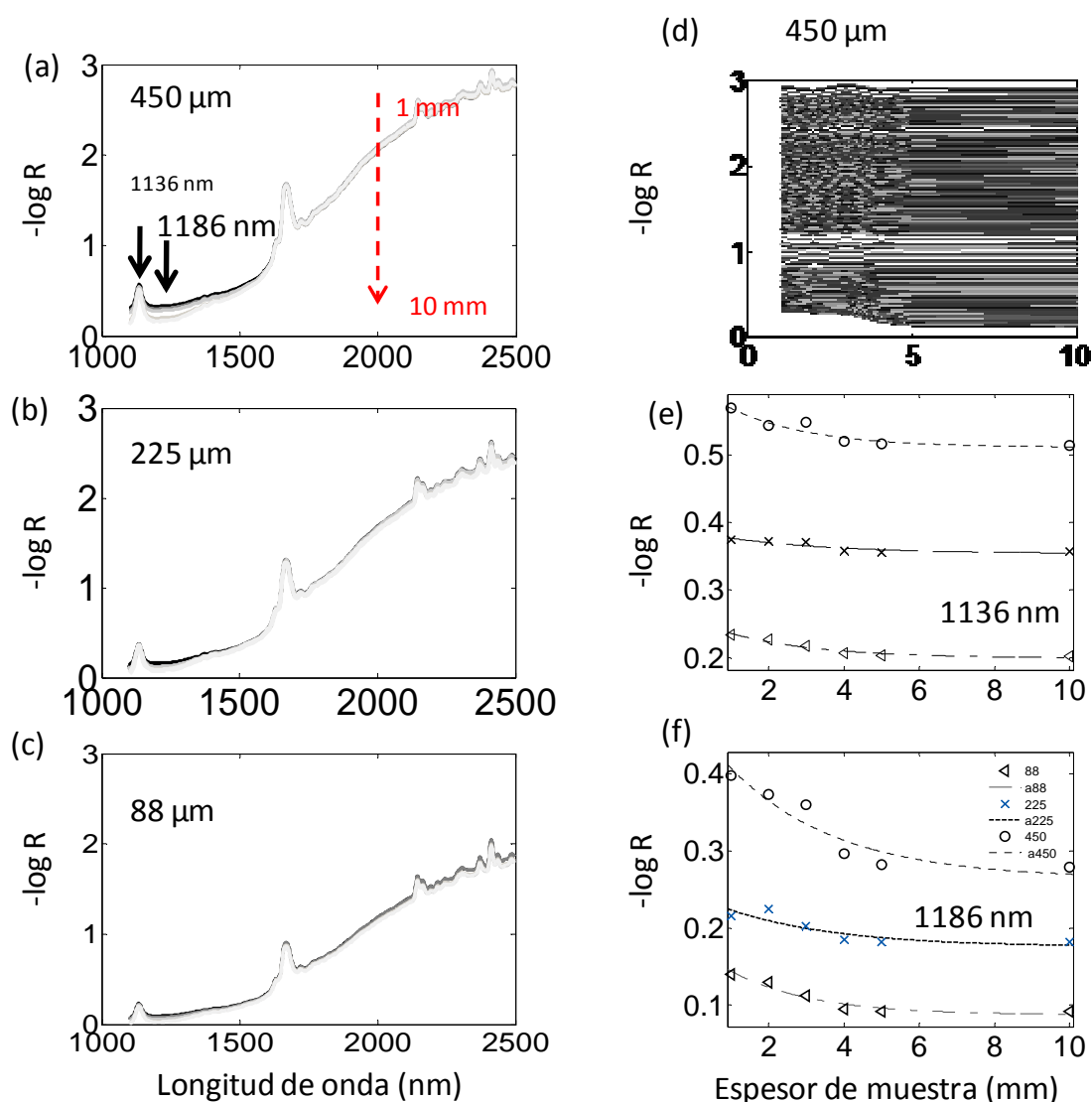


Figura 33. Espectros de KHP registrados a espesores diferentes para 3 tamaños de partícula, (a) 450 μm , (b) 225 μm y (c) 88 μm , de arriba hacia abajo 5 espectros que corresponden con 5 espesores de muestra (2,3,4,5,10 mm). (d) Representación del $-\log R$ con respecto al espesor de muestra para todas las longitudes de onda y para el tamaño mayor, 450 μm . (e) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1136$ nm y para los tres tamaños de partícula (o = 450 μm , x=225 μm , ∇ =88 μm). (f) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1186$ nm y para los tres tamaños de partícula (o = 450 μm , x=225 μm , ∇ =88 μm). Las líneas en la figuras (e) y (f) representan los ajustes de cada relación a una ecuación similar a la ecuación 28.

En la figura 33 (d) se ha representado el $-\log R$ frente a el espesor de muestra para todas las longitudes de onda del espectro para el tamaño mayor, 450 μm . Esta representación indica que en muchas de las longitudes de onda no hay descenso de $-\log R$ al aumentar el espesor, con lo que es de suponer que se ha alcanzado el espesor de información antes de un 1 mm (menor espesor estudiado). La figura 33 (e) y 33(f) muestra esta relación para los tres tamaños de partícula y para dos longitudes de

onda, el pico característico de menor absorción y la longitud de onda donde no hay ninguna banda de absorción y sólo se obtiene el efecto físico de la dispersión de la radiación. (1136 nm y 1186 nm).

La curva correspondiente a estas dos longitudes de onda fue ajustada para los tres tamaños de partícula a una ecuación tipo la ecuación 28. Los resultados se muestran en la tabla 11. Como vemos, en este caso los ajustes son de peor calidad que en el caso anterior, sobre todo para la muestra de 225 μm . Por tanto, no se utilizó los modelos ajustados para obtener el espesor de información, sino que se obtuvo de manera aproximada utilizando los gráficos (e) y (f) de la figura 33.

Tabla 11. Valores de las constantes correspondientes a las ecuaciones obtenidas para KHP

KHP-1136	a	b	c	R	Adj R	espesor muestra (mm)
88	0.056	0.417	0.1992	0.940	0.900	3
225	0.033	0.347	0.354	0.800	0.670	4
450	0.092	0.465	0.511	0.876	0.793	4.5
KHP-1186						
88	0.090	0.466	0.088	0.920	0.870	4
225	0.068	0.341	0.176	0.742	0.570	5.2
450	0.204	0.352	0.264	0.877	0.790	6

La absorción y la dispersión afectan a la profundidad de penetración de la radiación NIR de forma similar, un aumento en cualquiera de las dos variables disminuye la capacidad de penetrar en la muestra en el sentido de que ambas variables aumentan la pérdida de energía en el balance general.

Según estos resultados, y en contra de las conclusiones obtenidas por Clarke *et al*¹², la penetración no depende de una forma exponencial de la longitud de onda, sino que presenta la misma dependencia de la longitud de onda que la absorción característica de cada compuesto; es decir, en los picos de absorción característicos la radiación penetra menos, mientras que en las zonas de poca absorción (aunque ésta se

encuentra a una longitud de onda alta) la penetración es mayor. Sin embargo la conclusión obtenida por Clarke *et al.* es parcialmente acertada, ya que la mayoría de los compuestos farmacéuticos, debido a las características de la radiación NIR, presentan un espectro con mayores absorciones en las longitudes de onda mayores.

Se puede tomar algunas precauciones a la hora de controlar la penetración en una medida NIR simplemente eligiendo el rango adecuado de longitudes de onda. Este control de la penetración es más importante en NIR-CI, donde en muchos casos la penetración será el factor limitante a la hora de delimitar la resolución real de las imágenes.

El tamaño de partícula también ejerce un efecto fundamental en la penetración. A tamaños de partícula menores, mayor dispersión de la radiación y, por tanto, menor penetración. En consecuencia, la molturación de la muestra a tamaños de partícula menores conseguirá una menor penetración de la radiación, aunque no necesariamente mejor resolución de una imagen química, como veremos en el siguiente capítulo, que se centra en el efecto que tiene la dispersión sobre la resolución de imagen.

5.4.2 Número de capas teóricas según la teoría de la capa representativa

Con ayuda de la teoría de la capa representativa, y haciendo uso de los resultados obtenidos en el capítulo anterior para ambas sustancias, se puede predecir el número de capas teóricas que penetrará la radiación en una muestra hasta que se estabiliza el valor de reflectancia obtenido.

Como vimos en el capítulo anterior, una muestra de sólidos puede describirse como un conjunto de capas paralelas y perpendiculares al haz de radiación incidente. Las propiedades de esta muestra quedan definidas a partir de la definición de una capa representativa. Conocidas (o estimadas) (apartado 4.3.3) las propiedades de esta

primera capa, se puede obtener una representación de cómo evoluciona el proceso de medida utilizando las ecuaciones de Bendford (ecuaciones 24).

De esta forma, las figuras 34 y 35 muestran la evolución de la reflectancia, la absorbancia y la transmisión para el sistema H₂O/NaCl a la longitud de onda de 1440 nm (figura 34) y 1936 nm (figura 35), según las propiedades de la capa representativa obtenidas en el apartado 4.3. A medida que aumenta el número de capas, el valor de reflectancia tiende a la estabilización. El número de capas teóricas que la radiación puede recorrer hasta que la reflectancia llega a un valor cercano al de estabilización (se puede definir por ejemplo 95%) se puede obtener directamente de estos gráficos o numéricamente a través de las ecuaciones de Bendford. Este número de capas tiene, necesariamente, una relación con el valor de espesor de información. Esta relación debe ser explorada con atención en el futuro y será descrita adecuadamente en función del tipo de muestra y el instrumental utilizado.

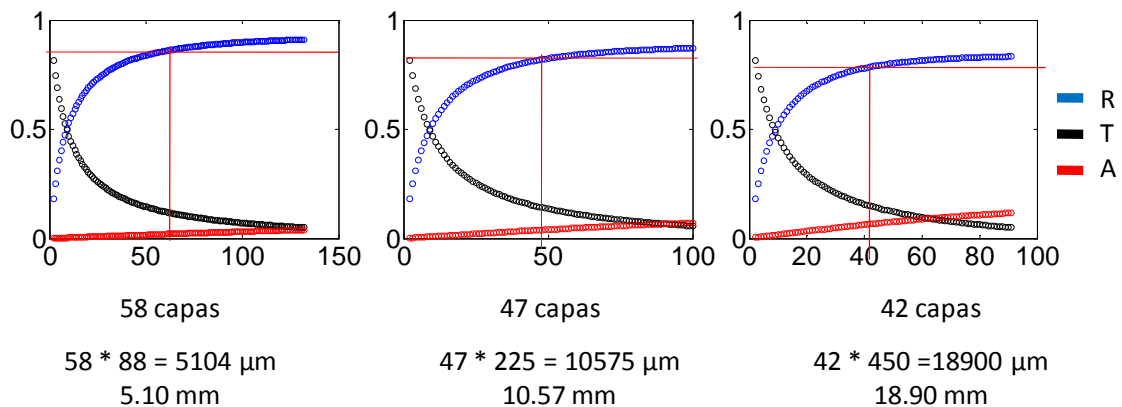


Figura 34. Estimación del número de capas capaz de atravesar la radiación según la teoría de Dahm, NaCl (1440 nm)

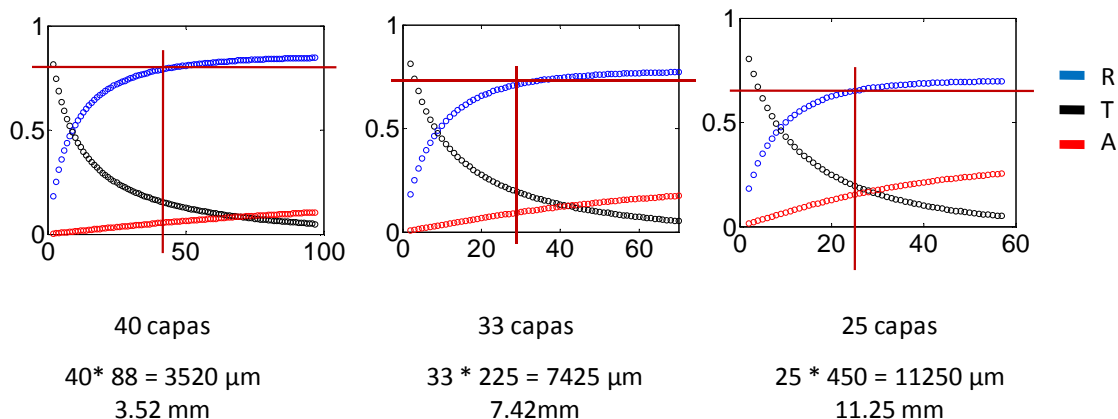


Figura 35. Estimación del número de capas capaz de atravesar la radiación según la teoría de Dahm, NaCl (1936 nm)

La figura 36 muestra la estimación del número de capas teóricas que consigue una estabilización de la señal para el KHP a 1136 nm, una de las longitudes de onda en estudio.

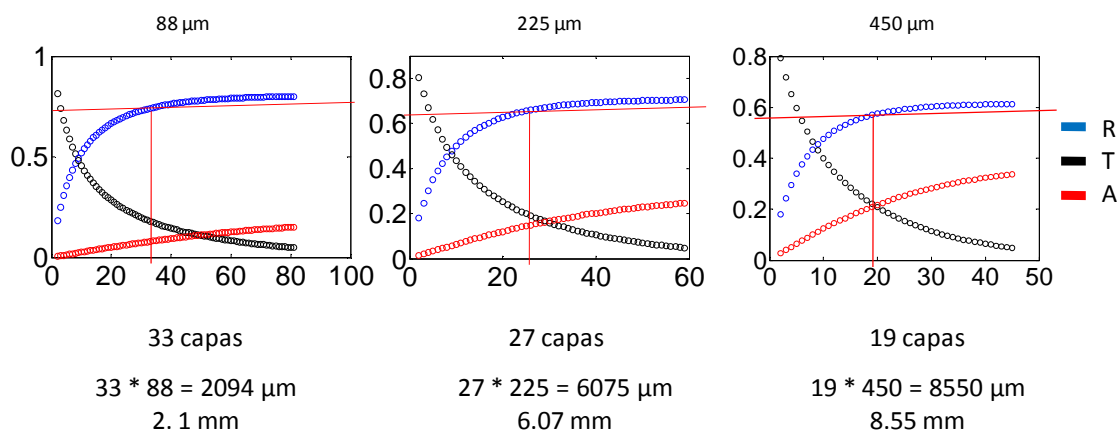


Figura 36. Estimación del número de capas capaz de atravesar la radiación según la teoría de Dahm, KHP (1136 nm)

A través de la teoría de la capa representativa se puede obtener un valor de penetración máxima. El valor real de penetración será menor, ya que la muestra no presentará una estructura sin orden, con huecos, etc. En todo caso significa un valor guía, que se puede obtener a partir del valor de reflectancia a espesor infinito. Esta predicción sigue la misma tendencia que los valores experimentales, crece con el tamaño de partícula y disminuye con la absorptividad. De hecho, la relación entre los valores reales y los valores estimados por la ley de Dahm es lineal, con una pendiente constante para las longitudes de onda y las muestras estudiadas. Esta relación lineal

sugiere que la teoría de Dahm es un buen modelo para predecir penetración, debiendo introducirse un factor de corrección debido a la irregularidad de las muestras reales.

6

RESOLUCIÓN DE UNA IMAGEN QUÍMICA

6.1	Introducción	84
6.2	Objetivos.....	87
6.3	Metodología de trabajo.....	88
6.4	Resultados	90

6.1 INTRODUCCIÓN

6.1.1 Resolución en Imagen Química hiperespectral

En primer lugar, es conveniente aclarar algunos términos que pueden crear confusión alrededor de la palabra resolución cuando se trabaja en imagen química. Existen dos tipos básicos de resolución en una imagen química, la resolución espectral y la resolución espacial.

Resolución Espectral: La resolución espectral es una característica del instrumento y es un término que es familiar a los usuarios de espectroscopia clásica. Representa la distancia existente entre longitudes de onda a la hora de formar el espectro (1-10 nm en NR-CI). A mayor resolución espectral (menor distancia entre longitudes de onda, es decir mayor número de longitudes de onda empleadas) mayor selectividad a la hora de resolver espectros con picos solapados o muy parecidos.

Resolución espacial: La resolución espacial define el tamaño de la imagen y el tamaño de cada píxel en ella. Por tanto, define la capacidad espacial de predicción, es decir la sensibilidad espacial de la técnica. Relacionados con ella, se puede definir, a su vez, dos conceptos fundamentales:

Resolución Óptica: La resolución óptica del aparato viene definida por el número de detectores disponibles y el tamaño de imagen tomado (por ejemplo, 256*320 píxeles por imagen, con un tamaño de imagen de 2.56*3.20 cm corresponde con una resolución óptica de 100 μm de lado de un píxel cuadrado). A mayor resolución, mayor número de píxeles por imagen, menor tamaño de píxel, y por tanto mayor definición en la imagen.

Resolución Química: Debido a que la mayoría de las medidas son realizadas en reflectancia difusa, un tema crucial sujeto a debate es las limitaciones prácticas que existen a la hora de establecer la resolución real de trabajo. Es decir, qué cantidad de muestra contribuye a la medida que es registrada en una determinada superficie (píxel), o dicho con otras palabras, el grado de contaminación del espectro de un píxel por material de los píxeles vecinos. Este concepto será ampliamente discutido a continuación.

6.1.2 Resolución Química

Hay dos atributos claves que definen la resolución real de una imagen química: la resolución lateral y la profundidad de penetración.

En la figura 37 se esquematiza la entrada de un fotón en una muestra con una penetración finita. Tras penetrar en la muestra, los fotones que se encuentran en la dirección que se indica con la flecha negra interactúan con el volumen de muestra marcado en la figura. El espectro obtenido de esta medida es característico de las absorciones NIR debido a la interacción de todas las especies químicas contenidas en este volumen de muestra. El contraste de una imagen NIR está basado en el espectro NIR obtenido y, por tanto, tanto la penetración de la radiación como la dispersión de la misma, directamente relacionadas con el volumen de muestra analizado, afectan y limitan las capacidades en cuanto a magnificación lateral de las técnicas NIR imagen.

Para las longitudes de onda NIR, la penetración de la radiación de la muestra es sustancial, mientras la longitud de onda es comparativamente corta. De esta forma, la penetración de la radiación en la muestra puede ser el factor limitante a la hora de determinar la resolución espacial en un experimento de imagen NIR. Este razonamiento es válido para cualquier configuración instrumental de NIR-CI, imagen

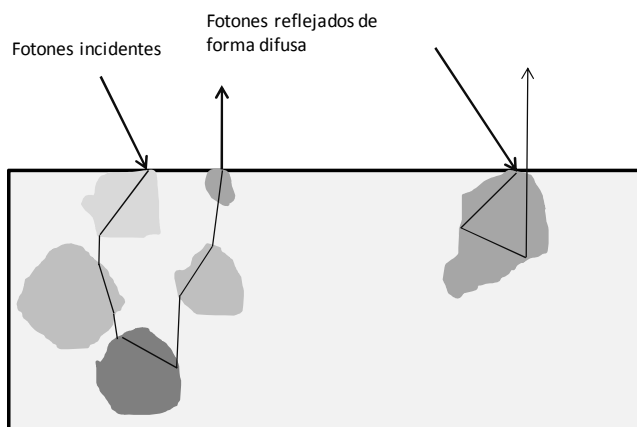


Figura 37. Radiación NIR penetrando en una muestra dispersiva (material en polvo)

global basada en detectores CCD o técnicas de microscopia NIR, basadas en la obtención de espectros puntuales o en línea. Obviamente, en función de las características de enfoque, iluminación, distancia de la muestra a los detectores, etc. cada instrumento puede presentar profundidades de penetración diferentes.

Otro factor que afecta es la resolución lateral. Se define resolución lateral en imagen química como la habilidad para medir un espectro sobre un objeto que viene definido por una resolución óptica dada, sin contribución de la radiación que proviene de objetos vecinos (píxeles vecinos). Hay dos factores principales que afectan a la resolución lateral: el límite por difracción, una función simple de la longitud de onda de la radiación y de la apertura del sistema óptico empleado¹¹, y los fenómenos de dispersión; función, principalmente, de las características de la muestra. Por tanto, el tipo de dispositivo empleado influye de manera determinante en la contribución lateral. Una de las diferencias básicas entre las dos configuraciones principales (FPA y espectro simple o en línea) es el sistema de iluminación. Mientras que en los sistemas de mapeo la muestra sólo se irradia en la zona en la que se está adquiriendo el espectro (cada píxel), en los sistemas FPA la muestra está permanentemente recibiendo radiación en toda su superficie. Esto hace que, en este último tipo de sistemas, exista mayor contribución entre píxeles vecinos. En muestras dispersivas, como pueden ser, en mayor o menor medida, todas las muestras farmacéuticas (muestras en polvo o granulados y comprimidos), la dispersión tiene un efecto en la resolución lateral que supera de forma significativa a los fenómenos de difracción, al

menos si las partículas son mayores de 20 μm (límite de difracción para radiación NIR⁹⁵). Es por esto que en este tipo de muestras la resolución lateral se ve afectada de manera principal por los efectos de dispersión.

A pesar del conocimiento generalizado de la existencia de estos fenómenos y de la abundancia de trabajos sobre la aplicación del NIR-CI, existe muy poca información disponible de la resolución real que podemos esperar de esta técnica. Hudak *et al* (2008) establecen, siguiendo criterios teóricos, un límite inferior para la magnificación en imagen NIR, teniendo en cuenta la penetración y el límite por difracción, y obtienen un valor de 31 μm ⁹⁶. Establecen también que la información correspondiente a un píxel estará influenciada, al menos, por uno o dos píxeles vecinos. Clark *et al* (2006) realizan una interesante reflexión sobre la necesidad de estudiar y diseñar materiales estándar para la calibración de sistemas de imagen química¹⁶, mientras que Kauffman *et al* (2008) introducen un procedimiento para la fabricación de materiales estándares para su aplicación en imagen Raman⁹⁷. Sin embargo, no existen referencias que aporten valores o procedimientos para obtener la resolución de una muestra real para un sistema de imagen NIR. Tampoco han sido descritos los efectos reales que pueden tener las distintas características de la muestra en la resolución espacial.

6.2 OBJETIVOS

A lo largo de este capítulo se describe un procedimiento para medir la resolución química de una imagen NIR para diferentes materiales, haciendo incidencia en el efecto que produce las características dispersivas de la muestra. También se ha utilizado el procedimiento para comparar dos sistemas de adquisición de imágenes diferentes.

6.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO

Para estudiar la resolución química de las imágenes y el efecto que produce la dispersión sobre la misma, se ha registrado imágenes sobre tres polímeros diferentes cuyas características, así como el símbolo que los define a lo largo de estos estudios se muestran en la figura 38. De esta forma, se ha obtenido 5 fronteras que han sido denominadas I2, I3, I4, I5, I6 para ser identificadas a lo largo de este estudio. La muestra final comprende una superficie de 50*50 mm con un espesor de 20 mm, mayor que el espesor de información en todos los casos.

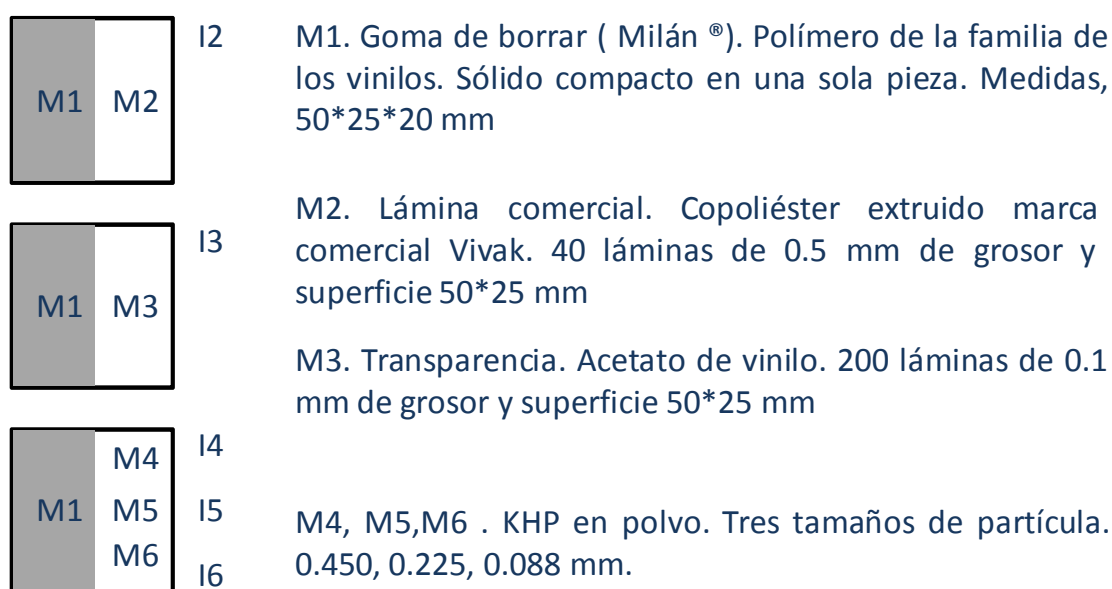


Figura 38. Conjunto de muestras para el estudio de las fronteras entre distintos sólidos.

El método utilizado para obtener la resolución de las imágenes o de los mapas de distribución será el presentado por Gardiner et al (1986)⁹⁸, que es considerado un método apropiado para estimar la resolución de una imagen química en el reciente texto dedicado a imagen Raman e Infrarroja, Infrared and Raman Spectroscopy Imaging⁹⁹, también utilizado por Sommer *et al* para obtener la resolución de imágenes Raman¹⁰⁰. La resolución se obtiene del estudio de la imagen obtenida sobre una frontera entre dos materiales sólidos. El perfil de intensidad corresponde con un perfil similar al de la figura 39, en el que el eje de las x representa una dimensión espacial

que cruza la frontera, tal como muestra la figura 39 (b). El material 1 viene representado por una Intensidad medida 1, mientras que el material 2 le corresponde una intensidad 2, para una longitud de onda determinada λ_i . La resolución viene definida por la longitud, expresada en número de píxeles, que comprende valores de intensidad que se encuentran entre el límite superior, delimitado por el 95% del valor de intensidad I1 en este ejemplo, y el límite inferior, delimitado por el 5% de del valor de intensidad. I2.

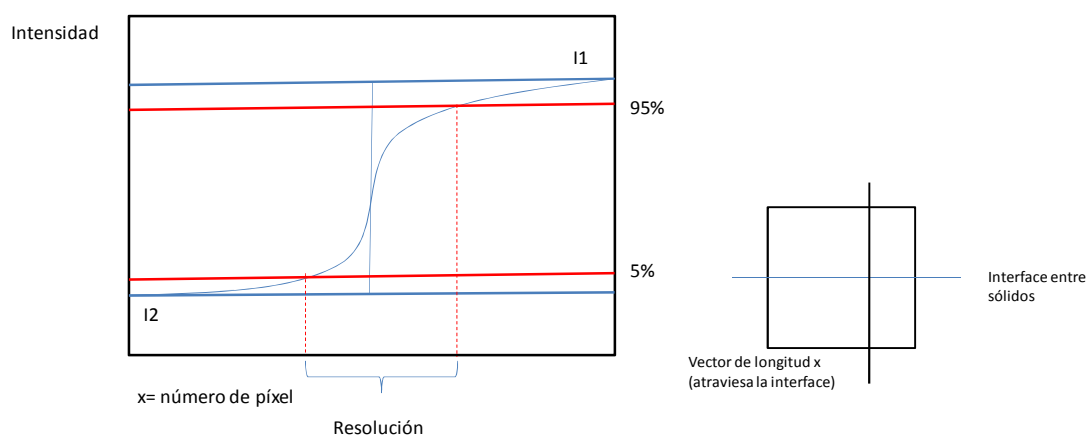


Figura 39. Método para obtener la resolución. Medidas de una frontera entre dos sólidos.

Este método será aplicado a lo largo de este trabajo sobre imágenes a una determinada longitud de onda y sobre mapas de distribución obtenidos mediante técnicas quimiométricas, demostrando así que la resolución del mapa obtenido puede depender de la información y la técnica empleada a la hora de obtenerlo.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Variación de la resolución química con la longitud de onda

Una imagen química hiperespectral obtenida a través de un equipo FPA está formada por un conjunto formado por tantas imágenes como longitudes de onda se registran. Se adquiere cada imagen por separado, para cada longitud de onda en la que la muestra presenta unas propiedades diferentes en función de su composición química. De esta forma, la resolución de cada imagen obtenida es diferente. Esto queda patente en el ejemplo de la figura 40. Se muestra imágenes obtenidas a longitudes de onda diferentes para la frontera I3.

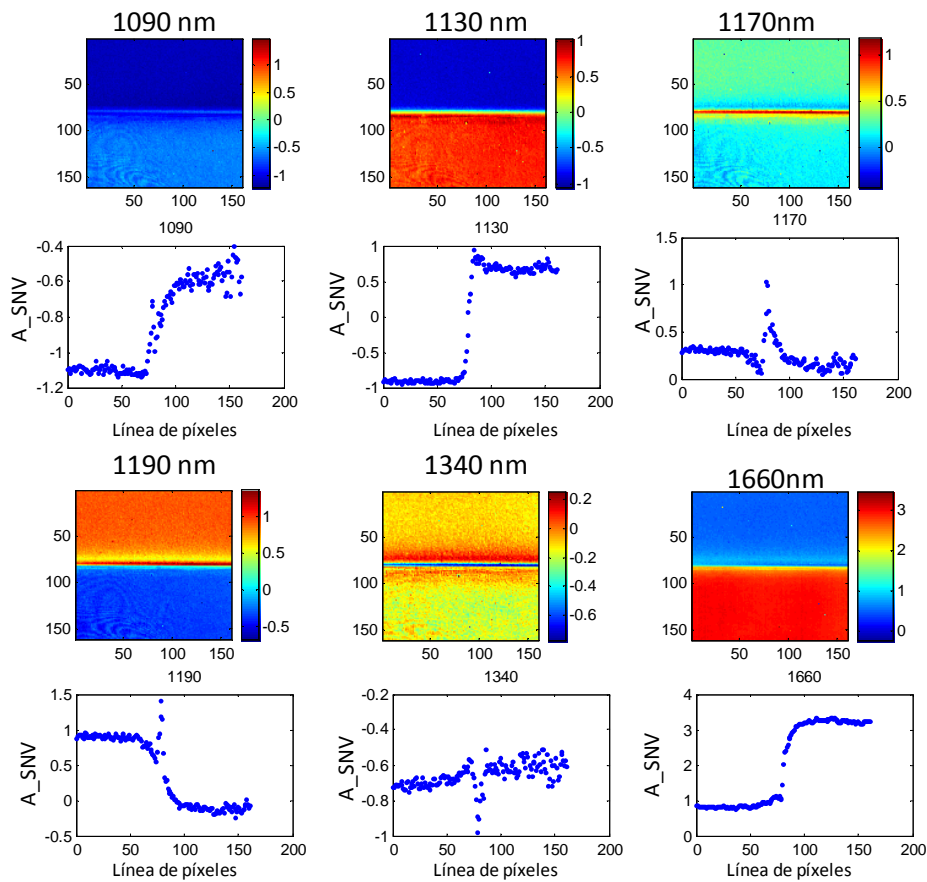


Figura 40. Frontera entre dos polímeros para distintas longitudes de onda.

El gráfico que acompaña a cada imagen representa la línea de píxeles en la posición 75 del eje de las x de cada imagen. El estudio de este gráfico permite realizar una medida objetiva de la resolución en cada línea según el método presentado en la figura 40.

El cambio de pendiente es menor y, por tanto, la resolución es mejor para la imagen obtenida a 1130 nm y similar para el resto de longitudes de onda que permiten la diferenciación de los compuestos, como puede apreciarse en la figura 40.

Tabla 12. Resolución de la frontera I2 a diferentes longitudes de onda

Longitud de onda (nm)	R(Nº píxeles)	R(mm)
1130	7	0.7
1660	17	1.7
1190	16	1.6
1390	17	1.7

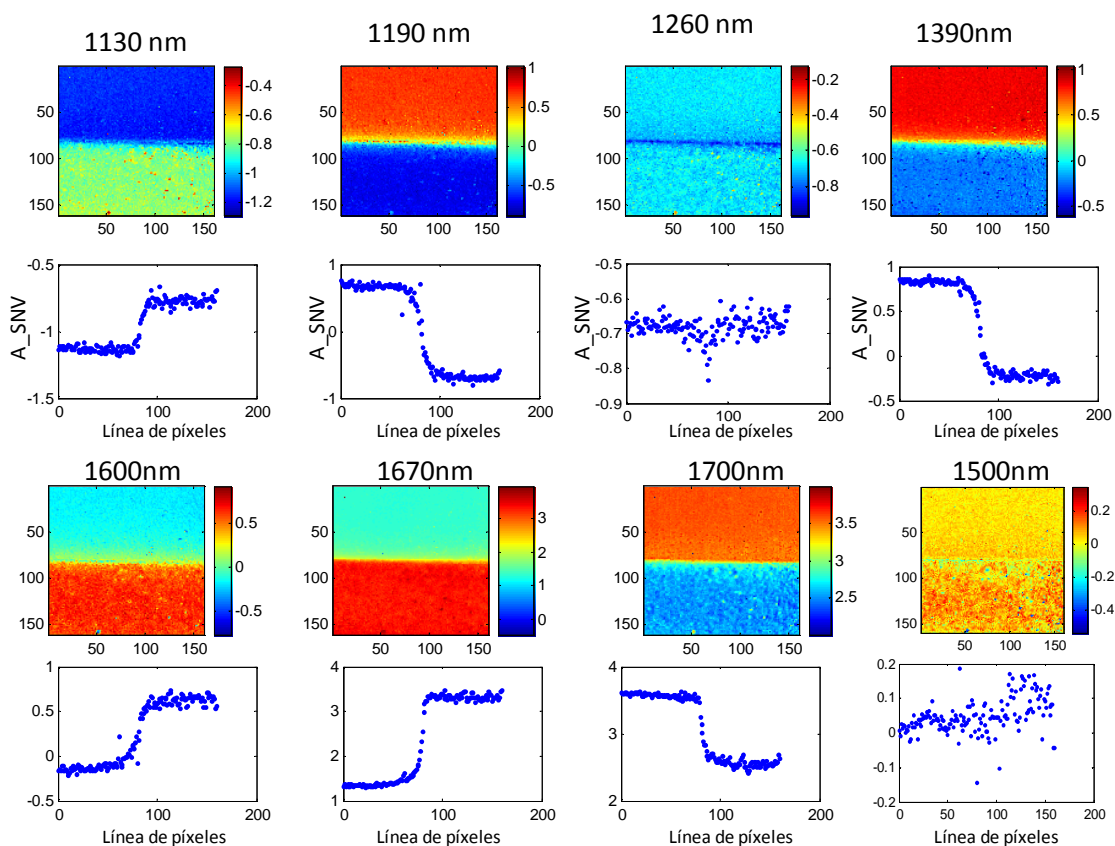


Figura 41. Imágenes de la frontera I5 obtenidas a distintas longitudes y representación del valor de los coeficientes en la línea de píxeles central ($x=75$).

En la figura 41 se muestra las imágenes obtenidas sobre la frontera I5 para algunas de las longitudes de onda características. En la tabla 13 se muestran los valores de resolución obtenidos para cada longitud de onda. Las longitudes de onda se han clasificado en dos grupos; el primer grupo corresponde con las longitudes de onda características del KHP, donde la intensidad de señal es mayor para el KHP que para el polímero. El segundo corresponde con las longitudes de onda características de la muestra m1. Se obtiene valores similares a los anteriores, alrededor de 1 mm, diferentes para cada longitud de onda.

Tabla 13. Resoluciones obtenidas para la frontera I5 a algunas longitudes de onda características.

Longitud de onda (nm)	R(N° píxeles)	R(mm)
1130	9	0.9
1600	18	1.8
1670	10	1.0
1190	16	1.6
1390	17	1.7
1700	5	0.5

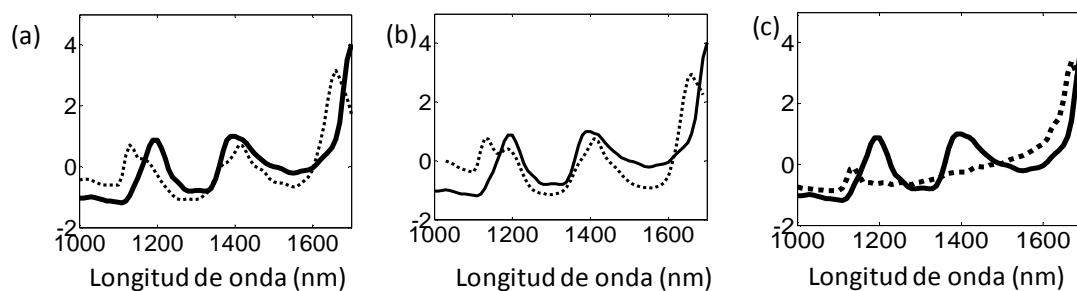


Figura 42. (a) Espectro puro del compuesto: m1 (línea continua) y m2 (línea discontinua). (b) Espectro puro del compuesto m1 (línea continua) y m3 (línea discontinua). (c) Espectro puro de la muestra m1 (línea continua) y espectro de m5 (línea discontinua).

6.4.2 Resolución de los mapas de distribución

La resolución que realmente interesa es la imagen o mapa del que se vaya a obtener la información. De esta manera, si la información se va a obtener de una longitud de

onda sencilla, bastará con determinar la resolución a esta longitud de onda. Normalmente en imagen NIR se trabaja con mapas de distribución obtenidos a través de algún método quimiométrico.

A lo largo de este trabajo se utilizará los mapas de coeficiente de correlación con un espectro puro para obtener mapas de distribución cualitativos. Se ha elegido esta herramienta para la obtención de los mapas debido a que se aplica de forma sencilla e individual a cada espectro. Esto permite trabajar con píxeles anómalos o muertos sin que tengan ninguna influencia en el global de los resultados obtenidos y, por tanto, permite una visión de la distribución de componentes sin necesidad de eliminar información. La resolución en los mapas de distribución dependerá, entre otros factores, del intervalo de longitudes de onda. En la figura 43 se presenta dos mapas de coeficiente de correlación con el espectro puro del KHP pero con distinto rango de longitudes de onda. El estudio de una de las líneas de píxeles que atraviesa la frontera permite comparar la resolución obtenida para cada intervalo del espectro. Como vemos en la figura, la resolución obtenida para el intervalo entre 1100-1300 nm es sensiblemente mayor que la obtenida para el intervalo 1500-1700 nm.

