



Universidad
Zaragoza

Detección de aminas biógenas en la salubridad de
alimentos, mediante métodos de tratamiento de
imágenes digitales.

Detection of Biogenic Amines in safety of foods by
digital image processing methods.

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

TRABAJO FIN DE GRADO

ALEJANDRO ESTEBAN PARICIO

DIRECTOR: ÁNGEL LOPEZ MOLINERO

FACULTAD DE CIENCIAS

Convocatoria de Junio de 2018

ABSTRACT

Chromogenic Imaging methods for Hydrogen Peroxide and Putrescine determination have been developed through digital camera with measurements of RGB reflected colours produced on test strips with 3, 3', 5, 5'-TetraMethylBenzidine.

Reaction factors such as: reagent sequence addition, surfactant composition have been studied. Instrumental factors were also considered: type of digital camera, imagen format, number of pixels, illumination colour of the digital scene.

Firstly, the HP colorimetric determination by test strips with HRP peroxidase and TMB substrate was studied and optimized. Three different types of calibration procedures may be applied. Between them, artificial neural network, RNA, was included. Predictions may be derived from single colour measurements but also with all RGB values. Differences in prediction errors and analytical performance could be evidenced

The colour variance and the factor analysis of the chromogenic process demonstrated that the R component with white illumination justified 67% of chromatic variance. The influence of the illumination evidenced that the r colour favoured the reflected R colour that increased and justified up to 93% of the chromatic variance.

Previous test strips studies for HP detection have been adapted to Putrescine as Biogenic Amine. DiAmineOxidase enzyme have been proved to be an efficient catalyse for diamine decomposition with HP production. Analytical performance also in different lighting conditions were established. Interferences such as cadaverine have been studied and characterized.

That method has been applied to biogenic amines control in commercial cold meat. Statistical comparison with reference solution showed that there were not systematic errors on the determination.

Key words: Digital Image Colorimetry, RGB colours, Hydrogen Peroxide, Biogenic Amine Putrescine Determination.

RESUMEN

Se han desarrollado métodos de colorimetría digital para la determinación de peróxido de hidrógeno y putrescina a través de cámara digital, con medidas del color RGB reflejado en tiras reactivas, con 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina.

Se estudiaron factores de reacción tales como: adición de la secuencia de reactivos y composición de surfactante. También se consideraron factores instrumentales: tipo de formato de imagen, número de píxeles, cámara digital y color de la iluminación de la escena digital.

En primer lugar, se estudió y optimizó la determinación de HP en tiras reactivas comerciales con peroxidasa HRP y sustrato TMB. Se aplicaron tres procedimientos diferentes de calibración, entre lo que se incluyó redes neuronales artificiales, RNA. Las predicciones se llevaron a cabo no solo a partir de un único color sino también según valores de RGB. Se evidenciaron diferencias en las prestaciones analíticas, además de errores de predicción.

La variación de color y el análisis de factores del proceso cromático demostraron que la componente R con iluminación blanca justificó el 67% de la variación cromática. La influencia de la iluminación evidenció que el la iluminación r favoreció el color R reflejado, que aumentó y justificó el 93% de la variación cromática.

Se adaptaron estudios previos de detección de HP a putrescina como amina biógena sobre tiras reactivas. La enzima DiAminoOxidasa demostró ser un catalizador eficiente para la descomposición de la diamina con producción de HP. También se evaluó el rendimiento analítico en diferentes condiciones de iluminación. Se estudió y caracterizó interferencias tales como la cadaverine.

Ese método se ha aplicado al control de aminas biógenas en embutidos. La comparación estadística con patrones de referencia demostró que no hubo errores sistemáticos en la determinación.

Palabras clave: Colorimetría de Imagen Digital, RGB, HP, Aminas Biógenas, putrescina.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
<u>1.-INTRODUCCIÓN:</u>	1
1.1. Colorimetría de imágenes digitales	1
1.2 Aminas Biógenas-AB-.....	2
<u>2.- OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO</u>	4
CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL	5
<u>1.-INSTRUMENTACION</u>	5
1.1. Cámaras digitales	5
1.2. Materiales de laboratorio.....	5
<u>2.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS</u>	6
2.1.- Preparación de disoluciones:	6
2.2-Procedimientos experimentales	7
2.3.-La Muestra	9
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
<u>1.- SISTEMA CROMOGÉNICO: Detección de HP sobre tiras reactivas.</u>	9
1.1.- Características cromogénicas digitales	9
1.2.- Condiciones del proceso: volumen de inyección, presencia y secuencia de adición de TS..	10
1.3.- Influencia de factores instrumentales	11
1.4.-Caracterización analítica de la determinación de HP.	13
<u>2. CARACTERIZACIÓN QUIMIOMÉTRICA: Varianza Cromática y Análisis Factorial</u>	18
<u>3.- SISTEMA CROMOGÉNICO: Detección de Aminas Biógenas sobre tiras reactivas.</u>	18
3.1.- Adaptación del método a Aminas Biógenas.	18
3.2.- Caracterización analítica de la determinación de putrescina	19
3.3.- Estudio de interferencias: cadaverina sobre la amina putrescina	21
<u>4.- APLICACIÓN DEL MÉTODO: Determinación de Aminas Biógenas.</u>	23
4.1.-Determinación de putrescina en embutidos	23
4.2.-Resultados.....	23
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA	24

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.-INTRODUCCIÓN:

1.1. Colorimetría de imágenes digitales

Nuevos métodos analíticos basados en imágenes digitales, en particular con Colorimetría de Imágenes Digitales, DIC¹, han sido desarrollados mediante: cámaras digitales, “smart-phones”, “i-pad-tablets”, “web-cam” o incluso “escáneres”. Los métodos usan detectores de radiación del tipo CMOS² (Complementary Metal Oxide Semiconductor), o CCD³ (Charge Coupled Device), que proporcionan medidas rápidas de colores básicos, rojo, verde y azul, RGB.

En estos sistemas los componentes necesarios para aplicaciones de análisis químico (CVAC) son: un dispositivo analítico capaz de modificar sus características de color en contacto con la muestra, un dispositivo de imagen (cámara digital, escáner, webcam, smartphone u otros) conectado a un ordenador/microcontrolador, un sistema de iluminación y un software de control y procesado de imágenes. Hoy en día el uso de dispositivos portátiles es un aliciente en la facilidad de la medida y la rápida transmisión de resultados.

