

CAPÍTOL IV

DETERMINACIÓ CINÈTICA DE MESCLES TERNÀRIES D'ALDEHIDS PER REACCIÓ AMB 3-METIL-2-BENZOTIAZOLONA HIDRAZONA

IV.1. OBJECTIU

En aquest capítol es desenvolupen dos mètodes cinètico-espectrofotomètrics per a l'anàlisi de mescles ternàries d'aldehids alifàtics de baix pes molecular que formen part d'alguns dels detergents comercials utilitzats en la desinfecció hospitalària. Ambdós es basen en la reacció d'aquests aldehids amb 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) sota situacions experimentals diferents, i l'aplicació de les tècniques de calibració multivariables, tals com la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS) i les Xarxes Neuronals Artificials (ANNs).

Aquest objectiu és doble i es materialitza en dos procediments diferents en els quals es mostra la gran capacitat dels mètodes cinètics en resoldre sistemes especialment complicats:

En el primer mètode cinètic, la mostra es dilueix de forma que el reactiu es troba en un lleuger excés, fent que la reacció que té lloc sigui de segon ordre.

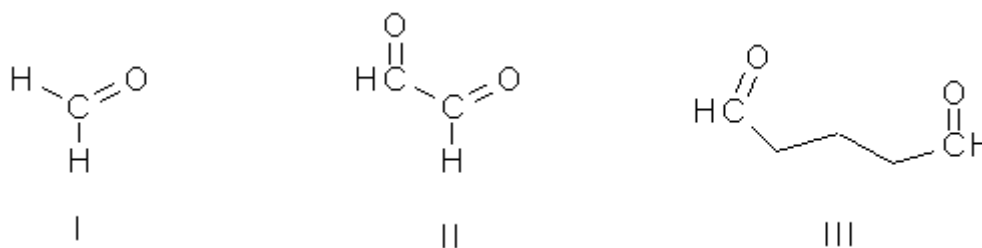
En el segon mètode, la mostra s'afegeix directament a la mescla de reacció on el reactiu es troba en un considerable defecte, fent que en aquestes condicions la cinètica sigui de pseudoprimer ordre respecte al reactiu.

IV.2. INTRODUCCIÓ

L'anàlisi de mostres que contenen mescles complexes de compostos químics constitueix un dels reptes de la química analítica actual, especialment quan aquests compostos presenten estructures i propietats similars i, per tant, s'interfereixen mútuament en la seva determinació.

La resolució d'aquest problema s'ha abordat clàssicament utilitzant tècniques de separació, però per la determinació d'un nombre reduït d'analits, l'aplicació dels mètodes de cinètica diferencial, registrant l'absorbància a un nombre gran de longituds d'ona i aplicant una calibració multivariable s'ha demostrat modernament com una alternativa potencialment competitiva, especialment al HPLC, ja que es redueix considerablement el temps d'anàlisi i s'evita (o redueix) l'ús de dissolvents orgànics [Pérez-Bendito, 1990; Cullen, 1997]. Malgrat això, la seva aplicació a mostres reals d'interès industrial és encara relativament escassa.

Mostres industrials que presenten aquesta problemàtica són les mescles d'aldehids utilitzades com a desinfectants. Així trobem en el mercat detergents per la neteja i desinfecció per equip mèdic i quirúrgic, i també de superfícies, que contenen habitualment mescles de formaldehid (I), glioxal (II) i glutaraldehid (III).

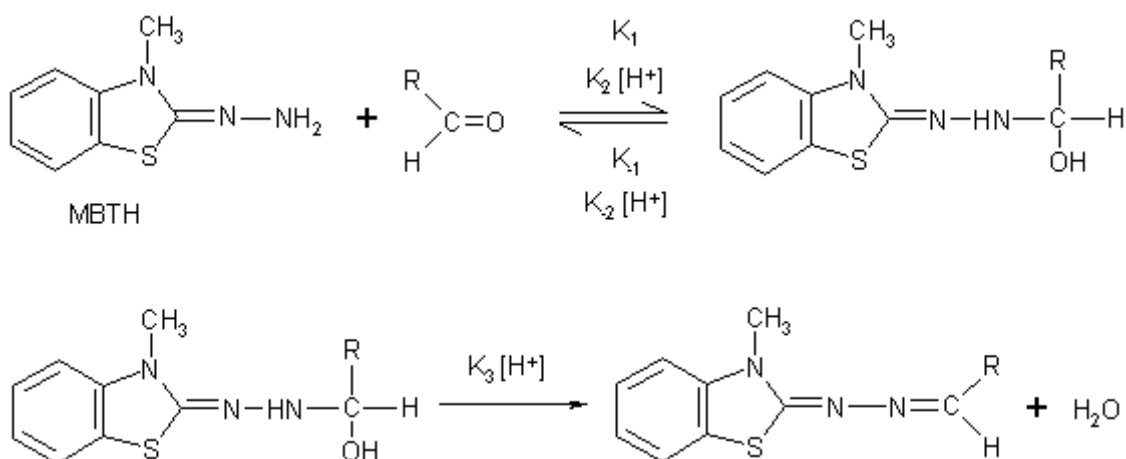


Esquema 4.1

La majoria dels mètodes descrits en la bibliografia per a la determinació de mescles d'aldehids provinents d'un ampli ventall d'aplicacions industrials, així com per l'estudi de la pol·lució ambiental, utilitzen la cromatografia HPLC amb detecció UV-Visible o fluorescent dels productes resultants d'una derivatització prèvia dels analits, normalment amb compostos de la família de les hidrazines [Papa, 1972; Selim, 1977; Dahlgran, 1988; Karst, 1996; Menet, 1996; Bueldt, 1997]. Aquesta metodologia analítica està àmpliament establerta en l'actualitat per l'anàlisi de mostres complexes degut al problema de la manca de selectivitat en la determinació dels diferents components.

S'han descrit també diversos mètodes per la seva determinació espectrofotomètrica basats en la derivatització cromogènica amb un número ampli de reactius que tenen en comú un grup amino primari com a grup derivatitzant [Konnors, 1973]. Un problema d'aquests mètodes es que tots els aldehids donen la mateixa reacció: formació de la imina, i per tant l'espectre dels compostos formats és molt semblant. En alguns casos el formaldehid té un comportament diferenciat, ja que pot reaccionar amb dos molècules del reactiu, generant productes d'estructura i espectre diferent a la dels altres aldehids [Konnors, 1973].

La diferència fonamental entre els diferents aldehids és la cinètica de la reacció, que generalment és molt més ràpida pel formaldehid i més lenta a mesura que augmenten els impediments estèrics produïts per la cadena alifàtica. Així, en un treball [Zurek, 1997] es descriuen dos mètodes fotomètrics, basats en la reacció amb 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) i 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) respectivament, per a la determinació del contingut total d'aldehids en solucions comercials desinfectants. En els dos procediments, les condicions d'anàlisi són optimitzades per la determinació de formaldehid, i les mesures fotomètriques són portades a terme a una única longitud d'ona. Ambdós presenten una sensibilitat molt baixa pels altres aldehids, especialment pels dialdehids com és el glixal, i els resultats trobats del contingut total d'aldehids en les mostres de desinfectants són molt inferiors als reals, fins al punt que el mètode Purpald es pot considerar selectiu pel formaldehid i no detecta la presència dels altres aldehids. En resum, els dos mètodes fotomètrics desenvolupats no són adequats per a determinació del contingut dels diferents aldehids.



Esquema 4.2

En aquest capítol es posen a punt dos procediments per a la determinació simultània cinètico-espectrofotomètrica de formaldehid (I), glioxal (II) i glutaraldehid (III), continguts en detergent desinfectants comercials, a partir de la reacció de condensació amb 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona en medi àcid per a donar la corresponent aldazine, on es va escollir aquest reactiu per ser prou sensible pels tres analits.

La reacció de condensació té lloc en dos passos (esquema 4.2) i està fortament afectada pel pH, ja que tant l'etapa d'addició com la de deshidratació estan catalitzades per ions H^+ . La velocitat de reacció del procés global està descrita per l'equació 1. El perfil de la velocitat de reacció front el pH presenta un màxim a pH 4-5 per a la majoria de sistemes i després disminueix amb l'augment de l'acidesa del medi.

$$v = \frac{k_3[H^+](k_1 + k_2[H^+])}{k_{-1} + k_{-2}[H^+] + k_3[H^+]} [MBTH][RHCO] \quad (1)$$

La complexitat del problema abordat ve determinada per la gran similitud entre els analits i els seus productes de reacció, així com de la pròpia mostra, on hi ha presents tensioactius i colorants, dels quals es desconeix tant la seva naturalesa com el seu contingut. Els dos procediments cinètics que es presenten volen ser dues alternatives vàlides on s'intenta trobar les condicions experimentals més favorables per a l'anàlisi d'aquest sistema. S'obtenen dos sistemes químics totalment diferents i pronunciadament no-lineals.

En el primer mètode la mostra es dilueix prèviament, per evitar interferències per part d'altres espècies contingudes en les mostres reals. Per altra banda, es treballa únicament en un lleuger excés de reactiu ja que aquest absorbeix en la regió espectral d'interès, i en aquestes condicions la reacció segueix una cinètica de segon ordre.

En el segon mètode, s'ha volgut facilitar el treball d'anàlisi de rutina afegint directament la mostra sense diluir a la mescla de reacció. En aquestes condicions el reactiu es troba en considerable defecte respecte als analits, i tenim que les reaccions segueixen una cinètica de pseudoprimer ordre respecte al reactiu. A més, s'han detectat interferències de la matriu, atribuïdes a la presència del tensioactiu, pel que la calibració s'ha realitzat utilitzant un sistema mixta, format per mescles dels aldehids per cobrir un interval ampli de concentracions i per mostres reals per incorporar l'efecte de matriu en el calibrat. Aquest tipus de sistemes mixtos per a construir la

calibració és àmpliament utilitzat en altres tècniques espectroscòpiques com és la espectroscopia d'infraroig pròxim (NIR) tant de mostres sòlides [Blanco, 1998] com líquides [Riley, 1998].

En ambdues situacions es considera idònia l'utilització dels mètodes de calibració multivariable pel processament de les dades experimentals. S'utilitza la regressió parcial per mínims quadrats (PLS), que dona molt bons resultats pel primer mètode, però no tan bons pel segon, especialment pel component minoritari (glutaraldehyd), cosa que s'ha atribuït a l'elevada no-linealitat del sistema. Per aquest segon mètode s'ha assajat també una calibració mitjançant les xarxes neuronals artificials (ANN), utilitzant com a variables d'entrada els scores d'un anàlisi en components principals de la matriu de dades espectrals (PC-ANN). La utilització d'aquest mètode de calibració permet millorar considerablement la predicció del glutaraldehyd, fent-la comparable a la dels altres analits.