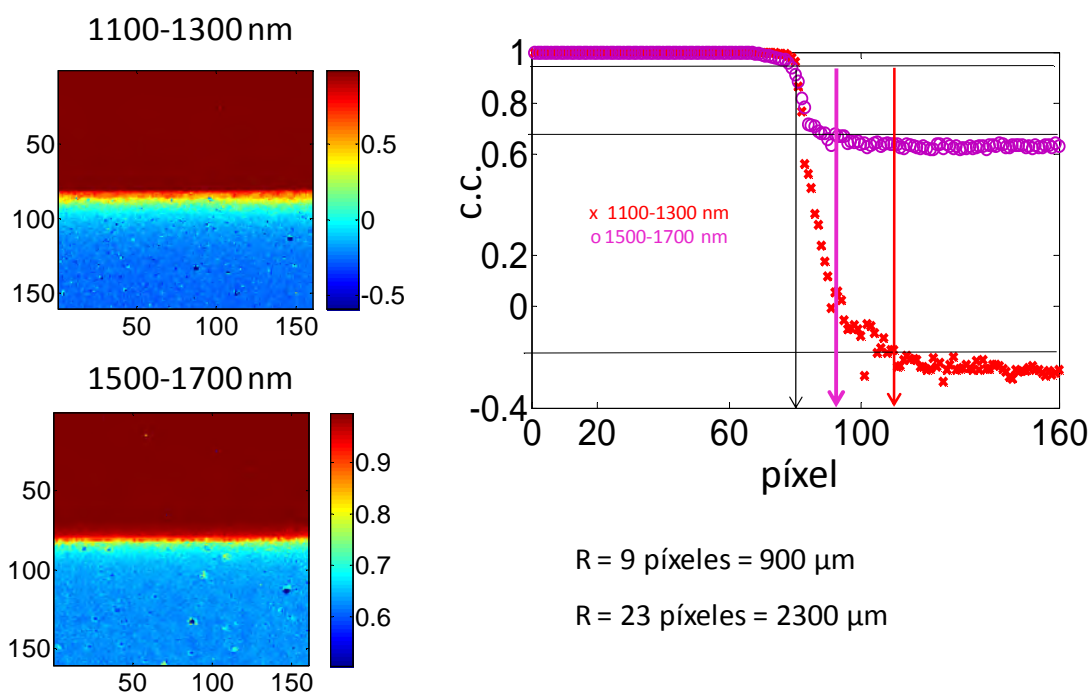


Figura 43. Mapas de correlación para la frontera 15 utilizando distintas partes del espectro. Perfil de resolución para la línea de píxeles $x=75$ para ambos mapas de correlación.

Para hacer una comparativa de diferentes materiales es fundamental, por tanto, utilizar el mismo rango de longitudes de onda. Los mapas de coeficientes de correlación expuestos a continuación se han obtenido utilizando el rango completo de longitudes de onda.

En la figura 44 se puede observar los mapas de correlación obtenidos para tres fronteras, I2, I3, I4. Los resultados obtenidos sobre la muestra I5 e I6 son prácticamente equivalentes a los obtenidos para la frontera I4 y, por tanto, no han sido representados.

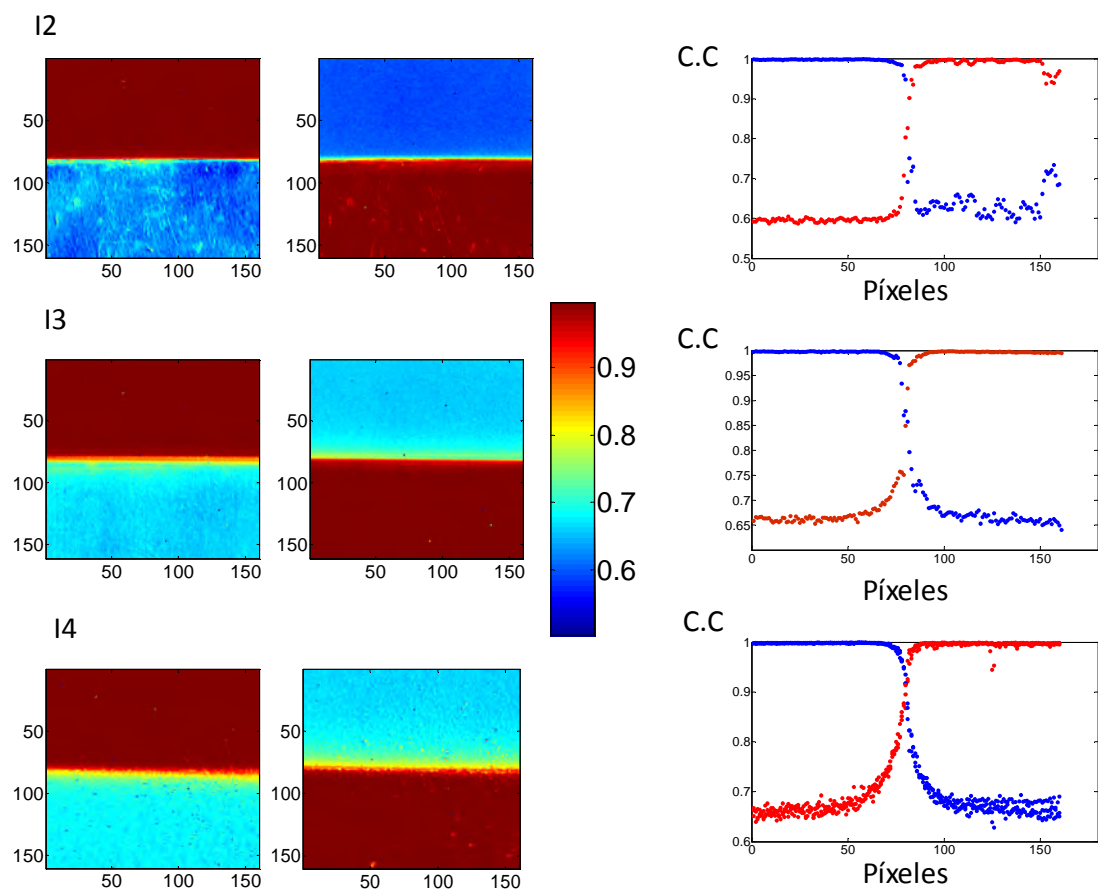


Figura 44. Mapas de correlación y perfil de valores de coeficiente de correlación a lo largo de la línea central de píxeles que atraviesa la frontera ($x = 75$) para las tres fronteras (I2, I3 e I4)

Las resoluciones obtenidas aplicando el método de Gardiner se exponen en la tabla 14. La resolución ha sido estimada para mapas de coeficiente de correlación de cada uno de los dos componentes de la frontera.

Como vemos, la resolución es peor en la muestra más dispersiva, I4, la formada por partículas de KHP. La muestra formada por más capas de polímero, I3, presenta un valor intermedio. Mientras que la muestra I2, con un número de capas menor es la que mejor resolución presenta, no obstante con un valor de alrededor de las 500 μm .

Tabla 14. Resolución obtenida para las diferentes fronteras en mapas de coeficientes de correlación con el espectro puro en el rango completo de longitudes de onda.

Frontera	R(Nº píxeles)	R(mm)
I2 m1	5	0.5
m2	7	0.7
I3 m1	14	1.4
m3	13	1.3
I4 m1	20	2
m4	22	2.2

6.4.3 Señal de un material no absorbente

En el siguiente experimento se registró la imagen de dos materiales en polvo, KHP y sacarosa, separados por un recipiente cilíndrico de vidrio con una pared de 0,5 mm de espesor. El objetivo de este experimento fue estudiar qué señal se obtiene cuando en el área de la imagen existe una zona espacial de tamaño relativamente grande que está ocupada por una sustancia no absorbente (en este caso vidrio). En la figura 45 se muestra los mapas de coeficientes de correlación obtenidos para ambos compuestos puros.

Como era de esperar, la zona de la imagen correspondiente con el material no absorbente presenta una correlación intermedia para ambos mapas de correlación con el espectro puro. Dicho de otra forma, el espectro que se obtiene en esta zona es un espectro correspondiente a una mezcla de las dos sustancias de composición no determinada. La resolución obtenida a partir de los perfiles de valores de coeficiente de correlación se corresponde casi con exactitud al espesor de sustancia no absorbente, 500 μm . Cuando se registró una imagen sobre una muestra compuesta

únicamente por sacarosa y vidrio el mapa de correlación obtenido para el compuesto puro, así como el perfil de valores de coeficientes de correlación (figura 45b) muestran muy pocas diferencias entre la zona ocupada por el vidrio y la zona ocupada por la muestra.

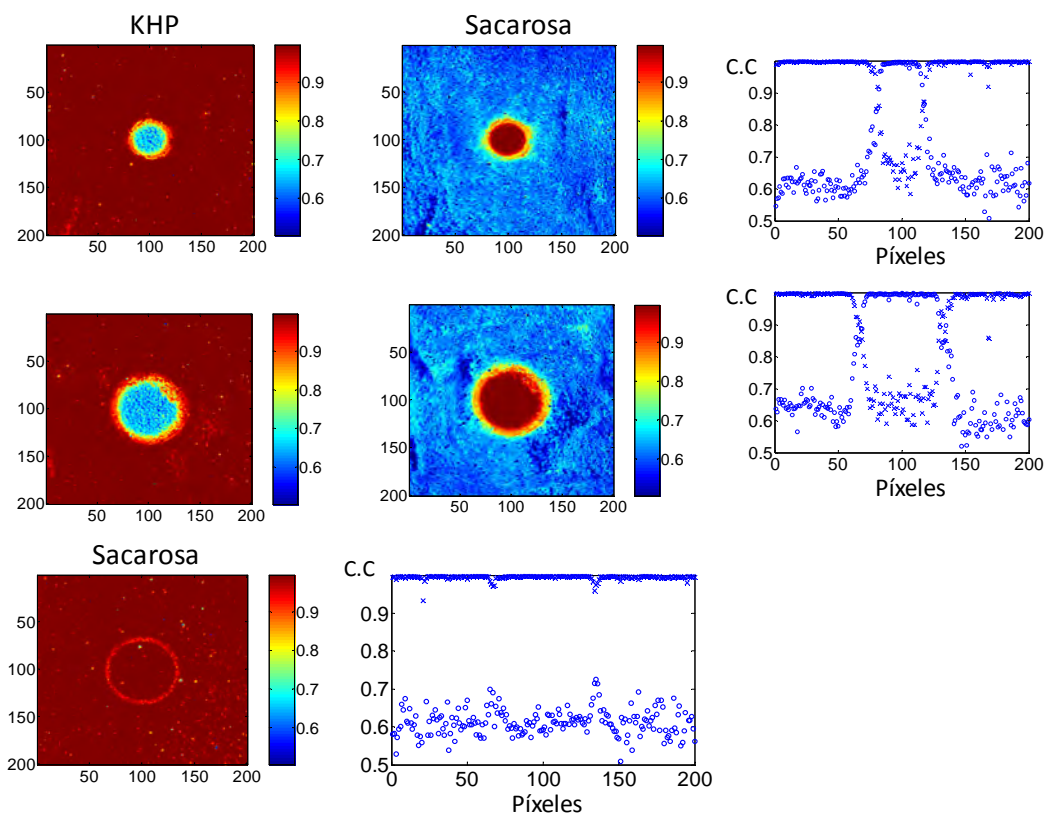


Figura 45. Mapas de correlación realizados con el espectro puro de KHP (en el exterior del círculo) y sacarosa (en el interior) separados por una pared de vidrio boro silicato (no absorbente en NIR) de 500 μm de espesor. Mapa de correlación para una muestra preparada únicamente con sacarosa y la pared de vidrio boro silicato.

Estos resultados expresan de nuevo la necesidad de conocer perfectamente la muestra y tener en cuenta sus características a la hora de interpretar imágenes obtenidas con un instrumento de NIR-CI.

6.4.4 Resolución entre dos materiales en polvo.

Para obtener la resolución existente entre dos muestras en polvo, fue necesario desarrollar un procedimiento alternativo. Para ello, se tomó una cubeta cuadrada de

vidrio de una altura suficiente para asegurar que el espesor de muestras es suficiente para que no se produzcan pérdidas por transmisión. Se dividió esta cubeta en dos por medio de una capa acetato de polivinilo (m3) de 100 μm de espesor, la cual actúa de separador entre las dos muestras. La presencia de este separador es esencial en la determinación de la resolución entre sustancias en polvo para asegurar que no hay efectos de dispersión de un polvo en el otro. Por los experimentos previos de penetración, era conocido que el acetato transparente presenta unos valores muy bajos de absorbancia, no obstante una vía clara de mejora en el experimento es utilizar como separador un material no absorbente. Este método es útil para determinar valores de resolución mayores a las 100 μm (espesor del separador). Una resolución menor daría como resultado una separación nítida de los tres componentes de la imagen (separador y dos muestras).

De esta manera se estudió la resolución del equipo para el análisis de muestras de dos muestras en polvo, sacarosa y KHP, con tres tamaños de partícula (0,45, 0,225, 0,088 mm). Los espectros puros de la sacarosa, el KHP, y el polímero que sirve de separador se muestran a continuación, en la figura 46.

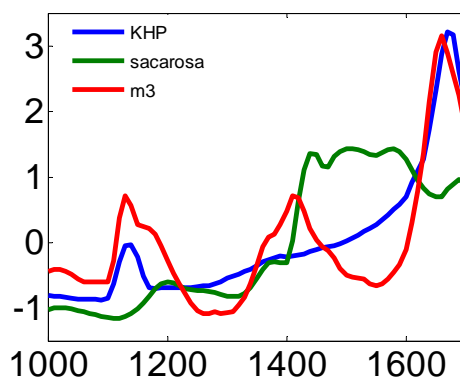


Figura 46. Espectros puros del KHP y la sacarosa ($d_p = 0.225$ mm) y de la frontera de polímero m3 con un espesor de 0.1 mm registrados con el instrumento Malvern. SyNIRgi.

La figura 47 muestra los mapas de correlación obtenidos para ambos componentes, los espectros alrededor de la frontera, y una de las líneas de píxeles utilizadas para obtener la resolución. Los mapas de correlación permiten detectar algún desborde de una de la muestra a través de la frontera. Estas líneas han de ser evitadas a la hora de determinar la resolución. Los espectros representados alrededor de frontera permiten

observar cómo existe influencia de los picos característicos de ambas sustancias en espectros situados al otro lado del separador de polímero. La fila de espectros que corresponde con la capa de polímero muestra un espectro mezcla de los tres espectros puros, aunque los espectros inmediatamente situados alrededor de la frontera muestran influencia de la otra sustancia en polvo, pero no del separador. Los valores de resolución obtenidos son en los tres casos muy similares alrededor de 15 píxeles (1.5 mm). No se observa una tendencia clara en la resolución para los diferentes tamaños de partícula. Esto hace pensar que esta variable tiene un efecto poco significativo o, al menos, del mismo orden que el error de estimación asumido en el método para obtener la resolución.

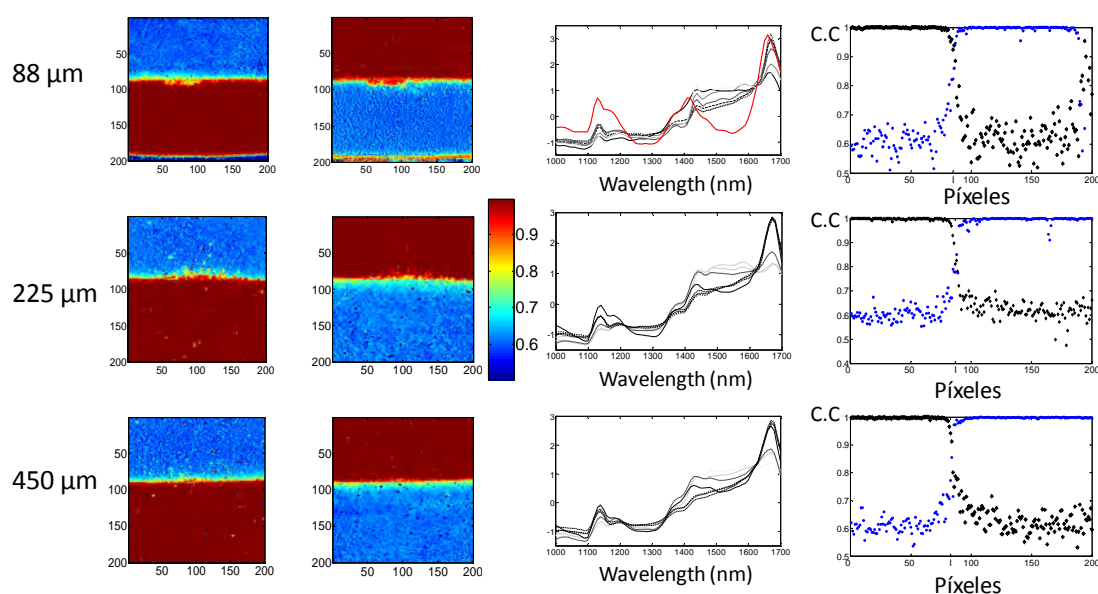


Figura 47. Mapas de correlación, espectros alrededor de la frontera y línea de valores de coeficiente de correlación que atraviesa la frontera en la línea píxeles $x=75$, para imágenes obtenidas sobre una muestra formada por sacarosa y KHP separados por una lámina de acetato de polivinilo (m_3) de 100 μm de espesor. De arriba abajo, tres tamaños de partícula 88, 225, 450 μm, el mismo para ambos productos. Imágenes registradas en el instrumento de Malvern SyNIRgi

6.4.5 Comparativa Prototipo Think Spectrally – Malvern SyNIR

En este estudio, se ha aplicado la metodología presentada anteriormente para determinar la resolución de imágenes obtenidas con el prototipo TS y con el instrumento comercial de Malvern SyNIRgi, con objeto de realizar una comparativa objetiva entre ambos.

En primer lugar, se ha comparado imágenes obtenidas sobre la frontera I4. En la figura 48 se muestran los resultados obtenidos para dos longitudes de onda características, 1400 y 1700 nm. Como vemos existen diferencias apreciables entre ambos dispositivos.

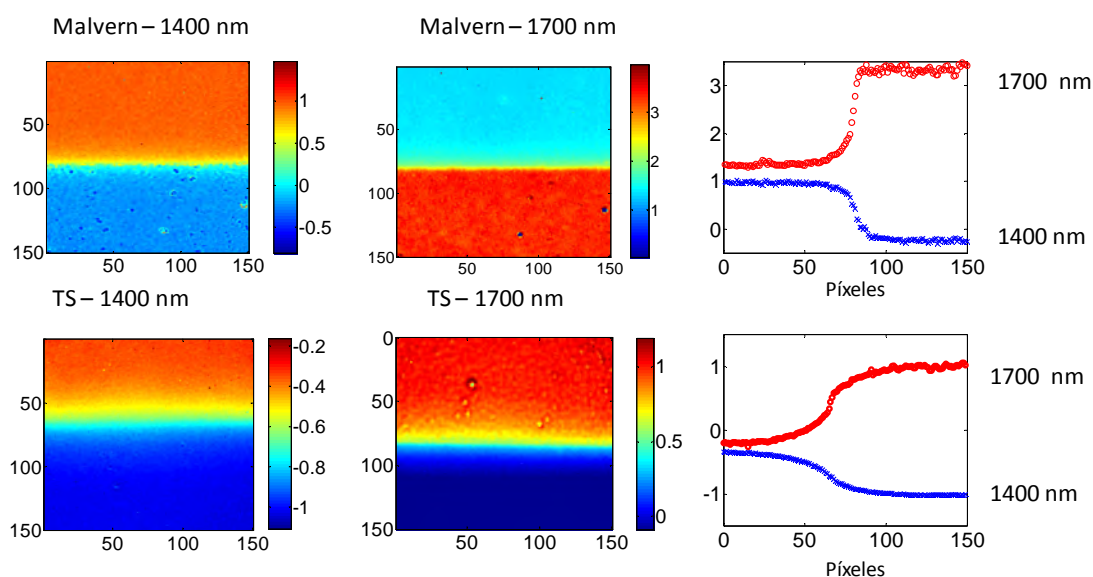


Figura 48. Comparativa en el estudio de la frontera I4 para los dos equipos FPA. Imágenes obtenidas a dos longitudes de onda características 1400 y 1700 nm. En la fila superior imágenes obtenidas con el equipo Malvern SyNIRgi y perfil de intensidades para una línea de píxeles correspondiente con $x=75$. En la columna inferior imágenes obtenidas con el prototipo y perfil de intensidades para una línea de píxeles correspondiente con $y=75$.

En la figura 49 (a, b) se ha representado los mapas de correlación con respecto al espectro puro de cada muestra (figura 49c) y obtenido de la propia imagen, realizando una media de los espectros suficientemente alejados de la frontera. Para obtener resultados representativos, se ha tomado el mismo rango de longitudes de onda en las

dos imágenes. La figura 49(c, d) muestra los espectros situados alrededor de la frontera. La figura 49f es la representación de las líneas de píxel que atraviesan la frontera en la posición $x=75$ y que permiten obtener los valores de resolución, alrededor de 17 píxeles (1,7 mm) para la imagen obtenida con la cámara Malvern SyNIRgi y aproximadamente el doble (32 píxeles, 3,2 mm) para el prototipo. Esta pérdida de resolución no tiene que ver con las características de la muestra o con el rango del espectro utilizado, ya que son los mismos en ambas imágenes. Son atribuibles, por tanto, a características inherentes al prototipo diseñado. De esta forma, por medio de este procedimiento se ha podido establecer las diferencias en resolución real de este dispositivo.

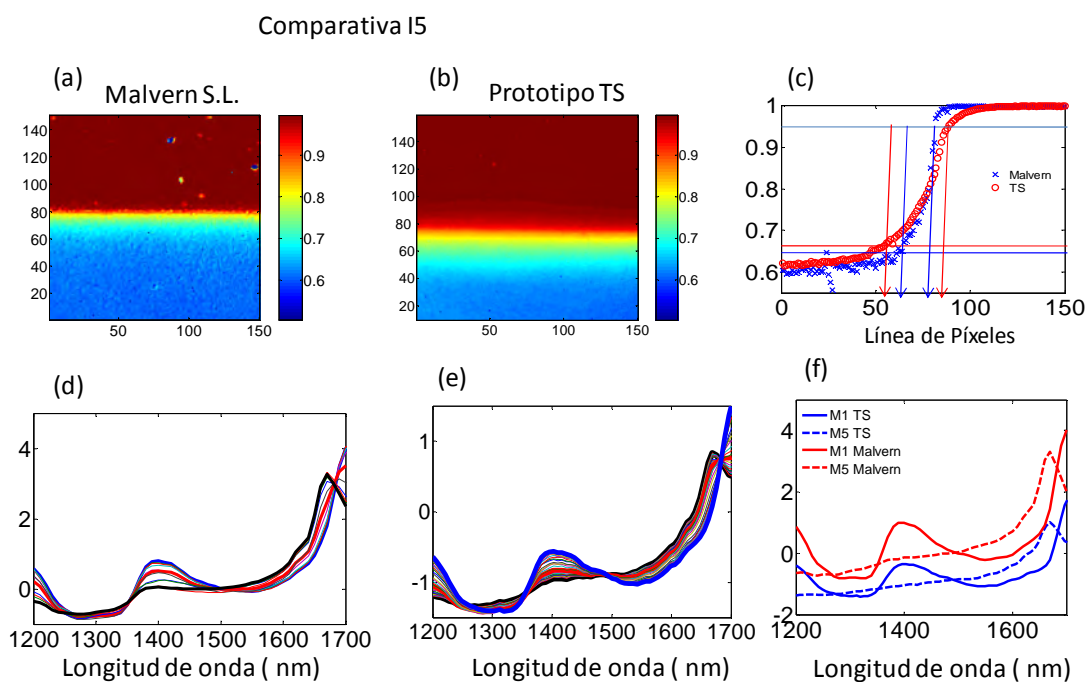


Figura 49. Mapas de coeficiente de correlación con el espectro puro del KHP para imágenes obtenidas con ambos instrumentos sobre la frontera I5. (a) Instrumento de Malvern SyNIRgi, (b) Prototipo TS, (c) comparativa de valores de coeficiente de correlación alrededor de la línea de píxeles $x= 75$. (d) y (e) espectros en las proximidades de la frontera. (f) Espectros puros de las mezclas en ambos instrumentos.

Se repitió el experimento para estimar la resolución entre dos muestras en polvo con el prototipo TS. La figura 50 muestra los espectros puros utilizados para obtener los mapas de coeficiente de correlación, obtenidos a partir de la propia imagen a partir de una media de los valores suficientemente alejados de la frontera. También se muestra

el espectro de acetato (m3) utilizado como separador, obtenido previamente mediante el registro de una capa suficientemente gruesa de este material.

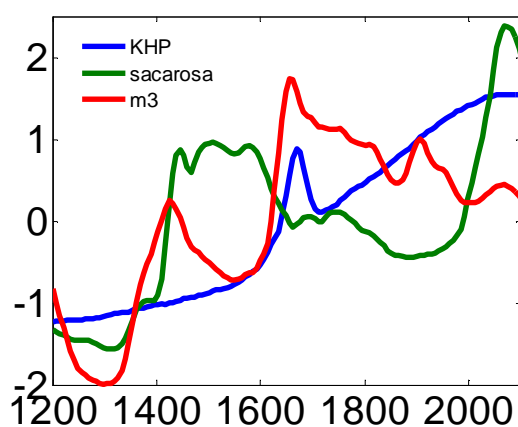


Figura 50. Espectros puros para el KHP y la sacarosa con tamaño de partícula promedio, $d_p = 0.225$ mm.

Los resultados se muestran en la figura 51. Los mapas de correlación muestran, nuevamente, una pérdida de resolución en el prototipo TS frente al dispositivo comercial Malvern SyNIRgi. La resolución obtenida en las imágenes para los tres tamaños de partícula diferentes muestran prácticamente la misma resolución, alrededor de 30 píxeles (3 mm), casi el doble de la obtenida para el equipo Malvern SyNIRgi, alrededor de 15 píxeles (1.5 mm). En la figura 51 se muestran también los espectros completos alrededor de cada frontera. En estas representaciones se observa claramente cómo se puede encontrar contribuciones de un pico característico en espectros situados espacialmente varios píxeles al otro lado de la frontera. En este caso también es de destacar que el separador de polímero no se detecta, ni con el espectro puro, ni con alguna influencia en el espectro central mezcla de los espectros de sacarosa y KHP.

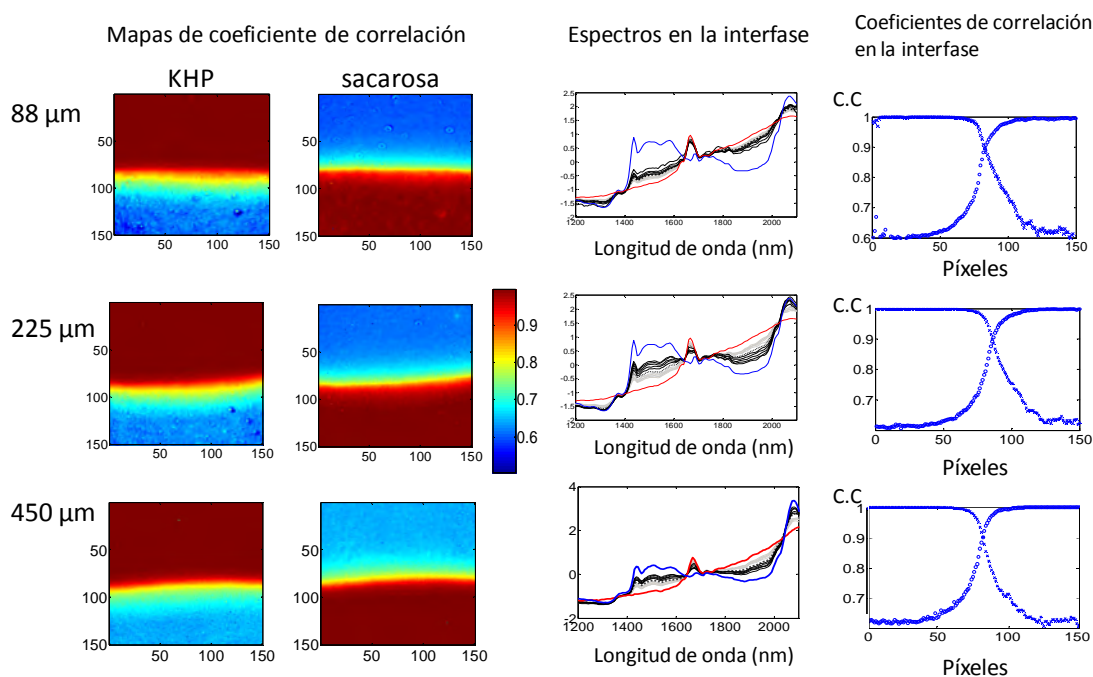


Figura 51. Mapas de correlación, espectros alrededor de la frontera y línea de valores de coeficiente de correlación para imágenes obtenidas sobre una muestra formada por sacarosa y KHP separados por una lámina de acetato de polivinilo (m3) de 100 μm de espesor. De arriba abajo, tres tamaños de partícula 88, 225, 450 μm, el mismo para ambos productos. Prototipo TS

6.4.6 Imágenes de partículas poliméricas

En el siguiente ejemplo se pretende mostrar el efecto real que puede tener una pérdida de resolución en la interpretación de los resultados obtenidos en un análisis mediante imagen NIR. Para ello, se ha registrado una mezcla de dos resinas de intercambio iónico de un tamaño de partícula relativamente grande (alrededor de las 500 μm), con los dos equipos FPA, el comercial de Malvern SyNIRgi y el prototipo TS. Las dos resinas son de características ópticas diferentes. La resina que denominamos R1 está formada por partículas esféricas y opacas, mientras que la resina que denominamos R2 está formada por partículas de forma irregular y apreciablemente translúcidas.

En la figura 52 se muestran dos mapas de correlación obtenidos siguiendo el mismo procedimiento para imágenes registradas sobre una mezcla de las dos resinas. Para obtener los mapas de distribución se ha seleccionado un espectro del centro de una de

las partículas de la resina R1. Como es apreciable en la figura 52, ambos mapas de correlación obtenidos muestran la distribución de las partículas. El mapa de distribución obtenido para el prototipo muestra una pérdida de contraste evidente, aunque también efectos de desenfoque. Como vemos en los valores de coeficiente de correlación de ambas figuras, los espectros en la imagen obtenida con el prototipo TS muestran unos valores de correlación mucho mayores, alrededor de 0.99-0.98 para la mayoría de la imagen, mientras que la imagen obtenida con el sistema Malvern SyNIRgi presenta unos valores alrededor de 0.9–0.8 para la mayoría de los píxeles. Este efecto queda mejor ilustrado en la figura 53, dónde se muestran los espectros utilizados para realizar los mapas de distribución.

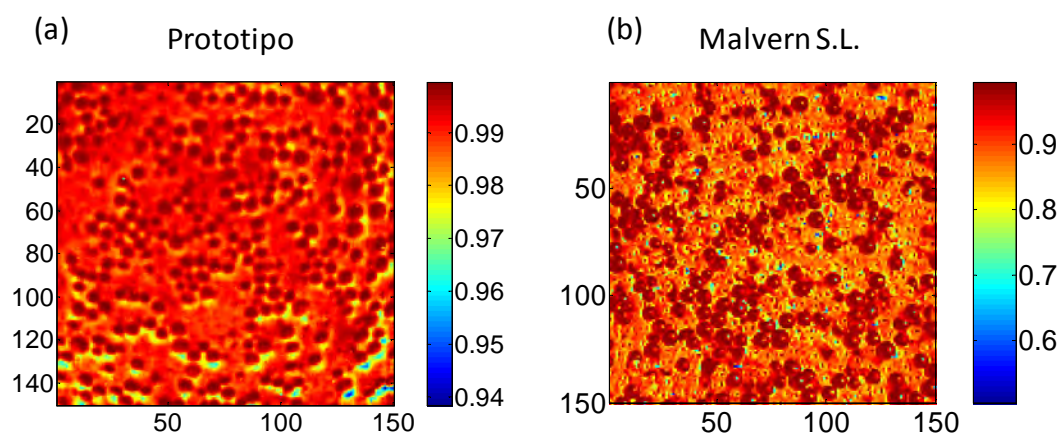


Figura 52. (a) mapa de correlación para una mezcla de las dos resinas de intercambio iónico utilizando una imagen obtenida con el prototipo TS y realizando la correlación con el espectro correspondiente a la posición [24, 52] (centro de una partícula de R1). (b) mapa de correlación para una mezcla de las dos resinas de intercambio iónico utilizando una imagen obtenida con el instrumento de Malvern SyNIRgi y realizando la correlación con el espectro correspondiente a la posición [111, 63] (centro de una partícula de R1).

En la figura 53a se muestran los dos espectros obtenidos para dos zonas de la imagen. En línea continua se representa el espectro obtenido para una partícula de R1, en concreto el espectro del píxel en la posición [24, 52] y, en línea discontinua, el espectro obtenido para una zona de partículas de la resina R2, en concreto el espectro situado en el píxel [111, 63]. En la figura 53b se muestra, sin embargo, el espectro puro de cada resina, obtenido cuando se registra una imagen de cada resina por separado. Como es visualmente apreciable, los espectros obtenidos al registrar la mezcla de las resinas en el prototipo TS son muy parecidos y reflejan una mezcla de proporciones

desconocidas de ambas resinas. En ningún caso, en ninguno de los píxeles de la imagen registrada con el prototipo TS se puede obtener el espectro puro de ninguna de las dos resinas. Este efecto es debido a la pérdida de resolución que presenta este dispositivo, y que se ve maximizada por los efectos de dispersión de la muestra.

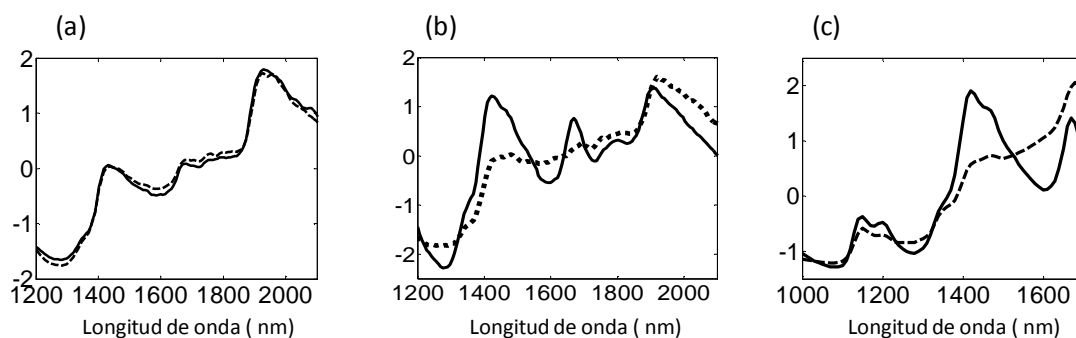


Figura 53. (a) espectros de las dos resinas contenidos en la imagen correspondiente al prototipo mostrada en la figura 16, utilizados para realizar el mapa de distribución, R1 línea sólida, R2 línea discontinua. (b) Espectros puros de las resinas registrados con el prototipo. (c) espectros puros de las resinas registrados con el instrumental de Malvern SyNIRgi registrados en la mezcla, que coinciden con el espectro puro obtenido de forma aislada.

En la figura 53c se muestran los espectros que representan los dos tipos de partícula en el mapa de correlación mostrado en la figura 52b. En este caso, para el dispositivo Malvern SyNIRgi, los espectros obtenidos son prácticamente equivalentes a los espectros puros registrados de forma separada. Este hecho demuestra que la resolución real es adecuada para estudiar este sistema de partículas. Basándonos en los resultados de resolución real obtenidos a lo largo de este capítulo, se puede concluir que disminuyendo el tamaño de partícula del experimento, necesariamente, efectos similares aparecerían también en el instrumento Malvern SyNIRgi. La pérdida de resolución debida a razones de carácter técnico del prototipo TS produce un efecto de magnificación en otros efectos, como el carácter dispersivo de la muestra.

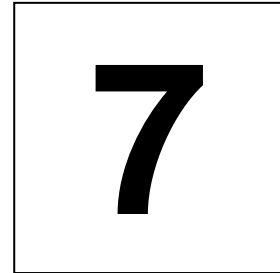
Es evidente que este tipo de pérdida de resolución conduce a errores importantes (en función del rango de resolución) en la aplicación de cualquier herramienta quimiométrica de carácter cuantitativo a datos NIR-Cl. Una de las conclusiones importantes de este capítulo es la necesidad de conocer las características de la

muestra y del instrumento y determinar la resolución real del mismo antes de aplicar herramientas quimiométricas cuantitativas.

6.4.7 Errores asociados a la determinación de la resolución. Replicado y utilización de todas las filas

Hay diferentes errores asociados a la estimación de la resolución siguiendo el método presentado anteriormente. Por un lado existen las desviaciones producidas por las posibles irregularidades en la frontera. Para minimizar este error se puede realizar una media de la resolución obtenida a lo largo de la frontera para cada línea de píxeles de la imagen, eliminando, si es necesario, los valores que se desvíen de forma notable del valor medio. Otra posibilidad es realizar una selección aleatoria de un número fijo de filas y realizar la media. Este es el procedimiento mediante el que se ha obtenido los valores numéricos de resolución durante este capítulo. El valor mostrado es una media de 15 filas seleccionadas aleatoriamente. En los casos en los que se observó irregularidades en la frontera mediante una inspección visual de los mapas de distribución, se eliminó esta zona de la selección aleatoria.

Otro error es el asociado con el error sistemático y la precisión de la técnica. Para minimizarlo se puede realizar varias réplicas de una misma imagen y aplicar el método a estas imágenes por separado. En nuestro caso se comprobó, mediante algunas réplicas aisladas, que la reproducibilidad entre imágenes era considerablemente mayor que otros efectos estudiados y por tanto se decidió no realizar réplicas de cada imagen.