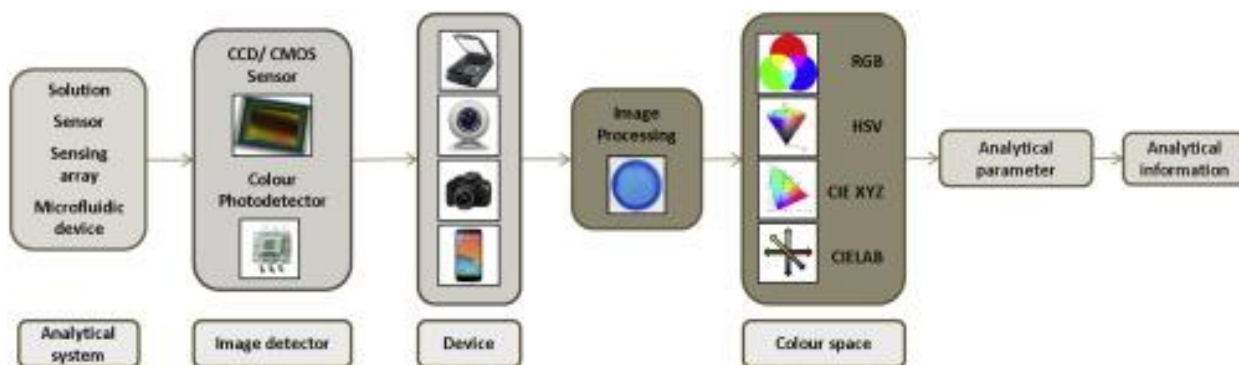


Figura 1: Esquema básico del sistema analítico¹

En el procedimiento de medida con cámara digital, la luz que alcanza un pixel del detector ha sido reflejada por los objetos coloreados que son previamente iluminados. El detector está compuesto de una plantilla de filtros (RGB), de modo que filtra y mide estos componentes. Finalmente, el microprocesador escala y ajusta los colores para compensar las variaciones en las condiciones de captura, tales como las debidas al nivel de exposición-brillo y la cromaticidad del iluminante (balance del blanco). Las medidas son valores individuales de intensidades de color RGB, escalados según la sensibilidad del detector-sensor. Así, sensores que leen mediante 8 bits dan lugar a respuestas escaladas en el rango: 2^8 , 0-255 unidades relativas de color. Mayores escalas, y sensibilidades se consiguen con sensores de 24 bits que dan lugar a medidas con: 2^{24} , 0-16 777 215 unidades relativas de color.

En la colorimetría tricromática⁶ RGB, los colores pueden ser definidos y codificados como suma aditiva de los tres filtros: RGB. Así, en un sensor con lectura de 8 bits, el color negro viene definido por la codificación: (0, 0, 0); mientras que el color blanco es definido por: (255, 255, 255).

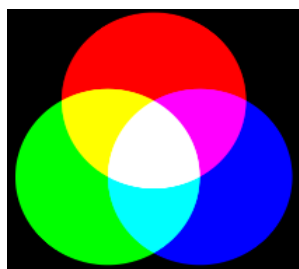


Figura 2: Imagen de una composición aditiva de colores básicos¹⁴

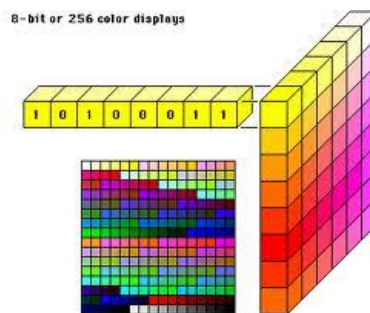


Figura 1: Codificación de un canal de color mediante un sensor de 8 bits¹⁴

La metodología analítica DIC cuantitativa estudia las relaciones entre las intensidades de los colores básicos con las concentraciones analíticas en condiciones de comparabilidad o reproducibilidad que dan lugar a resultados fiables.

Se han publicado métodos para la detección y medida rápida de diferentes analitos en muy diversos campos. Así se citan algunos ejemplos como: iones y metabolitos en fluidos biológicos, antisépticos-povidona yodada-, Fe (III) y Cloro en agua, Ni en meteoritos, o colorantes en alimentos⁷. Se ha aplicado en monitorización continua y automática de reactivos en tiempo real, control de procesos industriales de electrodeposición, en pruebas de campo semi-cuantitativas de compuestos opiáceos prohibidos o anfetaminas. También se ha aplicado en métodos de emisión atómica, DIB-FES, lo que ha permitido determinar principios activos de productos farmacéuticos de modo indirecto, a través de la emisión de metales alcalinos y alcalinotérreos⁸.

1.2.- Empleo de la colorimetría RGB en investigaciones precedentes

Nuestro grupo trabaja la caracterización DIC mediante el uso de técnicas quimiométricas avanzadas. Además ha puesto a punto diferentes metodologías analíticas para determinaciones de: Ti (IV) como aditivo en plásticos⁹, demanda química de oxígeno en aguas¹⁰, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en desinfectantes y productos químicos¹¹, dureza en aguas¹², Ca(II) en productos farmacéuticos¹³ y sulfitos en vinos¹⁴, entre otros.

1.2 Aminas Biógenas-AB-

- Clasificación de aminas biógenas

Las aminas biógenas¹⁵ son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y con actividad biológica, formadas por descarboxilación de aminoácidos o aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. Son sintetizadas a partir del metabolismo de animales, vegetales y especies microbianas.

Pueden ser clasificadas atendiendo a su estructura química y número de grupos aminos. Así se diferencian: aminas alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aminas aromáticas (tiramina, feniletilamina) o aminas heterocíclicas (histamina, triptamina). Por otra parte se distinguen: monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina y cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina y agmatina)¹⁶.

En organismos animales están implicadas en funciones tan diversas como la división celular, transmisión nerviosa y sistema vascular. Por ello, el organismo debe disponer de herramientas para eliminarlas en caso de acumulación, tras haber llevado a cabo una función específica. Esta función tiene lugar mediante la enzima mono-amino oxidasa (MAO).