Finalment els resultats obtinguts per l'aplicació de cada un dels mètodes, es contrasten amb un mètode de referència. En aquest cas, s'ha adaptat un mètode HPLC, prèviament descrit a la bibliografia [Zurek, 1997].

IV.3. EXPERIMENTAL

IV.3.1. REACTIUS I DISSOLUCIONS

Les diferents dissolucions de treball es preparen mitjançant adequada dilució de les solucions aquoses comercials de cada aldehid (Aldrich), el contingut de les quals es determina volumètricament: formaldehid $36,68 \pm 0,04$ % (w/w), glutaraldehid $25,67 \pm 0,06$ % (w/w) i glioxal $37,75 \pm 0,11$ % (w/w). El contingut de formaldehid es troba mitjançant el mètode del Na_2SO_3 [Encyclopedia of ICA, 1971], i valorant amb àcid sulfúric prèviament estandaritzat, l'hidròxid sòdic alliberat, essent l'indicador utilitzat la timolftaleina. El contingut de glutaraldehid i glioxal, es determina per reacció amb una dissolució aquosa de clorhidrat d'hidroxilamina $\text{H}_2\text{NOH.HCl}$ [British Pharmacopeia, 1993], i valorant amb hidròxid sòdic prèviament estandaritzat, l'àcid lliure format, utilitzant com a indicador el blau de bromo fenol. Totes les dissolucions un cop preparades es guarden a $4-5^\circ\text{C}$ en nevera i es protegeixen de la llum.

S'analitzen dues dissolucions desinfectants comercials (Diesin® Normal i Diesin® Rapid, de Henkel, Montornés del Vallés, Espanya), essent les dues força diferents tant pel contingut en aldehids com per l'aspecte (una és incolora i l'altra de color groc intens). Els continguts nominals en 100 g de solució desinfectant són de 0,7 i 8 g de formaldehid, 1,8 i 8 g de glioxal i 0,4 i 4,5 g de glutaraldehid, en Diesin® Normal i Diesin® Rapid respectivament. La naturalesa i el contingut de la resta dels components es desconeix.

IV.3.1.1. DISSOLUCIONS UTILITZADES EN ELS MÈTODES CINÈTICS

Les dissolucions dels aldehids purs, es preparen, de forma que, un cop dissenyat el conjunt de mostres de calibració, la concentració en els detergents desinfectants es trobi el més a prop possible del nivell central.

En el primer dels mètodes cinètics es preparen cada dos dies les dissolucions estoc dels diferents aldehids purs per pesada directa i aleshores, les dissolucions de treball (formaldehid $3,68 \times 10^{-3}$ M, glioxal $3,96 \times 10^{-3}$ M i glutaraldehid $8,40 \times 10^{-4}$ M), es preparen diàriament a partir de

dues dilucions consecutives de les anteriors. Un cas especial és el formaldehid que es prepara de nou cada dia, degut a la seva major inestabilitat.

En el segon mètode cinètic, es preparen també cada dos dies les dissolucions estoc dels aldehids purs per dilució adequada de les dissolucions comercials, però a diferència d'abans, aquestes dissolucions constitueixen ja les dissolucions de partida per la construcció del conjunt de mostres de calibració. Les concentracions d'aquestes són les següents; formaldehid 2,646 M, glioxal 3,391 M, glutaraldehid 0,4357 M.

A partir de les dissolucions de treball, es preparen en diferents dies el conjunt de mostres per a la construcció dels models de calibració. Aquestes mescles contenen els tres aldehids a unes concentracions variables, i es guarden protegides de la llum a 4-5°C. Però malauradament, es troba que la velocitat de la reacció del glioxal depèn de forma molt important del temps que transcorre des de la dilució de la solució estoc, atribuint aquest fet al diferent grau de polimerització en què es troba en les solucions. Així, per tal d'obtenir una bona reproduïbilitat en els resultats, es deixa sempre un temps superior a les dues hores abans de mesurar les mostres que el contenen.

En ambdós sistemes cinètics es manté el pH del medi de reacció constant, en el primer amb un tampó citrat-fosfat pH (H₂O) = 5, i en el segon amb una solució HCl 0,01 M; la força iònica del medi de reacció es fixa a un valor de 0,5 M amb KCl. Per evitar possibles reaccions colaterals per metalls continguts en les mostres, les dissolucions tampó contenen una concentració de EDTA 1×10^{-3} M. Ambdues dissolucions tampó estan preparades en 40 % (v/v) isopropanol:aigua, ja que la reacció dels compostos dicarbonílics generen productes de condensació insolubles en aigua. També s'han utilitzat altres solucions tampons per fer algunes proves, i només dir que els diferents valors de pHs que s'indiquen per aquestes solucions, es corresponen sempre al pH en solució aquosa abans d'afegir el isopropanol.

Les dissolució estoc del reactiu 3-metil-2-benzotiazolone hidrazona (MBTH) (Aldrich), es prepara cada dia per pesada directe, i la dissolució de treball s'obté a partir de la dilució en aigua bidestil lada de l'anterior, essent la concentració final de $2,10 \times 10^{-3}$ M.

L'anàlisi de les mostres de desinfectants comercials es realitza en diferents dies, agafant 9 alíquotes dels detergents i afegint-les al medi de reacció. En el primer mètode les alíquotes dels dos detergents, es porten primer a la concentració adient per mitjà de varies dilucions consecutives en aigua bidestil lada. En canvi, en el segon mètode s'afegeix directament a la cubeta de reacció, un volum determinat del detergent *Diesin*® Normal. De fet, l'objectiu que es busca quan es

desenvolupa aquest segon mètode cinètic d'anàlisi, és el de facilitar al màxim l'anàlisi de les mostres reals.

IV.3.1.2. DISSOLUCIONS UTILITZADES EN HPLC

Per a la determinació cromatogràfica s'utilitza CH₃CN (Panreac, HPLC) com a dissolvent i eluent, i 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) (Prolabo) com a reactiu derivatitzant.

La preparació del reactiu 2,4-DNPH, es fa seguint el procediment descrit per Shriner et al. [Shriner, 1980]; es dissolt 1 g de 2,4-DNPH en 5 ml d'àcid sulfúric concentrat, s'addicionen 7 ml d'aigua bidestil lada gota a gota i amb agitació constant, i aleshores la solució resultant s'afegeix a 25 ml d'etanol.

L'anàlisi de les mostres de desinfectants comercials es realitza en diferents dies mitjançant el mètode de l'addició estàndard, sobre un total de 4 alíquotes de cada una de les mostres, determinant així el contingut dels aldehids en dos lots de Diesin® Normal i un lot de Diesin® Rapid.

IV.3.2. PROCEDIMENT CINÈTIC D'ANÀLISI

En ambdós casos el procediment experimental és el mateix. Les diferents dissolucions preparades s'afegeixen directament a la cel·la espectrofotomètrica mitjançant l'ús de micropipetes. Inicialment s'afegeixen 1,9 ml de la dissolució tampó i seguidament 0,1 ml d'una de les mesclures d'aldehids. Les concentracions finals de formaldehid, glioxal i glutaraldehid es troben compreses en el primer mètode cinètic entre $(0,50-3,0) \times 10^{-5} \text{M}$, $(0,50-3,5) \times 10^{-5} \text{M}$ i $(0,21-0,62) \times 10^{-5} \text{M}$ respectivament, i en el segon mètode entre $(1,22-3,72) \times 10^{-2} \text{M}$, $(1,69-5,12) \times 10^{-2} \text{M}$ i $(0,23-0,70) \times 10^{-2} \text{M}$ respectivament.

La cubeta es col·loca aleshores a l'espectrofotòmetre, mantenint la temperatura a $25,0 \pm 0,1$ °C i s'inicia l'agitació constant. Després d'uns minuts, es registra l'espectre de referència i llavors comença la reacció per l'addició, ja en últim lloc, de 0,1 ml de la dissolució de reactiu, essent la concentració final en cubeta de $1 \times 10^{-4} \text{M}$. El registre de la cinètica s'inicia als 10 segons de l'addició de la primera gota de reactiu, temps que s'agafa com a temps inicial de reacció, i després

d'haver invertit unes tres vegades la cubeta ben tapada. Tant la temperatura com l'agitació es manté constant durant tot el registre cinètic.

L'espectre UV-Visible del sistema reaccionant es registra a intervals de 2 nm en el rang de longituds d'ona de 200-500 nm per el primer mètode i de 290-470 nm pel segon, i a intervals de 10 segons durant 15 i 10 minuts respectivament, utilitzant un temps d'integració de 0,5 i 0,3 segons.

Per l'anàlisi dels desinfectants comercials es segueix el mateix procediment que per les mescles preparades anteriorment; en el primer mètode cinètic s'afegeix un volum de 0,1 ml de les diferents alíquotes sotmeses a una considerable dilució (un factor de 1:500 i de 1:5000 per Diesin® Normal y Diesin® Rapid respectivament), mentre que en el segon mètode es s'afegeix directament un volum de 0,1 ml de les diferents mostres. En aquest segon mètode només es va analitzar una de les mostres (Diesin® Normal), ja que l'altra presenta un color groc intens, que en les condicions de mesura ocasiona una saturació del detector.

IV.3.3. PREPARACIÓ DELS CONJUNTS DE MESCLES AL LABORATORI. CRITERI D-ÒPTIM.

Per cada mètode es preparen per duplicat, en dies diferents i amb un ordre totalment aleatori, un total de 82 mescles. 50 d'aquestes mescles s'utilitzen per a preparar els models de calibració i 32 com conjunt de predicció. Les mescles de predicció són dividides en dos conjunts de 16 mescles cada un d'ells; un conjunt de test-set per definir els models de calibració construïts, i un conjunt de predicció externa per comprovar la capacitat predictiva real dels models.

El disseny del conjunt de mostres és un punt clau en la construcció dels models de calibració, ja que d'aquest disseny depenen molt tant la precisió com la exactitud dels resultats obtinguts. La utilització d'un disseny factorial complet amb un número suficient de nivells per a cada espècie, seria l'opció que donaria una millor qualitat en els resultats. Però donada la complexitat del sistema i la previsible existència de no-linealitats s'opta per un model de 5 nivells de concentracions per a cada aldehid; aquest model complet obliga a la preparació d'un número de mescles que es considera excessiu (5^3 més duplicats), pel que es va fixar arbitràriament com un número adequat el de 50 mescles de calibració. Per a seleccionar aquestes 50 de les 125 possibles, s'utilitza el criteri D-òptim [Carlson, 1992]. Aquest criteri és àmpliament utilitzat en disseny

experimental per generar dissenys reduïts que aportin la màxima informació d'un conjunt d'experiments possibles, i permet obtenir la màxima precisió en l'estimació dels paràmetres dels models construïts.