MAPAS DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN CON CONTRASTE MEJORADO

7.1 Introducción	108
7.2 Objetivos.....	108
7.3 Metodología de trabajo.....	109
7.4 Resultados	114

7.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen pocas aplicaciones informáticas específicas para el tratamiento de imagen NIR. Además, éstas suelen ser muy opacas a la hora de ofrecer información al usuario de los algoritmos, funciones estadísticas y matemáticas que utilizan y significan una inversión económica importante. La tendencia general es utilizar algún software de tratamiento de imagen que permita realizar el desdoblamiento de la matriz tridimensional de datos y utilizar posteriormente algún software específico para el tratamiento de espectros NIR. Esto implica un gasto importante tanto en tiempo como en dinero. Por esto se consideró un punto esencial en el desarrollo del prototipo TS demostrar también la posibilidad de generar, de una forma sencilla, algoritmos que combinen análisis de imagen clásico con quimiometría.

De forma paralela a la puesta en marcha y evaluación del prototipo, se ha llevado a cabo el desarrollo de herramientas para el tratamiento de datos obtenidos en NIR-CI. Estas herramientas han sido elaboradas en forma de rutinas programadas para ser ejecutadas en MatLab, dado que el programa de adquisición del prototipo está programado en dicho software.

El primer paso, llevado a cabo en este grupo de investigación, aunque fuera del proyecto de esta tesis, fue el desarrollo de una sencilla herramienta para obtener mapas de coeficiente de correlación utilizando un espectro de un componente puro²².

7.2 OBJETIVOS

En el trabajo que se expone a continuación, se ha desarrollado una metodología útil para obtener información de una imagen (o conjunto de imágenes), sin disponer de ninguna información previa sobre ella, a través del uso de coeficientes de correlación,

análisis de componentes principales (PCA) y la aplicación de una función, propuesta específicamente para mapas de coeficientes de correlación, que sirve para mejorar el contraste de los mismos.

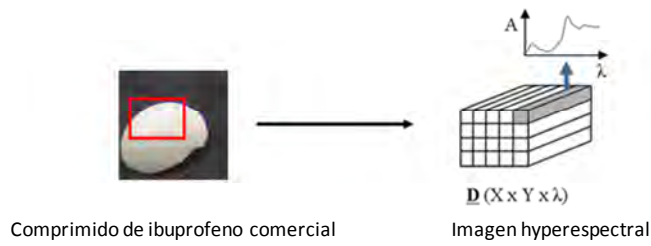
7.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO

La metodología propuesta a lo largo de este capítulo puede resumirse en 3 etapas fundamentales:

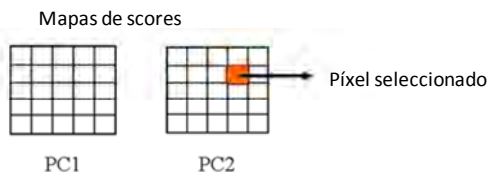
- la selección de un píxel o una zona de interés (Region of Interest, ROI) de la imagen.
- la obtención de los mapas de correlación correspondientes.
- la obtención, si es necesario, de los mapas de correlación de contraste mejorado.

Tras obtener los mapas de correlación, uno de los procedimientos habituales es transformarlos en imágenes binarias, es decir, imágenes formadas únicamente por dos valores numéricos 0 ó 1, las cuales permiten una computación más rápida y sencilla.

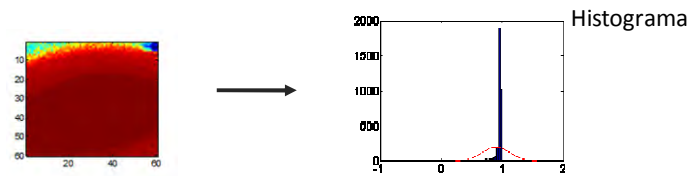
0) Adquisición y tratamiento previo de la imagen



1) Análisis de componentes principales – Selección del píxel o la zona de interés (ROI)



2) Mapas de correlación utilizando el espectro del píxel seleccionado



3) Mapas de correlación de contraste mejorado

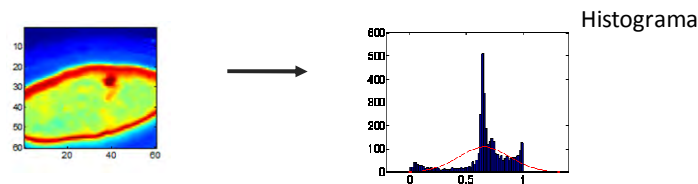


Figura 54. Esquema de la metodología propuesta.

7.3.1 Estructura de la imagen: Pretratamientos

La estructura de una imagen NIR es la de un cubo tridimensional de datos, donde x e y se refieren a las coordenadas espaciales de la imagen y λ a las longitudes de onda¹⁰¹.

Es decir, cada píxel de la imagen, $a(x, y)$ corresponde con un espectro en las coordenadas espaciales (x, y) con la estructura de un vector de dimensiones $(1 \times \lambda)$ (Figura 54).

Hay que realizar dos transformaciones matemáticas previas antes de aplicar cualquier otra herramienta quimiométrica o de análisis de imagen: El desdoblamiento de la matriz y el pretratamiento de la información espectral, fundamental en espectroscopia NIR. El desdoblamiento de la matriz es necesario para poder aplicar el análisis de componentes principales según el algoritmo clásico empleado en espectroscopia NIR. Los datos desdoblados D tendrán la estructura $(XY \times \lambda)$. Aplicar pretratamientos como el Standard Normal Variate (SNV), suavizados o derivadas (algoritmos de Savitzky-Golay o Norris), Multiplicative Scatter Correction(MSC)^{102,103} es necesario para minimizar fenómenos que interfieren en la señal química en espectroscopia NIR, tales como dispersión, ruido espacial, etc. La figura 54 esquematiza el procedimiento descrito.

7.3.2 Visualización inicial: Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica no supervisada de visualización y clasificación cuya aplicabilidad ha quedado sobradamente probada en análisis de imagen^{104,105,106}. En este caso, el PCA ha sido utilizado únicamente para obtener una primera aproximación visual de las fuentes de variabilidad que aparecen en la imagen. Esto se consigue mediante los mapas de *scores*, que se obtienen devolviendo el score obtenido para cada componente principal a su posición original de la imagen. De esta forma se obtienen tantos mapas de distribución como componentes principales hay en el análisis de PCA. Los *loadings* están relacionados con la información espectral, aunque debido a la presencia de distintas fuentes de variabilidad y al número particularmente grande de espectros analizados en análisis NIR-CI, normalmente es difícil asociar un loading con un espectro puro de un componente. Sin embargo, el PCA es uno de los métodos más directos y sencillos para obtener una idea inicial de la imagen y seleccionar un píxel o una zona de interés (ROI) para utilizarlo posteriormente para realizar los coeficientes de correlación (Figura 54, paso 1). A lo largo de este capítulo se denominará espectro objetivo al espectro elegido para realizar la correlación, ya sea el correspondiente con un píxel individual o el espectro medio de una zona de interés (ROI).

7.3.3 Mapas de correlación

Una vez se ha seleccionado el píxel de interés, $a(x', y')$ se calcula el coeficiente de correlación entre cada espectro en la imagen $b(x', y')$ y el píxel seleccionado $a(x', y')$, obteniendo la matriz $R(XxY)$, de coeficientes de correlación. El coeficiente de correlación utilizado a lo largo de todo este trabajo es el coeficiente de Pearson (ecuación 6), donde $Cov(a_{x'y'}, b_{xy})$ viene definida por la ecuación 29. A través de la ecuación 30 se realiza un escalado simple de los coeficientes entre 0 y 1.

$$\rho_{xy} = \frac{Cov(a_{x'y'}, b_{xy})}{\sigma_{a_{x'y'}} \sigma_{b_{xy}}} \quad (6)$$

$$Cov(a_{x'y'}, b_{xy}) = \frac{1}{(\lambda - 1)} \sum_{\lambda=1}^{\lambda} (a_{x'y'} - \bar{a}_{x'y'}) (b_{x'y'} - \bar{b}_{x'y'}) \quad (29)$$

$$\rho'_{xy} = \frac{(\rho_{xy} - \min(R))}{(\max(R) - \min(R))} \quad (30)$$

7.3.4 Mejora de contraste en los mapas de correlación

La información que ofrecen los mapas de correlación puede ser difícil de interpretar, principalmente debido a que la relación entre coeficientes de correlación y la concentración de API no es lineal y los gradientes de concentración presentes en un comprimido o muestra en polvo pueden ser muy variables. Además, es relativamente frecuente que la correlación entre píxeles sea alta, incluso en sistemas no homogéneos (mezclas de los mismos compuestos a distinta proporción), por lo que la distribución de los coeficientes de correlación puede dar la falsa apariencia de uniformidad. En este trabajo se propone la utilización de una función sencilla (ecuación 31), cuya misión es la de obtener una mayor discriminación entre los coeficientes más próximos a 1. Aplicando esta ecuación, y escalando entre 0 y 1 nuevamente, se obtiene una nueva distribución en el que las diferencias entre los coeficientes de correlación más

próximos a 1 se han amplificado. El grado de discriminación se controla a través del parámetro alfa de la ecuación 31.

$$e_{xy} = \left(\frac{\rho'_{xy} - \min(R')}{(\max(R') + \alpha) - \rho'_{xy}} \right) \quad (31)$$

Este parámetro puede tomar valores entre 0 (máxima discriminación) y 1 (equivalente al coeficiente de correlación sin transformar), debiéndose optimizar en cada caso. Más adelante se presentan unas sugerencias para la selección de sus valores.

7.3.5 Imágenes Binarias

En análisis de imagen, para poder obtener conclusiones estadísticas sobre las partículas o agregados que forman la muestra, se suele transformar la imagen a una escala simple de valores lógicos 0 y 1. De esta forma la visualización y la computación de información contenida en una imagen relativamente grande puede realizarse de una forma rápida y sencilla, de manera que puede llevarse a cabo funciones de recuento de partículas, reconocimiento de formas, obtención del diámetro promedio, etc. Para obtener una imagen binaria a partir de un mapa de coeficientes de correlación hay que fijar un valor umbral en la escala de los coeficientes para separar los 0 de los 1. Sin embargo, fijar este valor no es una tarea fácil, ya que, como se ha dicho anteriormente, la relación entre coeficientes de correlación y concentración de API no es lineal y, entre otros factores, puede depender de la resolución de trabajo, del tipo de muestra o de factores técnicos del instrumento. No existe ningún método objetivo para seleccionar este valor de corte y por tanto queda a juicio del analista fijar su valor. La función de mejora de contraste pretende servir de ayuda a la hora de seleccionar este valor, ya que permite obtener, de una manera sencilla, distintas distribuciones que enfatizan en mayor o menor grado las diferencias entre el espectro utilizado para realizar los coeficientes y el resto de espectros en la imagen.

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Estudio de la sección transversal de un comprimido comercial de ibuprofeno

La imagen elegida para ejemplificar la metodología propuesta se registró sobre la sección transversal de un comprimido comercial de ibuprofeno, tal como se muestra en la figura 54, punto 0, utilizando el instrumento descrito en el apartado 3.2.2, es decir, un instrumento de mapeo por puntos, en el que el tamaño de píxel fue de 70 μm de lado. La imagen contiene información de la sección transversal de un comprimido (perpendicular a los detectores NIR), es decir sobre la parte central correspondiente a la mezcla de ibuprofeno y excipientes, y un anillo que rodea a la misma, el recubrimiento. También contiene información de la superficie externa de la pastilla (zona curva), y de la cubeta de metal utilizada para transportar el comprimido. Uno de los puntos a favor de esta metodología es que se puede aplicar en presencia de píxeles anómalos, ya sean píxeles muertos, ruido perteneciente a partes que no absorben (como el recipiente de metal) o espectros extraños en general, permitiendo de esta forma una visión rápida de la muestra.

7.4.2 Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales aporta información valiosa de la imagen registrada, como puede verse en la figura 55. El PCA se ha calculado sobre los espectros previamente centrados. Se ha representado los mapas de *scores* para los 4 primeros componentes. El primer factor contiene más de un 70% de la variabilidad del modelo, mientras que los 4 primeros un 80%.

Los *loadings* espectrales obtenidos son difíciles de asociar con el espectro puro de cualquiera de los componentes. Los mapas de distribución del primer, segundo y tercer componente remarcan dos zonas principales en la imagen: la zona central de la

imagen (PC1) y el área que rodea a esta zona (PC2 y PC3). Esto concuerda con la inspección visual del comprimido que se ha tomado como muestra (figura 54). El análisis de componentes principales también ha detectado la presencia de un punto singular en un sector del área escaneada, señalado con un círculo en la figura 55, diferente al resto de la zona API. En el siguiente apartado se ha aplicado la metodología anteriormente descrita para, utilizando la información espectral, detectar la naturaleza y la procedencia de este punto discordante.

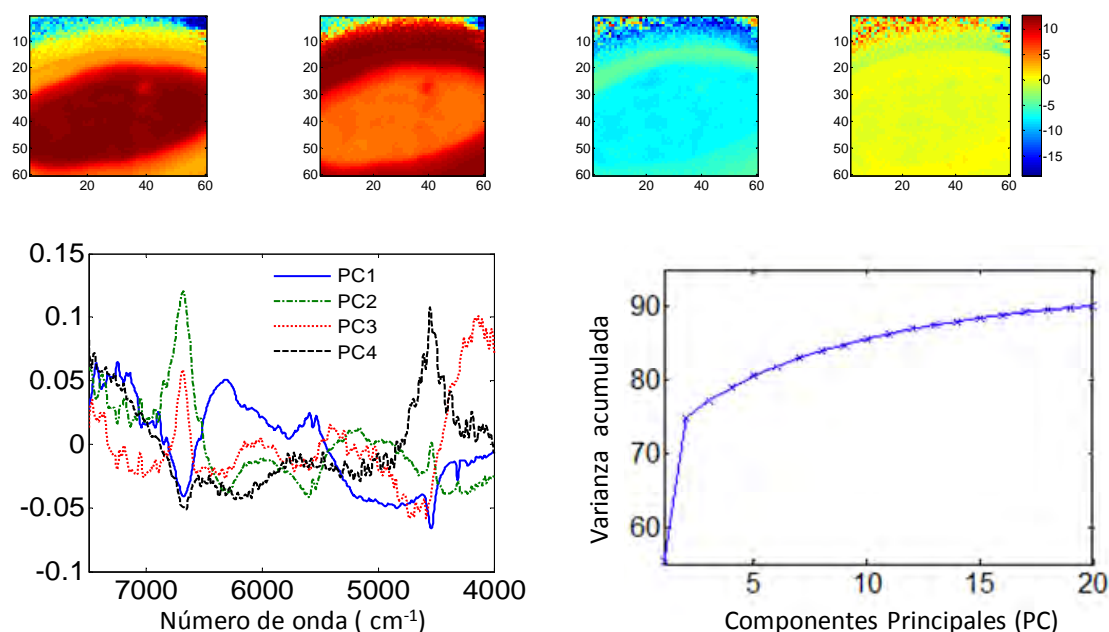


Figura 55. Análisis de componentes principales (PCA). Mapas de *scores* para los 4 primeros componentes. *Loadings* de los 4 primeros componentes. Varianza explicada por el modelo en función del número de componentes.

7.4.3 Mapa de coeficientes de correlación

Por lo tanto, para estudiar la singularidad encontrada en la superficie del comprimido, se tomó un espectro de su centro, en concreto el píxel en la posición [26, 40] y se calculó el coeficiente de correlación entre este espectro y el resto de píxeles del que está compuesta la imagen. Con los resultados obtenidos se elaboró el mapa de correlación de la figura 56a, que no parece ofrecer a una información muy clara, al menos a primera vista. Esto es debido a la alta correlación existente entre el espectro elegido y la mayoría de los espectros en la imagen, junto con la baja correlación entre

este espectro y la parte de la imagen que corresponde con el borde y el recipiente metálico. De esta manera, la imagen contiene una escala de coeficientes de correlación muy grande, y las diferencias que se pretende analizar para distinguir las partes interesantes del comprimido son pequeñas. El contraste de la imagen es consecuentemente malo. Esto queda patente también al observar el histograma o el diagrama de frecuencia acumulativa de los coeficientes. La mayoría se agrupan alrededor de 0.95-1. El contraste de los mapas depende en gran medida del valor máximo y el mínimo contenido en la imagen. Una posibilidad es acortar la escala, aunque implica la pérdida de información y no ayuda a decidir qué valor de corte es adecuado para separar las partes del comprimido de mayor similitud al espectro objetivo.

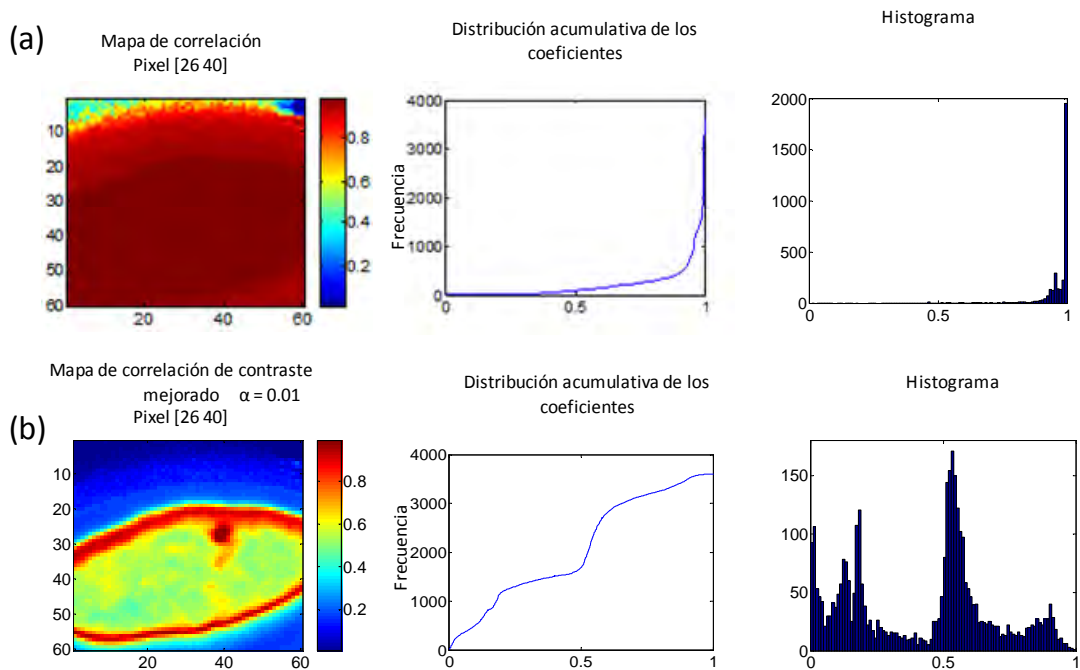


Figura 56. (a) Mapa de correlación, distribución acumulativa de los coeficientes e histogramas de coeficientes, (b) Mapa de correlación con coeficientes de contraste mejorado, distribución acumulativa de los coeficientes de contraste mejorado e histograma correspondiente.

7.4.4 Mapas de correlación de contraste mejorado

Con la intención de mejorar el contraste de los mapas de correlación, se aplicó la transformación propuesta con anterioridad (ecuación 31), utilizando un valor de $\alpha=0.01$. Los resultados, figura 56b, son visualmente muy expresivos. En este mapa se puede apreciar claramente una parte central del comprimido, una zona de recubrimiento y una parte externa de la imagen que no pertenece a la superficie lisa registrada. El espectro objetivo, situado en la zona extraña del comprimido, muestra una correlación mayor con la zona que corresponde al recubrimiento que con la zona circundante. Para apreciar el efecto que ha tenido la transformación en la distribución de los coeficientes es necesario observar el histograma correspondiente. La función de mejora de contraste ha conseguido una nueva distribución donde las diferencias entre la zona más similar (recubrimiento y parte interior del comprimido) se han hecho mayores. En el histograma se observa exactamente lo mismo; la distribución ha cambiado, desplazando los valores antes agrupados alrededor del 1, de forma que las diferencias entre las partes más similares del comprimido se han hecho mayores. Esto facilita la elección de un valor de corte para separar dichas partes. Naturalmente este es un efecto directamente relacionado con la escala a la que se realiza el histograma.

7.4.5 Efecto de la variación en el factor α .

En este apartado se comparan distintos mapas de correlación utilizando el mismo espectro objetivo, pero haciendo variar el valor del factor α , con la intención de mostrar su capacidad de regular la discriminación de la función de transformación. Los mapas de correlación fueron elaborados a partir de la misma imagen, utilizando dos espectros objetivo, uno correspondiente a la zona de recubrimiento, el píxel en la posición [19 39], y otro en el centro de la zona de API, píxel en la posición [40 30]. Los valores de α utilizados fueron 0.001, 0.01, 0.1, 1 en ambos casos. Los espectros

utilizados, así como los espectros puros de la sacarosa y del ibuprofeno se muestran en la figura 58, donde se puede apreciar una alta similitud entre ellos.

En la figura 58 se representó los mapas de correlación de contraste mejorado realizados utilizando el espectro objetivo de la zona correspondiente con el recubrimiento [19 39]. Para un valor de $\alpha=1$ la discriminación de la función es prácticamente nula y el mapa de correlación obtenido es equivalente al obtenido sin aplicar la función de mejora de contraste. Al disminuir el valor de α , la discriminación de la función aumenta. De esta manera, las distintas partes del comprimido se hacen más evidentes en los mapas de correlación correspondientes. Al obtener diferentes grados de discriminación se obtiene distintas medidas de similitud entre espectros, es decir, distintos grados de similitud entre componentes químicos de la muestra. La discriminación de la función es ilimitada y, por tanto, se ha de tener cuidado con el uso de valores muy pequeños, ya que podrían detectarse diferencias irrelevantes desde el punto de vista físico, es decir, siempre hay tener en cuenta que la correlación real entre los espectros es la obtenida en el mapa original. Sólo la utilización de ambos mapas, original y mejorado, de forma paralela, llevará a conclusiones correctas.

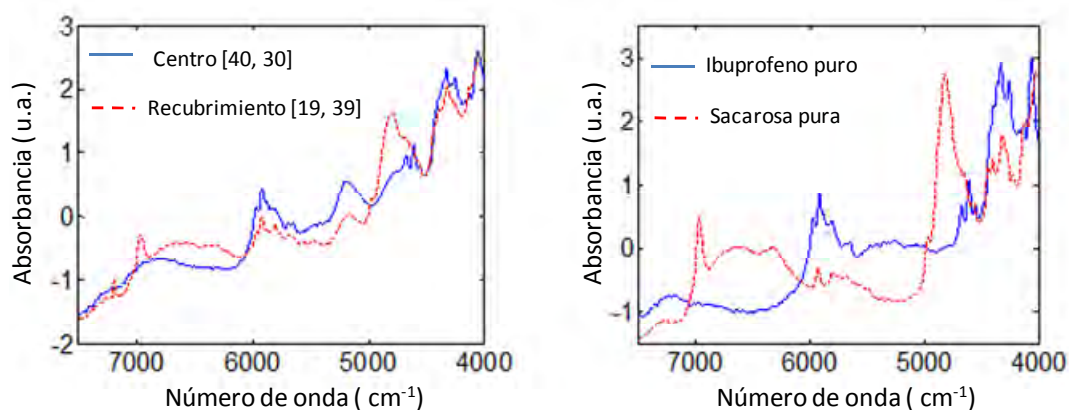


Figura 57. Espectros seleccionados para obtener los coeficientes de correlación y espectros puros del ibuprofeno y de la sacarosa.

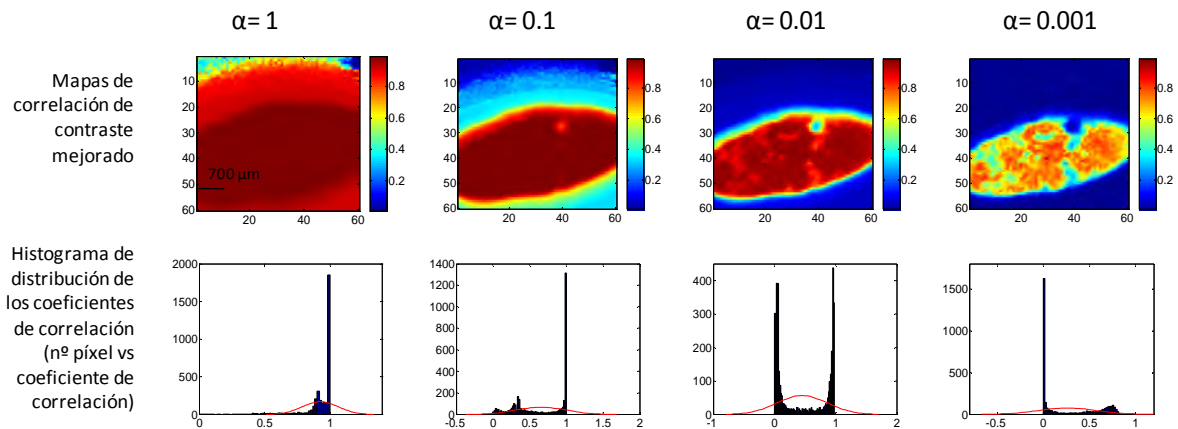


Figura 58. Mapas de correlación de contraste mejorado para distintos valores del factor α junto con su histograma correspondiente, utilizando, en este caso, el espectro de la zona central del comprimido, [19 39].

En la figura 59 se muestran los mapas de correlación de contraste mejorado, obtenidos utilizando el espectro objetivo [40, 30], correspondiente a la zona central del comprimido (zona API). De la misma forma que en los mapas anteriores, al disminuir el factor α aumenta la discriminación entre el espectro objetivo y los demás. Estos mapas detectan otra vez la presencia de la anomalía mencionada en el apartado anterior. A parte de esta zona, el resto de la zona de API se muestra uniforme. Al aumentar el poder de discriminación se puede distinguir pequeñas diferencias dentro de esta zona, siempre de menor magnitud que las observadas para la anomalía.

Los mapas de correlación mostrados en las figuras 58 y 59 permiten obtener representaciones visuales de las dos partes fundamentales del comprimido, zona de recubrimiento y zona de API. El criterio seguido está directamente relacionado con las características químicas, ya que es el coeficiente de correlación entre espectros.

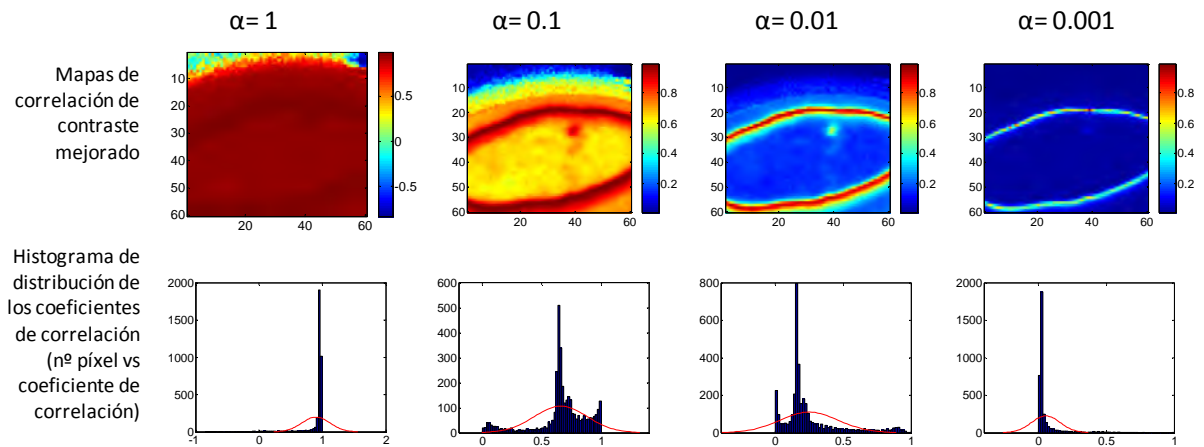


Figura 59. Mapas de correlación de contraste mejorado para distintos valores del factor α junto con su histograma correspondiente, en este caso, utilizando el espectro de la zona del recubrimiento del comprimido, [40, 30]

7.4.6 Obtención de imágenes binarias: Buscando un buen valor umbral.

A partir de los mapas de correlación, y con el objeto de agilizar la computación de la información estadística de la imagen, se puede obtener imágenes binarias. Para ello, se ha de fijar un valor de corte utilizando el histograma de distribución de valores. La principal ventaja de aplicar la función de mejora de contraste es que los histogramas que representan la nueva distribución suelen ser más fáciles de interpretar, ayudando en la tarea de seleccionar el valor de corte más adecuado.

En la figura 56 se pudo apreciar los beneficios de trabajar con el histograma de coeficientes de contraste mejorado (56b) en lugar de con el de coeficientes normales (56a). Esta mejora es también visible en la figuras 58 y 59. El cambio en la distribución ha expandido la escala de valores de la imagen, amplificando las diferencias entre los valores más próximos a 1, y haciendo evidentes diferencias que antes no lo eran.

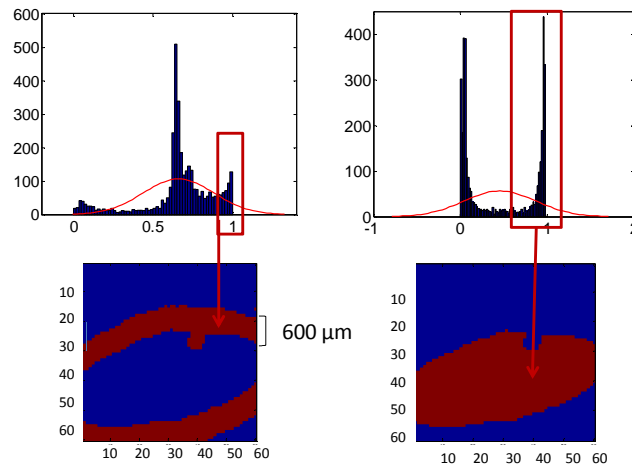


Figura 60. Selección del valor de corte utilizando los coeficientes de contraste mejorado para obtener imágenes binarias. (a) píxel [26 39], valor de corte $T = 0.92$, (b) píxel [40 30], valor de corte $T=0.8$.

Como hemos visto, el factor α permite controlar la discriminación entre los valores de correlación. Sin embargo, no existe un valor óptimo de α para seleccionar el mejor valor de corte. El procedimiento para extraer información fiable es la obtención de varios mapas de distribución, con distintos valores de α , y utilizar esta información junto con la obtenida a partir de la distribución original de coeficientes para seleccionar un valor de corte adecuado.

También hay que tener en cuenta que, aunque las diferentes zonas de una imagen estén bien definidas en un mapa de distribución, el procedimiento correcto para obtener imágenes binarias es calcular tantos mapas de correlación como zonas en la imagen deben ser localizadas, utilizando para ello el espectro objetivo necesario.

En el caso particular que nos ocupa las imágenes binarias han sido obtenidas a partir de los mapas de correlación de contraste mejorado mostrados en la figura 58 (para la zona de API) y la figura 59 (para la zona de recubrimiento). En el primer caso se utilizó el histograma correspondiente a los valores de coeficientes mejorados con un $\alpha=0.01$, y el valor de corte utilizado 0.6. En el segundo, se utilizó el mapa correspondiente a $\alpha=0.1$, y el valor de corte seleccionado fue 0.78. Los resultados se muestran en la figura 60, donde se ha generado imágenes binarias para distinguir entre dos zonas, el recubrimiento y la zona de API.

A partir de estas imágenes binarias se puede automatizar la medición del espesor del recubrimiento, de la zona de API, proporción de píxeles (de superficie) de uno sobre el otro, etc.

7.4.7 Mapas de correlación de contraste mejorado utilizando espectros puros

La figura 61 muestra mapas de correlación obtenidos utilizando el espectro puro del ibuprofeno y de la sacarosa, previamente representados en la figura 57. Los mapas de correlación de contraste mejorado obtenidos para el ibuprofeno muestran información similar a los calculados con el espectro objetivo [40 30]. Cabe destacar que, gracias a la mejora de contraste, se puede apreciar pequeñas diferencias en la concentración de ibuprofeno a lo largo de lo que ha sido definido como zona API.

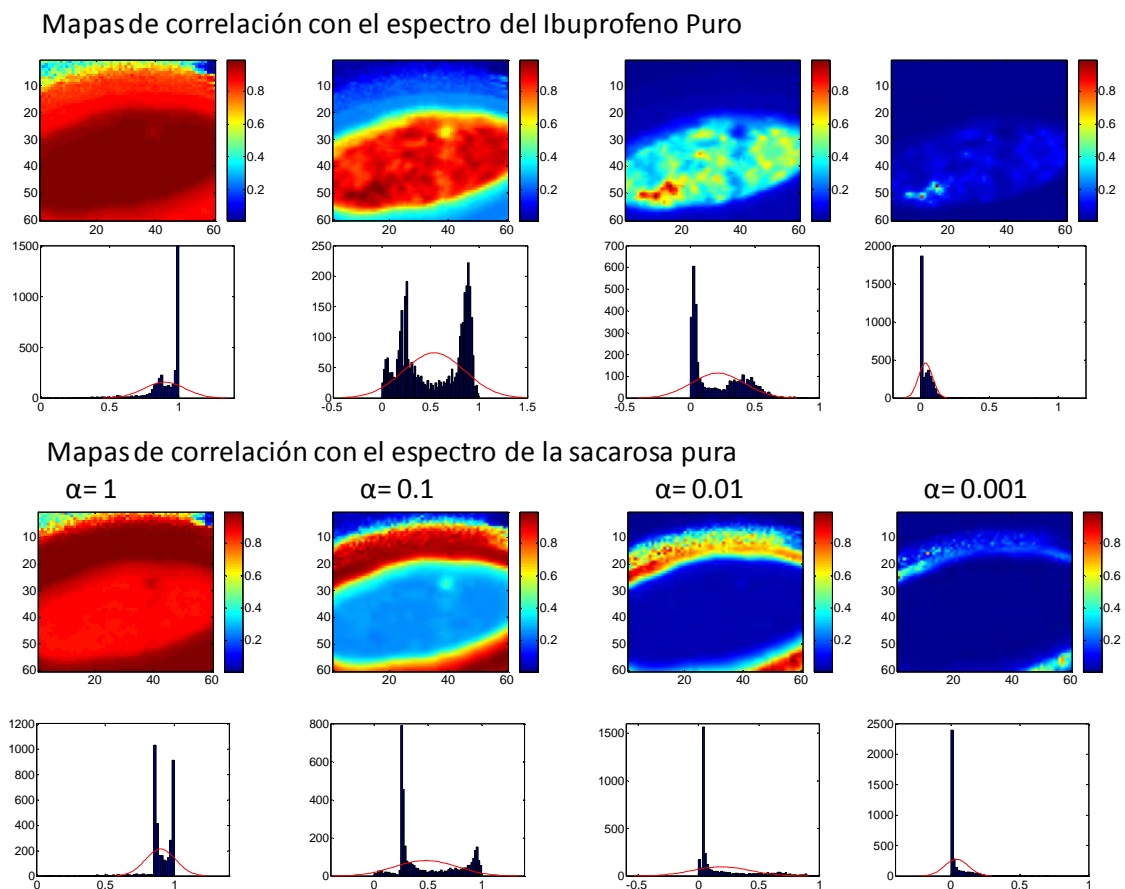


Figura 61. Mapas de coeficiente de correlación utilizando espectros puros de los componentes.

Por otro lado, los mapas obtenidos para la sacarosa no ofrecen información sobre el espesor de recubrimiento, paralelo al plano de la sección del comprimido. El espectro puro de la sacarosa presenta una correlación muy alta con la parte externa de la pastilla, necesariamente en la imagen por la forma del comprimido (figura 54), y menor con la zona paralela al plano de la sección del comprimido. Es decir, dos zonas con idéntica composición, presentan diferente correlación debido a la proximidad de una de ellas a otra zona de composición diferente. Por tanto, fue imposible obtener una imagen binaria representativa de esta zona utilizando mapas de correlación con el espectro puro (figura 61b). Efectivamente, una de las conclusiones de este estudio es que la zona de recubrimiento paralela al plano de la imagen no está representada por un espectro de la sacarosa pura, sino por una mezcla de este espectro con el del ibuprofeno y sus excipientes. Esto puede deberse a las características de adquisición de la imagen, resolución, etc. De esta forma, la metodología propuesta, en la que se utilizó espectros contenidos en la propia imagen, resultó de mayor utilidad para definir las características espaciales de la pastilla, frente a la utilización del espectro puro del componente del recubrimiento.

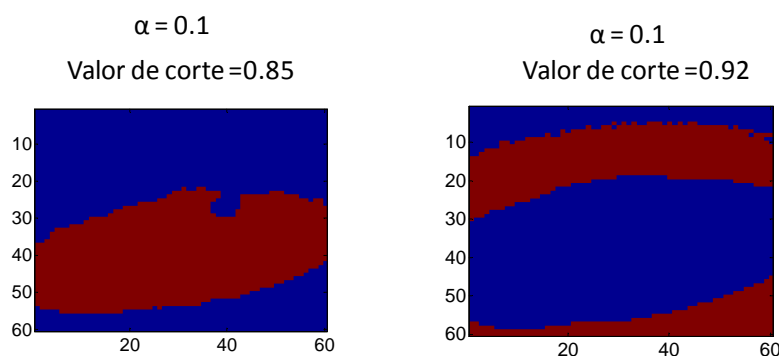


Figura 62. Imágenes binarias obtenidas mediante el uso de coeficientes de correlación con el espectro puro del ibuprofeno (izquierda) y de la sacarosa (derecha).

Esta metodología puede ser de utilidad en fases iniciales del estudio de una imagen, así como en otras situaciones específicas, como la mostrada en este capítulo. Los mapas de correlación ofrecen una posibilidad de computación rápida y sencilla de una imagen química hiperespectral.

8

ESTIMACIÓN DE LA UNIFORMIDAD EN MUESTRAS SÓLIDAS

8.1	Introducción	126
8.2	Objetivos.....	130
8.3	Metodología de trabajo.....	130
8.4	Comportamiento de la curva de uniformidad en sistemas binarios simulados. ..	139
8.5	Aplicaciones en muestras reales	149

8.1 INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica, durante la fabricación de preparados en forma sólida, la determinación del estado de homogeneidad de las mezclas constituye uno de los controles más importantes. Asegurar que las unidades individuales del fármaco presenten una correcta uniformidad, únicamente es posible consiguiendo una correcta distribución de todos los componentes del preparado. La mayoría de las técnicas implican análisis destructivos y tomas de muestra invasivas. Antes de la aparición de la espectroscopia NIR el estudio de esta relación estaba limitado a las características del método de muestreo y el tipo de análisis químico empleado para establecer la concentración de cada muestra.