Ciertas aminos biógenas están también implicadas en la formación de nitrosaminas, consideradas como carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas.

El contenido en aminos biógenas en alimentos frescos es prácticamente despreciable. A modo de ejemplo, en sardinas frescas, la histamina, cadaverina y putrescina se encuentran en concentraciones menores a 5 mg/100 g, 15 mg/100 g y 1 mg/100 g, respectivamente. Pero una vez que el alimento entra en fase de descomposición, la carga bacteriana propia y la incorporada en el procesado pueden elevar su concentración. La **Figura 4** muestra la ruta de síntesis de distintas aminos biógenas, formadas a través de la degradación de aminoácidos en proteínas:

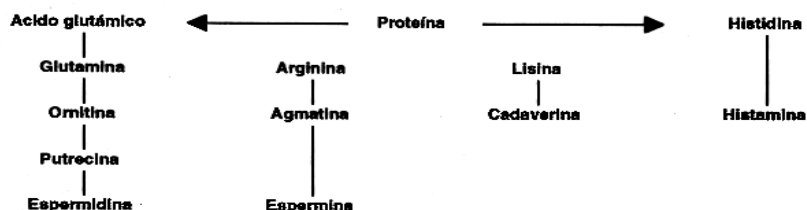


Figura 2: Formación de AB a partir de la degradación de aminoácidos¹⁷.

Al tratarse de sustancias termoestables, son útiles indicadores de calidad baja de productos almacenados. El aumento de aminos biógenas coincide con la aparición de mal olor, como en el pescado. También se correlaciona con el contenido de bases volátiles totales, trietilaminas, hipoxitaminas y pH¹⁸.

- Métodos de determinación.

La cromatografía es la técnica más utilizada para la detección de aminos biógenas. En un primer momento se empleaba la cromatografía en capa fina. Tras ella se desarrollaron métodos de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) o Ultra Alta Eficacia (UHPLC).

También se han desarrollado ensayos enzimáticos y biosensores con enzimas amino oxidasas que oxidan la amina biógena con O₂ generando un aldehído y H₂O₂. Un método típico¹⁹ se expone en la **Figura 5**: se da una primera etapa de descomposición de la amina en la que además se genera H₂O₂. Y seguida de una segunda en la que este último oxida un colorante para su detección. Nuestro TFG se centra en “detección de diaminas”, por lo que en la primera etapa se utiliza la enzima Di Amino Oxidasa, DAO que cataliza la descomposición de la amina a aldehído. Esta es más selectiva para putrescina y cadaverina que la enzima Mono Amino Oxidasa. En la siguiente etapa, el H₂O₂ formado oxida al reactivo 3,3', 5,5' TETRAMETIL BENCIDINA, “TMB”, en una reacción catalizada por la enzima peroxidasa (HRP).

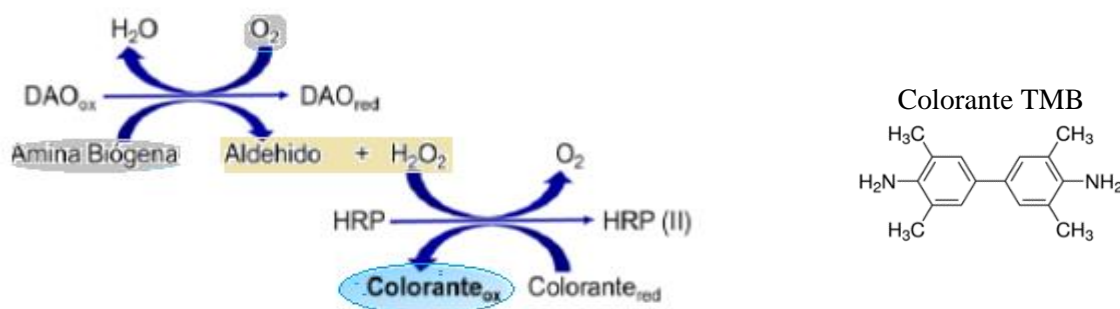
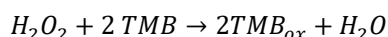


Figura 3: Esquema de reacción de las aminos biógenas con DAO y HRP en presencia de colorante TMB²⁰.

El resultado es la aparición de una coloración azul en una tira en la que está depositado-impregnada del cromógeno de acuerdo a la siguiente reacción:



También es común la determinación de AB mediante la detección de los organismos productores. Para ello se emplean técnicas moleculares independientes de cultivo, como la PCR, que permite la detección específica de los microorganismos productores de forma sencilla, rápida y cualitativa. En este contexto destaca la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), utilizada con éxito para la detección y cuantificación de microorganismos productores de AB en alimentos fermentados²⁰.

- Relación entre salubridad alimentaria y aminas biógenas.

Las aminas se forman como productos de los procesos metabólicos celulares normales de los seres vivos, por ello su presencia en alimentos como frutas, verduras, carnes y pescados es de carácter endógeno, apareciendo a bajas concentraciones. Sin embargo, como resultado de las actividades enzimáticas de algunos microorganismos, se producen AB exógenas, que aumentan las concentraciones iniciales y pueden tener efectos negativos.

En carne y pescado, su formación se relaciona con el deterioro de origen microbiano y por tanto con la frescura del alimento. Habitualmente se utiliza el *Índice de Bai*¹⁸, diseñado especialmente para productos marinos. La elección de este índice se basó en la observación de que a medida que avanza la descomposición, se incrementan los niveles de histamina, putrescina y cadaverina, mientras disminuye la concentración de espermidinas (pueden llegar a 0 en pescado descompuesto):

$$BAI = \frac{Putrescina + Cadaverina + Histamina}{1 + Espermina + Espermidina} \text{ (valores expresados en ppm)}$$

En alimentos fermentados, la formación de AB se asocia con la presencia de microorganismos productores como integrantes de la microbiota natural del producto, de un cultivo iniciador, o de la microbiota secundaria. Es importante señalar que los sistemas DAO y MAO, que oxidan las mono y di aminas generadas de forma natural en las células, juegan un papel importante en la eliminación de las AB de origen exógeno, constituyendo un importante sistema detoxificador.