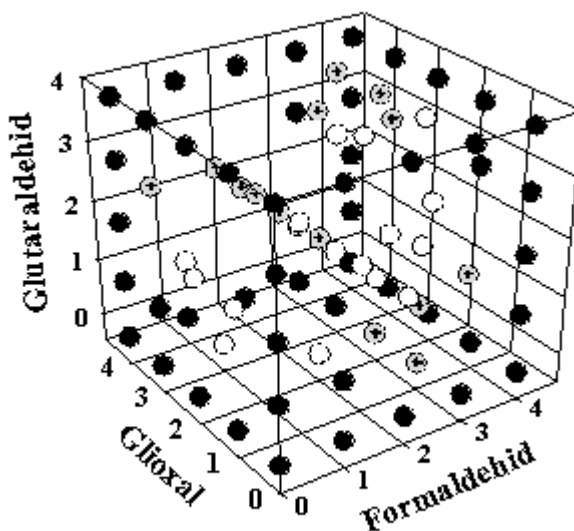


Figura 4.1. Composició de les mescles de calibració (●), de test-set (○), i de predicció (◐).

La selecció dels nivells de concentració dels tres aldehids es fa de forma que les concentracions dels diferents preparats comercials, es trobin el més a prop possible del nivell central del disseny, i que alhora els valors d'absorbància registrats no superin a 1 en la zona espectral d'interès. Els nivells extrems del disseny s'escullen de forma que es corresponguin a un $\pm 50\%$ o $\pm 75\%$ de la concentració en el nivell central per a cada analit.

El conjunt de mescles de predicció (conjunt de *test-set* i conjunt de predicció externa) s'escull del conjunt restant de mostres no utilitzades en la calibració, de forma aleatòria en cada un dels mètodes. Les concentracions de cada analit en aquests conjunts, es troben així compreses dins del intervals de concentració definits per les mostres de calibració.

A la figura 4.1 es mostra la composició de les diferents conjunts de mescles preparades, pel primer mètode cinètic estudiat.

IV.3.4. REGISTRE I PROCESSAMENT DE LES DADES

El registre dels espectres a diferents temps dels productes resultants de la condensació dels tres aldehids, es realitza mitjançant l'espectrofotòmetre de UV-Visible de díodes en línia Hewlett-Packard model HP-8453 A, que porta incorporat un bany termostàtic i un sistema d'agitació intern.

Del registre cinètic, s'obté per a cada mostra un vector que conté els diferents espectres registrats, ordenats seqüencialment per temps creixent de reacció; 13741 valors d'absorbància (151 longituds d'ona \times 91 espectres) i 5551 (91 longituds d'ona \times 61 espectres), pel primer i segon mètode cinètic respectivament. Aquest vector conté els. Per tal de facilitar els càlculs, es redueix força la quantitat de variables a tractar, escollint els valors d'absorbància més espaiats i agafant un nombre menor de temps.

A partir de la matriu de dades cinètico-espectrofotomètrica obtinguda amb el conjunt de totes les mostres, es construeixen els diferents models de calibració utilitzant l'algoritme PLS incorporat en el programa Unscrambler versió 6.1, i utilitzant les xarxes neuronals artificials (ANN) incorporades en el programa Neural-Connection.v. 2.0.

La construcció dels diferents models PLS es fa utilitzant el mètode de test set, i la matriu de dades es centra prèviament al seu processament. S'assagen diferents models per tal d'optimitzar el mode espectral (absorbància i primera derivada), el rang de longituds d'ona de treball, i el temps de registre cinètic, amb l'objectiu de minimitzar l'error de predicció de les mostres. El número de factors que s'escull és el menor que presenta un error quadràtic mig de predicció, PRESS, no significativament diferent del mínim, seguint el criteri de significació proposat per Haaland and Thomas que utilitza un *F-test* amb una probabilitat $P = 0,25$.

El tipus de xarxa que s'utilitza en la construcció dels diferents models ANN és l'anomenada *Multi-Layer Perceptron* (MPL) amb una sola capa oculta (i, h, o), i el procediment d'aprenentatge de la xarxa es basa amb l'algoritme de gradient conjugat, on els paràmetres d'aprenentatge són modificats pel mateix programa de càlcul emprat.

S'assagen paràmetres estructurals de la xarxa com és el número de neurones en la capa d'entrada i en la capa oculta, així com la funció de transferència (lineal, sigmoide o tangencial) utilitzada per cada neurona, i finalment el rang inicial i la distribució dels pesos (gaussiana o uniforme) per les connexions entre neurones de diferents capes. Pel que fa al número de neurones

en la capa de sortida, es procedeix de forma diferent en els dos mètodes cinètics desenvolupats. En el primer sistema, la capa de sortida conté tres neurones que es corresponen amb les concentracions dels tres aldehids, cosa que ens permet utilitzar un únic model per a la calibració conjunta, i així escurçar el temps de càlcul. En canvi, en el segon sistema es creu més oportú utilitzar una única neurona de sortida i treballar cada aldehyd per separat. Això d'entrada allarga molt els càlculs, però es pensa que els resultats tendiran a ser millors que en el procediment anterior.

Previ a la construcció dels models ANN, es segueixen dues estratègies diferents per a reduir el nombre tant elevat de variables a tractar, i que fa impossible usar-les directament en la capa d'entrada de la xarxa. En la primera estratègia es construeixen models PC-ANN, on s'utilitza com a dades d'entrada els scores d'un model PCA de les dades cinètico-espectrals. En la segona estratègia es construeixen models ANN a partir d'unes poques variables originals escollides de forma empírica.

La selecció dels valors dels paràmetres òptims per a la construcció dels xarxes no és fàcil ni ràpid, ja que hi ha molts paràmetres a estudiar, i alhora aquests es troben relacionats en cert grau. El criteri que s'adopta és el d'escollir els models ANN més simples els quals presentin el menor error de predicció de les mostres de test set, i que alhora no hi hagi un sobre ajust acusat.

Finalment, per tal de facilitar la comparació i interpretació dels resultats obtinguts en cada un dels diferents de models provats, es calcula l'error estàndard relatiu de predicció (RSEP%), la reproduïbilitat límit R i la desviació estàndard relatiu mitja entre replicats (ARSD%) pels diferents conjunts de mostres. En aquests conjunts està inclòs el conjunt de mostres de predicció extern, el qual no s'utilitza en cap etapa de la construcció dels models. Degut al gran volum de variables a estudiar, en alguns casos es considera oportú que els resultats obtinguts pels diferents models ANN, siguin comparats entre ells mitjançant l'error quadràtic mig de predicció RMSEP. Aquest paràmetre s'obté directament del programa de càlcul emprat, i malgrat sigui un error absolut, ens dona una idea sobre quin dels models ANN assajats, s'obtenen els millors resultats.

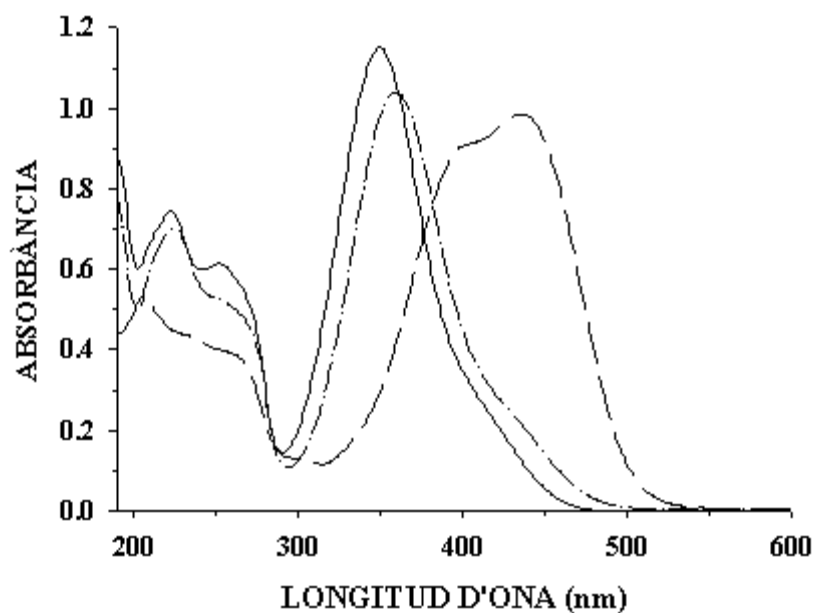
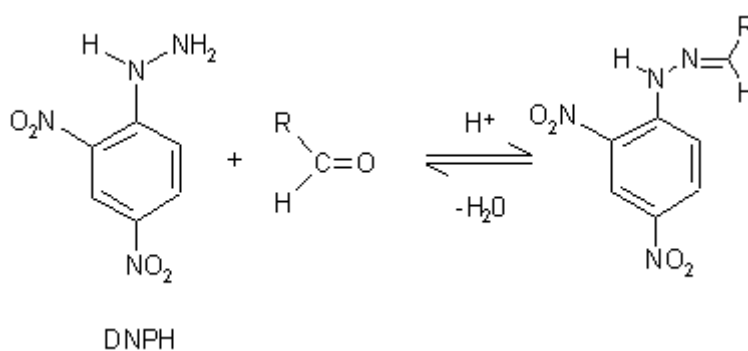


Figura 4.2. Espectres UV-Visible de les DNPhidrazones del formaldehid $5 \times 10^{-5} \text{M}$ (—), glioxal $3 \times 10^{-5} \text{M}$ (---), i glutaraldehid $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ (- -).