La espectroscopia NIR ha permitido establecer criterios de homogeneidad en mezclas de sólidos. El problema planteado ahora es cómo se puede cuantificar la uniformidad de una mezcla de sólidos a partir de una imagen.

8.1.1 Teoría de mezclas sólidas

El mezclado de sólidos es una operación crítica en muchas industrias, especialmente en producción farmacéutica, donde la concentración de principio activo puede ser especialmente baja y pequeñas variaciones en ella pueden producir cambios radicales en las propiedades del producto final.

Una mezcla de líquidos homogénea presenta la misma concentración de componentes en todos los elementos de la misma, sin ninguna consideración espacial. Sin embargo, una mezcla de sólidos es homogénea (o uniforme) cuando la proporción de sus constituyentes es la misma, dentro de una determinada cantidad de muestra que depende del tamaño, la densidad y otras características físicas de las partículas que se mezclan.

Durante los últimos 50 años han sido definidos distintos términos, dentro de la denominada teoría clásica de mezcla de sólidos, para ayudar a establecer el grado de uniformidad. En 1952, Danckwerts introduce por primera vez la *escala y la intensidad de segregación* como términos que describen el grado de uniformidad de una mezcla de sólidos¹⁰⁷. Define la *escala de segregación* como el tamaño mínimo de muestra que se ha de tomar para obtener en cada muestreo una concentración uniforme. Depende fundamentalmente del tamaño de partícula, aglomerado, o volúmenes no mezclados. La *intensidad de segregación* se define como la relación entre la concentración máxima y mínima, para una escala de segregación determinada. Estos conceptos serán ampliamente utilizados a lo largo de este trabajo. Otro concepto que queda definido por Danckwerts es la *escala de escrutinio*, o tamaño de muestreo a partir del cual una muestra homogénea se transforma en no satisfactoria, debido a que se analiza un tamaño de muestra demasiado pequeño, aproximándose a la escala de elementos individuales, es decir, la escala de segregación mínima para una mezcla de sólidos determinada.

Lacey (1954) introduce la mayoría de los procedimientos utilizados en la actualidad para el estudio del grado de uniformidad de una mezcla de sólidos¹⁰⁸. Define el término *índice de uniformidad* en función de dos conceptos fundamentales en la teoría de mezcla de sólidos, la varianza máxima y la varianza mínima, o estado ideal de mezcla.

La *varianza máxima* de una mezcla de sólidos se define como la varianza correspondiente al momento en que no existe mezcla, y es función únicamente de las concentraciones y propiedades físicas de sólidos.

La *varianza mínima* esperada en una mezcla de sólidos marca el final de un proceso de mezcla. Lacey considera una mezcla de sólidos ideal cuando sus componentes se distribuyen aleatoriamente en toda su extensión¹⁰⁸. En función de las características de los sólidos empleados y del proceso de mezcla en estudio, se puede definir un punto final, de carácter práctico, que viene caracterizado por una varianza final mínima. Esta *varianza mínima* puede conocerse mediante experimentación previa, mediante la

utilización de un estándar, o simplemente estar marcada por las exigencias del proceso, definidas, por ejemplo, en función de unos límites de concentración previamente fijados.

Cualquier mezcla intermedia tendrá una varianza que se encontrará entre estos dos valores de varianza límite: máxima (inicial) y mínima (final).

La mayoría de los índices de uniformidad están definidos utilizando estos términos. Obviamente, para conocer estos valores se han de hacer consideraciones en función del tipo de sistema que se tiene, dependiendo del tamaño y morfología de las partículas y de la concentración de los diferentes componentes. Fan *et al* recopilaron, en una excelente revisión, los diferentes índices de uniformidad empleados en el análisis de muestras sólidas¹⁰⁹. En él se hace evidente la gran variedad de teorías propuestas. Aunque existen grandes diferencias en función de los distintos sistemas en estudio, todos los índices están definidos en términos de una o dos de las varianzas límite mencionados anteriormente.

8.1.2 Análisis de uniformidad mediante espectroscopia NIR

La espectroscopia NIR ha sido aplicada con éxito en distintos procesos de fabricación. La mayoría de los trabajos publicados se caracterizan por realizar medidas *in-line* mediante sondas de fibra óptica, lo que permite tener un control en tiempo real del grado de homogeneidad que presenta la mezcla en fabricación. Se han desarrollado métodos NIR que permiten identificar el tiempo necesario para una correcta homogeneidad de las mezclas, utilizando el criterio de Desviación Estándar de Bloque Móvil calculado a partir de espectros tomados consecutivamente. Cuando la desviación estándar es mínima y se mantiene invariable con el tiempo se puede considerar que la mezcla analizada es homogénea^{110,111,112}. También el cálculo de la diferencia cuadrática media entre espectros consecutivos a lo largo del tiempo, permite determinar el punto óptimo de homogeneidad¹¹³. El control de la homogeneidad de mezclas puede ser llevado a cabo tanto por un método cualitativo

como cuantitativo. Se han desarrollado métodos basados en el concepto de Señal Neta del Analito (NAS, *Net Analyte Signal*). Dichos métodos han sido validados y constituyen una alternativa a los métodos HPLC actualmente utilizados¹¹⁴.

El desarrollo de la imagen química ha permitido obtener información en todas las etapas del proceso, es decir, durante el proceso de mezcla, dosificación de la mezcla y, por último, y quizás el aspecto más importante y novedoso, en el producto acabado, aportando datos sobre composición química y distribución espacial. Es por tanto una técnica que se ajusta particularmente bien a las directrices y la filosofía marcadas por la iniciativa PAT (Process Analytical Technology) y que debe complementarse con el desarrollo de nuevos procedimientos para el tratamientos de datos capaces de lidiar con toda la información recogida.

Como se ha mencionado anteriormente, el siguiente paso es parametrizar la uniformidad de una mezcla de sólidos a partir de una imagen química.

8.1.3 Análisis de Macro-píxel

En este sentido, Hamad et al (2008) han presentado recientemente una nueva metodología de trabajo denominada *análisis de macro-píxel* aplicable a imagen química¹¹⁵. El término macro-píxel refiere a un clúster cuadrado de píxeles con un valor intensidad igual al valor medio de intensidades de los píxeles incluidos. Se propuso dos métodos, el *Discrete-Level-Tiling method* (DLT), que usa cuadrados que no se superponen, y el *Continuous-Level Moving-Block method* (CLMB), que utiliza todas las combinaciones posibles de macro-píxel que se puedan obtener en la imagen, proporcionando así un barrido completo independiente de cualquier eje de simetría de la imagen. Ambos métodos buscan minimizar la varianza entre intensidades de macro-píxel variando el tamaño del mismo. De esta manera, se localiza la escala de segregación de la muestra como el mínimo valor de macro-píxel cuyo rango de intensidades se encuentra dentro de unas especificaciones.

8.2 OBJETIVOS

En este capítulo se presenta un procedimiento de trabajo para caracterizar el grado de uniformidad en muestras sólidas utilizando imagen NIR y análisis de macro-píxel. Gracias a estas dos herramientas, se hace posible el cálculo de la intensidad y la escala de segregación de una muestra sólida a través del estudio de las denominadas *curvas de uniformidad*. Se incluye una descripción del comportamiento que tienen las curvas para distintas características de las mezclas, como concentración o tamaño de partícula, estimadas a partir de imágenes binarias simuladas. Por último, se estudian algunos ejemplos prácticos de aplicación de las curvas a imágenes de algunos productos en polvo y comprimidos.

8.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO

El procedimiento desarrollado implica 3 etapas:

- la obtención y pre-tratamiento de la imagen NIR.
- la aplicación del análisis de macro-píxel para la obtención de la curva de uniformidad.
- el posterior uso de la curva de uniformidad para obtener los parámetros numéricos que definan la uniformidad de la muestras.

8.3.1 Obtención de la imagen NIR

El procedimiento que se propone ha sido ideado para su utilización sobre cualquier tipo de imagen, si bien su aplicación está orientada a imagen química. Se ha desarrollado inicialmente para el estudio de mapas de componente o distribución 2D, aunque también es posible su aplicación a la imagen 3D completa, realizando un análisis de varianza directamente sobre los espectros obtenidos. La información obtenida dependerá, en gran medida, del tipo de imagen sobre el que se ha trabajado. Como veremos, la aplicación del procedimiento sobre imágenes binarias o sobre mapas de concentración tiene la ventaja de que se trabaja en escalas conocidas y las varianzas límite son también conocidas. Otros mapas de distribución obtenidos por métodos alternativos, tales como PCA, mapas de correlación, etc. pueden ser útiles para obtener información sobre la heterogeneidad de la imagen, presentando la ventaja de que la información previa que se necesita sobre la muestra es mínima o nula.

8.3.2 Análisis de Macro-píxel

El primer paso, una vez elegida la imagen o conjunto de imágenes con las que se trabajará, es aplicar el análisis de macro-píxel a la imagen (o imágenes) para obtener valores de varianza entre macro-píxeles o fracciones de muestra, realizando su segmentación en partes cuadradas. El muestreo total de una imagen se consigue aplicando el CLMB desarrollado por Hamad *et al.* Este método está basado en el sub-muestreo de una imagen en ventanas de tamaño diferente. Una vez la imagen ha sido seccionada se puede obtener algunos parámetros estadísticos (media, varianza) para cada tamaño de macro-píxel.

En general, para un macro-píxel de tamaño ($I' \times J'$) cada sub-muestra puede denotarse $S'I'J'$, donde $I' = J'$ (al estar la muestra inicialmente dividida en cuadrados se ha optado

también por macro-píxel cuadrados), consecuentemente la sub-ventana para cada sub-muestra está definida por la ecuación 32.

$$PIX_{SI'J'} = I'J' \quad (32)$$

El número total de sub-muestras para cada tamaño de ventana viene dado por, $TOTAL_{SI'J'}$ y puede ser calculado mediante la ecuación 33.

$$TOTAL_{SI'J'} = [I - (I' - 1)] * [J - (J' - 1)] \quad (33)$$

La varianza para cada sub-muestra $SI'J'$ puede obtenerse entonces a partir de la ecuación 34.

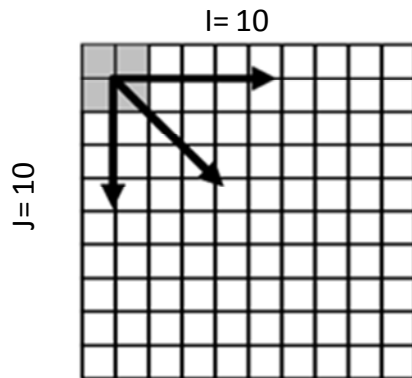
$$VAR_{SI'J'} = \frac{\sum_{i=1}^{I'} \sum_{j=1}^{J'} (s_{ij} - \bar{s})^2}{PIX_{SI'J'} - 1} - (J' - 1) \quad (34)$$

De esta forma, la varianza global puede obtenerse para cada tamaño de sub-ventana mediante la ecuación 35.

$$VAR_{I'J'} = \frac{\sum VAR_{SI'J'}}{TOTAL_{SI'J'}} \quad (35)$$

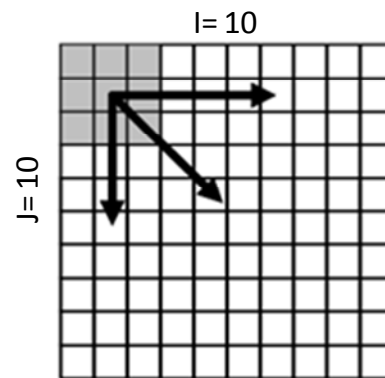
Para una mejor interpretación del procedimiento, la figura 63 muestra un ejemplo para dos tamaños de macro-píxel. Partiendo de una imagen de 10×10 ($I \times J$), píxeles el algoritmo calcula la varianza para cada sub-muestra. En la figura 63a se ha seleccionado una ventana de 2×2 ($I' \times J'$), con un número total de 4 píxeles por sub-muestra ($PIX_{S22}=4$). De esta forma el número total de posibles sub-muestras son 81, $TOTAL_{S22}=81$. Para una sub-muestra de 3×3 se puede obtener un total de 64 sub-muestras (Figura 64b).

a) Submuestra (2x2): 4 píxeles



Número total de submuestras: 81

b) Submuestra (3x3): 9 píxeles



Número total de submuestras: 64

Figura 63. Ejemplo de aplicación del análisis de macro-píxel.

Se repite el proceso con todos los tamaños de sub-muestra posibles obteniéndose una varianza característica para cada uno. Esta varianza puede ser representada frente al área de muestra analizada para obtener una curva que define las características de uniformidad de una muestra.

Se puede establecer una relación entre el tamaño de macro-píxel empleado (tamaño de muestreo) y la masa de muestreo real si se conocen suficientes datos de la mezcla sólida escaneada, como la densidad, tamaño de partícula, etc.

8.3.3 Curvas de uniformidad

La varianza de una mezcla de sólidos, máxima para un tamaño de muestras igual o menor al de los elementos individuales de la mezcla, disminuye al aumentar el tamaño de muestra analizado, hasta alcanzar un valor mínimo o valor 0 si se analiza toda la muestra. La representación de la varianza entre sub-muestras para cada tamaño de macro-píxel se denomina curva de uniformidad. Del estudio de esta relación se puede obtener los dos parámetros que definen una mezcla de sólidos, la intensidad y la escala de segregación¹⁰⁷.

8.3.3.1 Cálculo de las varianzas límite. Adaptación al análisis de imagen.

Para obtener la escala y la intensidad de segregación mediante el análisis de macro-píxel y normalizar los valores obtenidos, se ha de trabajar entre unos límites de varianza, lo que hará más fácil la interpretación de los resultados. Estas varianzas son las siguientes:

- σ_0^2 .- varianza máxima teórica, correspondiente a los componentes no mezclados
- σ_p^2 .- varianza de la imagen calculada para el total de los píxeles de la imagen. Esta varianza es la máxima que se puede obtener aplicando el análisis de macro-píxel a una imagen.
- σ_t^2 .- varianza objetivo, definida por las necesidades del proceso (p.e. concentración)
- σ_r^2 .- varianza mínima ideal, correspondiente con la varianza para un estado de distribución completamente aleatoria.
- σ_{mp}^2 .- varianza para cada tamaño de macro-píxel

$$\sigma_0^2 \geq \sigma_p^2 \gg \sigma_t^2 \geq \sigma_r^2$$

La varianza correspondiente a una mezcla de sólidos no mezclada (σ_0^2) depende únicamente de la concentración de los componentes y de las propiedades físicas de la muestra, tales como tamaño y forma de partícula. Para el caso más simple, estudio de un sistema binario con tamaño de partícula igual para los dos componentes, Lacey establece que la varianza máxima viene dada por la ecuación 36, donde C es la concentración del componente al que se refiere el estudio, expresada como fracción de partículas¹⁰⁸.

$$\sigma_0^2 = C \cdot (1 - C) \quad (36)$$

La varianza σ_p^2 se obtiene calculando la varianza entre el valor de los píxeles de la imagen. Es decir, asimilando tamaño de macro-píxel con tamaño de píxel. La varianza máxima de una imagen σ_p^2 debe coincidir con σ_0^2 cuando el tamaño de píxel es mucho mayor que el tamaño de partículas.

La varianza objetivo, debe definirse en función de las características del sistema en estudio y será la que indique que la muestra cumple con los requisitos de uniformidad requeridos. Por ejemplo, en términos de concentración se puede fijar un error del 5% del valor nominal como aceptable; a esta variabilidad le corresponde una varianza global, suponiendo una distribución normal. En el caso de no conocer o disponer de una varianza objetivo, la varianza límite de cualquier proceso de mezcla de sólidos puede fijarse en una distribución aleatoria, tal y como definió Lacey.

La varianza mínima, σ_r^2 de una distribución aleatoria para un sistema binario, con tamaño de píxel menor o igual al tamaño de partícula, se obtiene a través de la ecuación 37, donde N es el número de partículas en la muestra. Otros autores han estudiado esta relación para sistemas de partículas más complicados, con tamaños y densidades diferentes^{116,117}. Algunos procesos de mezcla implican el ordenamiento simétrico de sus componentes¹¹⁸. En este tipo de sistemas, la varianza mínima esperada es 0.

$$\sigma_r^2 = \frac{C*(1-C)}{N} \quad (37)$$

8.3.3.2 Intensidad y escala de segregación

El camino que describen las varianzas al disminuir la muestra presenta un punto final f en el momento en que la muestra pasa de satisfactoria a no satisfactoria, es decir, presenta una varianza inferior a (σ_f^2) . Este tamaño de muestra se denomina *escala de segregación* (S_s) o *escala de escrutinio* (S_R) si la muestra analizada es una muestra uniforme. En la figura 64 se muestra un ejemplo en el que se ha dibujado dos curvas,

una correspondiente con una supuesta muestra uniforme (línea discontinua) y otra para algún estado intermedio de mezcla.

La relación S_s/S_R puede ser un indicativo de la distancia que existe entre una imagen homogénea y otra que no lo es en términos de la escala de segregación; es decir, en términos de la mínima superficie posible que implica uniformidad.

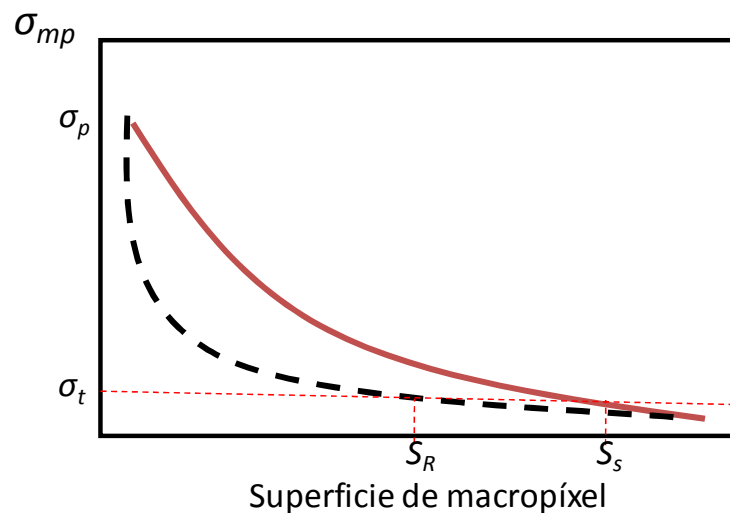


Figura 64. Ejemplo de obtención de la escala de segregación y escrutinio por medio de la curva de uniformidad

La intensidad de segregación está directamente relacionada con la escala de segregación, teniendo en cuenta la varianza máxima y mínima que presenta la muestra. De esta forma, una medida de la intensidad de segregación global que presenta la imagen viene dada por la relación de la ecuación 38a. Donde σ_p^2 es la varianza máxima de la imagen y σ_t^2 es la varianza objetivo, a partir de la cual la muestra se ha considerado uniforme. Si se conoce la σ_0^2 puede obtenerse una intensidad de segregación relativa, según la expresión de la ecuación 38b.

$$I_s = \frac{(\sigma_p^2 - \sigma_t^2)}{S_s} \quad (a) \qquad I_r = \frac{(\sigma_p^2 - \sigma_t^2)}{S_s \cdot (\sigma_0^2 - \sigma_t^2)} \quad (b) \qquad (38)$$

La curva de uniformidad contiene toda la información necesaria para obtener la Intensidad y la escala de segregación, aunque en ciertas ocasiones es una información

difícil de interpretar y, en ciertos casos, hay autores que optan por utilizar algún índice de uniformidad para obtener una visualización más directa del grado de uniformidad, ya que introducen los límites de varianza en la representación.

8.3.3.3 Índice de uniformidad frente a tamaño de macro-píxel

Existe un gran número de índices de uniformidad para el estudio de mezclas sólidas¹⁰⁹. Se ha seleccionado el índice de Kramer (ecuación 39) como punto de partida, adaptando su aplicación al análisis de imágenes. Para obtener este índice de uniformidad se ha de definir las varianzas límite, es decir, la varianza máxima y la varianza mínima. Se puede obtener dos índices diferentes en función de las varianzas límite que se utilice. El representado por la ecuación 39a, utiliza σ_0^2 , mientras que el segundo (ecuación 39b) normaliza el valor de varianza encontrado con respecto al valor máximo de varianza hallado en la imagen σ_p^2 . Este último índice sólo será útil para determinar la escala de segregación, ya que normaliza los valores de varianza con respecto a la máxima encontrada para cada imagen. Sin embargo, su utilidad radica en permite visualizar mejor pequeñas diferencias en escalas de segregación.

$$HI = \frac{\sigma_0^2 - \sigma_{mp}^2}{\sigma_0^2 - \sigma_t^2} \text{ (a)} \qquad HI' = \frac{\sigma_p^2 - \sigma_{mp}^2}{\sigma_p^2 - \sigma_t^2} \text{ (b)} \qquad (39)$$

Para un sistema binario de tamaño de partícula idéntico, el índice de uniformidad de Kramer se obtiene a través de las ecuaciones 36 y 37 en función únicamente de la proporción de sus componentes y el número total de partículas. El primer punto donde la representación de este índice frente al tamaño de muestra se vuelve 1 coincide con la *escala de segregación* de la muestra. De la pendiente de la recta obtenida entre el punto definido por la escala de segregación y el punto inicial de la curva, utilizando el índice HI, se obtiene la intensidad de segregación.

Otro índice de uniformidad, propuesto por Lacey¹⁰⁸, viene dado por el cociente entre las varianzas para cada tamaño de macro-píxel y la varianza mínima, también para

cada tamaño de macro-píxel ($\frac{\sigma_{mp}^2}{\sigma_p^2}$) Este índice ofrece una información similar al anterior, aunque esta indicado especialmente para detección de dominios ordenados.

8.3.3.4 Varianza de macro-píxel frente a inversa del tamaño de muestra

La teoría clásica de Lacey establece claramente la relación lineal existente entre la varianza de muestreo y el tamaño de muestra analizada (masa o número de partículas). Extendiendo esta teoría al análisis de imagen, la representación de σ_{mp}^2 frente a (superficie de macro-píxel)⁻¹ debe ser una recta. Esta relación se cumple siempre y cuando el tamaño de muestreo analizado sea suficiente en relación con el tamaño de partículas que se mezclen. Por tanto, si la aplicación de éste procedimiento sobre una mezcla uniforme no rinde una relación lineal, esto será indicativo de que el tamaño de imagen no es el suficiente para estudiar la distribución de esta mezcla.

Al trabajar con imágenes binarias se demuestra que la constante de la recta **a**, coincide con el valor de $\sigma_0 = C*(1-C)$. Esta varianza es la varianza máxima definida para un sistema binario de partículas, siempre y cuando el tamaño de partícula sea el mismo para los dos componentes e igual o menor que el tamaño de píxel.

8.4 COMPORTAMIENTO DE LA CURVA DE UNIFORMIDAD EN SISTEMAS BINARIOS SIMULADOS.

8.4.1 Efecto de la concentración en las curvas de uniformidad

Para conocer el efecto que producen en las curvas de uniformidad diferencias en la concentración de los componentes, se ha generado un set de imágenes simulando un sistema bi-componente y binario (0 = analito y 1= matriz), de partículas en forma de cubo (un cuadrado en el plano) y de tamaño de lado igual al tamaño de píxel (resolución óptica de la imagen), entre concentraciones de 0.1 a 0.5 partículas blancas (0) sobre partículas ordenadas de una forma aleatoria. De esta forma se ha intentado simular una mezcla de sólidos ideal, según la definición aportada por Lacey y Danckwerts^{107,108}.

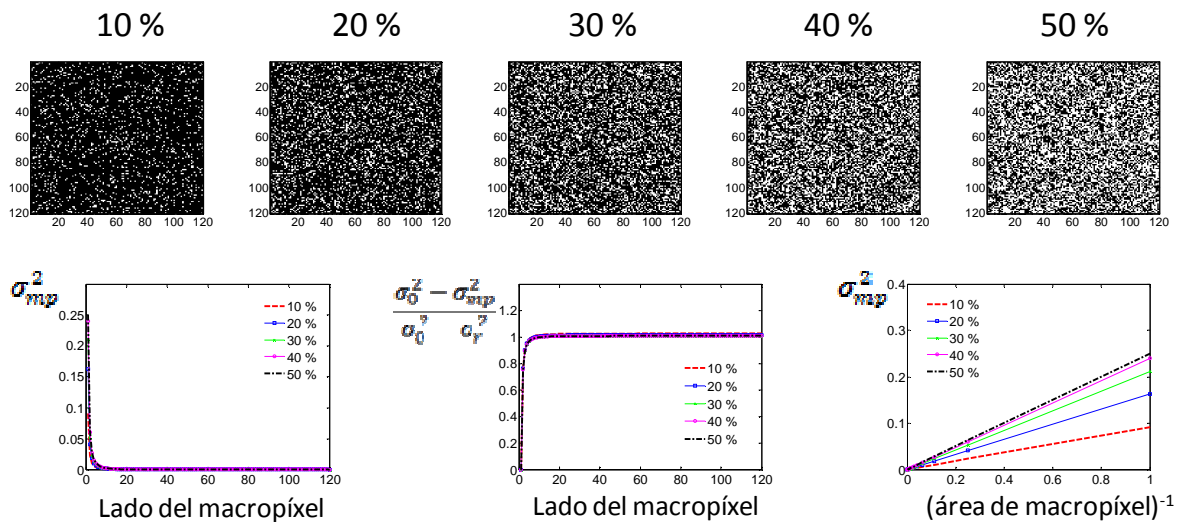


Figura 65. Efecto de la concentración en las curvas de uniformidad para distribuciones completamente aleatorias.

En la figura 65 se muestran las imágenes utilizadas, así como las curvas de uniformidad obtenidas. La primera representa la varianza de la muestra obtenida para diferentes

tamaños de macro-píxel y la segunda, el índice de uniformidad obtenido utilizando las varianzas límites (véase procedimiento). Esta gráfica permite obtener la escala de segregación de las mezclas, momento en que el índice de uniformidad se hace 1.

Tabla 15. (a) Valores obtenidos del análisis de las curvas de uniformidad figura 65, escala de segregación, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38a. (b) pendiente de la recta, a , para cada concentración de analito, coincide con la varianza máxima teórica, $\sigma_0=C*(1-C)$, para sistemas binarios.

(a)	S_s	I_s	(b)	a	σ_0
10%	9	0.01	10%	0.09	0.09
20%	10	0.016	20%	0.16	0.16
30%	11	0.019	30%	0.21	0.21
40%	11	0.022	40%	0.24	0.24
50%	12	0.021	50%	0.25	0.25

Al tratarse de mezclas aleatorias de tamaño de partícula constante, en todos los casos la escala de segregación es prácticamente la misma (tabla 15), aunque se observa un ligero aumento al aumentar la concentración. En la tercera representación se muestra la relación entre la varianza de cada macro-píxel y la inversa del tamaño de macro-píxel. Acorde con la teoría de mezcla de sólidos, esta relación es lineal para distribuciones aleatorias^{108,119}, como queda demostrado en la figura 65. En la tabla 15 se muestra la constante a de cada una de las rectas obtenidas para las distintas proporciones que, como se observa, son idénticas a las varianzas máximas teóricas calculadas a partir de la proporción de componentes.

En muestras binarias, la varianza para el tamaño mínimo de macro-píxel (tamaño de píxel de la imagen, σ_p) es igual a la varianza máxima de una mezcla de partículas sólidas sin mezclar (σ_0), que se puede obtener mediante la ecuación 33 si ambos componentes de la mezcla tienen tamaños de partícula y densidades iguales.

El estudio con datos binarios simulados, en los que el tamaño de partícula coincide con el tamaño de píxel, muestra que el tamaño de lado del macro-píxel se incrementa muy ligeramente con la proporción de principio activo, pasando de 9 a 12 para una

variación de concentración de 10% a 50% respectivamente. Se podría por tanto estimar un valor mínimo aproximado de lado de macro-píxel de 10, para definir una distribución ideal.

8.4.2 Efecto del tamaño de partícula en las curvas

En la figura 66 se muestra un conjunto de imágenes donde se ha distribuido aleatoriamente una concentración del 30% de API, con diferentes tamaños de partícula cuadradas, que oscilan entre 1 y 5 píxeles de lado. Las curvas de uniformidad obtenidas muestran el efecto que tiene el tamaño de partícula en la escala de segregación.

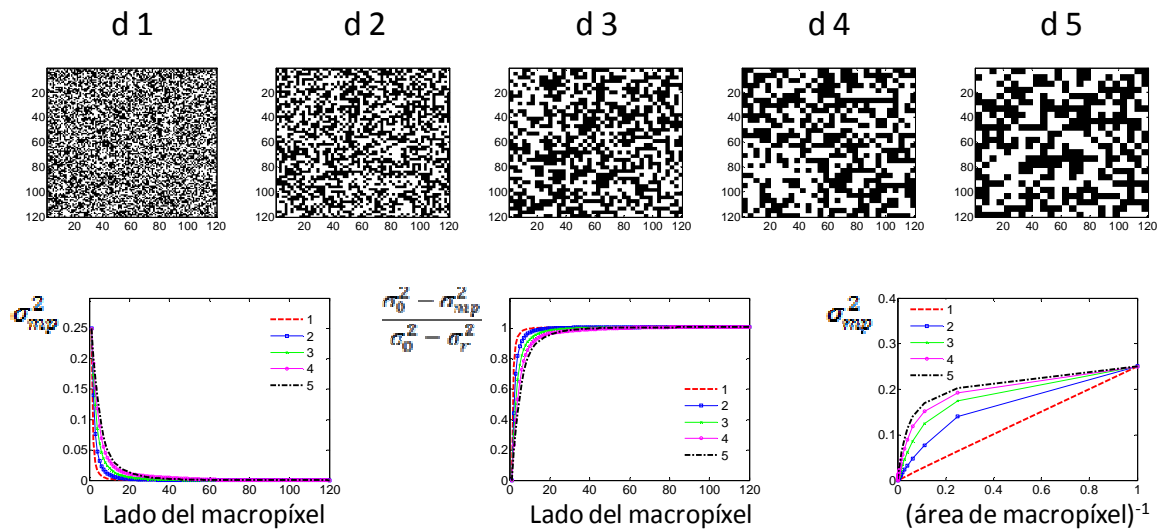


Figura 66. Efecto del tamaño de partícula en las curvas de uniformidad

Dada la dificultad de generar imágenes con una distribución aleatoria para el tamaño de partícula grande (4 y 5 píxeles) para un tamaño de imagen de 100 píxeles, no es una sorpresa observar como la imagen para el tamaño de partícula de 5 píxeles tiene una escala de segregación menor que la correspondiente para el tamaño de 4 píxeles de lado. Ninguna de las dos puede corresponder con una distribución completamente aleatoria para este tamaño de imagen. A medida que el tamaño de partícula se incrementa, aumenta en una relación casi proporcional la escala de segregación. Así, se pasa de 9 a 24, cuando el tamaño de partícula se triplica. En el caso de partículas

muy grandes, puede ocurrir que el tamaño total de muestra (imagen), sea insuficiente para poder considerar una distribución aleatoria. Este hecho se ve reflejado en una pérdida de linealidad en la representación de la varianza frente a la inversa del área del macro-píxel.

Tabla 16. Escala de segregación imágenes figura 66, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38

	S_s	I_s
d1	9	0.028
d2	18	0.014
d3	24	0.01
d4	41	0.006
d5	34	0.007

Las imágenes de la figura 67 representan sistemas binarios de dominios ordenados con tamaño de partícula o tamaño de agregado diferente. En la tabla 17 se observa la escala de segregación para cada una de las distribuciones. La escala de segregación no es el doble del tamaño de agregado, como debería ser si la varianza mínima esperada fuera 0. Para los límites marcados, es decir, varianza mínima igual a varianza de una muestra aleatoria, los valores de escala de segregación son los mostrados en la tabla.

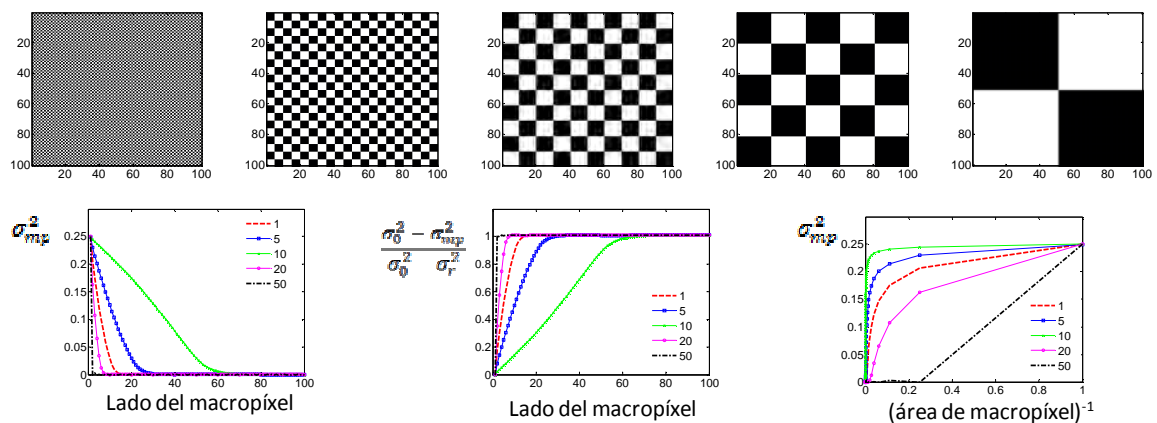


Figura 67. Curvas de uniformidad para diferentes estados de segregación de dominios ordenados

La escala de segregación de la muestra es, lógicamente, una función directa del tamaño de partícula (o agregado). Este tamaño de partícula marca el tamaño de imagen necesario para obtener resultados estadísticamente significativos.

Tabla 17. Escala de segregación de las imágenes mostradas en la figura 67, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38

	S_s	I_s
1	2	0.125
5	7	0.035
10	14	0.018
20	28	0.009
50	64	0.004

8.4.3 Distribuciones no aleatorias con distinto tamaño de agregado

En la figura 68, se muestra un conjunto de imágenes binarias generado con la intención de mostrar el efecto que produce la aglomeración de uno de los componentes dentro de una mezcla aleatoria de dos componentes con el mismo tamaño de partícula y concentración constante.

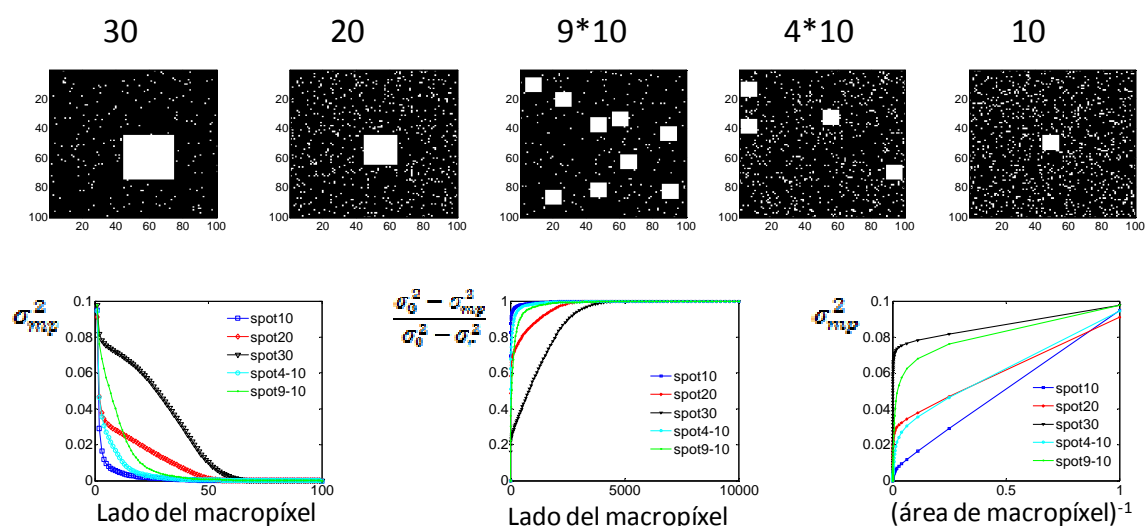


Figura 68. Curvas de uniformidad para diferentes tamaños de agregado e igual concentración de analito (10%)

En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos para las 5 distribuciones de la figura 68. La escala de segregación decrece al disminuir el tamaño o el número de agregados. Por tanto, la escala de segregación es una medida del grado de uniformidad de la muestra, en unidades de superficie.

Tabla 18. Escala de segregación correspondiente con imágenes figura 68, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38

	S_s	I_s
30	65	0.0014
20	52	0.0017
9*10	50	0.0018
4*10	41	0.0021
10	27	0.0029

En la figura 69 se presenta un conjunto de imágenes que simula otro tipo de segregación, en el que las partículas se agrupan en zonas diferenciales de la muestra, aunque sin formas agregados. Las imágenes podrían simular un proceso de mezcla por convección, en el que el componente en estudio, inicialmente situado en una de las esquinas de la muestra, se desplaza a lo largo de ella en diferentes distribuciones hasta que llega a repartirse aleatoriamente a lo largo de toda la imagen.

En la tabla 19 se muestran los valores obtenidos para la escala y la intensidad de segregación. Como se observa, la escala de segregación es mínima para la distribución aleatoria, alrededor de 10 píxeles de lado, y crece en función del tipo de distribución del componente en la imagen. La intensidad de segregación en imágenes binarias, siempre referida a la escala de segregación, indica el grado de acumulación o dispersión del componente. A igual escala de segregación, una intensidad de segregación mayor implica una varianza entre sub muestras mayor, es decir, aumenta la probabilidad de encontrar acumulaciones de un componente en una superficie equivalente a la escala de segregación. El método detecta las pequeñas diferencias que visualmente pueden apreciarse entre la imagen 5 y 6, que significan en realidad un cambio importante en la escala de segregación. El cambio, que visualmente no parece

tan pronunciado, es más notable para la imagen 4, cuya distribución presenta una escala de segregación similar a la imagen 1.