Una ingesta excesiva de AB o un mal funcionamiento de los enzimas detoxificadores pueden producir la acumulación de estas sustancias. Esta alteración puede deberse a problemas genéticos o a la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos de carácter antidepresivo, como los inhibidores de las mono aminas oxidasas²¹.

2.- OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

- ✓ Implementar la DETERMINACION de HP y seguidamente de la AB denominada PUTRESCINA mediante un método digital con cámara fotográfica.
- ✓ OPTIMIZAR la influencia de las condiciones experimentales y llevar a cabo el estudio de las prestaciones analíticas de la determinación de HP y de PUTRESCINA sobre tiras reactivas.
- ✓ Estudiar la interferencia de la diamina CADAVERINA sobre la determinación de la Putrescina.
- ✓ Comparar el método de calibración de regresión lineal por mínimos cuadrados, con métodos alternativos y robustos de calibración.
- ✓ Aplicar el método a alimentos reales y evaluar sus prestaciones.

CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL




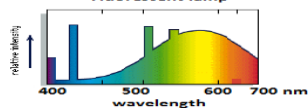
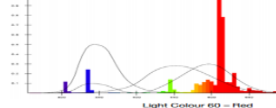
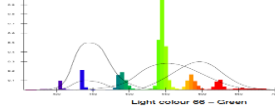
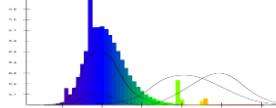

1.-INSTRUMENTACION

1.1. Cámaras digitales

Cámara digital CANON: Compacta: Power Shot SX230 HS	
<i>Resolución</i>	12,1 megapíxeles(12.1×10^6 píxeles)
<ul style="list-style-type: none"> ○ Sensor `CMOS`: 1 /2.3 pulgadas = 6.17x4.55 mm ○ Área pixel= $(6.17 \times 4.55) \times 10^6 / 12.1 \times 10^6 = 2.32 \mu\text{m}^2$ ○ Procesador: DIGIC 4 iSAPs 	
Cámara réflex NIKON: D100	
<i>Resolución</i>	6 megapíxeles
<ul style="list-style-type: none"> ○ Conversor analógico digital de 12 bits. ○ ISO 200-1600. Velocidad 30-1/4000 sec. ○ Lente con focal equivalente a 36-105 mm. ○ Tarjeta Compact Flash de 256 MB. ○ Formatos: JPEG, TIF y RAW. 	
Cámara réflex CANON EOS 200D	
<i>Resolución</i>	24.2 megapíxeles
<ul style="list-style-type: none"> ○ ISO 12800-25600 (ampliable hasta 51200) ○ Sensor “CMOS” de 22.3 x 14.9 mm ○ Conexión Inalámbrica: WiFi, NFC & Bluetooth ○ Procesador de imagen: DIGIC 7 ○ Formatos: JPEG, RAW, DPOF. 	
‘Smart-Phone’ iPhone 5c	

1.2. Materiales de laboratorio

1. Micropipetas Pipet-Lite ‘RAININ’ 5-50 μl , 20-200 μl , 100 μl – 1 ml y 0,5-5 ml.
2. Matraces aforados de 10, 25, 50, 100 y 250ml.
3. Placa de pocillos ELISA
4. Vaso de precipitados de 50 mL y 100 ML
5. Vidrio de reloj
6. Placa calefactora y de agitación BIBBY
7. Balanza analítica y embudos de plásticos
8. Papel de filtro
9. Centrifugadora CENCOM II
10. Filtros de jeringa estériles NY 0.45 μm
11. Jeringa estéril Ecoject, 2 ML

“Lighting-Box”:			
			
Pocillos y soportes de reacción			
Pocillos ELISA			
ILUMINANTES: Lámparas LED			
LED Colours EGLO RGB E27 : REGULABLE A 16 COLORES	Características LED: 6 WATT, 470 LUMEN		
Fluorescent Warm White 	F- Red emission 	F- Green emission 	F- Blue emission 
Espectro de la zona visible, con el reconocimiento de las bandas-canales de color.			
			

2.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

2.1.- Preparación de disoluciones:

Todos los reactivos fueron de grado analítico. El agua desionizada fue obtenida de un sistema convencional de purificación de agua destilada.

- Disolución patrón de HP: 100 mg/l: Se prepara a partir de Hydrogen peroxide, Scharlau, solution 30% w/w (110 vol), H_2O_2 , Núm. CAS [7722-84-1], Peso molecular 34.01 g/mol. Se toman 0.08 mL y se diluyen con agua desionizada a volumen de 250 ml en matraz aforado.
- Disolución patrón putrescina: 1000 mg/l: Se disuelven 0.1 g de putrescina en agua desionizada y se diluye a 100ml, en disolución de tampón fosfato pH 7, Producto Sigma: Putrescine dihydrochloride >98% (TLC). $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$ Núm. CAS [333-93-7], Peso molecular 161.07 g/mol.
- Disolución patrón de cadaverina: 1000 mg/l: Se disuelven 0.1 g de producto en agua desionizada y se diluye a 100ml, en disolución de tampón fosfato pH 7, Sigma: Cadaverine dihydrochloride. $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$ Núm. CAS [1476-39-7], Peso molecular 175.10 g/mol.

- Disolución tampón fosfato: pH 7. Disol 0.1 g/mol: 0.1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disueltos y diluidos a 100 ml. Se adiciona cantidades crecientes de disol de HCl 0.1 M hasta que el electrodo de pH marca un valor constante de pH=7
Producto Panreac. Peso molecular, 137.99 g/mol. Núm. CAS. [7558-79-4]
- Tensioactivo neutro Tritón X 100, 8% p/v 80 mg/l: Se vierten 0.8 g del tensioactivo en 10 ml de agua desionizada.: Polyethylene glycoltert-octylphenyl ether, Núm. CAS [9002-93-1]. Disoluciones diluidas de 4, 2, 6% se preparan por dilución de la anterior o por pesada de modo similar.
- Disolución de ácido tricloroacético, 6% (p/v). Peso molecular, 163.39 g/mol. Núm. CAS [76-03-9], Scharlau.
- Disolución enzima DAO²²: Se filtra la disolución de enzima comercial y se determina su actividad enzimática. Actividad enzimática: 81.09 U/mL.