IV.3.5. PROCEDIMENT CROMATOGRÀFIC

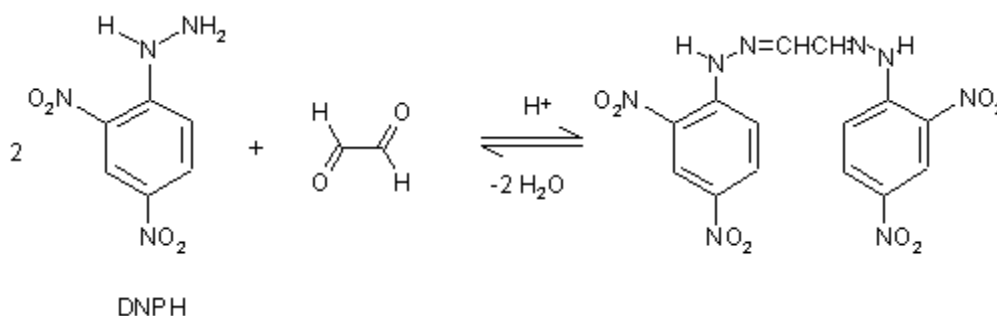
La DNPH reacciona amb aldehyds, així com també amb cetones, seguint l'esquema general següent:



Esquema 4.3

El glutaraldehid i el glioxal reaccionen amb dos mols de DNPH, per a donar lloc a les corresponents bishidrazones. Els espectres de les DNPhidrazones derivades del formaldehid,

glutaraldehyd i glioxal en CH₃CN es mostren a la figura 4.2, les quals presenten els màxim d'absorbància a 350, 360 i 434 nm, respectivament. A la figura es pot observar que la bishidrazona del glioxal presenta un fort desplaçament cap a longituds d'ona superiors comparat amb les altres hidrazones, fet que s'explica per la formació d'un llarg sistema conjugat en la derivatització (esquema 4.4).



Esquema 4.4

L'aplicació directa del mètode a les nostres mostres, basant-nos amb les dades trobades a la bibliografia, dona lloc a resultats poc reproduïbles, i és per això que es modifica aplicant el mètode de l'addició estàndard. S'afegeixen diferents quantitats dels tres aldehids sobre un mateix volum de mostra, i es procedeix a la seva derivatització. Així mateix, la composició de la fase mòbil es modifica lleugerament. A partir de la realització d'un conjunt d'experiències, on es varia la composició de la fase mòbil, s'escullen les següents condicions:

Una columna de fase reversa C₁₈ Spherisorb ODS-2 (15 cm de longitud, 0,46 cm de diàmetre intern, dimensió de partícula de 5 μm, Tracer)

Fase mòbil: gradient CH₃CN/Aigua, 4 min CH₃CN/Aigua 54% (v/v) i després s'augmenta al 70% (v/v) en 20 minuts

Caball: 1 ml/min

Volum d'injecció: 20 μl

Detecció: 350 nm, 360 i 434 nm

Per cada detergent es prepara una recta de calibració a partir de 5 alíquotes, on cada alíquota es tracta tal i com es descriu; s'agafa un volum 0,2 ml de la mostra prèviament diluïda en

aigua bidestil·lada (un factor 1:100 i 1:1000 per Diesin® Normal i Diesin® Rapid, respectivament), s'afegeix un volum variable de les dissolucions pures dels diferents aldehids, i finalment s'afegeix 1,5 ml de la solució de reactiu. La mescla es deixa reaccionar uns 10 minuts amb agitació constant, i passat aquest temps, es porta a un volum final de 25 ml amb CH₃CN.

S'injecten les diferents al·líquotes al cromatògraf per triplicat, després d'ésser filtrades mitjançant un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus. Les diferents concentracions contemplades en la recta de calibració, s'escullen de manera que la concentració central sigui molt pròxima a la concentració teòrica en el detergent, i que existeixi una relació lineal entre l'àrea del pic i la concentració.

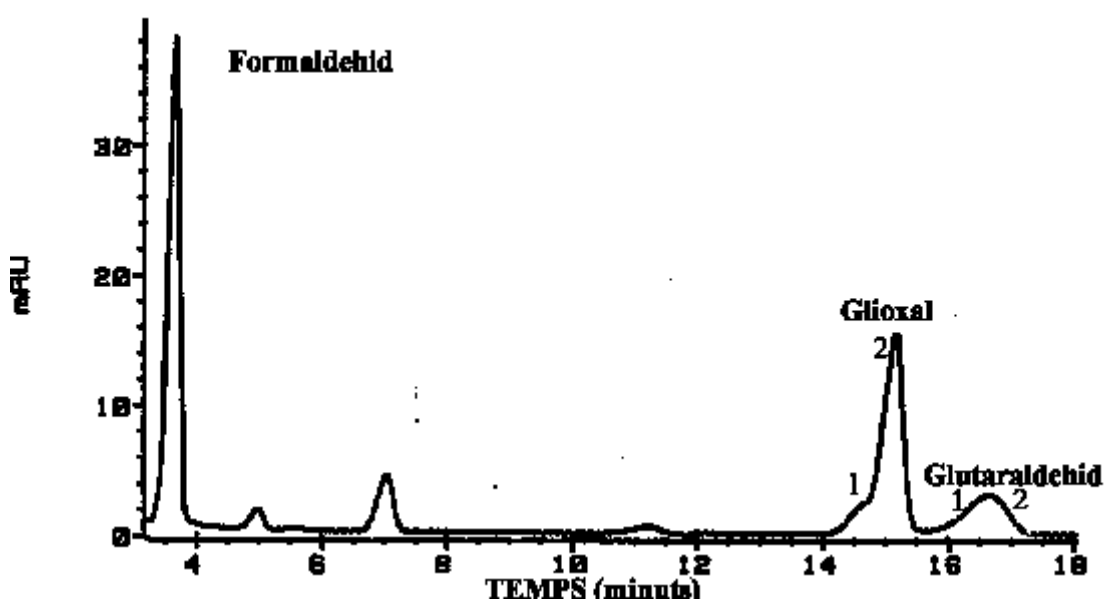


Figura 4.3. Cromatograma d'una mostra de Diesin® Rapid (diluida factor 1:1000), enregistrat a 360 nm.

En aquestes condicions, el cromatograma s'enregistra a les longituds d'ona dels màxims d'absorbància de cada una de les espècies, essent el temps de retenció de 3,6, de 14,8 i de 16,8 minuts per les DNPhidrazones del formaldehid, glioxal i glutaraldehid respectivament. A la figura 4.3 es mostra un cromatograma enregistrat a 360 nm, per a una de les mostres de desinfectant després de reaccionar amb DNPH. S'observa un pic ben definit per la hidrazona del formaldehid, dos pics per la bishidrazona del glioxal corresponents als dos isòmers que es formen [Zurek, 1997], i un pic força ample per la bishidrazona del glutaraldehid. També s'observen bandes corresponents a altres components que formen part de la composició dels desinfectants. Pel

glutaraldehyd també s'ha descrit la formació de varis isòmers en el procés de derivatització [Lindahl, 1995], i la banda tan ampla que apareix en el cromatograma, és resultat de la superposició dels dos isòmer que es formen majoritàriament en les nostres condicions de treball.

Es determina el contingut mig de formaldehyd, glioxal i glutaraldehyd a partir de l'anàlisi d'un total de 4 mostres de dos lots de Diesin® Normal i un lot Diesin® Rapid.

IV.4. MÈTODE CINÈTIC PER MOSTRES DILUÏDES

IV.4.1. INTRODUCCIÓ

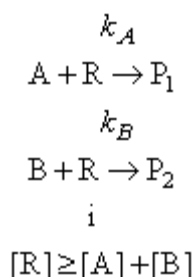
En aquest apartat es posa a punt un procediment per a la determinació simultània cinètico-espectrofotomètrica de formaldehid (I), glioxal (II) i glutaraldehid (III), en mostres molt diluïdes. La concentració de reactiu és igual o lleugerament més alta que la concentració combinada dels tres analits en les mostres, cosa que fa que ens trobem davant d'un sistema cinètic de segon ordre de reacció.

En un treball previ en el grup d'investigació [Blanco, 1996a] es va demostrar que mescles binàries d'espècies químicament molt iguals (quan les reaccions que tenien lloc seguien una cinètica de segon ordre) podien ser resoltes força bé mitjançant l'aplicació de les tècniques de calibració multivariables PLS i ANN.

En el sistema que ara s'estudia, el reactiu no es pot posar en suficient excés al medi de reacció, ja que la seva banda d'absorció es superposa de forma important a la dels productes d'interès, i a més, s'ha vist que es descomposa lentament per a donar lloc a compostos colorejats que també interfereixen a l'espectre.

En aquesta situació, tant les concentracions dels analits com la del reactiu varien amb el temps i cap d'elles es pot suposar constant, cosa que representa tenir un sistema en el que el senyal analític no és lineal amb la concentració dels analits.

Si considerem dos analits A i B que reaccionen amb un reactiu comú R per a donar lloc a dos productes P₁ i P₂, i considerant un mecanisme de segon ordre per ambdues espècies,



tenim que la velocitat de reacció bé definida per la següent equació:

$$\frac{d[P_1]}{dt} + \frac{d[P_2]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = k_A[A][R] + k_B[B][R] \quad (2)$$

on k_A i k_B són les constants de velocitat de A i B respectivament, i els coeficients estequiomètrics que afecten a cada espècie són de 1.

En les etapes inicials del treball, es busquen les millors condicions experimentals per dur a terme la reacció. Però aquestes condicions estan limitades per varis fets. En primer lloc la concentració de reactiu queda fixada de manera que la seva absorbància en la zona de treball sigui baixa. Per altra banda, interessa que pels tres analits la reacció sigui raonablement ràpida i suficientment sensible, per tal de poder diluir la mostra de forma que es minimitzin les possibles interferències provinents de la presència d'altres espècies en les mostres objecte d'anàlisi.

El seguiment de l'evolució de la reacció es fa utilitzant un detector de díodes en línia, registrant l'espectre combinat dels productes de reacció a mesura que aquests es van formant. En les condicions escollides, els derivats del formaldehid i el glutaraldehid presenten espectres molt similars (λ_{\max} 310 nm i 306 nm, respectivament), en canvi el espectre del derivat del glioxal està completament desplaçat a longituds d'ona superiors ($\lambda_{\max} = 404$ nm).

Finalment, el conjunt de les dades registrades, es processa per mitjà de PLS i ANN.