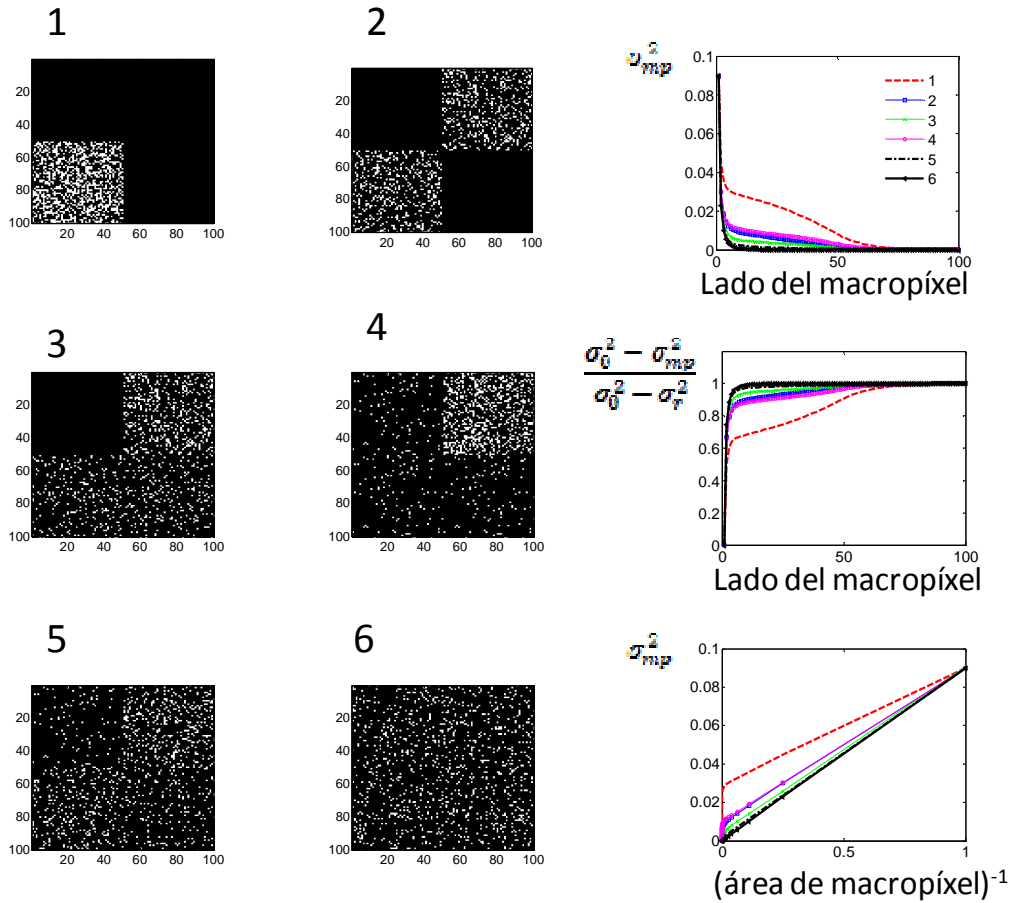


Figura 69. Distribuciones con distinto grado de segregación agregado e igual concentración de analito (10%)

Si se compara los resultados para la primera imagen de la figura 68 y la tercera de la figura 69, vemos que prácticamente presentan la misma intensidad y escala de segregación, aunque las distribuciones son muy distintas.

Tabla 19. Intensidad y escala de segregación distribuciones figura 69, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38.

	S_s	I_s
1	81	0.0011
2	56	0.0016
3	62	0.0014
4	72	0.0012
5	17	0.0050
6	11	0.0080

El efecto probable de la formación de agregados se ha simulado para distintos tamaños de agregado y distinto número de los mismos. En todos los casos se ha encontrado un incremento considerable del tamaño del macro-píxel (escala de segregación) necesario para definir una distribución aleatoria. Asimismo, aparecen claras irregularidades en la representación de las curvas de uniformidad. Este ejemplo pone en evidencia la conveniencia de realizar las tres representaciones propuestas, no únicamente la más obvia de varianza frente a tamaño de macro-píxel.

La simulación de un proceso, en el que partiendo de una situación totalmente segregada se llega a una distribución totalmente aleatoria se ve claramente reflejado en las curvas de uniformidad y en la evolución del tamaño de macro-píxel, que pasa de 81 a 11.

8.4.4 Cambios en la intensidad de segregación. Imágenes con segregación

Las imágenes anteriores corresponden a una intensidad de segregación máxima para la escala de segregación correspondiente, ya que los valores de cada uno de los dos componentes aparecen en porcentajes de unos y ceros. En la figura 70 se muestra un grupo de imágenes con la misma escala de segregación (agregados ordenados de forma cuadrada de 20 píxel de lado) pero con distinta intensidad de segregación. La primera representa el mismo sistema binario expuesto en la figura 67, en la que los agregados simulan componentes puros. En las siguientes imágenes la concentración de los agregados varía desde 0.9-0.1 para la segunda, 0.8-0.2 para la tercera, y así consecutivamente hasta 0.5-0.5 para la última. El análisis de macro-píxel realizado proporciona las curvas de uniformidad que se encuentran a la derecha.

Todas las imágenes presentan la misma escala de segregación, menos la que es uniforme. La intensidad de segregación es máxima para las máximas diferencias de concentración, y disminuye de forma progresiva hasta ser prácticamente 0 para la imagen homogénea. Se puede definir una intensidad relativa si se conoce la intensidad de segregación máxima. Un valor cercano a 1 implica una intensidad de segregación cercana al máximo, mientras que un valor cercano al 0 implica una imagen cercana a la uniformidad.

Tabla 20. Escala de segregación figura 70, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38a. I_R es la intensidad relativa, relativa a la intensidad de segregación máxima, ecuación 38b.

	S_s	I_s	$I_R=I_0/I_i$
100-0	31	0.008	1.0000
90-10	31	0.005	0.6250
80-20	31	0.003	0.3750
70-30	31	0.0015	0.1875
60-40	31	0.0003	0.0375
50-50	11	0.000001	0.0001

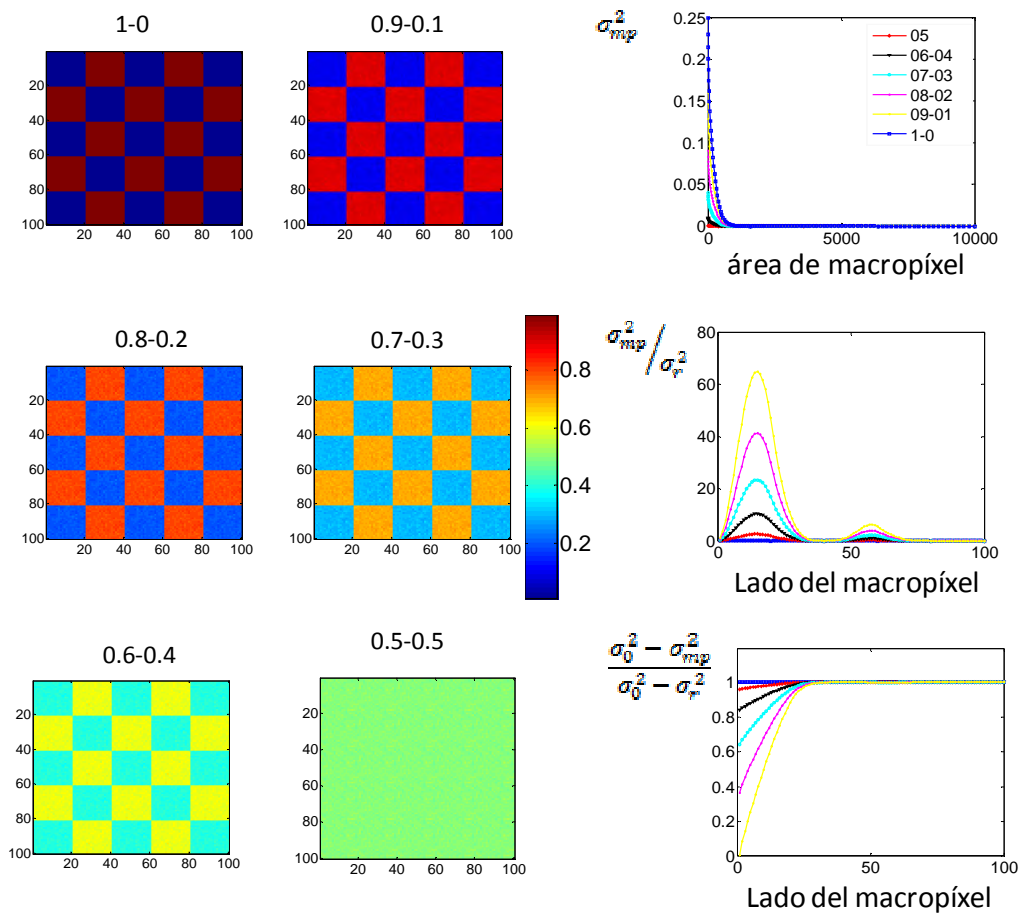


Figura 70. Efecto de la segregación en las curvas

En la figura 70 se ha utilizado la relación entre la varianza de la imagen para cada macro-píxel y la varianza de la imagen homogénea como otro índice de homogeneidad y se ha representado la curva correspondiente (segunda representación de la columna de la derecha). Como es apreciable, esta curva es más sensible a los dominios ordenados, ya que presenta máximos en la curva de uniformidad en 20 y 40 píxeles, que es el lado de píxel que se repite en la imagen.

8.5 APLICACIONES EN MUESTRAS REALES

8.5.1 Estudio de una mezcla de productos farmacéuticos en polvo.

En la figura 71 podemos ver mapas de concentración obtenidos utilizando imágenes de mezclas de productos en polvo (ibuprofeno con celulosa micro-cristalina como excipiente), con un tamaño de partícula similar, alrededor de las 10 μm , y unas 7 veces menor que el tamaño de píxel (70 μm). Se ha trabajado con diferentes concentraciones de ibuprofeno (API). Las imágenes fueron obtenidas con el sistema de mapeo por puntos de la figura 10, apartado 3.2.2. Para obtener los mapas de concentración se ha realizado una regresión lineal clásica (CLS) utilizando los espectros puros de los componentes. Los mapas de concentración representan una superficie cuadrada de la muestra de 4.2 mm de lado, divididos en 60 píxeles de 0.07 mm de lado. Esto implicó el registro de 3600 espectros por imagen, con un tiempo de adquisición de 16 horas por imagen, realmente elevado para este tipo de sistemas. Se muestran 6 mapas, 3 en los que la concentración media de la zona fue del 70% de ibuprofeno y otros 3 con 50, 30 y 10 %, respectivamente.

Como criterio de homogeneidad para obtener la escala de segregación, se eligió que $\sigma_t^2 = 0.0001$, lo que corresponde con que el 90% de los macro-píxeles deben tener la misma concentración media que el total.

Independientemente de la concentración de la mezcla, la escala de segregación ordena las muestras en función del tamaño de sus agregados, mientras que la intensidad de segregación ordena las muestras en función de las diferencias de concentración que existen intra-muestra, siempre referida a la escala de segregación correspondiente.

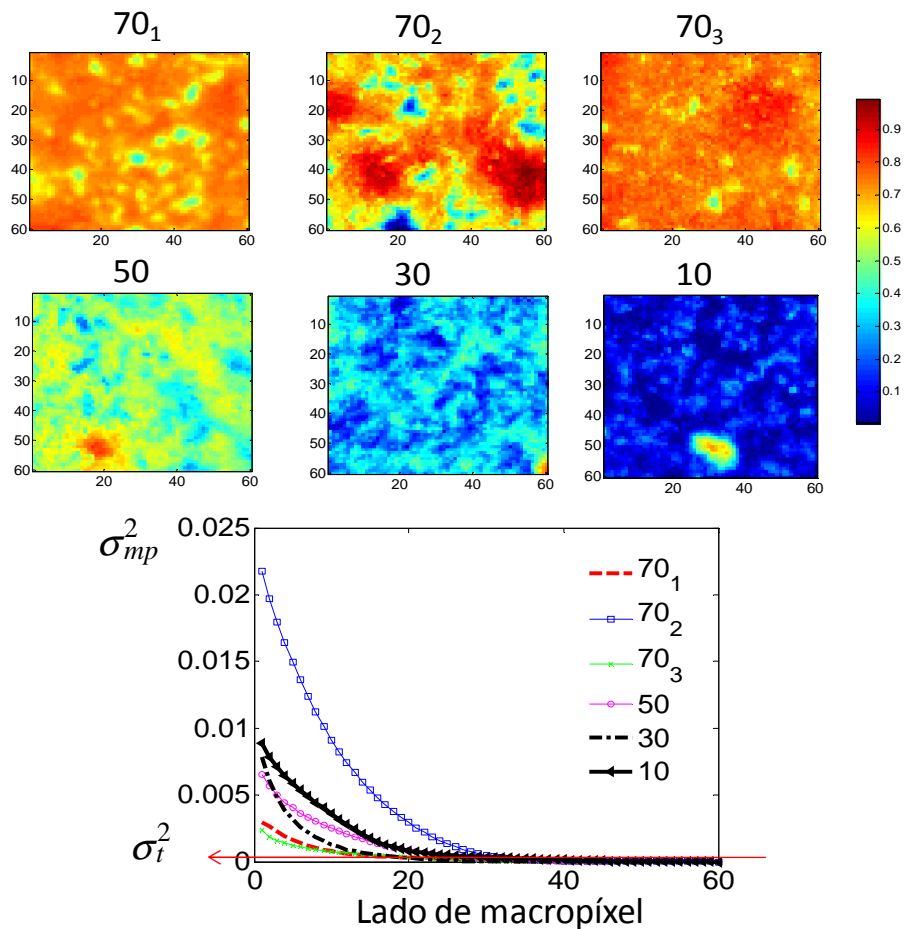


Figura 71. Mapas de concentración de ibuprofeno de una mezcla de ibuprofeno y celulosa micro-cristalina (mcc) a diferente concentración de API (70 % de ibuprofeno en la primera fila, 50 30 y 10 respectivamente en la segunda, y curvas de uniformidad obtenidas.

El hecho de que la varianza se haya estabilizado en todos los casos, es un indicativo de que el tamaño de imagen es suficiente para estudiar esta mezcla. Esto se corrobora con los valores de escala de segregación obtenidos para las muestras más uniformes, imágenes 1 y 3, con una escala de segregación menor de 10 píxeles. Esto implica que una pequeña sub-muestra de esta mezcla, correspondiente con una superficie cuadrada de 10 píxeles de lado, es uniforme bajo los requerimientos previamente fijados. Naturalmente esta superficie está relacionada directamente con una masa de muestra, que depende de las características de los sólidos mezclados.

Tabla 21. Escala de segregación imágenes figura 71, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38

	S_s	I_s
1	9	0.00025
2	26	0.00079
3	7	0.00019
4	22	0.00027
5	23	0.00034
6	36	0.00025

8.5.2 Uniformidad de comprimidos farmacéuticos

Una de las principales ventajas de la espectroscopia de imagen NIR es que permite obtener información de la distribución espacial de los componentes en todo tipo de muestras sólidas. Si se dispone de una muestra estándar y puede obtenerse una imagen del total de su superficie, se dispone automáticamente de una curva de uniformidad estándar, específica de la resolución a la que ha sido adquirida la imagen. Otras imágenes, adquiridas en las mismas condiciones sobre otras muestras, pueden ser comparadas a través de sus curvas de uniformidad y, de esta manera, establecer cómo se desvían las muestras del estándar en términos de intensidad y escala de segregación.

En el ejemplo desarrollado a continuación, se presenta un protocolo para la detección de comprimidos farmacéuticos no uniformes. Para ello se utilizan mapas de coeficiente de correlación y análisis de macro-píxel, obtenidos a partir de imágenes registradas con el instrumento Malvern SyNIRgi.

Para controlar la uniformidad de un lote de comprimidos no es necesario realizar análisis cuantitativo, ni obtener mapas de concentración. La estimación de la uniformidad y la cuantificación de la escala de segregación pueden hacerse a través de mapas de coeficientes de correlación, mediante los cuales se mide la diferencia existente entre el espectro en cada píxel de una imagen y un espectro medio, obtenido a través de la preparación previa de una imagen estándar o por la elección de un

comprimido o grupo de comprimidos estándar dentro del propio lote. Esta elección puede llevarse a cabo utilizando el procedimiento presentado en el capítulo anterior. Por medio de los mapas de correlación Utilizando espectros contenidos en la propia imagen, se pueden obtener los mapas de correlación y una visión general de la superficie de los comprimidos. Así se puede seleccionar el/los comprimidos que presentan una superficie más uniforme. Siguiendo este procedimiento, se seleccionó la imagen de la figura 72. Se obtuvo el espectro medio y se realizó el mapa de correlación con respecto a este espectro medio para comprobar la uniformidad de la imagen. El análisis de macro-píxel debe ser aplicado sobre imágenes cuadradas o rectangulares, así que se seleccionó una zona cuadrada, intentando obtener la superficie máxima de comprimido (señalada en negro en la figura 72). En la misma figura también se muestra la curva de uniformidad obtenida para este comprimido (comprimido estándar), que a partir de ahora será utilizada como curva estándar. Hay que destacar los valores de varianza para esta curva estándar, del orden de 10^{-7} , que confirman que el comprimido es uniforme para cualquier tamaño de macro-píxel, incluyendo el tamaño de píxel original.

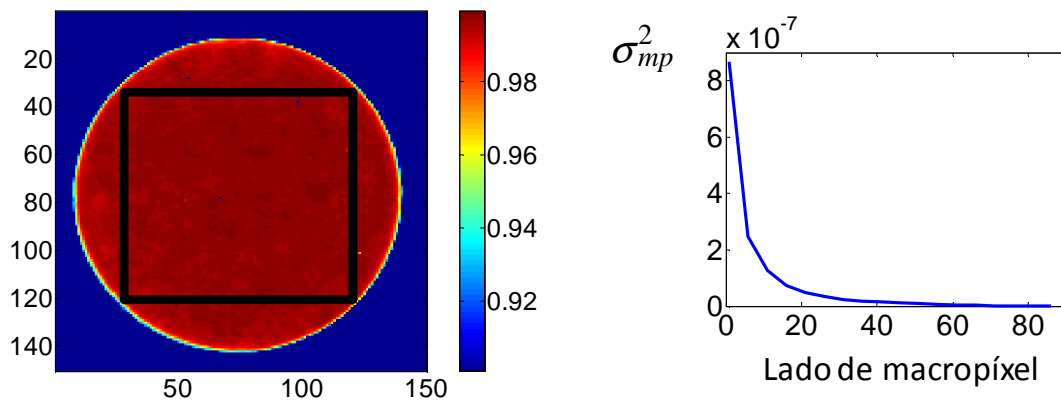


Figura 72. Mapa de correlación con el espectro medio obtenido a partir de todos los espectros situados en la zona correspondiente a un comprimido. En el recuadro negro se ha marcado la zona cuadrada de máxima superficie.

En la figura 73 se muestran los mapas de correlación obtenidos utilizando el espectro medio estándar para 8 comprimidos. Los 4 primeros presentan características muy similares al comprimido estándar, mientras que los 4 últimos representan comprimidos no uniformes. Una inspección visual de los mapas da una idea de la no

uniformidad de los comprimidos, pero no ofrece una medida objetiva del grado de uniformidad.

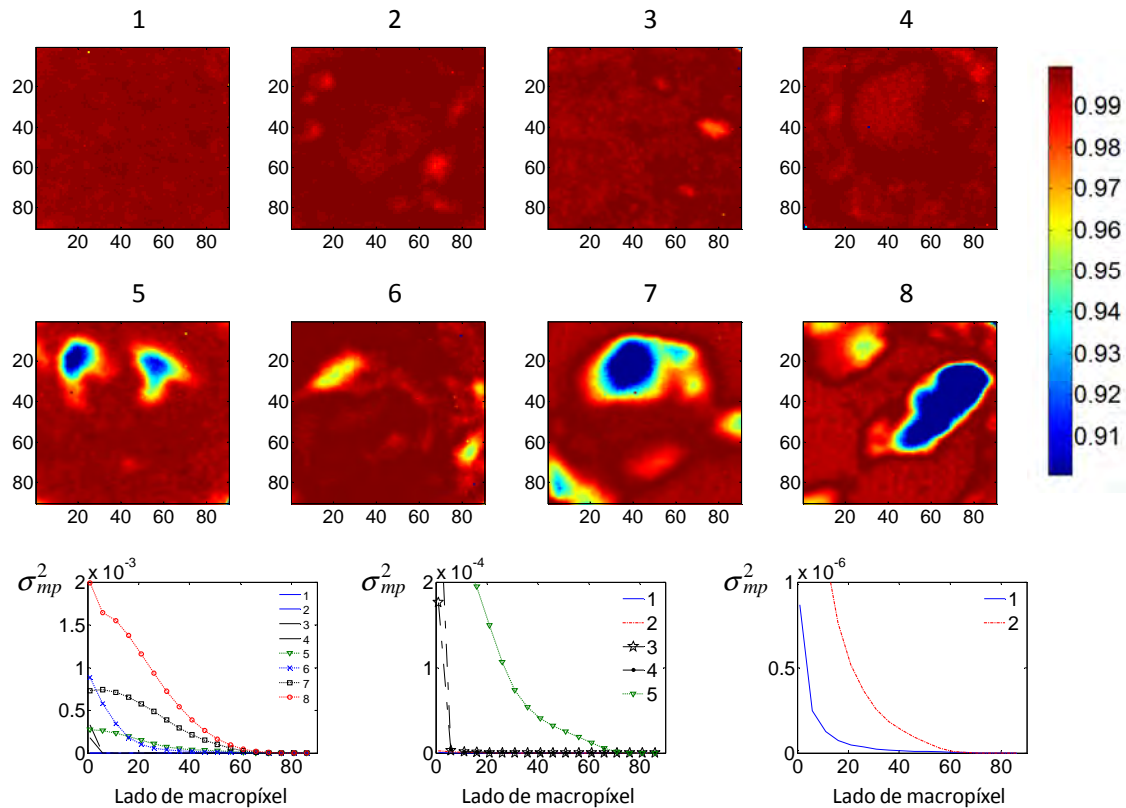


Figura 73. Mapas de correlación con el espectro medio del comprimido estándar para varios comprimidos. Curvas de uniformidad para los 8 comprimidos mostrados.

Se ha dibujado también la curva de uniformidad obtenida para cada imagen, numeradas en la figura entre 1 y 8. Existen diferencias notables entre ellas, las más uniformes presentan una varianza inicial muy baja si se las compara con las menos uniformes. Según aumenta el tamaño de macro-píxel la varianza tiende a estabilizarse, definiendo el punto donde la muestra se hace uniforme, es decir, la escala de segregación. El punto exacto debe ser definido por las necesidades del proceso o por el criterio del analista. Se puede definir un índice de uniformidad en función de las varianzas máxima y mínima, pero al no disponer en este caso de valores de concentración, fijar este tipo de límites usando mapas de coeficientes de correlación sin un calibrado previo requiere obtener toda la información de la comparación entre el comprimido estándar y el resto.

En la figura 74 se muestra el índice de uniformidad, obtenido mediante la comparación de varianzas para cada tamaño de macro-píxel, entre cada comprimido y el estándar. La varianza máxima define la escala del índice obtenido, pero no la relación entre cada imagen, que se mantendrá proporcional. A partir de estas curvas se puede obtener la escala y la intensidad de segregación de cada comprimido.

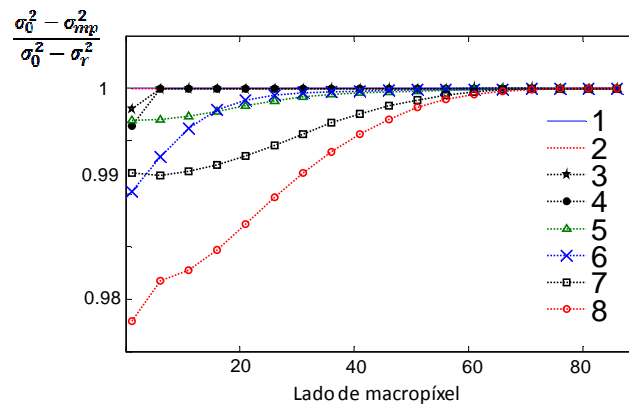


Figura 74. Índice de uniformidad para los 8 comprimidos.

Otro posible criterio para establecer las diferencias entre las imágenes analizadas es calcular el área comprendida entre las dos curvas de uniformidad, la de la imagen estudiada y la del estándar.

Estas herramientas permiten obtener un factor numérico objetivo para comparar el grado de uniformidad de superficies sólidas. A partir del desarrollo de estas metodologías se puede plantear la obtención de sencillos gráficos de control para controlar la uniformidad de una superficie sólida para un tamaño de muestra fijado previamente.

En la figura 75 se muestran los valores de varianza obtenidos para los 8 comprimidos de la figura 73 utilizando, respectivamente, un tamaño de macro-píxel de 20 píxeles (círculo negro) y 40 píxeles (triángulo azul) de lado. La línea roja representa la varianza del comprimido seleccionado como estándar. Alrededor de este límite se puede situar otro superior, en función de la experiencia experimental previa, de los requerimientos del proceso, etc. (línea naranja). De esta forma los comprimidos que se encuentran

fuera de límite se clasifican como no uniformes. La tendencia que muestra el gráfico se debe a que los comprimidos fueron ordenados previamente en función de su uniformidad. Normalmente el gráfico tendrá un aspecto similar a un gráfico de control convencional. Según este gráfico de control, si el requerimiento previo de uniformidad es la superficie aproximada de $\frac{1}{4}$ de comprimido (macro-píxel de 40 píxeles de lado) sólo las muestras 7 y 8 se clasifican como no uniformes. Si el requerimiento de uniformidad fuera de $\frac{1}{8}$ de comprimido (macro-píxel de 20 píxeles de lado) la muestra 5 y la 6 también se clasificarían como no uniformes.

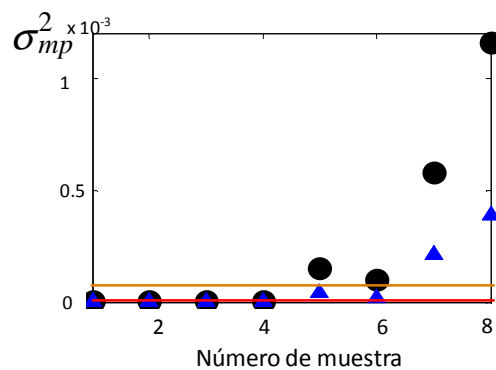
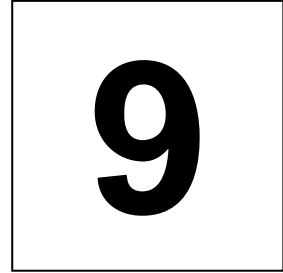


Figura 75. Varianza para un tamaño de macro-píxel de 20 píxeles de lado (negro) y 40 píxeles de lado (azul) para cada uno de los 8 comprimidos de la figura 73.



CONCLUSIONES

A lo largo de esta memoria se han expuesto diversos trabajos experimentales que han contribuido a explorar las capacidades y posibilidades de la espectroscopia de imagen NIR en el análisis de sólidos. A continuación se repasan los contenidos de cada capítulo y se enuncian las principales conclusiones que se pueden extraer en cada uno de ellos:

En el capítulo 4 se ha hecho un estudio exhaustivo del efecto que produce el tamaño de partícula en el espectro NIR registrado en modo reflectancia difusa y se ha aplicado la teoría de la capa representativa (RLT) para calcular los coeficientes de absorción y dispersión de dos muestras en polvo. Conclusiones que se pueden extraer son:

- Un aumento en el tamaño de partícula produce un incremento de la absorbancia aparente de la muestra. La magnitud de este incremento depende de la longitud de onda, siendo mayor cuanto mayor es el coeficiente de absorción.
- Existe un intervalo de tamaño de partícula (entre 63 y 225 μm) en el que la relación entre absorbancia aparente (o función de Kubelka-Munck) y tamaño de partícula es lineal.
- Se ha demostrado la aplicabilidad de la teoría de la capa representativa (RLT), enunciada recientemente por Dahm, a muestras en polvo. Para ello se ha asumido que el espesor de cada capa coincide con el diámetro de partícula.
- Esta teoría permite predecir la tendencia no lineal que existe entre el aumento en la intensidad de banda y el aumento del tamaño de partícula, lo que no era posible con las teorías vigentes anteriormente.
- Asimismo, permite calcular independientemente el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión a una determinada longitud de onda. Se ha demostrado que el coeficiente de absorción es independiente del tamaño de partícula y que el coeficiente de dispersión varía de forma inversamente proporcional al diámetro de partícula, en el intervalo de tamaños estudiado.

- La representación de ambos coeficientes en función de la longitud de onda permite visualizar y cuantificar la mutua dependencia entre ambos, ya que al incrementarse el coeficiente de absorción, disminuye el de dispersión.
- La extrapolación de estas conclusiones a una imagen NIR-CI, permite prever el efecto que tendría una variación no aleatoria del tamaño de partícula, la cual podría provocar errores significativos en la estimación de la concentración de los componentes.

En el capítulo 5 se ha estudiado la penetración de la radiación NIR en muestras sólidas en polvo. Se ha puesto de manifiesto que:

- La penetración es función del coeficiente de absorción (K). Longitudes de onda con valores de K altos, penetran menos que las longitudes de onda con valores bajos. Asimismo, la penetración es función del coeficiente de dispersión (S), penetrando menos en muestras con coeficiente de dispersión grande que en muestras con coeficiente de dispersión bajo.
- Para muestras poco absorbentes la penetración puede ser de varios milímetros.
- La absorbancia ($\log_{10}1/R$) de una muestra varía de forma exponencial negativa con el espesor de la misma.
- Un efecto indirecto de todo ello es que al registrar un espectro NIR en modo reflectancia, si el espesor de la muestra no es suficiente y hay pérdidas por transmitancia, se obtendrán valores de absorbancia ($\log_{10}1/R$) mayores de lo que correspondería.
- El valor encontrado para un espesor infinito por la teoría de capas representativa (RLT) es superior al valor experimental encontrado. Sin embargo, existe una relación lineal que sugiere la posibilidad de usar RLT para la predicción de dicho espesor.

En el capítulo 6 se ha definido el término resolución química de una imagen y estudiado cómo varía la resolución lateral para varios tipos de muestra de distinta capacidad de dispersión de la radiación. El análisis de imágenes de la misma muestra obtenidas con un instrumento comercial y con el prototipo desarrollado en el grupo de investigación en colaboración con la empresa *Think Spectrally*, se ha utilizado para caracterizar el prototipo y definir líneas de mejora del mismo.

- La radiación difusa proveniente de una determinada posición y área (píxel) contiene información de un determinado volumen, pudiéndose hablar de contaminación lateral cuando nos referimos a píxeles vecinos en la misma superficie y de contaminación en profundidad cuando nos referimos a material situado en superficies situadas por debajo de la superficie fotografiada.
- La contaminación en profundidad dependerá fundamentalmente de la penetración de la radiación, habiéndose encontrado que las conclusiones obtenidas en el capítulo 5 en un instrumento NIR convencional son extrapolables a NIR-CI
- Se ha demostrado que la resolución química depende en gran medida de las propiedades de dispersión del material analizado. Para una resolución óptica de 100 μm , se ha encontrado valores de resolución química que varían de 0,7 a 2,1 mm.
- La resolución del instrumento comercial ha demostrado ser mucho mejor que la del prototipo. Líneas de mejora que se ha planteado llevar a cabo en un futuro próximo:
 - Reducción de la potencia lumínica
 - Mejora del sistema de enfoque
 - Sustitución de óptica de borosilicato por óptica de germanio.

En el capítulo 7 se presentó una herramienta quimiometría que permite obtener mapas de distribución de los componentes de una muestra utilizando únicamente información contenida en la propia imagen.

- Se ha desarrollado una función que permite mejorar el contraste en los mapas de distribución, enfatizando la separación entre los espectros más parecidos.
- Se ha demostrado su utilidad para obtener información no sólo de los mapas de distribución, sino también de los histogramas de correlación de una imagen.
- La aplicación a la imagen de un comprimido lacado ha permitido detectar e identificar una intrusión de la laca en el interior del comprimido.

En el capítulo 8 se presentó otra herramienta que combina el procesado de espectros y de imagen para definir y obtener el grado de uniformidad de una muestra a partir de su imagen NIR.

- Se demostró la aplicabilidad de las curvas de uniformidad de la teoría clásica de mezcla de sólidos al análisis de homogeneidad de una imagen. Este estudio se ha realizado tanto sobre muestras simuladas como en muestras reales.
- La aplicación de las curvas de uniformidad en imágenes simuladas demostró que se puede establecer una relación entre la aplicación de este procedimiento y la teoría clásica de mezcla de sólidos. También mostró el comportamiento que tienen las curvas de uniformidad ante distintos cambios en propiedades de la muestra, tales como la concentración de analito, el tamaño de partícula o la formación de agregados.
- El concepto de homogeneidad de un analito en una muestra se relaciona intrínsecamente con el de uniformidad de distribución de concentración. Por ello, una extensión directa de las teorías de muestreo clásico a una imagen implica el uso de mapas de concentración. Esta etapa de procesado

cuantitativo de la información química contenida en una imagen puede evitarse mediante el uso de mapas de correlación o mapas binarios.

- Los resultados experimentales en el análisis de mapas de concentración de mezclas de dos componentes, en polvo y con tamaño de partícula de aproximadamente un orden de magnitud menor al tamaño de píxel, muestran resultados concordantes con los datos simulados. Así, un tamaño de macro-píxel de aproximadamente 10 indica uniformidad de distribución, mientras que la presencia de aglomerados (mala homogeneización) se ve claramente reflejada en las curvas de uniformidad, con tamaños de macro-píxel de 22-36.
- Un aspecto importante a tener en cuenta es la relación existente entre tamaño de partícula y tamaño de píxel. Si el tamaño de partícula es significativamente menor que el píxel, en cada píxel ya se está haciendo un promedio de varias partículas, por lo que no es de extrañar que la definición de homogeneidad sea aplicable a tamaños de macro-píxel muy pequeños (prácticamente a píxeles individuales) y que el umbral del coeficiente de correlación sea muy alto.
- Se ha demostrado la aplicabilidad de las curvas de uniformidad sobre mapas de correlación obtenidos a partir de imágenes de diversos comprimidos. Las curvas de uniformidad y la información que se puede extraer de ellas es comparable a la obtenida sobre mapas de concentración, con la salvedad que los valores de varianza que se obtienen son mucho menores (los coeficientes de correlación son todos muy próximos a 1). Esto pone de manifiesto la necesidad de disponer de muestras estándar (comprimidos considerados como aceptables) para poder definir el umbral sobre el que estimar el tamaño de macro-píxel que define uniformidad (o aceptabilidad).

10

REFERENCIAS

Referencias

-
- ¹ U.S Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry, PAT-A Framework for Innovate Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance, FDA (CDER), (2004), [documento disponible en Internet en la dirección: <http://www.fda.gov/cder/guidance/6419fnl.pdf>]
- ² E.N. Lewis, J Schoppelrei, E. Lee. *Spectroscopy*, **19** (2004) 26-36.
- ³ R.C. Lyon, E.H. Jefferson, C.D. Ellison, L.F. Buhse, J.A. Spencer, M.M. Nasr, A.S. Hussain. *Am. Pharm.Rev.*, **6** (2003) 62-70.
- ⁴ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline Pharmaceutical Development Q8, *Step 5*, (2005).
- ⁵ M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela. *Analyst*, **123** (1998) 135R-150R.
- ⁶ E.W. Ciurczak, Principles of near-infrared spectroscopy, in: D.A. Burns, E.W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd edition, Marcel Dekker Inc., New York/Basel, 2001.
- ⁷ E.W. Ciurczak, J.K. Drennen III, *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
- ⁸ G. Reich, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **57** (2005) 1109-1143.
- ⁹ Handbook of Near-infrared analysis. Ed. D.A.Burns and E.K. Ciurczak, 2008.
- ¹⁰ A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, S.E.J. Bell, *Eur. J.Pharm. Biopharm.*, **69** (2008) 10-22.
- ¹¹ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48** (2008)533-553.
- ¹² F.C. Clarke, S.V. Hammond, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Appl. Spectrosc.*, **56** (2002) 1475-1483.
- ¹³ M. Iyer, H.R. Morris, J.K. Drennen III, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **10** (2002) 233-245.
- ¹⁴ H. Ma, C.A. Anderson, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **15** (2007) 137-151.

Referencias

- ¹⁵ S.J. Hudak, K. Haber, G. Sando, L.H. Kidder, E.N. Lewis, *NIR news*, **18** (2007) 6-8.
- ¹⁶ D. Clark, S. Sasic, *Cytometry.Part A*, **69A** (2006)815-824.
- ¹⁷ F. Clarke, *Vib. Spectrosc.*, **34** (2004) 25-35.
- ¹⁸ J. Burger, P. Geladi, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **15**(2007) 29-37.
- ¹⁹ M.L. Hamad, C.D. Ellison, M.A. Khan, R.C. Lyon, *J. Pharm. Sci.*, **96** (2007) 3390-3401.
- ²⁰ S. Sasic, *Appl. Spectrosc.*, **61** (2007) 239-250.
- ²¹ A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, *Trends Anal. Chem.*, **23** (2004) 70-79.
- ²² J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. MasPOCH, J. Coello, M. Blanco, **27** (2008) 696-713.
- ²³ E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, L.H. Kidder, *Near-infrared chemical imaging as a process analytical tool, Process Analytical Technology*, K.A. Bakeev (Ed.) Blackwell Publishing Ltd, Oxford, (2005), 187-225.
- ²⁴ A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen II, *J. Pharm. Sci.*, **90** (2001) 1298-1307.
- ²⁵ E.N. Lewis, J. Dubois, L.H. Kidder, K.S. Haber, *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, IH. F. Grahn, P. Geladi (Eds.), John Wiley & Sons, Ltd., 2007, 335-361.
- ²⁶ E. Lee, W. X. Huang, P. Chen, E. N. Lewis, V. Vivilecchia, *Spectroscopy* **21** (2006) 24-32.
- ²⁷ R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L.X. Yu, E.H. Jefferson, A.S Hussain, *AAPS PharmSciTech*, **3**(2002) 1-15.
- ²⁸ H. Ma, C.A. Anderson, *J. Pharm. Sci.*, **97** (2008) 369-373.
- ²⁹ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *Talanta* **73** (2007) 733-741.
- ³⁰ N. Jovanovic, A. Gerich, A. Bouchard, W. Jiskoot, *Pharm. Res.* **23** (2006) 2002
- ³¹ T. Furukawa, H. Sato, H. Shinzawa, I. Noda, S. Ochiai, *Anal. Sci.*, **23** (2007) 871-876.
- ³² S. Sasic, *Anal. Chim. Acta*, **611** (2008) 73-79.
- ³³ A.S. Zidan, O.A. Sammour, M.A. Hammad, N.A. Megrab, M.J. Habib, M.A. Khan, *J. Microencapsulation*, **25** (2008) 45-153.
- ³⁴ B.J. Westenberger, C.D. Ellison, A.S. Fussner, S. Jenney, R.E. Kolinski, T.G. Lipe, R.C. Lyon, T.W. Moore, L.K. Reville, A.P. Smith, J.A. Spencer, K.D. Story, D.Y. Toler, A.M. Wokovich, L.F. Buhse, *Int. J.Pharm.*, **306** (2005) 56-70.