- **Tiras Quantofix**: peróxido 25. Tiras reactivas semi-cuantitativas para la determinación de H_2O_2 , HP. Macherey-Nagel²³

Tienen ‘almohadilla’ reactiva preparada con enzima peroxidasa que cataliza la descomposición de HP para oxidar el indicador TMB a su forma oxidada de color azul, con producción de O_2 .

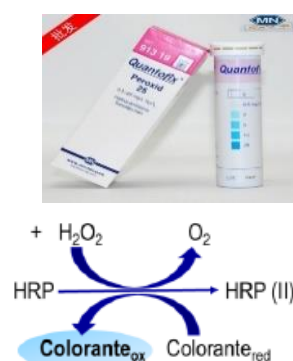


Figura 6: Tiras reactivas comerciales y reacción cromogénica

- Disoluciones diluidas de todos los reactivos se preparan a conveniencia a partir de las anteriores de referencia y por dilución de modo previo al uso.

2.2-Procedimientos experimentales

2.2.1-Experiencia tipo determinación de HP: rango dinámico

El procedimiento experimental se describe en la **Tabla 1**. En placa de pocillos ELISA se adicionan los volúmenes de los reactivos indicados. Se añaden con micropipeta.

	Dis. HP, μl	Dis. Tampon fosfato, pH 7, μl	Dis. Tritón X100 (0,6 %), μl	Vol H_2O , μl	Vol. total, μl	HP, mg/l
Blanco	0	500	500	1000	2000	0,00
1	20	500	500	980	2000	1,07
2	100	500	500	900	2000	5,33
3	190	500	500	810	2000	10,12
4	270	500	500	730	2000	14,39
5	350	500	500	650	2000	18,65
6	410	500	500	590	2000	21,84
7	470	500	500	530	2000	25,04

Tabla 1: Experiencia de rango dinámico para la determinación de HP

2.2.2-Experiencia tipo determinación de AB: rango dinámico

El procedimiento experimental se prepara de modo similar al anterior. Así, sobre placa de pocillos ELISA se añaden las disoluciones patrón que se indican, siempre con micropipetas.

	Dis. putrescina, μl	Dis. Tampon fosfato, pH 7, μl	Vol. total, μl	[Putrescina], mg/l
Blanco	0	1000	1000	0
1	50	950	1000	5
2	80	920	1000	8
3	200	800	1000	20
4	300	700	1000	30
5	400	600	1000	40
6	500	500	1000	50
7	550	450	1000	55
8	650	350	1000	65
9	800	200	1000	80
10	900	100	1000	90

Tabla 2: Experiencia de rango dinámico para la determinación de AB

Por otra parte, sobre tiras reactivas de HP, se añaden 5 μL de disolución de enzima DAO. Después de 5 minutos, se añaden las disoluciones preparadas anteriormente con micropipeta.

2.2.2.- Captura de imágenes

Dentro de la 'lighting-box' se sitúan las tiras comerciales. Se utilizan fondos blancos, iluminación artificial e indirecta para evitar luz reflejada, de diferentes colores. La cámara se utiliza en "modo automático" y sin flash. Antes de tomar las imágenes, se pre-enfoca con referencia en el fondo blanco, para sistematizar los "balances de colores automáticos".

2.2.3.-Lectura de colores

Las imágenes en formato ".jpg" se transfieren al ordenador mediante Microsoft Photo Editor. En cada imagen se miden las intensidades RGB mediante un programa desarrollado por Matlab. La lectura final se obtiene como media de 150 píxeles en 'regiones de interés: ROI', a lo largo de cada "almohadilla". El tratamiento matemático de los datos se realiza posteriormente mediante Matlab y /o Microsoft Excel. En la **Tabla 3** se ofrecen las características más significativas del proceso.

Volcado de imágenes	MicroSoft Windows 8, con Microsoft Photo Editor
Medida colores	'programa': lectura color', en MatLab 2011b
Archivos: Matriz de datos RGB:	Patrones: "almohadilla", 150 puntos' x 3 intensidad(RGB). Muestras: "almohadilla", 150 puntos' x 3 intensidad(RGB).
Tratamiento de datos	Mediante Excel 2010
'ROI'	'líneas de lectura' :

Tabla 3: Procedimiento para la medida y tratamiento de datos en la imagen digital.

2.3.-La Muestra

2.3.1. Características de la muestra

- **Muestra de ensayo:** El análisis de alimentos se realiza sobre una muestra de embutido sometido a un periodo de putrefacción, con objeto de detectar aminas biógenas.
El embutido utilizado fue de la marca “*JAMONES Y EMBUTIDOS RUBIELOS, TERUEL. DUROC.*”
- **Muestra real²⁴:** Se corta en embutido en pequeños trozos. Se pesan 5 g en vaso de precipitados. Se añaden 20 mL de disolución de TCA y se tritura. Luego se homogeneiza durante 3 min en baño de ultrasonidos. A continuación, el homogeneizado se centrifuga a 10.000 rpm y T^a ambiente durante 10 min. El sobrenadante obtenido se filtra, con placa de 40 µm. Y se afora con agua destilada en matraz de 25 mL. De esta disolución se inyectan 650 µl a pocillos ELISA donde se diluye a 1 ml vol. final.
El reglamento (CE) 2073/2005 establece valores límite de 100 mg/Kg en pescado para la histidina-histamina. Así mismo publicaciones especializadas sobre las muestras dan supuestos valores de 60 mg de putrescina /Kg de embutido²⁴. Y que hemos considerado como referencias del posible contenido máximo del embutido.
- **Muestra sintética:** Se preparan dos muestras de putrescina libre de efecto matriz. A partir de una disolución patrón de 98.91 mg/l, se tomaron alícuotas de 200 y 350 µL. Luego se diluyen a los pocillos de 1 mL. Lo que da lugar a muestras de 20 y 35 mg/l a analizar.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- SISTEMA CROMOGÉNICO: Detección de HP sobre tiras reactivas.