IV.4.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

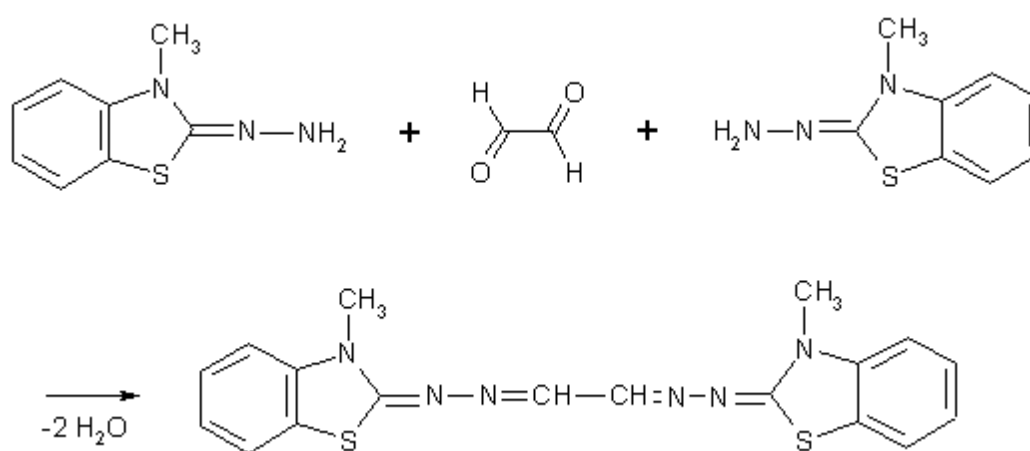
IV.4.2.1. REACCIÓ DELS ALDEHIDS AMB MBTH

La reacció de condensació de compostos carbonílics amb reactius de la família de les hidrazines i altres nucleòfils de nitrogen, per a formar els corresponents derivats, es troba àmpliament descrita en la literatura i utilitzada amb finalitats analítiques [Kommors, 1973]. La reacció té lloc en dues etapes (l'etapa d'addició seguida de la deshidratació, esquema 4.2), i està fortament afectat pel pH del medi, ja que ambdós passos estan catalitzats per ions H^+ . La velocitat de reacció del procés global es troba expressada per l'equació 1. D'aquesta manera, la selecció d'un adequat pH de treball constitueix un dels punts claus en el desenvolupament del mètode.

El reactiu MBTH és escollit per a la resolució cinètico-espectrofotomètrica dels tres aldehids en estudi, ja que permet obtenir unes diferències considerables tant en la velocitat de reacció com en els espectres dels diferents productes resultants. Grans diferències s'observen especialment en el derivat del glioxal, el qual es combina amb dos mols de MBTH per a donar lloc

a la corresponent bisaldazine (esquema 4.5), cosa que complica encara més el mecanisme de reacció. Aquest derivat del glioxal caracteritzat anteriorment [Zurek, 1997], presenta un espectre desplaçat cap a longituds d'ona superiors comparat amb les altres hidrazones, fet que s'explica per la formació d'un llarg sistema conjugat.

El mecanisme seguit pel glutaraldehid, no està descrit, però tenint en compte que es tracta d'un compost dicarbonílic, podria ser que també es combinés amb dos mols de MBTH. Però en aquest cas, al trobar-se els dos grups reactius de la molècula molt separats, aquests es comporten com a grups independents i no existeix la conjugació anterior.



Esquema 4.5

A la figura 4.4 es mostren els espectres d'absorbància dels productes derivats de la reacció de MBTH $1 \times 10^{-4} \text{M}$, amb els diferents aldehids a una mateixa concentració $5 \times 10^{-5} \text{M}$, després de 15 minuts de l'inici i a les condicions de treball escollides ($\text{pH} = 5$).

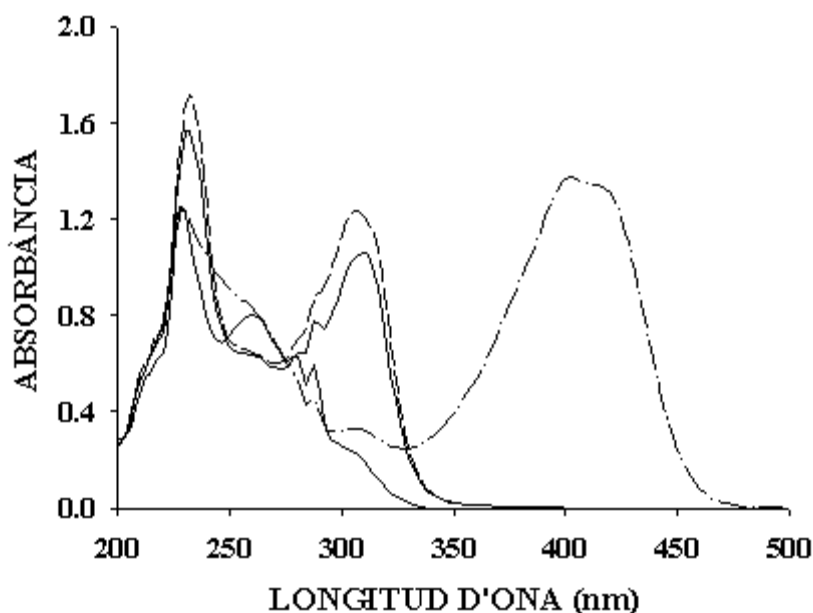


Figura 4.4. Espectre del MBTH (—), i dels derivats del formaldehid (—), glioxal (- -) i glutaraldehyd (---).

Es pot veure com l'espectre del derivat del glioxal està totalment desplaçat de la resta, ja que absorbeix en la regió del visible on presenta un doble pic amb màxims a 404 i 416 nm. Els espectres del formaldehid i del glutaraldehyd, en canvi, són molt semblants entre ells, amb només una diferència d'uns pocs nm entre els dos màxims d'absorbància (310 nm i 306 nm, respectivament), i a més, hi ha la contribució de la cua del reactiu en aquesta mateixa regió espectral. Aquest fort solapament que existeix, faria difícil de resoldre el sistema pels mètodes espectrofotomètrics convencionals, però aquí es disposa també de la informació que ens aporta la cinètica de la reacció, ja que els analits reaccionen a diferent velocitat. La relació de les constants de velocitat aparents formaldehid/glutaraldehyd, calculades a partir de la representació de la velocitat inicial (en variació d'absorbància sec^{-1} , a 310 nm) vers la concentració inicial d'un conjunt de dissolucions pures de cada un dos aldehids, és de 2,1. A part, la intensitat de les bandes dels productes derivats també és força diferent, essent els valors d'absortivitat molar aparent calculats als màxims d'absorbància de cada espècie, de 16120, 18834 i 29322 $\text{l}\times\text{cm}^{-1}\times\text{mol}^{-1}$ pel

formaldehid, glutaraldehid i glioxal, respectivament. Aquestes diferències afavoreixen els compostos més lents, en aquest cas el glioxal i el glutaraldehid, i això fa que augmenti la seva contribució a l'absorbància total de la mescla respecte al component ràpid, en aquest cas el formaldehid.

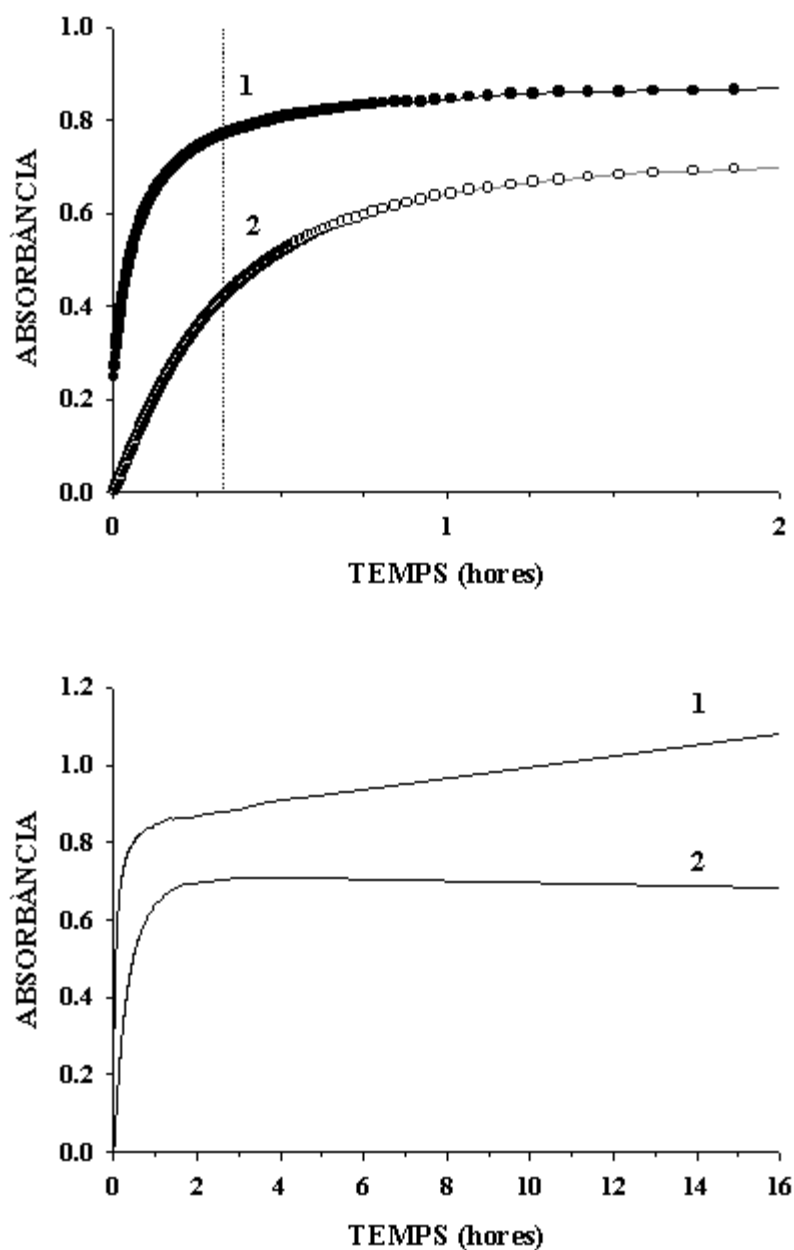


Figura 4.5. Perfil cinètic a 310 nm (1) i 404 nm (2), d'una mescla que conté els tres aldehids.

Es segueix la velocitat de reacció mitjançant el registre de l'espectre complet de les bandes dels productes de condensació durant un temps de 15 minuts. No s'agafen temps més llargs de registre, ja que en el temps considerat obtenim suficient informació del sistema. Per altra banda, en estudiar temps més llargs, s'observa que l'absorbància creix mica en mica i no arriba a establir-se. A la figura 4.5 es mostra el perfil cinètic a 310 i 404 nm d'una mescla que conté els tres aldehids (concentració total de 4×10^{-5} M). Aquest comportament s'atribueix a algun tipus de descomposició que pateix el reactiu que queda en excés en el medi de reacció. Aquesta descomposició és molt lenta, però a temps llargs de registre arriba a ser considerable, i els productes que s'en deriven absorbeixen també en la zona de treball.