Referencias

- ³⁵ L.R. Hilden, C.J. Pommier, S.I.F. Badawy, E.M. Friedman, *Int. J. Pharm.*, **353** (2008) 283-290.
- ³⁶ L.J. Makein, L.H. Kidder, E.N. Lewis, M. Valleri, *NIR news*, **7** (2008) 11-15.
- ³⁷ L. Weiyong, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, D. Winstead, *Int. J. Pharm.*, **350** (2008)369-373.
- ³⁸ H. Ma, C.A. Anderson, *J. Pharm. Sci.*, **97** (2008) 369-373.
- ³⁹ E.N. Lewis, L.H. Kidder, E. Lee, *NIR News*, **16** (2005) 2-4.
- ⁴⁰ J. Dubois, J.-C. Wolff, J.K. Warrack, J. Schoppelrei, E.N. Lewis, *Spectroscopy*, **22** (2007)40-50.
- ⁴¹ . M.A. Veronin, E. Lee, E.N. Lewis, *Ann. Pharmacother.*, **41** (2007) 1111-1115.
- ⁴² E.N. Lewis, J.E. Carroll, F. Clarke, *NIR News*, **12** (2001) 16-18.
- ⁴³ D. Clark, M. Henson, F. LaPlant, S. Sasic, L. Zhang, *The Handbook of Vibrational Spectroscopy, Applications in Life, Pharmaceutical and Natural Sciences, Pharmaceutical Applications*, Edit: D. E. Pivonka, J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, John Wiley & Sons, Ltd., Vol. 5 (2007) 1-27.
- ⁴⁴ D.A. Skoog, *Principles of Instrumental Analysis*, Ed. Brooks Cole, 1997.
- ⁴⁵ W.W. Wendlandt, H.G. Hecht, *Reflectance Spectroscopy*. Interscience, New York , 1966.
- ⁴⁶ J.M. Olinger, P.R. Griffiths, in: D.A. Burns, E.W. Ciurczak(Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Marcel Dekker, New York, 1992
- ⁴⁷ J. Burger, P. Geladi, *J. NIR Spectrosc.* **15** (2007) 29.
- ⁴⁸ R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Appl. Spectrosc.* **43** (1989)772.
- ⁴⁹ N. Elkhider, K.L.A. Chan, S.G. Kazarian, *J. Pharm. Sci.* **96** (2007)351.
- ⁵⁰ W. Windig, *Chemometrics Intelligent Lab. Syst.* **23** (1994) 71.
- ⁵¹ L. Zhang, *Pattern Recognition Methods for the Analysis of Infrared Imaging Data and Multivariate Calibration Standardization for Near Infrared Spectroscopy*, PhD Thesis, Ohio University, USA, 2002.
- ⁵² K.L.A. Chan, S.G. Kazarian, D. Vassou, V. Gionis, G.D. Chryssikos, *Vib. Spectrosc.* **43** (2006) 221–226.
- ⁵³ K.L.A. Chan, S.G. Kazarian, *Vib. Spectrosc.* **42** (2006) 130–134.
- ⁵⁴ K.L.A. Chan, S.G. Kazarian, *Vib. Spectrosc.* **35** (2004) 45–49.

Referencias

- ⁵⁵ C. Ravn, E. Skibsted, R. Bro, *Anal.* **48** (2008) 554-561.
- ⁵⁶ B.M. Wise, N.B. Gallagher, S.W. Butler, D.D. White, G.G. Barna, *J. Chemometrics* **13** (1999) 379.
- ⁵⁷ P. Geladi, H. Isaksson, L. Lindqvist, S. Wold, K. Esbensen, *Chemometrics Intelligent Lab. Syst.* **5** (1989)209.
- ⁵⁸ P. Geladi, S. Wold, K. Esbensen, *Anal. Chim. Acta* **191** (1986)473.
- ⁵⁹ O. Svensson, K. Abrahamsson, J. Engelbrektsson, M. Nicholas, H. Wikstrom, M. Josefson, *Chemometrics Intelligent Lab. Syst.* **84**(2006) 3.
- ⁶⁰ K.L.A. Chan, N. Elkhider, S.G. Kazarian, *Chem. Eng. Res. Des.* **83**(2005) 1303.
- ⁶¹ P. Geladi, H. Grahn, *Multivariate Image Analysis*, John Wiley & Son Ltd, New York, USA, 1997.
- ⁶² L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, *Anal. Chim. Acta* **545** (2005)262.
- ⁶³ S. Sasic, *Appl. Spectrosc.* **61** (2007) 239.
- ⁶⁴ Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *Anal. Chim. Acta* **535** (2005) 79.
- ⁶⁵ Y. Roggo, N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **61** (2005) 100.
- ⁶⁶ S. Chevallier, D. Bertrand, A. Kohler, P. Courcoux, *J. Chemometrics*, **20** (2006) 221.
- ⁶⁷ M. Blanco, J. Cruz and M. Bautista, *Anal. Bioanal.Chem.* **392** (2008) 1367-1372.
- ⁶⁸ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *Talanta* **73** (2007) 733.
- ⁶⁹ E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, L.H. Kidder, *Near-infrared chemical imaging as a process analytical tool*. In: K.A. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, (2005), 187-225.
- ⁷⁰ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, C. Collet, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68** (2008) 828-837.
- ⁷¹ S. Sasic, *Anal. Chim. Acta*, **611** (2008) 73-79.
- ⁷² W. Li, A.Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, D. Winstead, *Int. J. Pharm.* **350** (2008) 369–373.
- ⁷³ P. Geladi, J. Burger, T Lestander. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **72**(2004). 209-217
- ⁷⁴ Kortüm G, *Reflectance Spectroscopy: Principles, Methods, Applications*. Springer, New York (1969)

Referencias

- ⁷⁵ W.W. Wendlandt, H.G. Hecht, *Reflectance Spectroscopy*. Interscience, New York (1966).
- ⁷⁶ D.J. Dahm, K.D. Dahm, "Discontinuum Theory of Diffuse Reflection" in the Handbook of Vibrational Spectroscopy, Volume 2, Ed. J.M. Chalmers and P.R. Griffiths. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK, 2001.
- ⁷⁷ J.M. Olinger, P.R. Griffiths, in: D.A. Burns, E.W. Ciurczak(Eds.), Handbook of Near-Infrared Analysis, Marcel Dekker, New York, 1992
- ⁷⁸ P. Kubelka, F. Munk, *Zeitschrift für Technische Physik* **12** (1931) 593
- ⁷⁹ D. Dahm and K. Dahm. *Appl. Spectrosc.* **53** (1999) 647
- ⁸⁰ F. Benford, *J. opt. Sc. Amer.*, **36** (1946) 524-554
- ⁸¹ Murray, I. Scattered information: philosophy and practice of near infrared spectroscopy. Near Infrared Spectroscopy. Proceedings of the 11th international conference. 2003.1-11.
- ⁸² Palik E.D. *Handbook of Optical Constants of Solids III*. Academic Press, New York. , 1998.
- ⁸³ D. Dahm and K. Dahm, *J. Near infrared Spectrosc.* **11** (2003) 479-485.
- ⁸⁴ D. Dahm, K. Dahm, K. Norris, *J. Near infrared Spectrosc.* **8** (2000) 171-181
- ⁸⁵ T. Burger, J.Kuhn, R. Caps, J. Fricke , *J. Appl. Spectrosc.* **51** (1997) 309-317
- ⁸⁶ M. D. Morris, M. V. Schulmerich, K. A. Dooley, K. A. Esmonde-White, Biomedical Applications. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Ed. Salzer and Siesler, Wiley VCH, Germany, 2008, 113-224.
- ⁸⁷ D. Bellon-Maurel, Near-Infrared Hyperspectral Imaging in Food and Agricultural Science. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Ed. Salzer and Siesler, Wiley VCH, Germany, 2008, 225-295.
- ⁸⁸ M. Andersson, M Josefson, F.W. Langkilde, K.G. Wahlund, *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **20**(1999) 27-37
- ⁸⁹ S.V. Hammond, *Eur. Pharm. Rev.*, **3** (1998) 47-51.
- ⁹⁰ W. G. Haanstra, W. Hansen, M. J. Huys, *Applied Spectroscopy*. **52(6)**(1998) 863-868.
- ⁹¹ O. Berntsson, T. Burger, S. Folestad, L-G Danielsson, J. Kuhn, J.Fricke, *Anal. Chem.*, **71** (1999),617-623.
- ⁹² O. Berntsson, L-G. Danielsson, S. Folestad., *Anal. Chim. Acta.*, **364** (1998) 243-51.

Referencias

- ⁹³ J.M. Olinger, P.R. Griffiths, *Anal. Chem.*, **60** (1988), 2427-2435.
- ⁹⁴ B.F. MacDonald, K.A. Prebble, *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **11** (1993) 1077-1085.
- ⁹⁵ P. R. Griffiths, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Ed. Salzer and Siesler, Wiley VCH, Germany, 2008, 26-41
- ⁹⁶ J. S. Hudak, K.Haber, G. Sando, L.H. Kidder, E.N. Lewis. *NIR news*. **18** (2007) 5-7.
- ⁹⁷ J.F. Kauffman, S.J. Gilliam, R.S. Martin. *Anal. Chem.* **80** (2008) 5706-5712
- ⁹⁸ D. J. Gardiner, M. Bowden, and P. R. Graves, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser.*, **A320** (1986) 295-299.
- ⁹⁹ E. Wessel, C. Vogel, O. Kolomiets, U. Hoffmann, H.W. Siesler. *Infrared and Raman Spectroscopy Imaging*. Ed. Salzer and Siesler, Wiley VCH, Germany, 2008, 297-343.
- ¹⁰⁰ A. J. Sommer, L.G. Tisinger, C. Marcott, G. M. Story, *Appl. Spectrosc.* **55**(2001) 252-256.
- ¹⁰¹ A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, G. Downey, J.M. Frias, *Trends in Food Science Technology* **18** (2007) 590.
- ¹⁰² R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Applied Spectroscopy* **43** (1989) 772.
- ¹⁰³ P. Geladi, H. Grahn, *Multivariate Image Analysis*, John Wiley & Son Ltd., New York, 1997.
- ¹⁰⁴ Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *Anal. Chim. Acta*, **535**(2005) 79.
- ¹⁰⁵ P. Geladi, H. Isaksson, L. Lindqvist, S. Wold, K. Esbensen, *Chemometrics Int. Lab. Syst.*, **5** (1989) 209.
- ¹⁰⁶ L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, *Anal. Chim. Acta*, **545** (2005) 262.
- ¹⁰⁷ P.V. Danckwerts, *Research (London)*, **6** (1953) 355-361.
- ¹⁰⁸ P.M.C. Lacey, *J. Appl. Chem.*, **4** (1954) 257-268.
- ¹⁰⁹ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem. Res.* **62**(1970) 53-69.
- ¹¹⁰ S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, and Aldridge, P.K., *Anal.Chem.* **68** (1996) 509-513.
- ¹¹¹ P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver and P.K Aldridge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996) 551- 559.
- ¹¹² S.S.Sekulic, J.Wakeman, P. Doherty and P.A. Hailey, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**(8) (1998) 1285-1309.
- ¹¹³ M.Blanco, R. Gonzalez, E. Bertran, *Talanta* **56** (2002) 203-212.

Referencias

- ¹¹⁴ E.T.S Skibsted, H.F.M. Boelens, J.A. Westerhuis, D.T. Witte and A.K. Smilde, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41(1)** (2005) 26-35.
- ¹¹⁵ M.L. Hamad, C.D. Ellison, M.A. Khan, R.C. Lyon, *J. Pharm. Sci.* **96** (2007) 3390-3401.
- ¹¹⁶ L. H. Cartlijier and A. J. Möes, *Drug Dev. Ind. Pharmac.* **12** (1986) 1203-18
- ¹¹⁷ K. R. Poole, R. F. Taylor, G. P. Wall, *Tram Insl. Chem Eng.* **42** (1964) 305-15
- ¹¹⁸ J. A. Hersey. *Powder Technol.* **11** (1975) 41-44.
- ¹¹⁹ J.Gyenis, *Chem. Eng.Process.*, **38** (1999) 665-674.

11

ANEXOS

ANEXO-1.ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cubo de datos hiperespectral NIR. Los espectros NIR están asociados con cada píxel y cada imagen asociada con cada número de onda (longitud de onda) NIR. Derecha: Una imagen química (CI) del principio farmacéutico activo (API = Active Pharmaceutical Ingredient) generado a partir del procesado de los datos del cubo.....	2
Figura 2. Modos de registro en NIR	6
Figura 3. Fenómeno de absorción, transmisión y reflexión de la radiación electromagnética al interactuar con la materia.	6
Figura 4. Procesos de reflexión en un material especular (a) o irregular (b). Fenómeno de reflectancia difusa (c).....	8
Figura 5. Tipos de configuraciones que permiten obtener una imagen química hiperespectral en el infrarrojo próximo	11
Figura 6. Desdoblamiento de la matriz. Etapa fundamental en el tratamiento de las imágenes con las técnicas habituales de espectroscopia NIR.....	13
Figura 7. Clasificación de los métodos utilizados en NIR-CI para extraer información en forma de mapas de distribución de componentes.....	15
Figura 8. Modelo Bilineal en el que se basa la descomposición en la regresión lineal clásica (CLS).....	19
Figura 9. Espectrómetro NIR FOSS 6500, módulo RCA, a la derecha detectores del RCA, abajo cubetas empleadas para medir en este módulo.....	29
Figura 10. Sistema de adquisición de imagen NIR de mapeo por puntos.	30
Figura 11. Sistemas de plano focal o imagen global. A la izquierda dispositivo comercial de la compañía Malvern SyNIRgi. a la derecha prototipo desarrollado por la empresa Think Spectrally y el grupo de quimiometría aplicada de la UAB.	31
Figura 12. Esquema de una capa representativa.....	40
Figura 13. Espectros registrados para el agua retenida en el NaCl, representados en: a) Reflectancia, b) $\log(R/R_0)$, c) $F(R) = (1-R)^2/2R$	45
Figura 14. Espectros registrados para el KHP, representados en: a) $\log(R_{ref}/R_0)$, b) $F(R) = (1-R)^2/2R$, c) R	47
Figura 15. Absorbancia aparente para los máximos de absorción del H ₂ O para los distintos tamaños de partícula.	48
Figura 16. F(R) para los máximos de absorción del H ₂ O para los distintos tamaños de partícula.	49
Figura 17. Absorbancia aparente para los máximos de absorción del KHP para los distintos tamaños de partícula.	49
Figura 18. F(R) para los máximos de absorción del KHP para los distintos tamaños de partícula.	50
Figura 19. F(R) para los máximos de absorción del KHP. Zona de comportamiento lineal.....	51
Figura 20. F(R) del KHP para $\lambda = 1136$ nm. Recta de regresión.....	51
Figura 21. Relación de absorbancia corregida para los máximos de pico A_{1440}/A_{1936} , arriba, y relación de $F(R)_{1440}/F(R)_{1936}$, abajo, representadas frente al tamaño de partícula.	54
Figura 22. Múltiples reflexiones internas en el seno de una partícula. Stokes.	55

Figura 23. Valores experimentales (símbolos huecos) comparados con los valores obtenidos por medio de la teoría de la capa representativa (símbolos sólidos), para $\lambda=1136$, $\lambda=1668$, $\lambda=2146$, $\lambda=2412$.	57
Figura 24. Valores experimentales (símbolos huecos) comparados con los valores obtenidos por medio de la teoría de la capa representativa (símbolos sólidos) para $\lambda=1936$ nm.	59
Figura 25. (a) Coeficiente de absorción del KHP para cuatro longitudes de onda, 2412, 2146, 1668, 1136 nm. Relación con el tamaño de partícula. (b) Coeficiente de dispersión del KHP para cuatro longitudes de onda, 2412, 2146, 1668, 1136 nm. Relación con el tamaño de partícula.	61
Figura 26. (a) Coeficiente de dispersión del agua retenida en el NaCl para dos longitudes de onda, 1440 nm, 1936 nm. Relación con el tamaño de partícula. (b) Coeficiente de absorción del agua retenida en el NaCl para dos longitudes de onda, 1440 nm, 1936 nm. Relación con el tamaño de partícula.	62
Figura 27. Coeficiente de absorción (discontinua) y dispersión (continua) para el agua retenida en el NaCl con $dp=188$ μm calculados mediante la teoría de la capa representativa.	64
Figura 28. Coeficientes de absorción (izquierda) y dispersión (derecha) para el agua retenida en el NaCl vs tamaño de partícula, comparativa de los dos métodos utilizados para obtenerlos. Con símbolos llenos, método que utiliza dos espesores de muestra.	65
Figura 29. Coeficiente de absorción(a) y dispersión (b) para el KHP con $dp=225$ μm calculados mediante la teoría de la capa representativa	66
Figura 30. Coeficientes de absorción (derecha) y dispersión (izquierda) para el KHP representado frente al tamaño de partícula. Comparativa de ambos métodos utilizados para obtener los coeficientes. Con símbolos llenos, método que utiliza espectros registrados para dos espesores de muestra.	67
Figura 31. Posibles caminos ópticos seguidos por la radiación en una medida en reflectancia difusa sobre una muestra particulada.	71
Figura 32. Espectros de agua retenida en NaCl registrados a espesores diferentes para 3 tamaños de partícula. (a) 450 μm , (b) 225 μm y (c) 88 μm ; de arriba hacia abajo 5 espectros que corresponden con 5 espesores de muestra (1, 3, 5, 10 y 15 mm). (d) Representación del $-\log R$ con respecto al espesor de muestra para todas las longitudes de onda y para el tamaño mayor, 450 μm . (e) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1440$ nm y para los tres tamaños de partícula ($\sigma = 450$ μm , $\chi=225$ μm , $\nabla=88$ μm). (f) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1936$ nm y para los tres tamaños de partícula ($\sigma = 450$ μm , $\chi=225$ μm , $\nabla=88$ μm). Las líneas en la figuras (e) y (f) representan los ajustes de cada relación a una ecuación similar a la ecuación X.	75
Figura 33. Espectros de KHP registrados a espesores diferentes para 3 tamaños de partícula, (a) 450 μm , (b) 225 μm y (c) 88 μm , de arriba hacia abajo 5 espectros que corresponden con 5 espesores de muestra (2,3,4,5,10 mm). (d) Representación del $-\log R$ con respecto al espesor de muestra para todas las longitudes de onda y para el tamaño mayor, 450 μm . (e) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1136$ nm y para los tres tamaños de partícula ($\sigma = 450$ μm , $\chi=225$ μm , $\nabla=88$ μm). (f) $-\log R$ vs espesor de muestra, para $\lambda = 1186$ nm y para los tres tamaños de partícula ($\sigma = 450$ μm , $\chi=225$ μm , $\nabla=88$ μm). Las líneas en la figuras (e) y (f) representan los ajustes de cada relación a una ecuación similar a la ecuación 28.	77
Figura 34. Estimación del número de capas capaz de atravesar la radiación según la teoría de Dahm, NaCl (1440 nm)	80

Figura 35. Estimación del número de capas capaz de atravesar la radiación según la teoría de Dahm, NaCl (1936 nm)	81
Figura 36. Estimación del número de capas capaz de atravesar la radiación según la teoría de Dahm, KHP (1136 nm)	81
Figura 37. Radiación NIR penetrando en una muestra dispersiva (material en polvo)	86
Figura 38. Conjunto de muestras para el estudio de las fronteras entre distintos sólidos.	88
Figura 39. Método para obtener la resolución. Medidas de una frontera entre dos sólidos. ...	89
Figura 40. Frontera entre dos polímeros para distintas longitudes de onda.	90
Figura 41. Imágenes de la frontera I5 obtenidas a distintas longitudes y representación del valor de los coeficientes en la línea de píxeles central (x=75).	91
Figura 42. (a) Espectro puro del compuesto: m1 (línea continua) y m2 (línea discontinua).(b) Espectro puro del compuesto m1 (línea continua) y m3 (línea discontinua). (c) Espectro puro de la muestra m1 (línea continua) y espectro de m5 (línea discontinua).	92
Figura 43. Mapas de correlación para la frontera I5 utilizando distintas partes del espectro. Perfil de resolución para la línea de píxeles x=75 para ambos mapas de correlación.....	93
Figura 44. Mapas de correlación y perfil de valores de coeficiente de correlación a lo largo de la línea central de píxeles que atraviesa la frontera (x =75) para las tres fronteras (I2, I3 e I4). 94	94
Figura 45. Mapas de correlación realizados con el espectro puro de KHP (en el exterior del círculo) y sacarosa (en el interior) separados por una pared de vidrio boro silicato (no absorbente en NIR) de 500 μm de espesor. Mapa de correlación para una muestra preparada únicamente con sacarosa y la pared de vidrio boro silicato.....	96
Figura 46. Espectros puros del KHP y la sacarosa ($d_p = 0.225 \text{ mm}$) y de la frontera de polímero m3 con un espesor de 0.1 mm registrados con el instrumento de Malvern. S.L.	97
Figura 47. Mapas de correlación, espectros alrededor de la frontera y línea de valores de coeficiente de correlación que atraviesa la frontera en la línea píxeles x=75, para imágenes obtenidas sobre una muestra formada por sacarosa y KHP separados por una lámina de acetato de polivinilo (m3) de 100 μm de espesor. De arriba abajo, tres tamaños de partícula 88, 225, 450 μm , el mismo para ambos productos. Imágenes registradas en el instrumento de Malvern SyNIRgi	98
Figura 48. Comparativa en el estudio de la frontera I4 para los dos equipos FPA. Imágenes obtenidas a dos longitudes de onda características 1400 y 1700 nm. En la fila superior imágenes obtenidas con el equipo Malvern y perfil de intensidades para una línea de píxeles correspondiente con x=75. En la columna inferior imágenes obtenidas con el prototipo y perfil de intensidades para una línea de píxeles correspondiente con y=75.	99
Figura 49. Mapas de coeficiente de correlación con el espectro puro del KHP para imágenes obtenidas con ambos instrumentos sobre la frontera I5. (a) Instrumento de Malvern SyNIRgi, (b) Prototipo TS, (c) comparativa de valores de coeficiente de correlación alrededor de la línea de píxeles x= 75. (d) y (e) espectros en las proximidades de la frontera. (f) Espectros puros de las mezclas en ambos instrumentos.	100
Figura 50. Espectros puros para el KHP y la sacarosa con tamaño de partícula promedio, $d_p = 0.225 \text{ mm}$	101
Figura 51. Mapas de correlación, espectros alrededor de la frontera y línea de valores de coeficiente de correlación para imágenes obtenidas sobre una muestra formada por sacarosa y KHP separados por una lámina de acetato de polivinilo (m3) de 100 μm de espesor. De arriba	

abajo, tres tamaños de partícula 88, 225, 450 μm , el mismo para ambos productos. Prototipo TS.....	102
Figura 52. (a) mapa de correlación para una mezcla de las dos resinas de intercambio iónico utilizando una imagen obtenida con el prototipo TS y realizando la correlación con el espectro correspondiente a la posición [24, 52] (centro de una partícula de R1). (b) mapa de correlación para una mezcla de las dos resinas de intercambio iónico utilizando una imagen obtenida con el instrumento de Malvern SyNIRgi y realizando la correlación con el espectro correspondiente a la posición [111, 63] (centro de una partícula de R1).	103
Figura 53. (a) espectros de las dos resinas contenidos en la imagen correspondiente al prototipo mostrada en la figura 16, utilizados para realizar el mapa de distribución, R1 línea sólida, R2 línea discontinua. (b) Espectros puros de las resinas registrados con el prototipo. (c) espectros puros de las resinas registrados con el instrumental de Malvern SyNIRgi registrados en la mezcla, que coinciden con el espectro puro obtenido de forma aislada.....	104
Figura 54. Esquema de la metodología propuesta.	110
Figura 55. Análisis de componentes principales (PCA). Mapas de <i>scores</i> para los 4 primeros componentes. <i>Loadings</i> de los 4 primeros componentes. Varianza explicada por el modelo en función del número de componentes.....	115
Figura 56. (a) Mapa de correlación, distribución acumulativa de los coeficientes e histogramas de coeficientes, (b) Mapa de correlación con coeficientes de contraste mejorado, distribución acumulativa de los coeficientes de contraste mejorado e histograma correspondiente.	116
Figura 57. Espectros seleccionados para obtener los coeficientes de correlación y espectros puros del ibuprofeno y de la sacarosa.	118
Figura 58. Mapas de correlación de contraste mejorado para distintos valores del factor α junto con su histograma correspondiente, utilizando, en este caso, el espectro de la zona central del comprimido, [19 39].....	119
Figura 59. Mapas de correlación de contraste mejorado para distintos valores del factor α junto con su histograma correspondiente, en este caso, utilizando el espectro de la zona del recubrimiento del comprimido, [40, 30].....	120
Figura 60. Selección del valor de corte utilizando los coeficientes de contraste mejorado para obtener imágenes binarias. (a) píxel [26 39], valor de corte $T = 0.92$, (b) píxel [40 30], valor de corte $T=0.8$	121
Figura 61. Mapas de coeficiente de correlación utilizando espectros puros de los componentes.	122
Figura 62. Imágenes binarias obtenidas mediante el uso de coeficientes de correlación con el espectro puro del ibuprofeno (izquierda) y de la sacarosa (derecha).	123
Figura 63. Ejemplo de aplicación del análisis de macro-píxel.....	133
Figura 64. Ejemplo de obtención de la escala de segregación y escrutinio por medio de la curva de uniformidad.....	136
Figura 65. Efecto de la concentración en las curvas de uniformidad para distribuciones completamente aleatorias.	139
Figura 66. Efecto del tamaño de partícula en las curvas de uniformidad	141
Figura 67. Curvas de uniformidad para diferentes estados de segregación de dominios ordenados	142
Figura 68. Curvas de uniformidad para diferentes tamaños de agregado e igual concentración de analito (10%)	143

Figura 69. Distribuciones con distinto grado de segregación agregado e igual concentración de analito (10%)	145
Figura 70. Efecto de la segregación en las curvas.....	148
Figura 71. Mapas de concentración de ibuprofeno de una mezcla de ibuprofeno y celulosa micro-cristalina (mcc) a diferente concentración de API (70 % de ibuprofeno en la primera fila, 50 30 y 10 respectivamente en la segunda, y curvas de uniformidad obtenidas.....	150
Figura 72. Mapa de correlación con el espectro medio obtenido a partir de todos los espectros situados en la zona correspondiente a un comprimido. En el recuadro negro se ha marcado la zona cuadrada de máxima superficie.....	152
Figura 73. Mapas de correlación con el espectro medio del comprimido estándar para varios comprimidos. Curvas de uniformidad para los 8 comprimidos mostrados.....	153
Figura 74. Índice de uniformidad para los 8 comprimidos.	154
Figura 75. Varianza para un tamaño de macro-píxel de 20 píxeles de lado (negro) y 40 píxeles de lado (azul) para cada uno de los 8 comprimidos de la figura 73.....	155

ANEXO 2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamices empleados.....	33
Tabla 2. Rectas de regresión para el NaCl y el KHP. dp indica el tamaño de partícula.....	53
Tabla 3. Coeficientes de absorción estimados para el KHP	58
Tabla 4. Coeficientes de absorción estimados para el agua retenida en el NaCl	59
Tabla 5. Coeficiente de absorción y dispersión para el KHP	61
Tabla 6. Coeficiente de absorción y dispersión para el agua retenida en NaCl.....	62
Tabla 7. Coeficiente de absorción y dispersión para el agua retenida en NaCl	65
Tabla 8. Coeficientes de absorción y dispersión para el KHP	67
Tabla 9. Referencias bibliográficas en el estudio de la penetración de información en el Infrarrojo Próximo.....	73
Tabla 10. Constantes y penetración de información para el agua retenida en el NaCl.....	76
Tabla 11. Valores de las constantes correspondientes a las ecuaciones obtenidas para KHP...	78
Tabla 12. Resolución de la frontera I2 a diferentes longitudes de onda	91
Tabla 13. Resoluciones obtenidas para la frontera I5 a algunas longitudes de onda características.....	92
Tabla 14. Resolución obtenida para las diferentes fronteras en mapas de coeficientes de correlación con el espectro puro en el rango completo de longitudes de onda.	95
Tabla 15. (a) Valores obtenidos del análisis de las curvas de uniformidad figura 65, escala de segregación, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38a. (b) pendiente de la recta, a , para cada concentración de analito, coincide con la varianza máxima teórica, $\sigma_0=C*(1-C)$, para sistemas binarios.....	140
Tabla 16. Escala de segregación imágenes figura 66, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38	142
Tabla 17. Escala de segregación de las imágenes mostradas en la figura 67, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38	143
Tabla 18. Escala de segregación correspondiente con imágenes figura 68, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38	144
Tabla 19. Intensidad y escala de segregación distribuciones figura 69, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38.	146
Tabla 20. Escala de segregación figura 70, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38a. I_R es la intensidad relativa, relativa a la intensidad de segregación máxima, ecuación 38b.	147

Tabla 21. Escala de segregación imágenes figura 71, S_s , expresada como una longitud, en este caso, en número de píxeles de lado de una superficie cuadrada. I_s es la intensidad de segregación obtenida a través de la ecuación 38.....151

ANEXO 3. ARTÍCULO 1

Application of Representative Layer Theory to Near-Infrared Reflectance Spectra of Powdered Samples

CARLOS CAIRÓS, JORDI COELLO, and SANTIAGO MASPOCH*

Dpto. Química, Facultad de Ciencias, Cn, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

The diffuse reflectance near-infrared (NIR) spectrum of a powdered sample includes the contribution of specular and diffuse reflectance, which is a function of absorbance and scattering. The fraction of light scattered depends in a complex manner on the physical properties of the sample such as particle size, refraction index, etc. Several theories to study the dependence of NIR spectra on the particle size have been proposed. The best known is the Kubelka–Munk model, an approach based on continuous mathematics. Recently Dahm and Dahm put forward an alternative method, the representative layer theory (RLT), which uses discontinuous mathematics as a basis. This approach can be used to identify and disentangle the scattering and absorbance signals as well as their dependence on the particle size. The scattering and absorption coefficient of NaCl (a nonabsorbing material) and of potassium hydrogen phthalate, KHP (a strong absorber), have been estimated through the application of the representative layer theory, working on a particle size range from 63 to 450 μm . In both samples, the absorption coefficient of the sample (K) remains constant and practically independent of the particle size, while the scattering coefficient of the sample (S) decreases when the particle diameter increases, becoming stable around a diameter of 250 μm .

Index Headings: Near-infrared spectroscopy; NIR spectroscopy; Representative layer theory; Scattering coefficient; Absorption coefficient; Particle size.

INTRODUCTION

Diffuse reflection near-infrared (NIR) spectroscopy has been extensively accepted as a rapid, nondestructive analytical technique for many kinds of solid samples. Among the many applications demonstrated, NIR spectrometry has been shown to be a powerful tool for direct analysis of mixtures of powders, granules, etc. The spectrum obtained is affected not only by the chemical, but also by the physical properties of the sample. This means that a wealth of chemical and physical information, both qualitative and quantitative, can be obtained within seconds, often without the need for any sample preparation. The best known example of the physical effect is the effect of particle size on light scattering. It can either be reduced by some transformation of the spectra,^{1–3} or it can be used to determine particle size.^{4,5} Light scattering is also affected by powder packing and tablet hardness.⁶ Furthermore, the NIR spectrum is influenced by the crystal properties of the sample material, making it possible to distinguish different polymorphs and densities of a material.⁷ Nevertheless, and despite the numerous applications of this technique, as have been thoroughly reviewed elsewhere,^{8–14} there is still a need for a better understanding of diffuse reflectance phenomena.

Classical absorption spectrophotometry has its foundation in Beer–Lambert's law, which states that for a homogenous and non-scattering liquid sample, the concentration of an absorber

is directly proportional to the sample absorbance. In NIR diffuse reflectance spectroscopy, the requirements of classical absorption spectrophotometry are not completely fulfilled because the sample is non-homogenous and because of scattering.¹⁵ The path length of light for absorption spectrophotometry is constant, whereas in reflectance measurements the path length is a function of the microscopic structure of the material containing the absorber.¹⁶

The radiative transfer through a medium is a complex interaction of scattering and absorption processes, which can be described by the equation of radiative transfer (ERT).¹⁷ Several derivations of the ERT have been proposed as functions of the system under study. In order to describe the radiative transfer through an absorbing and scattering medium, Kubelka and Munk developed¹⁸ a two-flux theory. In this approach, the radiative flux inside a sample is described by one flux in the $+x$ direction and another one in the $-x$ direction; this allows the diffuse reflectance and transmittance to be obtained as a function of the Kubelka–Munk scattering (S_{KM}) and absorption (K_{KM}) coefficients. In order to derive the above equation, several assumptions such as infinite lateral extension, infinite optical thickness, homogeneity and isotropy of the sample, and diffuse illumination of the sample were made.

This equation allows the ratio between the scattering and absorption coefficients to be obtained, but not their single values. Because there is an interaction between absorption and scatter, Kubelka–Munk transformation often fails to achieve the desired linearity.

Burger et al.¹⁹ developed a three-flux approximation and showed that combined transmittance and reflectance measurements allow both the scattering and the absorption coefficients to be derived. This approximation yields good results with continuous systems, but a denominated hidden mass effect appears in discontinuous systems such as powdered samples of relative large particle size.

Recently, Dahm and Dahm^{20,21} derived a more general expression than the Kubelka–Munk equation, the representative layer theory (RLT), in a discontinuous approach, using plane parallel mathematics and two-flux approximation. In this method, the absorption–remission (or reflectance) function for a material of any thickness is expressed as a function of fractions of incident light absorbed (A), remitted (R), and transmitted (T) by a specified layer.

THEORY

Representative Layer Theory. The discontinuum theoretical treatment assumes that each layer of material is bounded by two parallel infinite planes. The total radiation entering a layer i is divided in to three components T_i , R_i , and A_i . T_i is the fraction leaving the layer in the same direction (total forward flux), R_i is the total backward flux, and A_i is the fraction absorbed. The total forward flux includes both transmission

Received 14 May 2008; accepted 5 September 2008.

* Author to whom correspondence should be sent. E-mail: Santiago.Maspoch@uab.es.

and forward scatter and the total backward flux includes both external and internal reflection and backscatter. Benford's equations allow the total forward and backward flux and the total absorption to be calculated in terms of the properties of an individual layer.²² The absorption/remission function $A(R_i, T_i)$ for remission from the layer can be derived as²⁰

$$A(R_i, T_i) = \frac{(1 - R_i)^2 - T_i^2}{R_i} = \frac{K}{S} \quad (1)$$

K and S are the apparent absorption and scattering coefficients of the sample, respectively. The coefficients derived by this law are defined through the Dahm work as apparent coefficients making up the sample as inherent properties of the sample.

If it is assumed that there is a sample that is infinitely thick and that is made up of many layers identical to the first one, this function becomes

$$A(R_\infty, 0) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{R_\infty} = \frac{2K}{S} \quad (2)$$

Dahm's Definition of Scattering and Absorption Coefficients. From the A , R , and T values for a sample of thickness d , the values for a sample that is $d/2$ thick can be calculated as follows:²³

$$T_{d/2} = \frac{T_d^2}{(1 - R_{d/2}^2)} \quad (3)$$

$$R_{d/2} = R_d(1 + T_d) \quad (4)$$

$$A_{d/2} = 1 - T_{d/2} - R_{d/2} \quad (5)$$

By starting with the measured transmission and remission fractions for a sample and repetitively applying the equations for a half thickness, absorption and remission fractions for progressively thinner layers can be derived. This would enable the calculation of the fraction of light absorbed (or remitted) divided by the thickness of the very small layer, which is exactly the definition of the linear absorption coefficient (this definition is intended to yield a measure of the absorbing power of the material, because for very thin samples, an absorption site receives an identical incident intensity). The division by the thickness is to keep our measurement from referring to an arbitrary thickness. These will be the absorption and scattering coefficients of the sample as a whole, not of the material of which the individual particles are composed.²⁴

$$K = \lim_{x \rightarrow 0} \left(\frac{A_{dx}}{dx} \right); \quad \rightarrow K = \frac{a_0}{d_i} \left(\frac{1}{\text{cm}} \right) \quad (6a)$$

$$S = \lim_{x \rightarrow 0} \left(\frac{R_{dx}}{dx} \right); \quad \rightarrow S = \frac{r_0}{d_i} \left(\frac{1}{\text{cm}} \right) \quad (6b)$$

They are called the apparent linear absorption coefficient and the apparent linear remission coefficient of the sample. These coefficients can be calculated measuring T_d and R_d for a sample with known thickness and applying the equations above, but the practical problem is that the values of transmission cannot be obtained normally with a standard diffuse reflectance

spectrometer. Other procedures have been presented by Dahm^{21,26} to calculate the coefficients, departing solely from the diffuse reflectance values.

The Dahm equation provides an exact solution for remission from and absorption by any layers whose absorption and scattering properties are completely defined. In the case of infinitesimal particles with low absorption, this formula gives results equivalent to the Kubelka–Munk equation. However, provided that its application is not restricted to the case of infinitesimal particles, it is expected to be more helpful in evaluating the remission of real systems.

The aim of this work is to study the validity of RLT in powdered samples of a pure component in different particle sizes over the range 63–450 μm to study the effect of particle size on scattering and absorption coefficients. Particles in this size range are considerably larger than the NIR wavelength and a large scattering effect would be expected.

Two different procedures to estimate K and S have been used. The first one uses infinite reflectance spectra and the intrinsic properties of the sample (refraction index, power absorption, sample thickness) and the second one uses the values of reflectance for the sample recorded at two different thicknesses, one the double of the other. These procedures have been applied in two samples with very different NIR spectra, potassium hydrogen phthalate (KHP) with defined absorption peaks at different absorption levels (high to low) and pure NaCl, a nonabsorbing material in the NIR region, where only small amounts of absorbed water can be detected at particularly low absorption levels.