1.1.- Características cromogénicas digitales

Se prepara un experimento sobre placa ELISA según la **Tabla 4**. Se adicionan 5 µl de las disoluciones así preparadas a tiras comerciales. Los valores reales y la figura del experimento se ofrecen a continuación.

	HP, mg/l
Blanco	0,00
1	1,07
2	5,33
3	10,12
4	14,39
5	18,65
6	21,84
7	25,04

Tabla 4: Rango Dinámico HP

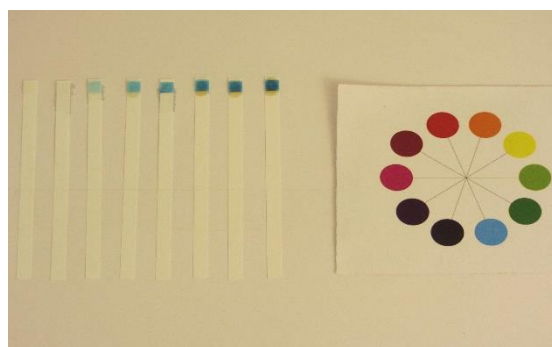


Figura 7: Captura imagen rango dinámico HP

La lectura de los colores reflejados BRG en la imagen digital permite observar la tendencia cromática con la concentración de HP. El experimento se llevó a cabo en diferentes iluminaciones: ‘w’, ‘r’, ‘b’ y ‘g’.

Los resultados presentados en la **Figura 8** corresponden a la iluminación 'w' con la intensidad de los colores primarios reflejados BRG.

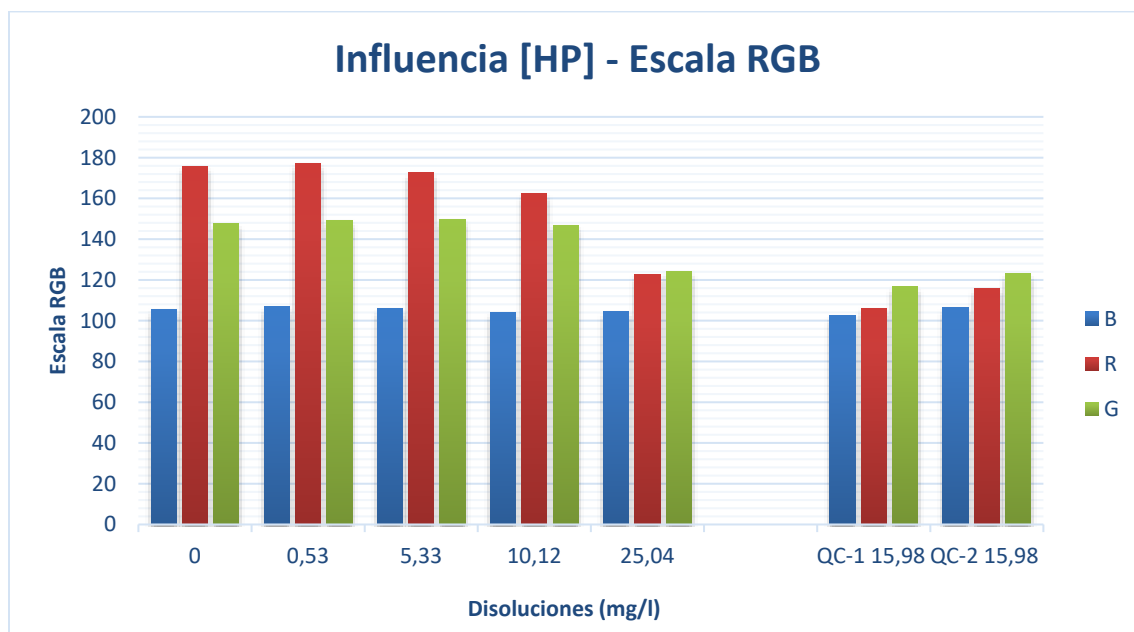


Figura 8: Evolución de los colores BRG con la concentración de HP

Se observa una clara tendencia descendente en el caso de la variable R, menos acusada para el caso G y apenas variación para la variable B.

1.2.- Condiciones del proceso: volumen de inyección, presencia y secuencia de adición de TS.

Se estudia la influencia del volumen de inyección y de tensioactivo como efecto de formación de micelas y ordenamiento de la reacción, sobre el desarrollo de la cromaticidad. Para ello se eligió Triton X100 como tensioactivo no iónico, ampliamente utilizado.

Se prepara un diseño de experimentos 3^k , de tres niveles y $k=2$ factores. Es decir: 3^2 , con una matriz de 9 experimentos. Para su estudio se añadió en todo momento disolución 8 mg/L de HP. El diseño de experimentos se observa en el **Anexo 1**

Los resultados se muestran en la **Figura 9**:

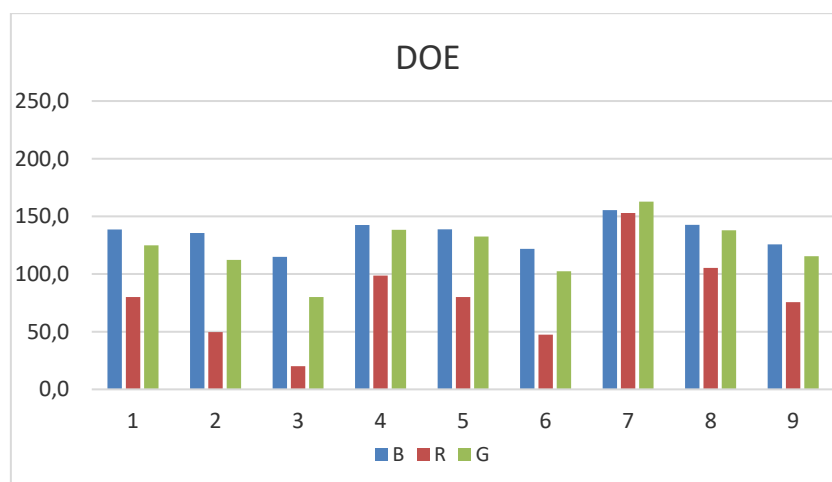


Figura 9: Valores obtenidos de BRG en términos de variables

Los resultados ponen de manifiesto que el volumen de inyección y el porcentaje de tensioactivo producen mayor coloración para el caso 7, es decir, para un volumen de inyección de 5 μL y la máxima concentración de tensioactivo, es decir, 2%, para la determinación de HP.