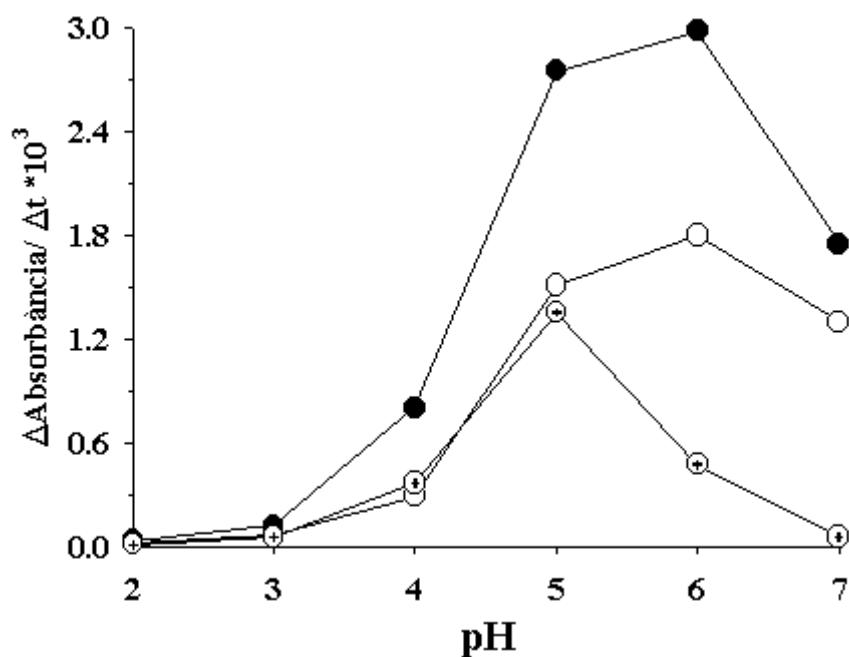


Figura 4.6. Efecte del pH sobre la velocitat aparent de reacció pel formaldehyd (●), =310nm, glioxal (○) =404nm, glutaraldehyd (◐) =306nm.

IV.4.2.2. ESTUDI DE LES CONDICIONS EXPERIMENTALS

La concentració del reactiu al medi és una de les condicions experimentals que s'estudia inicialment, ja que aquesta pot modificar el mecanisme de reacció. L'ideal seria poder utilitzar una concentració molt alta, per tal de convertir la reacció de segon ordre en una de pseudoprimer

ordre respecte a la concentració de cada un dels analits, i així simplificar al màxim el sistema i afavorir les espècies més lentes. Però això no és possible, per la limitació que suposa la contribució de la seva banda a 300 nm i el procés de descomposició que pateix amb el temps. Així doncs, s'escull una concentració $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de MBTH, concentració que només és lleugerament superior a la suma de les concentracions dels aldehids en les mostres.

A continuació s'estudia la influència del pH de reacció en el rang de 2-7, utilitzant dissolucions pures $3 \times 10^{-5} \text{M}$ de cada aldehyd i amb una concentració $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de MBTH. El pH del medi es fixa mitjançant tampons citrat-fosfat, preparats amb un 40 % isopropanol/aigua, per tal d'evitar la precipitació dels derivats del glutaraldehyd.

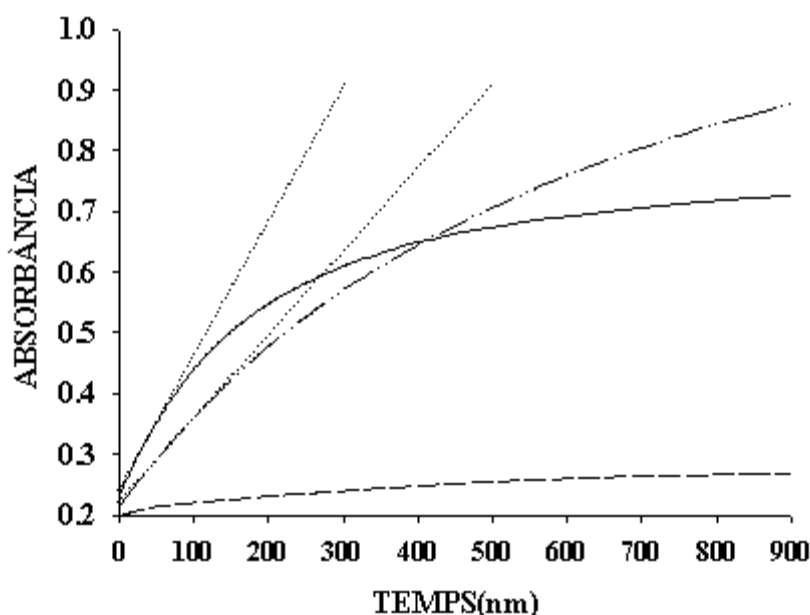


Figura 4.7. Perfils cinètics a $\lambda = 310 \text{ nm}$ pels derivats del formaldehid (—), glioxal (---), i glutaraldehyd (- -). pH = 5.

Es comprova que mentre el pH del medi de reacció no modifica massa els espectres d'absorbància de les diferents aldazines, sí que influeix molt en les velocitats del procés de condensació pels tres compostos. A la figura 4.6 es mostra la variació de la velocitat inicial aparent de reacció (en variació d'absorbància sec^{-1} , als màxims de cada espècie) amb el pH del medi. Es pot veure que mentre que les corbes pel formaldehid i el glutaraldehyd són força paral·leles, essent el formaldehid el que presenta una major velocitat de reacció, pel glioxal és separada una mica de

la resta. El glioxal és el compost que presenta la velocitat de reacció més baixa, i aquesta augmenta amb el pH fins arribar a un pH de 5 on és màxima. A partir d'aquest valor, la velocitat baixa ràpidament fins a valors molt petits. En canvi pel formaldehid i el glutaraldehyd, la velocitat màxima s'assoleix a un pH més elevat 5-6, i no es produeix una disminució tant brusca a pHs superiors. Una cosa que pot quedar confusa a la figura 4.6, és que realment no es representa la velocitat de reacció sinó el canvi de l'absorbància vers el temps. Aquesta velocitat aparent, és funció de l'absortivitat molar a la longitud d'ona utilitzada, i per tant és tracta d'una mesura que combina la discriminació cinètica, funció de la constant de velocitat, amb la sensibilitat espectrofotomètrica de les diferents espècies. Així, tenim que el canvi de l'absorbància pel glioxal és molt petita a la regió espectral on absorbeixen els altres compostos (figura 4.7).

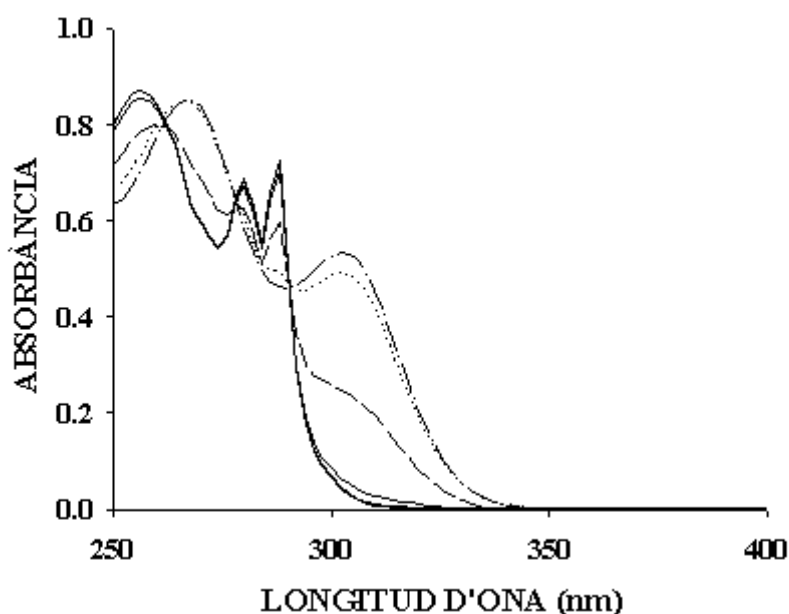


Figura 4.8. Espectres del MBTH a diferents pHs; 2,3,4 (—), 5 (---), 6 (....) i 7 (- -).

També s'observa que l'espectre d'absorbància del reactiu és diferent en funció del pH del medi. A la figura 4.8 es mostren els espectres del MBTH 1×10^{-4} M als diferents pHs estudiats. Com es pot veure, a mesura que augmenta el pH, apareix una banda d'absorbància centrada sobre 300 nm, la qual agafa valors força alts a pHs 6-7.

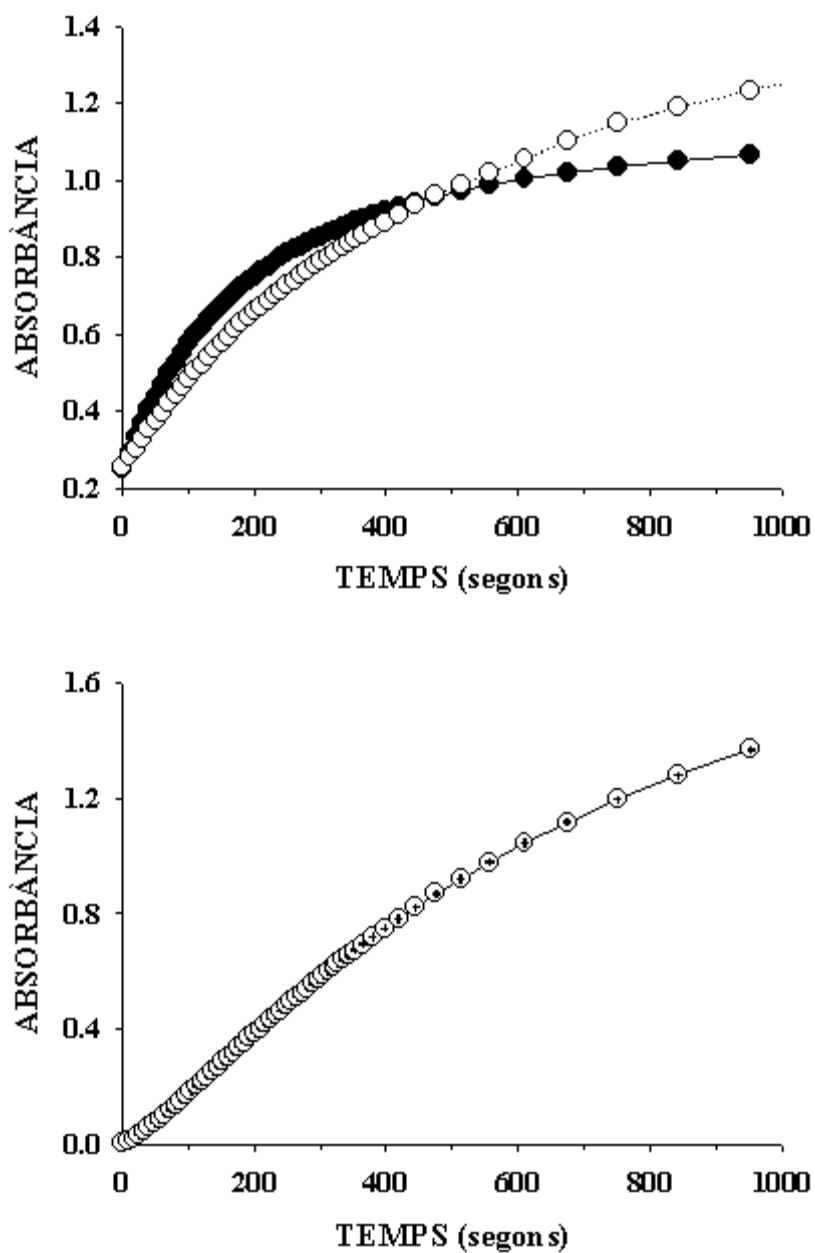


Figura 4.9. Perfils cinètics dels derivats del formaldehid (●) =310 nm, glioxal (○) =404 nm i glutaraldehid (○) 306 nm, pH = 5.