EXPERIMENTAL

Instrument. Near-infrared reflectance measurements of the powdered samples were made using a FOSS spectrometer (Model 6500, FOSS NIRSystems, MN) equipped with a rapid content analyzer (RCA) module. Particle size distribution data were acquired by sieving with a CISA sieve (Model RP.15, CISA, Spain) with nominal size of 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, and 500 μm .

Materials. Potassium hydrogen phthalate (KHP), $\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}$, Fluka Assay quality (>99.5%), and NaCl (Panreac, Spain), assay quality (>99%), were used. Both samples were sieved to obtain 10 different grades with different median particle sizes (particle size range: 63–450 μm). The particle sizes are expressed in average size between sieves.

Sample Preparation and Presentation. Samples were dried at 110 $^\circ\text{C}$. A NIR diffuse reflectance spectrum was recorded as $\log_{10}(1/R)$, where R is the reflectance, for each sample, as the average of 32 scans, over the wavelength range 1100 to 2498 nm, at 2 nm increments (700 data points). Prior to the spectrum for each sample being obtained, a reference spectrum was obtained for a porcelain plate. The sample is poured in to a quartz cuvette with an internal diameter of 25 mm and put over the window of the RCA module and the spectrum is recorded from the bottom. A constant weight of 100 g is applied for 30 seconds over each sample in order to assure the same compression. The R value finally used was an average of five replicates using five different portions of the same sample in order to correct possible distribution effects. The height of the sample in the sample holder has been estimated with help of a Vernier caliper.

Data Analysis. Data were processed using the following software: Vision V2.51 (Foss NIRSystems, MN), The

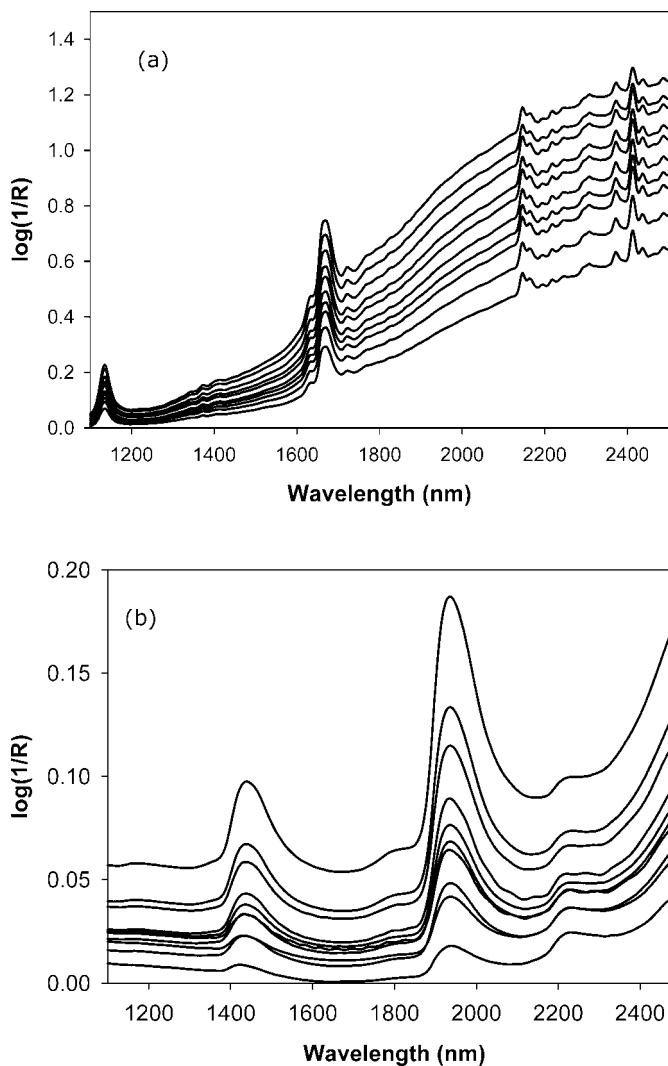


FIG. 1. NIR spectra of sieved samples. (a) KHP, (b) NaCl. 450 to 63 μm from top to bottom.

Unscrambler V9.2 (Camo, Norway), Matlab 7.0 (Mathworks, MA), and Microsoft Excel 2003.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the spectra of both substances under study. As expected, a strong effect of the particle size is observed, with an increase of apparent absorbance with particle diameter. NaCl is an ionic solid, transparent to NIR radiation, so absorbance values for NaCl are especially low and only the typical water absorption bands are detected. The effect of water can be considered negligible relative to the particle size effect in these spectra because of the small amount of water absorbed (about 0.04% mass fraction). The spectra of KHP present different absorption levels in their different absorption peaks, from very low at 1136 nm to very high at 2412 nm.

Estimation of Absorption and Scattering Coefficients Using R_∞ Values. Obtaining a Representative Layer. This procedure implies the use of the Stokes equations²⁵ (Eqs. 7, 8, and 9 below), where A , R , and T fractions for an individual layer may be calculated from the reflectivity of the material making up the layer (r_0), the absorption power of the sample (k), and the thickness of the sample (d). r_0 is a function of the

refractive index of the material (n_1) and the dispersive medium (n_0). In the near-infrared region, the refraction index of the samples can be considered, in a first approximation, as constant for the wavelength range. Index values of $n_{\text{NaCl}} = 1.55$ and $n_{\text{KHP}} = 1.6$ have been used in this work. The absorbing power of the material is defined, in the case of the directed radiation, at normal incidence to plane parallel sheets of thickness d , and it is equivalent to the Bouguer–Lambert–Beer transmission coefficient.

$$R_d = r_0 + \frac{(1 - r_0)^2 r_0 e^{-2kd}}{1 - r_0^2 e^{-2kd}} \quad (7)$$

$$T_d = \frac{(1 - r_0)^2 e^{-2kd}}{[1 - r_0^2 e^{-2kd}]} \quad (8)$$

$$A_d = 1 - T_d - R_d \quad (9)$$

$$r_0 = \frac{(n_0 - n_1)^2}{(n_0 + n_1)^2} \quad (10)$$

Knowing k , the *representative layer* is defined by the refractive index of the medium and the thickness of the layer (particle size of the powdered sample). If k is unknown, R_d , T_d , and A_d can be derived as a function of k . This approach doesn't fit exactly with Dahm's representative layer, since the effect of voids between particles has not been considered. To take into account this effect wouldn't change the shape of the response curve, nor the qualitative conclusions, but would slightly modify the values of the obtained parameters. Benford's equations for p identical layers (Eqs. 11, 12, and 13 below) can be applied in an iterative way to obtain R_∞ and A_∞ as a function of k when $T \approx 0$. On the other side, $A(R_\infty, 0)$ can be obtained in an experimental way through reflectance spectra.²⁴ The power absorption value (k) has been estimated by comparing the $A(R, 0)_{\text{exp}}$ with $A(R, 0)_{f(k)}$ obtained above. In this work, particle size dependency is hence studied; a fit method based on particle size relation has been used. $A(R, 0)_{f(k)}$ is plotted for each particle size, and different k values are tried until a good fit is obtained between the experimental and proposed values. Both values are displayed in Fig. 2 versus particle sizes for each characteristic wavelength.

$$T_{p+1} = \frac{T_p T_1}{(1 - R_p R_1)} \quad (11)$$

$$R_{p+1} = R_p + \frac{T_p^2 R_1}{(1 - R_p R_1)} \quad (12)$$

$$A_{p+1} = 1 - T_{p+1} - R_{p+1} \quad (13)$$

As shown in Fig. 2a, the higher the absorption level of KHP, the higher the sub-linear nonlinearity introduced in the relationship between absorbance and particle size. The same effect is expected in the relation between the remission function and concentration of species in the sample. It is interesting that the curvature observed in Fig. 2a for the experimental values is predicted by the representative layer theory, in contrast to other theories, such as the Kubelka–Munk equation.²⁷ For NaCl samples (Fig. 2b), however, the super-linear shape observed in

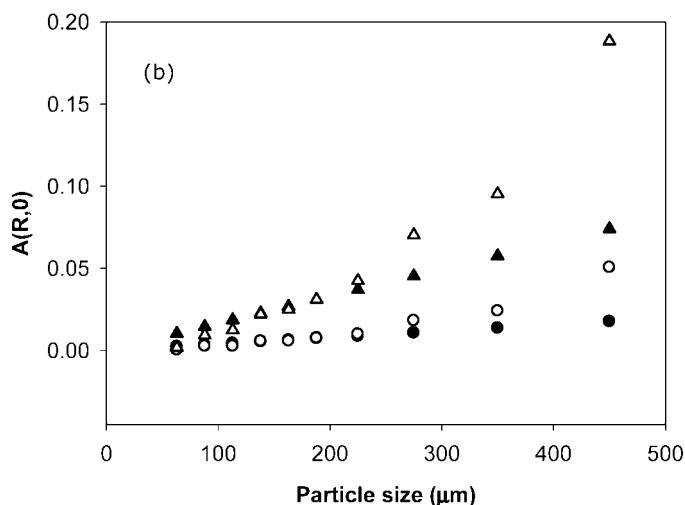
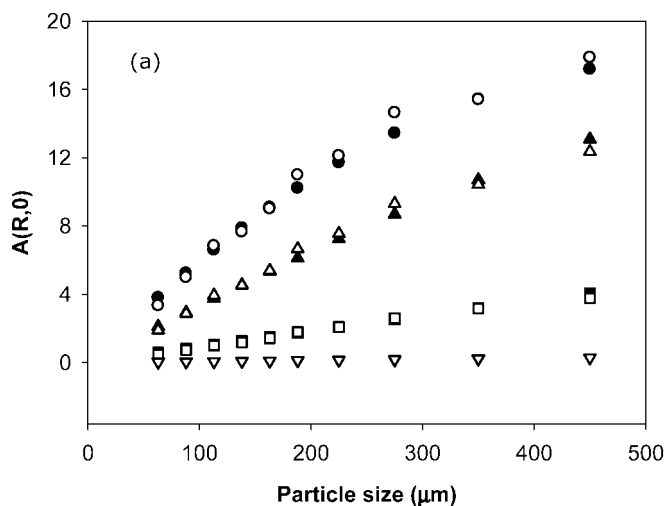


FIG. 2. $A(R, 0)_{\text{exp}}$ and $A(R, 0)_{\text{calc}}$ for (a) KHP, 2412 nm, 2146 nm, 1668 nm, and 1136 nm; and (b) NaCl, 1440 nm and 1936 nm. Open symbols are the experimental values and solid symbols are the calculated ones.

Fig. 2b is not explained by the representative layer theory for a simple monocomponent layer, but NaCl–H₂O (even water content is very low) indeed forms a two-component system, so deviations from the simple monolayer behavior have to be expected; consequently, the functions were fitted using the linear zone observed in the experimental data.

Absorption powers of KHP (k) and water in NaCl are shown in Table I. The fact that the ratio $k_{1440}/k_{1936} = 0.235$ practically coincides with the reported ratio²⁸ of molar absorptivity

TABLE I. Estimated absorption power for water in NaCl and for KHP.

Sample	λ (nm)	K (cm ⁻¹)
NaCl	1440	0.038
	1936	0.16
KHP	1136	0.30
	1668	4.5
	2146	14
	2412	30

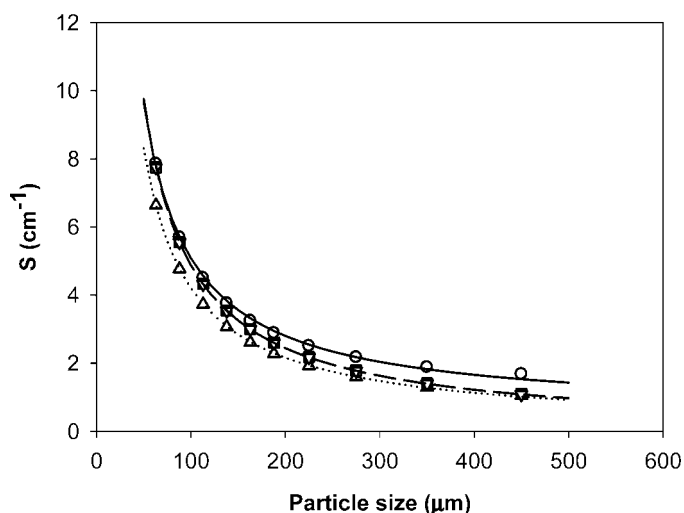
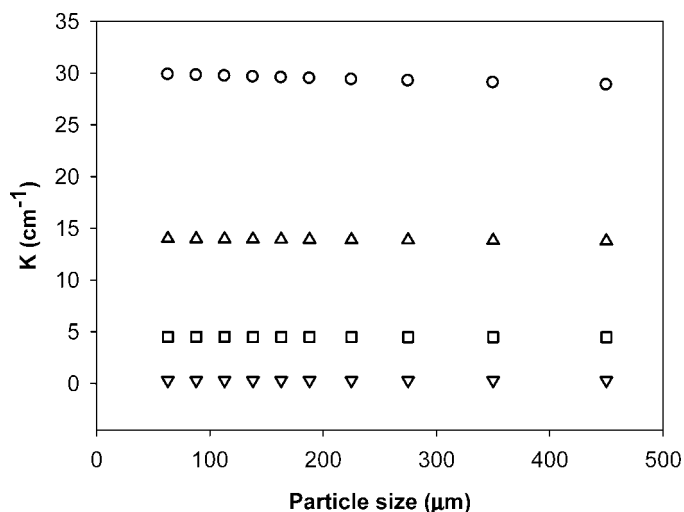


FIG. 3. (Top) Apparent absorption (K) and (bottom) scattering (S) coefficients for KHP as a function of particle size. Lines calculated using the values of Table II. (Solid line) 2412 nm; (dotted line) 2146 nm; and (dashed line) 1136 nm. Wavelengths: 2412 nm, 2146 nm, 1668 nm, and 1136 nm.

coefficients of pure H₂O, $\epsilon_{1440}/\epsilon_{1936} = 0.228$, can be considered an indirect validation of the procedure followed.

Obtaining K and S . Once the *representative layer* has been obtained, the apparent absorption and scattering coefficients are calculated through the iterative process described in the Theory section by Eqs. 3, 4, and 5. The criterion used to stop the iterative process is the stabilization of the R and A values obtained in each iteration. The absorption and scattering coefficients are taken as the limit values of R and A when T approaches 1, in accordance with the Dahm definition of coefficients (Eq. 6). Each iteration corresponds to a half of the previous thickness, and thus the thickness of the hypothetical layer is known. The ratio between the stable value of absorption (a_0) and reflectance (r_0) and this calculated thickness are the absorption (K) and scattering coefficient (S).

K and S values obtained for the characteristic wavelengths are shown in Figs. 3 and 4 for KHP and NaCl, respectively. As can be seen, absorption coefficients remain constant for the different particle sizes while scattering coefficient values increase when the particle sizes decrease.

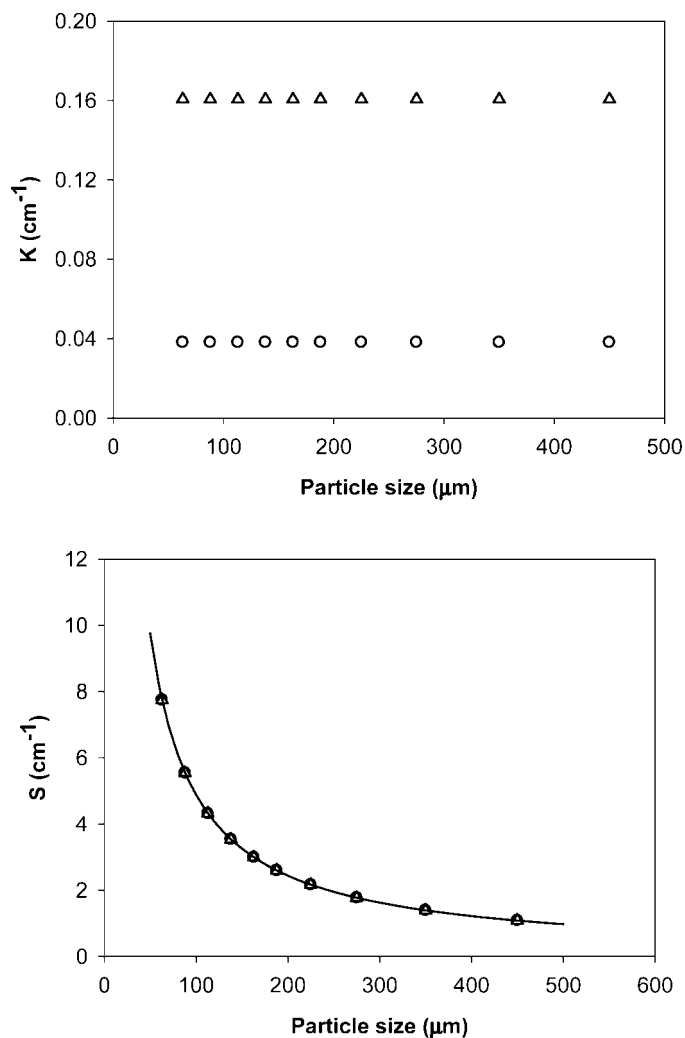


FIG. 4. (Top) Apparent absorption (K) and (bottom) scattering (S) coefficients for NaCl as a function of particle size. Lines calculated using the values of Table II. Wavelengths: 1440 nm and 1936 nm.

The scattering coefficients obtained for KHP and NaCl have been fitted to an equation as $S = b + a/d$, where d represents particle size and a and b are constants.

Table II shows the values obtained for coefficients a and b and the determination coefficient (r^2) for both samples at each wavelength. It is important to point out that the values of a and b for the two bands of water and the first one of KHP, that is to say, the low absorption peaks, are exactly the same. This fact suggests, in a first approach, that for low absorption samples,

TABLE II. Parameters of the fitted equation of S versus particle size for different wavelengths.

Sample	λ (nm)	a	b	r^2
NaCl	1440	487.9	0.000	1.00
	1936	487.9	0.000	1.00
KHP	1136	487.9	0.000	1.00
	1668	487.1	0.016	1.00
	2146	410.4	0.107	0.99
	2412	456.9	0.517	0.99

TABLE III. Apparent absorption and scattering coefficients for KHP ($\lambda = 1136$ nm). Ps is the particle size.

Ps (μm)	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})
450	0.31	1.01
350	0.34	1.48
275	0.34	1.54
225	0.30	2.12
188	0.32	2.33
163	0.31	2.59
138	0.29	3.13
113	0.32	3.75
88	0.30	4.56

since K is independent of particle size as has been shown above, the scattering coefficient only depends on the particle size, in agreement with Dahm and Dahm's assertion that for a weakly absorbing particle, the absorption/remission function becomes proportional to the ratio of volume to surface area of the particle. The other bands of KHP, with higher absorption levels, present small differences. It is also noteworthy that the scattering coefficient stabilizes above 250 μm in every case.

Coefficients Obtained Using Two Thicknesses of Sample.

An alternative method, proposed by Dahm,^{21,28} consists of obtaining the coefficients by the use of empirical values of R_d and R_{2d} , scanning the samples with two different thicknesses, both smaller than the infinite thickness. In our case, 1 and 2 mm have been used. One of the assumptions made in this methodology is that the thickness is a multiple of the particle size.

Spectra have been recorded for each particle size and for both sample thicknesses. With these spectra R_d and R_{2d} can be obtained for each representative peak of the sample, and the values of the representative layer can be obtained through the application of the Benford equations (Eqs. 11, 12, and 13). Once a representative layer is obtained, the coefficients are calculated with Eqs. 3, 4, and 5, by the same iterative procedure used above.

Table III shows the results obtained for KHP at 1136 nm. When the absorption level is higher, the depth of penetration of the NIR radiation is lower, and the infinite thickness is already reached for values smaller than 1 mm. Because of that, coefficients have only been obtained between 1100 and 1500 nm.

By this method a spectrum of K is obtained. The scattering and absorption coefficients for a particle size of 225 μm are displayed in Fig. 5a. The scattering coefficient obtained remains constant with the wavelength, showing smaller variations with the absorption power of the substance at the absorbance peaks. This result is similar to the results of Dahm and Dahm²⁷ for plastic sheets and the results of Burger¹⁹ through transmission and reflectance values. Values derived for the different particle sizes are given in Fig. 6, contrasted with those obtained using infinite reflectance values.

It was impossible to obtain the coefficients for the smaller particle sizes of NaCl (from 88 to 163 μm) because the spectra were very noisy for 1 mm of thickness, probably as a consequence of the small absorption level of this sample. For this reason, a higher particle size of 750 μm has been used in order to have a better view of the data tendency. The results for K and S are shown in Table IV. The coefficients for a particle size of 188 μm are shown in Fig. 5b as a function of

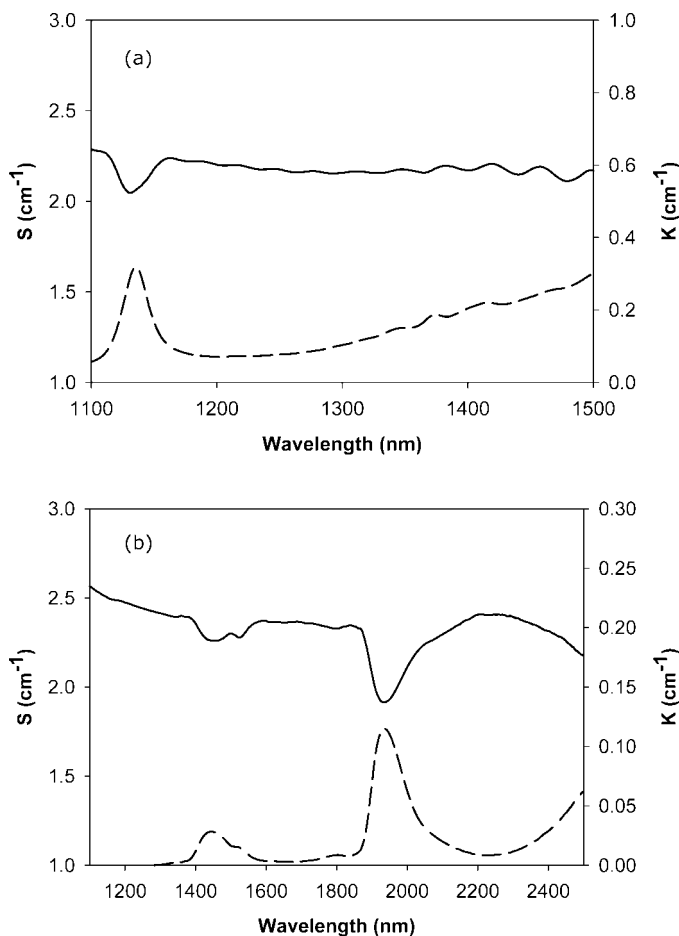


FIG. 5. (Dashed line) Apparent absorption coefficient (K) and (solid line) scattering coefficient (S) as a function of wavelength. Both calculated using the representative layer theory. (a) KHP (particle size = 225 μm); (b) NaCl (particle size = 188 μm).

wavelength. The scattering coefficient displays a minimum value in the maximum absorption level, whereas it remains constant for the rest of the wavelengths. Figure 7 presents the results of both methods for the different particle sizes.

It is valuable that the results derived by both methodologies are similar, even for the lowest bands of water, taking into account the different assumptions made in each case and the possible experimental error produced in the measurement of the sample thickness.

CONCLUSION

Scattering and absorption coefficients have been obtained following the representative layer theory and by using two different experimental approaches: measurement of the infinite reflectance and measurement of reflectance at two different finite thicknesses. The information provided by these two methods is not exactly the same, since one allows individual coefficients to be obtained for a particular wavelength while the other produces the whole spectrum, but both yield similar results, which can be considered an indirect proof of its consistence.

An increase of particle size produces a decrease in scattering effects because the scattering coefficient is inversely proportional to the particle diameter. At low absorption levels, both

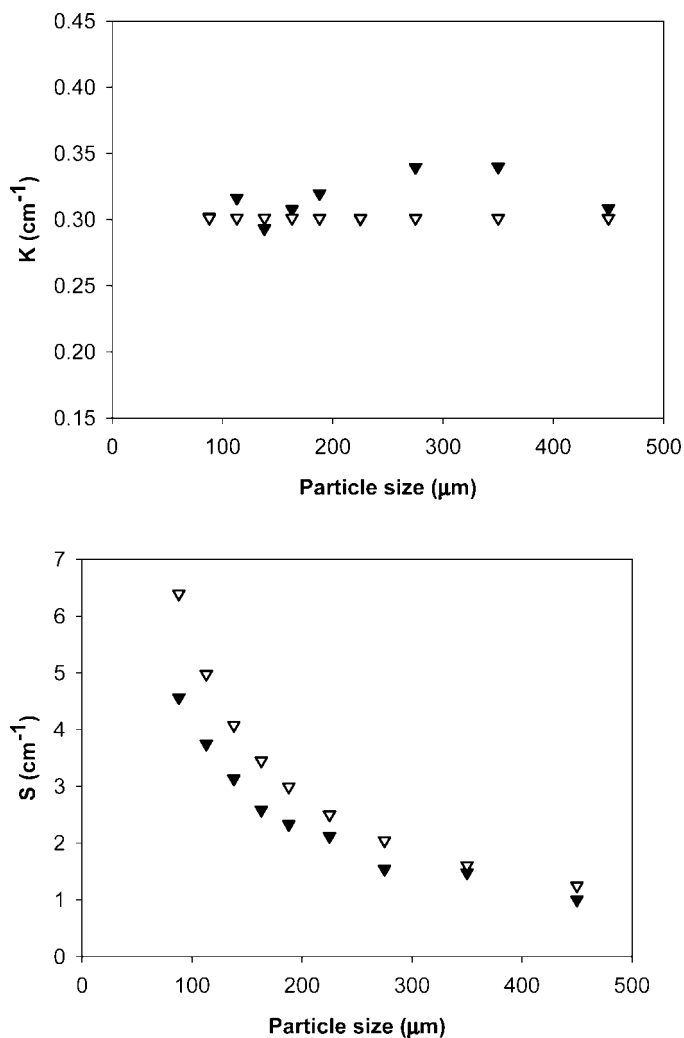


FIG. 6. (Top) Apparent absorption (K) and (bottom) scattering (S) coefficients for KHP as a function of particle size for $\lambda = 1136$ nm. Filled symbols indicate values obtained using reflectance measurements at two different sample depths. Empty symbols indicate values obtained from infinite reflectance.

samples yield exactly the same fitted equations between scattering coefficients and particle size; consequently, this effect must be directly associated with the physical properties of the sample. A critical point in the behavior of scattering has been detected around 250 μm , since above this value the scattering seems stabilized.

The absorption coefficients are practically constant and independent of the particle size. At the wavelength of the absorption maxima, the scattering coefficient slightly decreases, which is consistent with the results previously reported.

TABLE IV. Apparent absorption and scattering coefficients for NaCl. Ps is the particle size.

Ps (μm)	1440 nm		1936 nm	
	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})	K (cm^{-1})	S (cm^{-1})
750	0.043	0.91	0.17	0.76
450	0.042	1.43	0.19	1.44
350	0.047	1.46	0.24	1.28
275	0.037	1.22	0.22	1.03
188	0.028	2.46	0.11	2.08

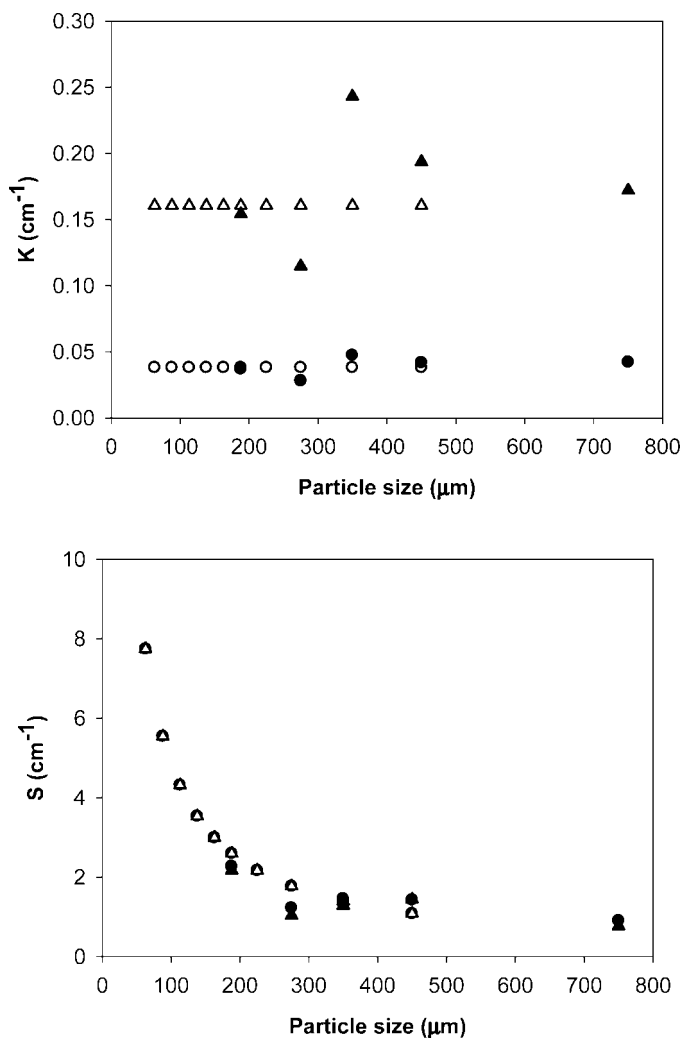


Fig. 7. (Top) Apparent absorption (K) and (bottom) scattering (S) coefficients for NaCl. Filled symbols indicate values obtained using reflectance measurements at two different sample depths. Open symbols indicate values obtained from infinite reflectance. Wavelengths: 1440 nm and 1936 nm.

The experimental data prove that RLT is a valid procedure to apply on powdered samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This communication was partially presented as a poster at the 13th International Conference on NIR, Umeå, Sweden, June 2007. The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this research within the framework of Project CTQ2004-02013. Carlos Cairós thanks Spain's Ministry of Science and Technology for his predoctoral fellowship BES2005-9614.

1. L. S. Aucott, P. H. Gartwaite, and S. T. Buckland, *Analyst* (Cambridge, U.K.) **113**, 1849 (1988).
2. P. Geladi, D. MacDougall, and H. Martens, *Appl. Spectrosc.* **39**, 491 (1985).
3. C. R. Bull, *Analyst* (Cambridge, U.K.) **116**, 781 (1991).
4. J. L. Ilari, H. Martens, and T. Isaksson, *Appl. Spectrosc.* **42**, 722 (1988).
5. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, F. Gonzalez, and R. Pous, "Effect of the Simple Cell Module and Particle Size on the NIRS Determination of Piracetam", in *Near Infra-Red Spectroscopy. Bridging the Gap Between Data Analysis and NIR Applications*, K. I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes, and A. Tandberg, Eds. (Ellis Horwood, New York, 1992), pp. 401–406.
6. K. M. Morisseau and C. T. Rhodes, *Pharm. Res.* **14**, 108 (1997).
7. E. Dreassi, G. Ceramelli, P. Corti, S. Lonardi, and P. L. Perruccio, *Analyst* (Cambridge, U.K.) **120**, 1005 (1995).
8. E. W. Ciurczak and J. K. Drennen, *Spectroscopy* **7**, 12 (1992).
9. K. A. Martin, *Appl. Spectrosc. Rev.* **27**, 325 (1992).
10. J. J. Workman, *J. Near Infrared Spectrosc.* **1**, 221 (1993).
11. P. Corti, E. Dreassi, and S. Lonardi, *Il Farmaco* **48**, 3 (1993).
12. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, and C. de la Pezuela, *Analyst* (Cambridge, U.K.) **123**, 135R (1998).
13. D. A. Burns and E. W. Ciurczak, *Handbook of Near Infrared Analysis* (Marcel Dekker, New York, 2001).
14. M. C. Pasikatan, J. L. Steele, C. K. Spillman, and E. Haque, *J. Near Infrared Spectrosc.* **9**, 153 (2001).
15. W. F. McClure, *Spectroscopic Techniques for Food Analysis*, R. H. Williamson, Ed. (VCH Publishers, Cambridge, UK, 1994), Chap. 2.
16. G. S. Birth and H. G. Hecht, *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, P. C. Williams and K. H. Norris, Eds. (AACC, St. Paul, MN, 1987), p. 1.
17. G. Kortum, *Reflectance Spectroscopy* (Springer-Verlag, New York, 1969).
18. P. Kubelka and F. Munk, *Zeitschrift Tech. Physik* **12**, 593 (1931).
19. T. Burger, J. Kuhn, R. Caps, and J. Fricke, *Appl. Spectrosc.* **51**, 309 (1997).
20. D. J. Dahm and K. D. Dahm, *Appl. Spectrosc.* **53**, 647 (1999).
21. D. J. Dahm and K. D. Dahm, *J. Near Infrared Spectrosc.* **7**, 47 (1999).
22. D. J. Dahm and K. D. Dahm, *Interpreting Diffuse Reflectance and Transmittance. A Theoretical Introduction to Absorption Spectroscopy of Scattering Materials* (IM Publications, Chichester, UK, 2007), Chap. A, p. 11.
23. D. J. Dahm and K. D. Dahm, *Interpreting Diffuse Reflectance and Transmittance. A Theoretical Introduction to Absorption Spectroscopy of Scattering Materials* (IM Publications, Chichester, UK, 2007), Chap. D, p. 56.
24. D. J. Dahm and K. D. Dahm, *Interpreting Diffuse Reflectance and Transmittance. A Theoretical Introduction to Absorption Spectroscopy of Scattering Materials* (IM Publications, Chichester, UK, 2007), Chap. C, p. 39.
25. D. J. Dahm and K. D. Dahm, *Interpreting Diffuse Reflectance and Transmittance. A Theoretical Introduction to Absorption Spectroscopy of Scattering Materials* (IM Publications, Chichester, UK, 2007), Chap. C, p. 38.
26. D. J. Dahm, K. D. Dahm, and K. Norris, *J. Near Infrared Spectrosc.* **8**, 171 (2000).
27. D. J. Dahm, K. D. Dahm, and K. Norris, *J. Near Infrared Spectrosc.* **10**, 1 (2002).
28. I. Murray, "Scattered information. Philosophy and practice of near infrared spectroscopy", in *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference*, A. M. C. Davies and A. Garrido-Varo, Eds. (NIR Publications, Chichester, UK, 2004), p. 9.

ANEXO 4. ARTÍCULO 2



Implementation of enhanced correlation maps in near infrared chemical images: Application in pharmaceutical research

Carlos Cairós^a, José Manuel Amigo^{b,*}, Robert Watt^c, Jordi Coello^a, Santiago Maspocho^a

^a *Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

^b *Department of Food Science, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg-C, Denmark*

^c *The School of Pharmacy-University of London, 29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, UK*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2009

Received in revised form 16 April 2009

Accepted 21 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Chemical imaging

Enhanced contrast function

Tablets

Singularities

Hyperspectral near infrared

ABSTRACT

Recent developments in Hyperspectral Imaging equipment have made possible the use of this analytical technique for fast scanning of sample surfaces. This technique has turned out to be especially useful in Pharmacy, where information about the distribution of the components in the surface of a tablet can be obtained. One particular application of Hyperspectral Chemical Imaging is the search for singularities inside pharmaceutical tablets, e.g. coating defects. Nevertheless, one problem has to be faced: how to analyze a sample without any previous knowledge about it, or having only the minimum information about the tablet.

In this work a new methodology, based on correlation coefficients, is introduced to obtain valuable information about one Hyperspectral Image (detection of defects, punctual contaminants, etc.) without any previous knowledge. The methodology combines Principal Component Analysis (PCA), correlation coefficient between one specific pixel included in the image and the rest of the image; and a new enhanced contrast function to obtain more selective chemical and spatial information about the image. To illustrate the applicability of the proposed methodology, real tablets of ibuprofen have been studied.

The proposed methodology is presented as a control technique to detect batch variability, defects in final tablets and punctual contaminants, being a potential supplementary tool for quality controls. In addition, the usefulness of the proposed methodology is not exclusive to NIR-CI devices, but to any hyperspectral and multivariate image system.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years the traditional single point spectroscopy (mainly focused on near infrared, Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopy) has been successfully combined with mapping devices that allow obtaining a spectral pattern in each area unit of one surface (commonly denoted as pixel). With the inclusion of these techniques, Hyperspectral Chemical Imaging devices have increased the possibilities in a number of research fields, especially in pharmaceutical research [1–5]. The opportunity to obtain quality spectral information of tablets surface in a short period of time allows the direct analysis of the sample without needing further chemical analysis. In this sense, the targets are focused in two different aspects: to study the distribution of the analytes in the surface of the tablet; and to detect and locate anomalies, defects, contaminants or thickness of coatings.

Analysis of chemical images with mathematical tools makes possible to extract the desirable information from the raw data

[1,6]. For example, a number of research works have been recently published focusing the interest in the analysis of pharmaceutical mixtures being blended to assure the perfect distribution of all the analytes on the surface of the product tablet [7–10]. In this sense, techniques like Partial Least Squares Regression (PLS-R), Classical Least Squares (CLS) or even Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) are being applied [1,2,10].

Nevertheless, the execution of these tasks presents several drawbacks, being the main one the lack of any prior information about the components forming the tablet, or that the pure analytes available in a research laboratory are not identical to the analytes used for manufacturing the tablets. This is the case, for example, when adulterated samples are studied or when unknown contaminants are present in one tablet/surface. Consequently, pharmaceutical researchers are continuously looking for robust and reliable working methodologies that allow obtaining the maximum information of interest of the tablet with the minimum previous knowledge.

In this sense, several methods have been already proposed to extract valuable information about the Hyperspectral Images without further information. The main ones are Principal Component Analysis (PCA) [11] and its variant, the Fixed Size Image

* Corresponding author. Tel.: +45 353 32570; fax: +45 353 33245.

E-mail address: jmar@life.ku.dk (J.M. Amigo).

Window-Evolving Factor Analysis (FSIW-EFA) [6]. These techniques are aimed to extract the main sources of variability in the tablet and to study the local and global rank (i.e. the number of sources of variability in the tablet).