La visualización de los resultados mediante superficie 3D, para cada componente BRG, muestra claramente como la detección se favorece a mayores % de TS y menores volúmenes de inyección.

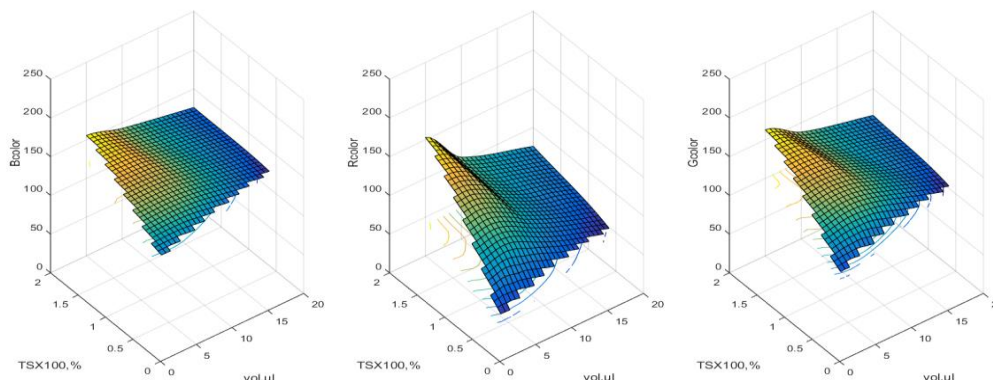


Figura 10: Condiciones experimentales para las variables B, R y G

Por otra parte se ha visto la incidencia del modo de adición de tensioactivo. Así se compara la pre-adición de TS a la tira y seguidamente su secado (15-20 min) y luego la adición del analito, orden 1, respecto a la adición del TS junto a la disolución de medida, orden 2.

En este caso se prepararon tres disoluciones para cada orden de adición. Las concentraciones elegidas fueron: 0-blanco-, 10.07 y 20.25 mg/l de HP.

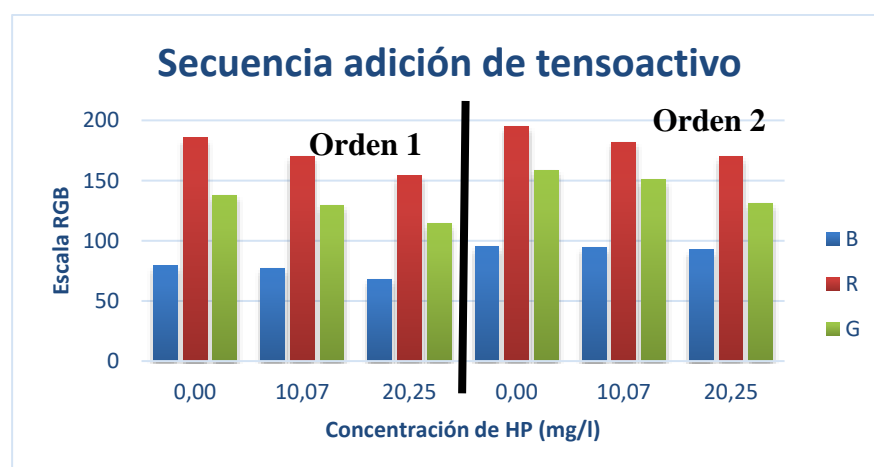


Figura 11: Comparación del orden de adición de TS

El orden de adición 2 genera una mayor cromaticidad.

Es decir, la pre-adición de TS a la tira no favorece el desarrollo del color.

Orden 1: Se pre-adicionan 10 μL de disolución de TS a la tira y se dejan secar. Posteriormente se añade el analito.

Orden 2: Se añade la disolución de TS directamente sobre la disolución de interés. Y juntos se adicionan a la tira.

1.3.- Influencia de factores instrumentales

1.3.1. Cámaras y formato de la imagen

Para un estudio de rango dinámico de determinación de HP similar al de la **Tabla 4**, en condiciones de referencia, se ha estudiado la influencia del tipo de cámara y el formato de la imagen sobre la varianza cromática. Los dispositivos son: cámara compacta, cámara réflex y móvil. El número de píxeles en la lectura de las zonas ROI es de 150. Las cámaras estudiadas aparecen en la **Tabla 5**:

Cámara compacta CANON- JPG	Cámara réflex NIKON-JPG	Cámara réflex CANON-JPG	Móvil, iPhone 5c- JPG
Varianza total→5582.43	Varianza total→760.62	Varianza total→2105.95	Varianza total→237.08

Tabla 5: Tipos de cámara, varianza cromática para un experimento de rango dinámico de HP, según la tabla 4.

La máxima cromaticidad sobre las tres componentes RGB se consigue con la cámara compacta, seguida de las cámaras Réflex y por último el móvil.

La evaluación de la varianza cromática en la cámara Réflex NIKON se ha evaluado con formato JPG y también con RAW. Se evidencia una relación de varianzas: JPG/RAW = 2,6. Es decir el formato JPG esta favorecido.

1.3.2. Número de píxeles

Se ha estudiado cómo influye el número de píxeles seleccionados en la región de interés (ROI) sobre la lectura de la medida cromática, en términos de varianza cromática. Los resultados obtenidos son los siguientes:

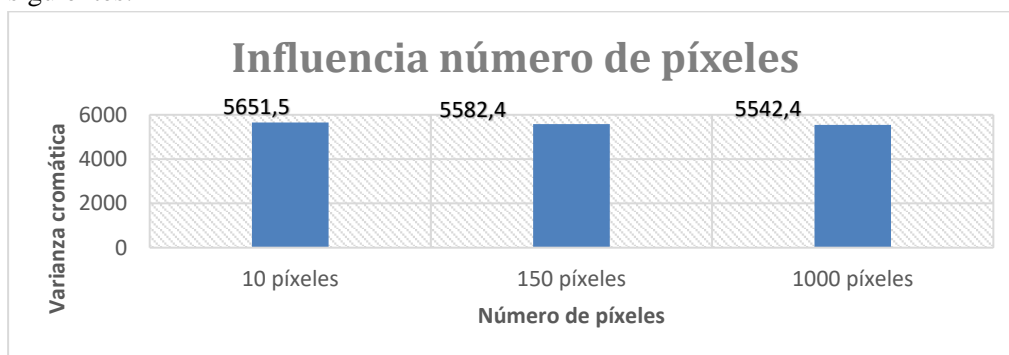


Figura 12: Comparación de la varianza cromática según el número de píxeles en la medida del color digital

No se observa un cambio significativo en términos absolutos de varianza. No obstante, todos los estudios posteriores se realizan con n=150.