Un cop vist tot això, s'escull un pH de treball de 5, considerant que és el més favorable per la quantificació dels tres analits, ja que malgrat hi hagi la banda del reactiu superposada amb la dels productes d'interès aquesta no agafa valors massa alts. En aquestes condicions s'asseixeix una bona

velocitat de reacció pels tres aldehids, i alhora la diferència en les velocitats de reacció entre el formaldehid i el glutaraldehid també és màxima. A la figura 4.9 es mostren els perfils cinètics dels tres derivats (concentració de 5×10^{-5} M) als màxims d'absorbància, on s'aprecia la diferència existent entre el senyal del formaldehid i del glutaraldehid, i la presència d'un temps d'inducció pel derivat del glixal, conseqüència de la seva cinètics més complicada.

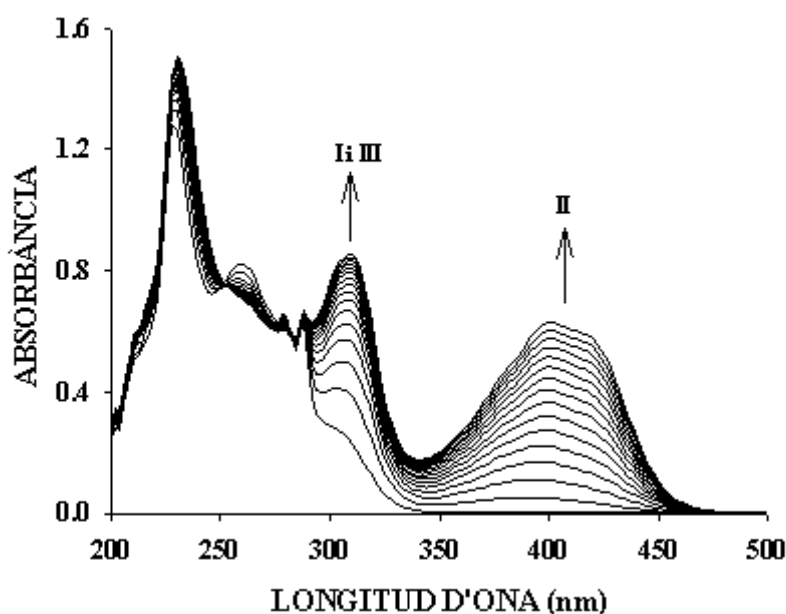


Figura 4.10. Evolució de l'espectre dels productes de reacció d'una mescla dels tres aldehids. Es mostren els espectres registrats cada minut.

IV.4.2.3. ANÀLISI DE MESCLES TERNÀRIES D'ALDEHIDS

Un cop escollides les condicions experimentals més idònies per a dur a terme l'anàlisi, es passa a la quantificació del formaldehid, glixal i glutaraldehid en mescles. A la figura 4.10 es pot veure la gran quantitat d'informació que es genera en cada registre cinètic, un total de 13741 valors d'absorbància. La mescla que es troba representada a la figura conté els tres aldehids a diferents concentracions ($3,0 \times 10^{-5}$ M en formaldehid, $3,5 \times 10^{-5}$ M en glixal i $5,1 \times 10^{-6}$ M en glutaraldehid). La banda centrada sobre 300 nm inclou majoritàriament la contribució de les aldazines del formaldehid i glutaraldehid, i la banda centrada sobre 400 nm només la contribució de l'aldazine

del glioxal. En ambdues regions de l'espectre l'absorbància creix de forma desigual, a mesura que els diferents productes de reacció es van formant. A les figures 4.11 A-B es mostren els perfils cinètics a 310 i 404 nm d'aquesta mateixa mescla, així com els perfils de cada un dels aldehids purs a la mateixa concentració. Mescles que contenen concentracions diferents dels tres aldehids, presenten una evolució diferent en les dues regions espectrals i els espectres globals són resultat d'aquesta nova combinació. Per altra banda, es pot veure com la contribució del glutaraldehid a l'absorbància total és força petita si es compara amb la resta, i això és conseqüència de la seva baixa concentració en les mostres que es volen analitzar. Aquí es demostra la gran importància d'escollir les condicions experimentals més idònies en cada problema plantejat. En aquest sistema tan important és el fet que hi hagi grans diferències cinètiques com espectrals entre els components analitzar, com que la contribució de cada un d'ells sigui prou gran per ser mesurable. En un sistema com aquest, també ajuda el fet d'agafar un temps més llarg de registre, per afavorir que la reacció del compost minoritari tingui lloc en major extensió i així fer la magnitud de la seva contribució al senyal més gran.

A les figures 4.11 A-B, també es pot apreciar com l'absorbància de la mescla no es correspon a la suma de les absorbàncies individuals. Això és perquè al treballar en condicions de segon ordre, la velocitat de reacció de cada un dels analits és funció de la seva concentració i alhora de la concentració de les altres espècies presents les quals reaccionen també amb el reactiu. Aquesta dependència queda clarament plasmada a la figura 4.12, on es representen els perfils cinètics a 404 nm per un conjunt de mescles que contenen la mateixa concentració de glioxal $3,5 \times 10^{-5}$ M i glutaraldehid $2,1 \times 10^{-6}$ M, però concentracions diferents de formaldehid ($0,50-3,0 \times 10^{-5}$ M). S'observa com la velocitat de formació de l'aldazide derivada del glioxal, la qual absorbeix en solitaria aquesta longitud d'ona, és cada cop més petita a mesura que la concentració de formaldehid augmenta (Fet que també s'observa clarament a figura 4.11 B).

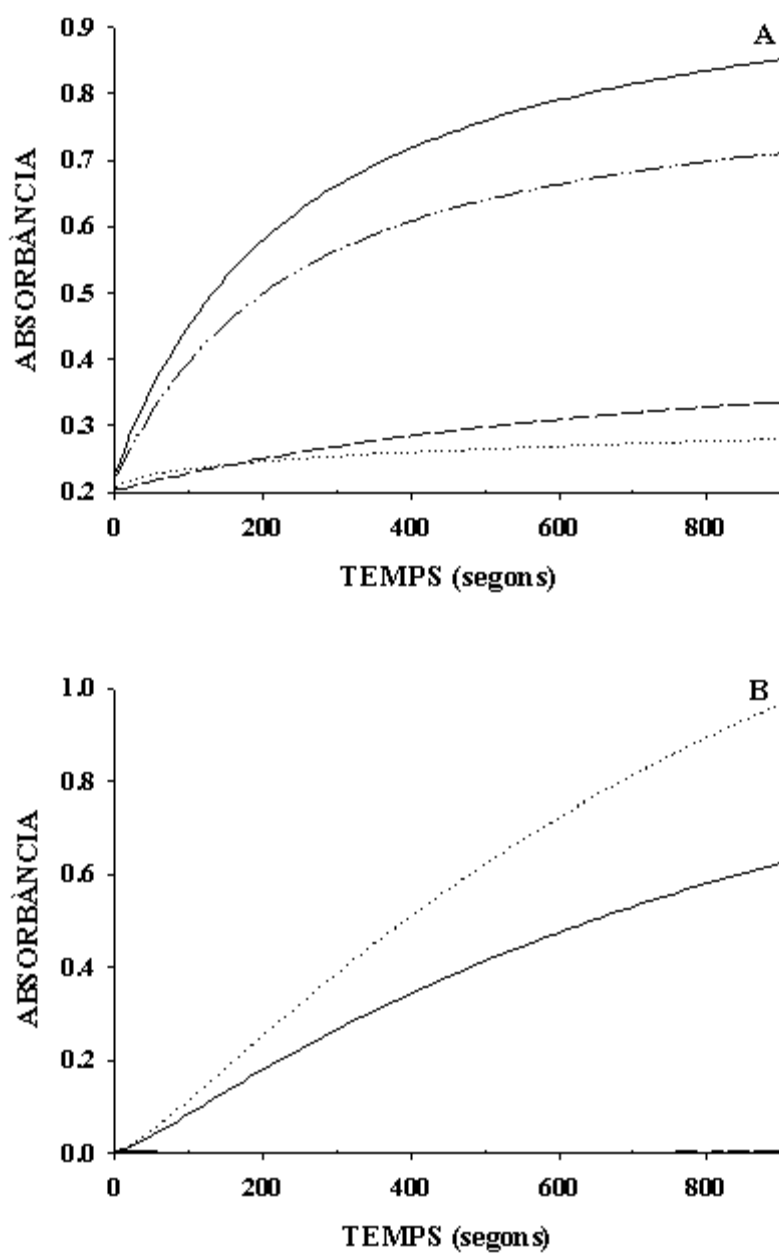


Figura 4.11 A-B. Perfils cinètics a 310 nm (A) i 404 nm (B) dels aldehids purs; formaldehyd (- -), glioxal (...), glutaraldehyd(---), i els de la mescla(—) que els conté a les mateixes concentracions.