In this paper, a new working methodology is proposed to study chemical image samples using only self-contained information. The general scope is to introduce a new approach for better visualization of anomalies in surfaces as well as to study the surface itself, locating different zones, etc. The methodology is based on the mutual correlation between one specific pixel and the rest of the image. The main advantage of using correlation coefficients is that it is a mathematical parameter that measures the similarity between two spectra. However, one of the main problems working with correlation coefficients is that, usually, many of the spectra in the image are highly correlated with each other, making the interpretability of the correlation map a complicated task. This is the case, for example, when the analysis of the tablet is performed by using near infrared chemical image (NIR-CI), where the spectra are usually highly correlated with each other. To overcome this problem and improve the information obtained with the correlation maps, a new enhanced contrast function is proposed to normalize the scale of the correlation coefficient and to enhance the differences between a target spectrum in the image and the rest of image's spectra. This method is based on the scaling of the Pearson correlation index to improve contrast in chemical images where the composition of the target sample is unknown.

Another possibility studied in this work is the calculation of the enhanced correlation maps when the pure spectra are available. This perspective offers direct information about the qualitative distribution of a determined analyte in the sample without needing further modeling (for example with MCR-ALS or PLS) and in an understandable way.

The proposed working procedure is fulfilled with a prior Principal Component Analysis to obtain a first visualization of the tablet and to allow the selection of the pixel of interest. To test the effectiveness and prove the benefits of the methodology, a real commercial tablet of ibuprofen was tested. To accomplish the applicability of the proposed methodology, an analysis of the tablet by using pure spectra of components has also been performed. The enhanced correlation maps are calculated and thoughtfully studied.

2. Working methodology

The proposed methodology can be summarized in three well defined steps. The combination of all of them may increase the knowledge about the image and the distribution of the component or mixture of components represented by each pixel. This point is discussed further on in this paper. The three steps, preceded by a preprocessing data stage are:

- (1) A previous visualization of the surface by using Principal Component Analysis.
- (2) Selection of the pixel of interest and calculation of the correlation surface between the selected pixel and the rest of the pixels in the image.
- (3) Calculation, whether needed, of the enhanced correlation surface.

In some cases a transformation of the image into a binary one can be useful to obtain the particle/size domain or other sample characteristics.

2.1. Structure of the image: preprocessing

The structure of an Hyperspectral Image is a three-dimensional data cube, $\underline{D}(X \times Y \times \lambda)$ where X and Y represent the spatial axes and

λ the spectral profile obtained for each pixel [12,13]. Each pixel of the image, $a(x,y)$, corresponds to one spectrum in the defined spatial coordinates x and y and has the structure of a vector of dimensions $(1 \times \lambda)$ (Fig. 1).

Before applying any methodology, two previous steps are mandatory: the unfolding of the image and the preprocessing of the spectral information. The unfolding step is crucial to adapt the three-dimensional structure to Principal Component Analysis. Consequently, the new unfolded image D will have the dimension $(XY \times \lambda)$. Preprocessing is necessary in order to avoid the influence of undesirable phenomena classically encountered in Hyperspectral Images such as scattering and/or spatial noise. Different methods, such as smoothing/derivatives (Savitzky–Golay or Norris algorithms), Standard Normal Variate (SNV), Multiplicative Scatter Correction (MSC) and normalizing to unit vector length are frequently used [14,15].

2.2. Initial visualization: Principal Component Analysis

Principal Component Analysis (PCA) is an unsupervised technique of visualization and classification that has already been successfully used in Image Analysis [1,5,11,16,17]. Herein, PCA is performed to obtain a first overview of the main sources of variability on the surface studied in an easy way. In PCA applied to Hyperspectral Images, the scores maps are obtained by refolding the scores vectors obtained for each factor; whereas the loadings are related to the spectral variability. Usually, the association of one Principal Component loading to a pure analyte is a difficult task, because PCA is aimed to explain variability sources, which include the influence of chemical components and physical aspects (as illumination or roughness of the surface). Nevertheless, PCA is the most straightforward method to obtain a first impression of the tablet and to select the pixel under consideration (Fig. 1, step 1).

2.3. Correlation maps

The key part of constructing useful correlation maps is to select an adequate pixel to calculate its correlation with all other pixels. Once the pixel of interest, $a(x',y')$, has been selected, an correlation map $R(X \times Y)$ is created by calculating the correlation coefficient between each spectrum on the image $b(x,y)$ and the selected spectrum. In this work, the Pearson correlation coefficient for each pixel, ρ_{xy} , is calculated as follows:

$$\rho_{xy} = \frac{\text{Cov}(a_{x'y'}, b_{xy})}{\sigma_{a_{x'y'}} \sigma_{b_{xy}}} \quad (1)$$

where $\text{Cov}(a_{x'y'}, b_{xy})$ accounts for the covariance between both spectra, $a_{x'y'}$ being the spectrum in the selected pixel and b_{xy} each of the pixels of the image (Eq. (2)); whereas $\sigma_{a_{x'y'}}$ and $\sigma_{b_{xy}}$ account for the standard deviation of $a_{x'y'}$ and b_{xy} , respectively.

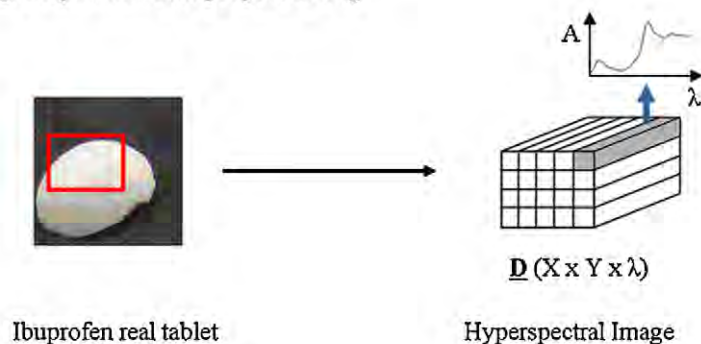
$$\text{Cov}(a_{x'y'}, b_{xy}) = \frac{1}{(\lambda - 1)} \sum_{\lambda=1}^{\lambda} (a_{x'y'} - \bar{a}_{x'y'})(b_{xy} - \bar{b}_{xy}) \quad (2)$$

The correlation coefficients are scaled from 0 to 1 (lowest and highest similarity, respectively) for better interpretation (Eq. (3)):

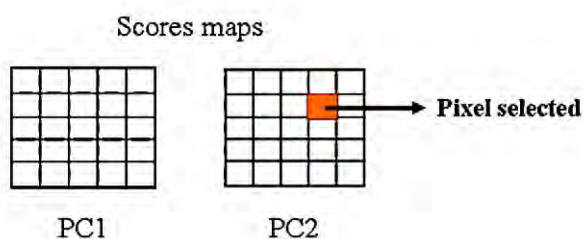
$$\rho'_{xy} = \frac{\rho_{xy} - \min(R)}{\max(R) - \min(R)} \quad (3)$$

Therefore, a new correlation map R' ($X \times Y$) is obtained, having into consideration that the only difference between R and R' is the scale of correlation coefficients. This transformation helps to the interpretation of the correlation values and, therefore, the correlation histogram, since the values are quoted between 0 and 1 (Fig. 1, step 2).

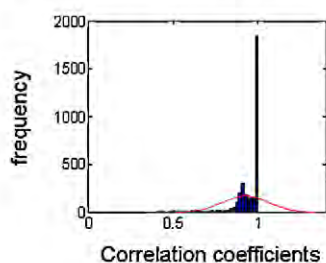
0) Image acquisition and preprocessing



1) Principal Component Analysis for selecting one pixel



2) Correlation maps between the selected pixel and the rest of the pixels



3) Enhanced Correlation maps varying the value of α

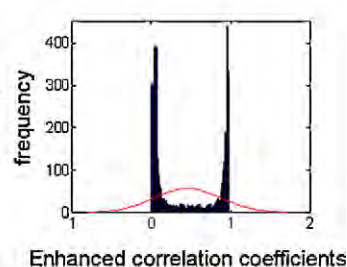


Fig. 1. General scheme of the application of the proposed methodology. The scheme has been divided into three steps: Principal Component Analysis and selection of the pixel of interest, calculation of the correlation coefficients and, finally, the enhancing of the correlation histogram.

2.4. Enhanced correlation maps

As we pointed out in Section 1, the information that the correlation map offers may be difficult to interpret. The enhancing contrast function proposed in this work (Eq. (4)) uses the calculated correlation coefficients from Eq. (1) to calculate a new parameter for each pixel e_{xy} . This new enhanced correlation map, $E(X \times Y)$ is obtained in the following way:

$$e_{xy} = \frac{\rho'_{xy} - \min(R')}{(\max(R') + \alpha) - \rho'_{xy}} \quad (4)$$

The obtained enhanced coefficients can be re-scaled (in the same way as in Eq. (3)) for better interpretation. This new function tries to increase the discrimination between correlation coefficients by using the maximum and the minimum value of correlation coefficients in R' (Fig. 1, step 3). Basically, the transformation stretches the distribution of the correlation coefficients. The discrimination power is controlled by one parameter, α . The value of this param-

eter ranges from 0 to infinite, but 1 is convenient upper limit (see Section 4.4). As it will be shown later on, α values close to 0 means higher discrimination power; whereas values of α close to 1 indicate that almost no discrimination is being performed in the correlation coefficients.

2.5. Binary images

In order to calculate the particle/domain statistics of the image a complementary step is to translate the chemical image into a binary image (two component easy-to-compute image defined only by 1 and 0), setting a threshold on the enhanced correlation coefficient scale of the chemical image. Nevertheless, setting this threshold is not an easy task and to our knowledge no objective method has been reported so far. The enhanced function facilitates this; as the new scale of enhanced coefficients is normalized to emphasize the difference between the target spectrum and the rest of image's spectra.

3. Experimental

3.1. Tablet

To illustrate the working procedure of this methodology, a commercial tablet of ibuprofen was randomly selected from a commercial package of ibuprofen 200 mg. The nominal concentration of ibuprofen was 55% (versus total weight of the tablet). The tablet contained a sucrose coating and the core of the tablet (ibuprofen and excipients).

The tablet was sectioned using a cutting blade coupled to a microscope. First, the tablet must be immobilized on a microscope slide. Even if a cutting blade could cut a tablet perfectly flat, that flat surface needs to be made parallel to the image plane. By mounting the tablet and then cutting with respect to the microscope slide plane, the surface of the prepared tablet is automatically in line with the image plane.

Pure spectra of ibuprofen and sucrose were registered by scanning a flat surface of compacted pure component simulating tablet conditions.

3.2. Instruments and software

The transverse section of the tablet was scanned with an Auto Image Microscope connected to a Fourier Transform Near Infrared (FT-NIR) spectrometer (PerkinElmer). The area of the image corresponds to $4.2 \text{ mm} \times 4.2 \text{ mm}$ divided into 60×60 pixels of $70 \mu\text{m}$ size. The wavelength range was from 4000 to 7500 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} .

Images were preprocessed before the analysis. Standard Normal Variate and Savitzky–Golay smoothing with a window size of 9 points and a polynomial order 2 were applied. PCA have been performed after mean centering the data in order to emphasize variability between spectra. All the preprocessing methods used as well as the methodology proposed in this paper have been implemented in several easy-to-use MATLAB routines (version 2008b, The MathWorks, Massachusetts) and they are freely available upon request or via web [18].

4. Working procedure: analyzing the main parts of an ibuprofen tablet

The corresponding image, due to the shape of the sample, included information about coating and core (parts of interest), with the features that the core part was perpendicular to NIR light plane and some coating part was not perpendicular to scan plane and component of the metal sample holder (Fig. 1).

One of the main features of this approach is that is not sensible to bad pixel, in the sense that noisy or not expected spectra do not change final results, allowing a fast visualization of tablet surface.

4.1. Principal Component Analysis and selection of one pixel of interest

As it can be seen in Fig. 2, the PCA analysis of the tablet offered important information. Only the first four factors score maps are depicted. These four factors explained more than the 80% of the variance, while the first factor contains more than 70%.

Loadings profiles are difficult to associate to a pure spectrum of the two main components of the tablet. The first, second and third scores maps emphasized two different areas of the tablet: the central part of the tablet (PC 1) and an area surrounding the central part (PC 2 and 3). Consequently, it is suggested that the tablet was composed by three parts mainly: its main mixture, the coating edge and the external coverage surrounding the tablet. Also, an unexpected singular point was detected in the main part of the tablet (blue circle in the second factor of the scores maps). Therefore, further investigation was necessary to determine the nature of this part of the tablet and correlation coefficient maps were performed.

4.2. Correlation map for finding singularities in the tablet

In our case, one of the pixels of the unexpected area was selected (pixel in position (26×40)) and the correlation map was determined (Fig. 3a).

As it can be observed in Fig. 3a the correlation map seemed not to offer really good information at first sight. This result is due to

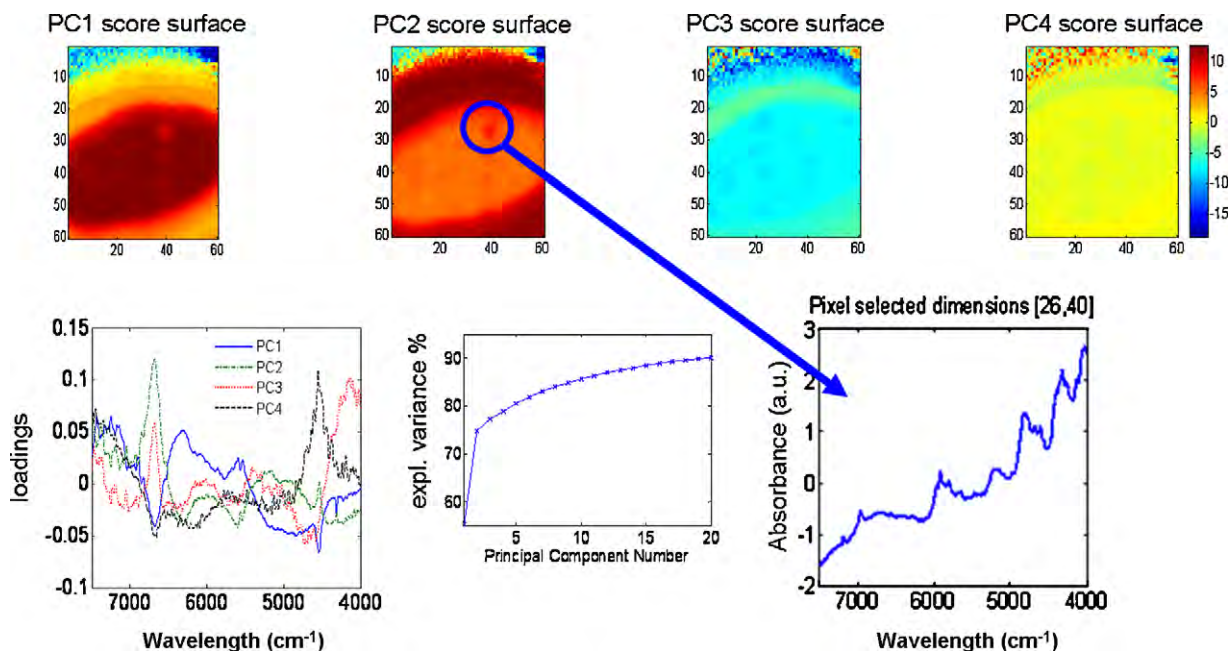
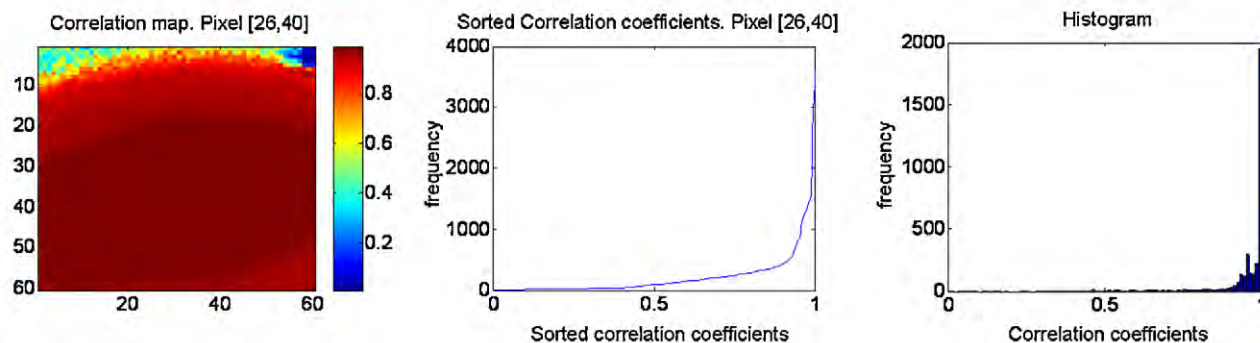


Fig. 2. First part of the graphical output. PCA analysis of the tablet. Upper row, first 4 PC's scores surfaces (blue, low intensity; red, high intensity). Lower row, loadings plot for the first 4 factors, cumulative variance plot and the spectrum of selected pixel (26×40) . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

(a) Correlation figures



(b) Enhanced correlation figures

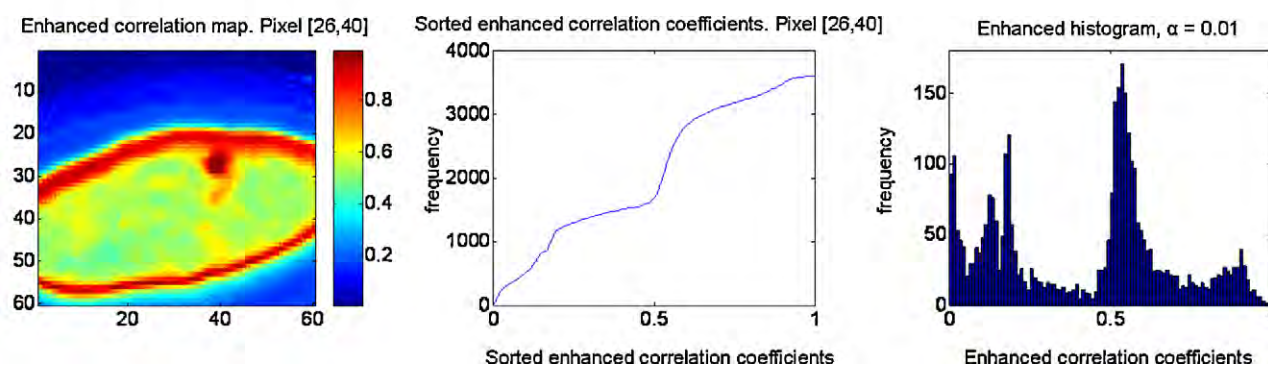


Fig. 3. (a) Correlation map, sorted correlation coefficients and histogram of the correlation coefficients. (b) Enhanced correlation map, sorted enhanced correlation coefficients and its corresponding histogram.

the high correlation between the selected spectrum and the main part of the tablet, and the low correlation coefficient between the selected spectrum and the coverage part. The large scale makes complicated a visual representation of the results. By plotting the attained distribution of correlation coefficients as accumulative frequency diagram or histogram (Fig. 3a), the inadequate contrast of the image can be understood. Most of the values of correlation were found around 0.99 but values from 0 to 0.98 can be found in different proportions. This distribution makes impossible to reduce the scale and consequently, the whole range (from 0 to 1) should be used. As it is showed, the contrast of the obtained map depends on the minimum and maximum value of correlation coefficients.

4.3. Enhanced correlation map

Trying to improve the visualization of the correlation maps, the enhancing transformation was applied by imposing an α value of 0.01. The results (Fig. 3b) were impressive: now the enhanced correlation map clearly shows the coating contour, correlation zone in where the pixel of interest was located. The sorted enhanced correlation coefficients and the corresponding histogram showed a new distribution, as well. It was possible to observe how the enhanced function divided the sample into very distinguishable areas. Also it is seen that the unexpected area encountered in the tablet was chemically related to the coating components: the maximum similarity of the selected pixel was found in the area surrounding the central part of the tablet, area expected to be the coating zone.

4.4. The effect of varying the value of α

To illustrate discrimination power of α , correlation maps of two target spectra, one corresponding to the coating zone, pixel in posi-

tion (19×39), and the other corresponding to core zone, pixel in position (40×30) were performed by varying the α value. Target spectra are plotted in Fig. 4a. It can be observed the high similarity between these two spectra and the pure spectra of ibuprofen and sucrose (Fig. 4b).

Correlation maps for pixel (19×39) depicted in Fig. 5 showed correlation with the coating zone target spectrum. A high correlation with the coating and the core of the tablet is observed in correlation map using $\alpha = 1$. In this case, the information of the enhanced correlation map is very similar than the information given by the correlation map itself. Nevertheless, the discrimination power increased with the decreasing the value of α . This offered valuable information about the composition and general distribution of the coating, allowing the study of this chemical distribution with different discrimination levels.

Fig. 6 illustrates the enhanced correlation maps of the sample with a target spectrum of the core tablet (pixel (40×30)). Once more, a decreasing in α value was translated into an increasing in the discrimination. The anomaly was again detected and identified as a low correlation region inside of core zone, but the rest of the core seemed to be well distributed. Increasing the discrimination power, small differences within core region could be appreciated. In general, the enhanced correlation maps shown in Figs. 5 and 6 allowed obtaining the coating size and the core area of the tablet, checking the chemical distribution of both areas.

4.5. Binary images: finding a good threshold

One of the main advantages of the enhanced correlation function is the improvement in the interpretability of the enhanced histogram, with the purpose of setting an appropriate threshold to obtain binary images that may show the zones of interest. Fig. 3

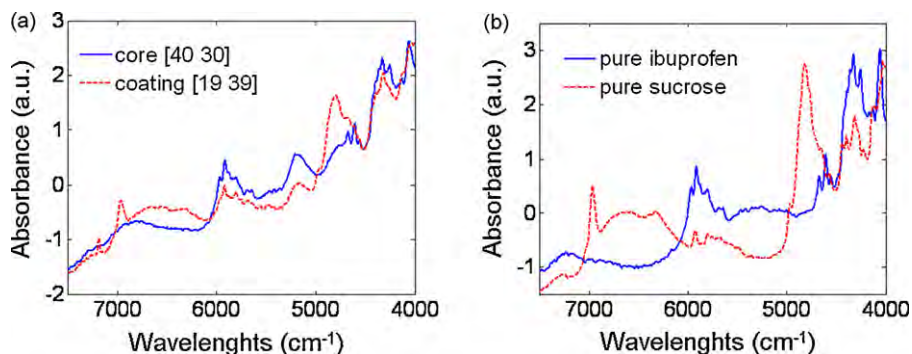
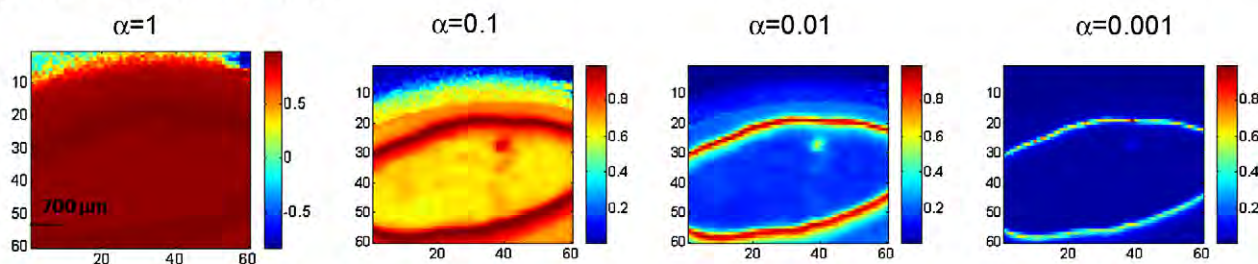


Fig. 4. (a) Core and coating target spectra used to perform correlation and enhanced correlation maps. (b) Pure spectra of ibuprofen and sucrose.

(a) Enhanced correlation maps



(b) Enhanced correlation histograms

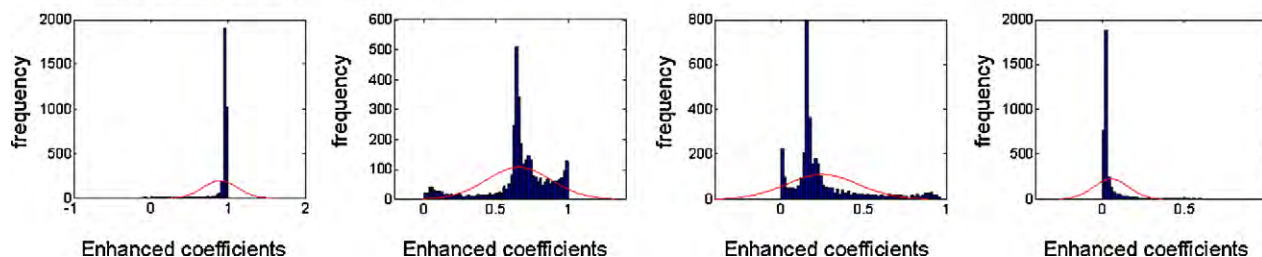
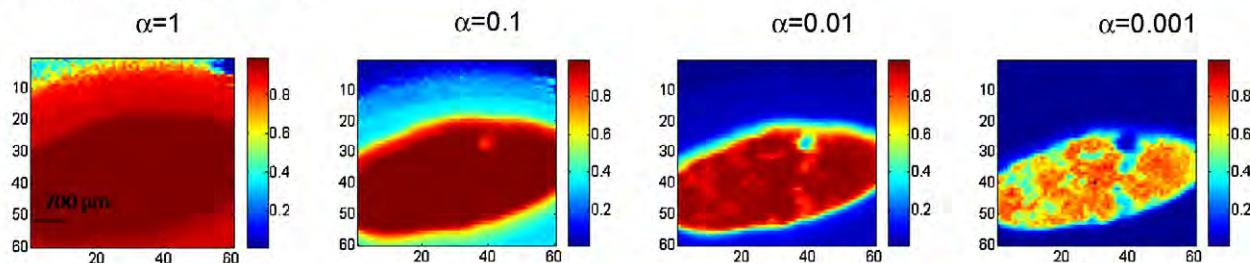


Fig. 5. (a) Enhanced correlation maps and (b) the corresponding histograms calculated for pixel (26 \times 39) by varying the value of α .

(a) Enhanced correlation maps



(b) Enhanced correlation histograms

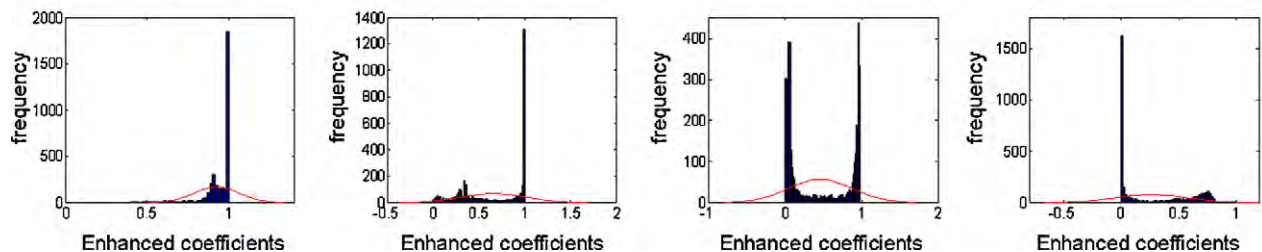


Fig. 6. (a) Enhanced correlation maps and (b) the corresponding histograms calculated for pixel (40 \times 30) by varying the value of α .

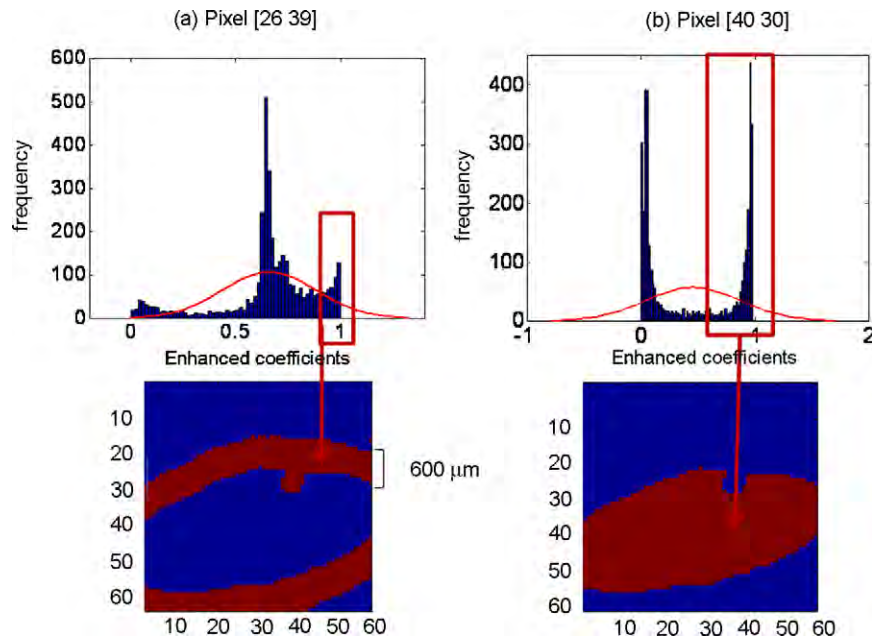
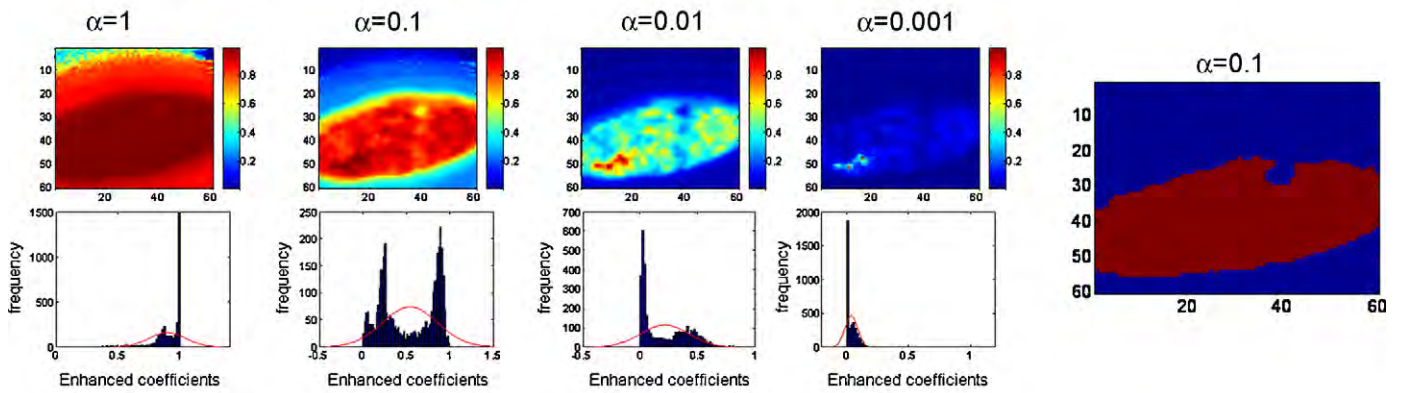


Fig. 7. Selection of the enhanced coefficients range to obtain binary image for (a) pixel (26 × 39) and (b) pixel (40 × 30).

already showed the benefits of working with the enhanced correlation histogram (Fig. 3b) instead of working with the standard correlation histogram (Fig. 3a). The effect of α in the coefficient distribution was clearly observed in the histograms in Figs. 5 and 6.

When α decreased, the enhanced correlation coefficients, initially grouped around 0.99, shifted to lower values in the histogram. Consequently, the distribution was expanded along the x-axis, but with different discrimination grade. This amplification effect with

(a) Enhanced maps and histograms for ibuprofen



(b) Enhanced maps and histograms for sucrose

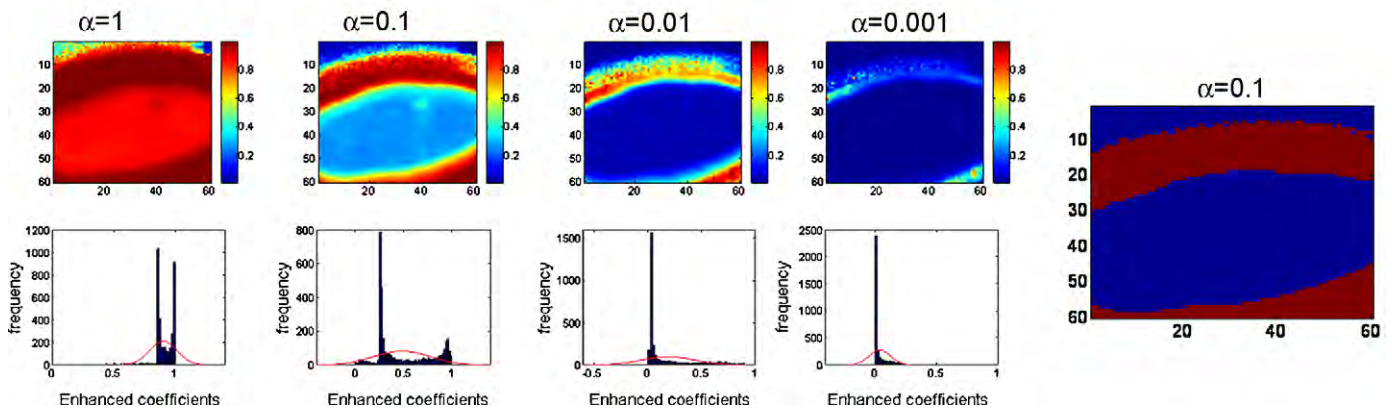


Fig. 8. (a) Enhanced correlation maps and histograms of the sample using ibuprofen and (b) sucrose with different α values.

α allows a better assignment of the threshold to build a binary image.

Nevertheless, there are not optimum values of α . Calculating various enhanced correlation maps with different α values, and making the transformation to a binary image with the one that clearly discriminates the zones is a recommended task.

Even if many zones are clearly depicted in one histogram, the right procedure to obtain binary images is performing correlation maps with as many target spectra as zones should be located. In this particular case, the chosen values of enhanced correlation coefficients ranged from 0.78 to 1, over coefficients obtained using $\alpha = 0.1$ for the coating zone (Fig. 5) and from 0.6 to 1 using $\alpha = 0.01$ for the core zone (Fig. 6). These results are shown in Fig. 7, where it is possible to distinguish between the coating edge of the tablet and ibuprofen zone.

5. Enhanced correlation maps using pure spectra

Fig. 8 shows the enhanced correlation maps and the corresponding histograms obtained for two of the main components in the tablet (Fig. 4b): ibuprofen (API) and sucrose (unique coating component). The ibuprofen enhanced correlation maps showed similar information as the enhanced correlation maps obtained with the target pixel (40×30) (see Section 4.4). It is remarkable that the enhanced contrast function was a useful tool to distinguish small differences on ibuprofen concentration at the tablet surface.

On the other hand, the sucrose enhanced correlation maps did not provide good information about the coating zone parallel to the plane of tablet section. The sucrose pure spectrum was highly correlated with the external part of the tablet (coating), necessarily in the image because of the sample shape (Fig. 1). The zone of study was difficult to define, and it was not possible to obtain a representative binary image of the coating zone (Fig. 8b). Indeed, one of the conclusions of this study was that the coating zone is not represented by sucrose pure spectrum, but by a mixture spectrum mainly composed of sucrose, ibuprofen and excipients responses. Thus, correlation coefficient maps demonstrated to be a more useful tool to establish chemical distribution assessment and size of this type of tablets coating than pure component correlation maps.

This new methodology can be very useful in initial phases of image studies, and in other specific situations as it has been previously shown, where different zones or components want to be identified in a sample. Correlation maps offer another fast-computing possibility to obtain information about the large amount of data achieved using these new chemical image techniques.

6. Conclusions

A new, simply implemented approach for obtaining spatial information of pharmaceutical tablets without any previous knowledge has been presented by using near infrared chemical image and information contained only in the sample under analysis. The fact that previous information about the sample is not needed makes the proposed methodology especially useful in analysis of unknown samples, strange contaminants localization, and locating anomalies in different samples.

The basic idea is to explore how spectral or other properties of each pixel in the image differ from the others, and that was achieved through the application of Pearson's correlation coefficient. The proposed function allows changing the correlation scale in order to obtain a good contrast for the image for any combination of correlation coefficient maximum and minimum.

The proposed methodology can detect a deviation by comparing the spectra obtained from one tablet. As we pointed out beforehand, the main feature of this methodology is that the operator has the opportunity of selecting different pixels as well as different α values in an easy way. This dynamic iteration allows studying different areas of the image and increasing and decreasing the discrimination with the selected pixel. Therefore, the methodology can be used as a control technique to detect defects in final tablets and punctual contaminants, being a potential supplementary tool for quality controls. In addition, it has to be pointed out that the usefulness of the proposed methodology is not exclusive to NIR-CI devices, but it can be applied to any hyperspectral and multivariate image system.

Acknowledgements

José Manuel Amigo wants to thank the Danish Research Council for Technology and Production Sciences for his post-doctoral fellowship. Santiago Maspoch, Jordi Coello and Carlos Cairós are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this research within the framework of Project CTQ2007-62528. Carlos Cairós thanks the Spain's Ministry of Science and Technology for his predoctoral fellowship BES2005-9614.

References

- [1] J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. Maspoch, J. Coello, M. Blanco, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 696.
- [2] J.M. Amigo, C. Ravn, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37 (2009) 76.
- [3] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *Talanta* 73 (2007) 733.
- [4] N. Jovanovic, A. Gerich, A. Bouchard, W. Jiskoot, *Pharmaceutical Research* 23 (2006) 2002.
- [5] Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *Analytica Chimica Acta* 535 (2005) 79.
- [6] A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 70.
- [7] H. Ma, C.A. Anderson, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 15 (2007) 137.
- [8] H. Ma, C.A. Anderson, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (2008) 369.
- [9] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, S.E.J. Bell, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2008) 10.
- [10] C. Ravn, R. Bro, E. Skibsted, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 554.
- [11] Y. Roggo, N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61 (2005) 100.
- [12] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, G. Downey, J.M. Frias, *Trends in Food Science & Technology* 18 (2007) 590.
- [13] G. Reich, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1109.
- [14] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Applied Spectroscopy* 43 (1989) 772.
- [15] P. Geladi, H. Gråhn, *Multivariate Image Analysis*, John Wiley & Son Ltd., New York, 1997.
- [16] P. Geladi, H. Isaksson, L. Lindqvist, S. Wold, K. Esbensen, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 5 (1989) 209.
- [17] L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, *Analytica Chimica Acta* 545 (2005) 262.
- [18] <http://www.models.kvl.dk/users/jose.manuel.amigo/index.htm>.