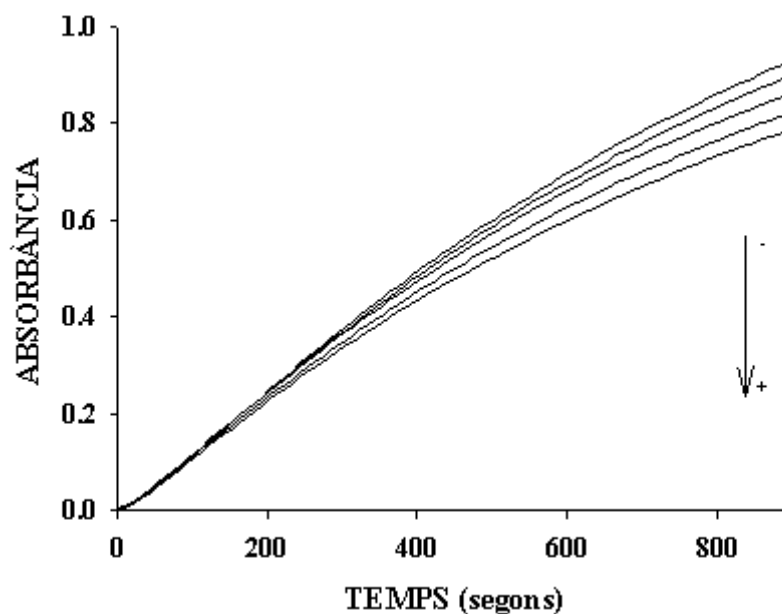


Figura 4.12. Perfils cinètics a 404 nm en mostres que presenten concentració creixent de formaldehid $(0,5-3) \times 10^{-5}$ M, sentit fletxa.

IV.4.2.3.1. Construcció de models PLS1

Inicialment es va escollir la regressió parcial per mínims quadrats, ja que malgrat és un mètode de regressió dissenyat per resoldre sistemes lineals, ha estat utilitzat anteriorment en alguns sistemes cinètics que es desvien d'un comportament lineal, donant especialment bons resultats en reaccions que segueixen mecanismes de segon ordre.

Abans de construir els diferents models PLS1, es redueix la quantitat de variables contingudes en la matriu de dades cinètico-espectrofotomètrica. L'objectiu és evitar un excés de variables molt correlacionades i eliminar part d'aquelles que no contenen informació rellevant del sistema químic a resoldre, ja que d'aquesta manera es pot disminuir el temps de càlcul i alhora millorar la qualitat dels resultats. La selecció es fa de forma empírica assajant varis intervals espectrals, escollits en funció dels espectres dels productes de reacció. Es troba que els millors resultats s'obtenen agafant la regió espectral completa, ja que tota ella aporta informació relacionada amb les concentracions de les altres espècies. Així s'agafa de tota la regió espectral

registrada, però només els valors d'absorbància de 294-350 nm cada 2 nm, i de 350-470 nm cada de 10 nm ja que en aquesta última zona només hi ha la banda ampla deguda al glioxal. Els valors per sota de 294 nm s'eliminen ja que agafaven valors massa alts i alhora compliquen els models calculats. A part, també s'assagen models escalats pel glutaraldehyd, però els resultats són molt pitjors.

També s'assagen diferents model PLS per veure si és possible disminuir el número d'espectres en els registres, ja sigui espaiant-los en el temps o bé agafant un interval més curt. Es troba que tant el formaldehyd com el glioxal es quantifiquen molt bé inclús agafant temps curts de registre, mentre que pel glutaraldehyd els millors resultats s'obtenen amb tots els 15 minuts de registre. Això és lògic, ja que essent el component minoritari i de velocitat global de reacció més lenta, la seva contribució a la absorbància de la mescla té lloc preferentment a temps finals, quan quasi tot el formaldehyd i glioxal ja han reaccionat.

El número de factors significatius trobats ens els models PLS1 és de 11 pel formaldehyd i glutaraldehyd, i de 8 pel glioxal. Aquest valor tant elevat de factors, el qual és molt superior al número d'anàlits, s'atribueix al fet que el PLS modela les no-linealitats degudes al mecanisme de reacció, augmentant el número de factors. A la taula 4.1 es mostra el RSEP%, la reproduïbilitat límit (R) i la ARSD% obtinguts al quantificar els diferents conjunts de mostres preparades al laboratori.

S'observa que el formaldehyd i el glioxal es quantifiquen amb molt bona exactitud i precisió (RSEP i ARSD 1,5%), mentre que pel glutaraldehyd la qualitat dels resultats és inferior (RSEP i ARSD 4%) encara que es pot considerar suficientment bona tenint en compte la seva baixa concentració. La similitud entre els valors RSEP% i ARSD% indica la absència d'errors sistemàtics en l'ajust del model de calibració i que les diferències trobades en la determinació dels analíts es deuen a la reproduïbilitat del procés cinètic de mesura, i per tant, el soroll de les dades cinètiques, o constants de velocitat, afecta molt més al glutaraldehyd com a conseqüència de la seva baixa contribució al senyal.

Però aquests valors només proporcionen una visió global dels resultats, i es per això que a les figures 4.13 A-C es mostren els resultats de forma gràfica, on es representa la concentració de cada component trobada mitjançant PLS1 front a la concentració real que hi ha en les mescles de predicció. A la taula 4.2 es troben els paràmetres de regressió d'aquestes rectes per tots els

conjunts de mostres. Es pot veure que totes les mostres es prediuen bé, i que en el glutaraldehid hi ha una major dispersió ens els resultats.

Taula 4.1. RSEP%, R i ARSD% calculats amb els models PLS1 que utilitzen les dades d'absorbància 294-470 nm registrades durant els 15 primers minuts de reacció, pel formaldehid, glioxal i glutaraldehid en els tres conjunts de mostres. Numero de PCs utilitzats en el model: a = 11, b= 8.

	Formaldehid ^a			Glioxal ^b			Glutaraldehid ^a		
	RSEP5	R(M)	ARSD%	RSEP%	R(M)	ARSD%	RSEP%	R(M)	ARSD%
Calibració	0,90	$5,1 \times 10^{-7}M$	1,04	1,21	$7,3 \times 10^{-7}M$	1,37	2,95	$2,7 \times 10^{-7}M$	2,35
Test set	1,75	$6,6 \times 10^{-7}M$	1,82	1,32	$5,3 \times 10^{-7}M$	1,00	2,85	$3,7 \times 10^{-7}M$	3,07
Predicció ext.	0,92	$5,9 \times 10^{-7}M$	0,86	1,53	$9,5 \times 10^{-7}M$	1,65	3,88	$4,4 \times 10^{-7}M$	3,85

Taula 4.2. Paràmetres de la recta concentració PLS vers concentració real de formaldehid, glioxal i glutaraldehid, per les mostres de calibració, test set i predicció externa. Interval de confiança del 95%. Número de mostres: a = 100 i b = 32.

	Formaldehid			Glioxal			Glutaraldehid		
	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació, r	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació, r	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació, r
Calibració ^a	$(0,5 \pm 7) \times 10^{-8}$	$1,000 \pm 0,003$	0,9998	$(0,7 \pm 1) \times 10^{-7}$	$1,000 \pm 0,004$	0,9998	$(2 \pm 7) \times 10^{-8}$	$0,994 \pm 0,015$	0,997
Test set ^b	$(0,5 \pm 2) \times 10^{-7}$	$0,995 \pm 0,013$	0,9993	$(-2 \pm 3) \times 10^{-7}$	$1,011 \pm 0,014$	0,9994	$(-0,3 \pm 2) \times 10^{-7}$	$1,00 \pm 0,04$	0,995
Predicció ^b	$(0,2 \pm 3) \times 10^{-7}$	$1,004 \pm 0,013$	0,9994	$(-0,8 \pm 3) \times 10^{-7}$	$1,002 \pm 0,015$	0,9991	$(0,8 \pm 2) \times 10^{-7}$	$0,97 \pm 0,04$	0,992

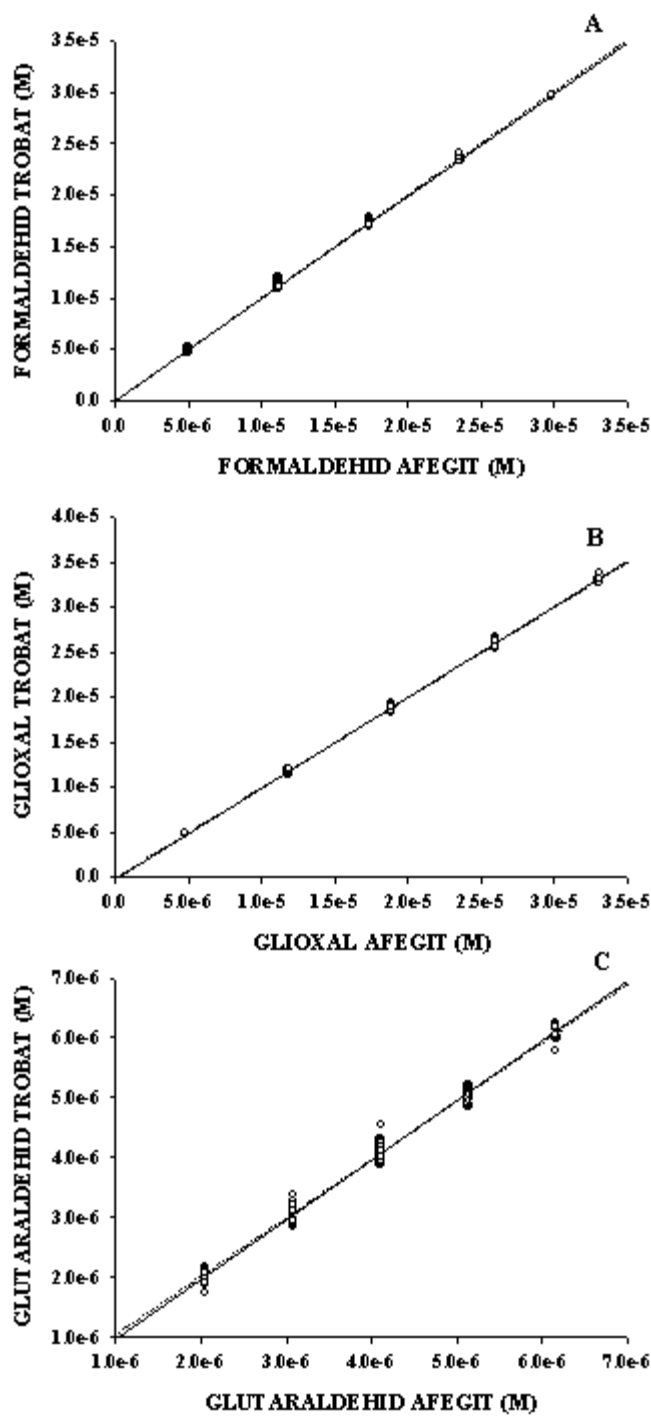


Figura 4.13 A-C. Concentració trobada pel fo rmaldehid (A), glioxal(B) i glutaraldehid (C), vers la concentració afegida en les mostres de test set (●) i predicció externa (○).