1.3.3. Iluminación

En base al amplio abanico de posibilidades, se ha profundizado en el estudio de la iluminación. Se ha estudiado la influencia del color de iluminación en los valores de las intensidades de los colores RGB y en la varianza cromática. En esta experiencia, se preparó un experimento de rango dinámico similar al de la **Tabla 4** y se iluminó con cuatro colores diferentes, w, r g b.

Se capturan las imágenes en las condiciones de sistema cerrado, modo automático y sin flash, con la cámara compacta Canon.

Los resultados del **Anexo 2** muestran las imágenes, los perfiles de cromaticidad y la influencia de los colores reflejados, RGB, según el color de iluminación.

Además en la **Figura 13** siguiente se muestran los valores de varianza cromática según la iluminación.

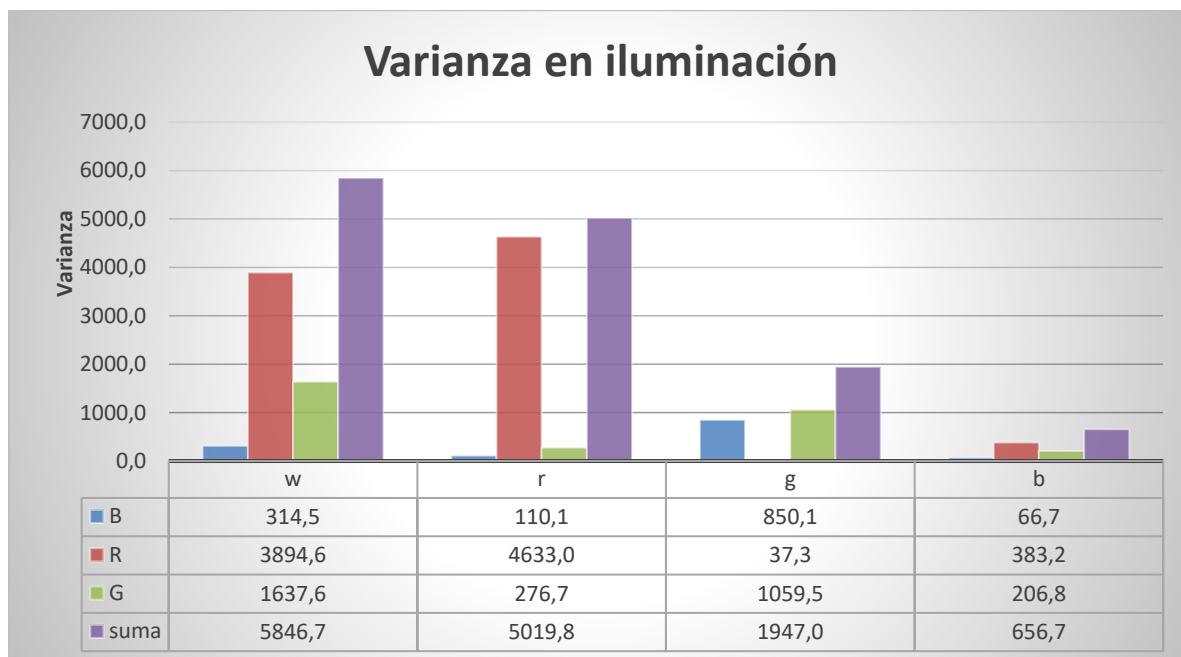


Figura 13: Varianza cromática en términos absolutos según el iluminante y distribución según los colores básicos reflejados

Los resultados más significativos muestran:

- El color R es el que más contribuye con iluminación w y justifica el 66.62% de la varianza cromática.
- Con iluminación roja la varianza del color reflejado R aumenta al 92.3%. Es decir, la iluminación favorece el color reflejado, a pesar de que disminuye la varianza total.
- Sin embargo, con iluminación verde y azul, no solamente se disminuye la varianza total, sino que también se reduce drásticamente la influencia del color R.

1.4.-Caracterización analítica de la determinación de HP.

La determinación semi-cuantitativa a través de las tiras reactivas de HP permite realizar la caracterización analítica bien a través de la referencia comercial o bien a través de patrones de referencia propios.

1.4.1. Uso de referencia comercial

Se elige como calibración la región de interés (ROI) de las zonas coloreadas marcadas en el envase.

Operamos en las siguientes condiciones: 150 píxeles, formato JPG, iluminación blanca/roja y cámara compacta Canon.

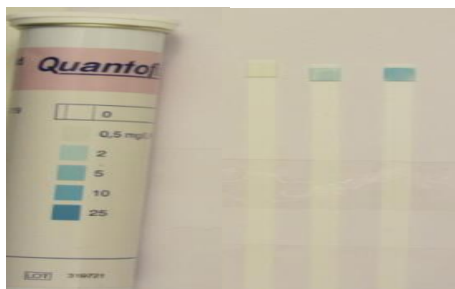


Figura 14: Referencias cromáticas del envase comercial y tiras con muestras problemas



Figura 15: Envase comercial de tiras reactivas de HP

• **Prestaciones del método**

Se lleva a cabo una determinación de la concentración de HP en muestras problema, mediante la interpolación visual, naked eye, de los colores problemas sobre la escala semi-cuantitativa proporcionada por el fabricante.

El resultado de la medida de las muestras de la **Figura 14**, de contenidos bajo-medio-alto mg/l HP, se da en la **Tabla 6**:

n	$[HP]_{teor}, mg/l$	$[HP]_{pred}, mg/l$	$([HP]_{pred} - [HP]_{teor})$	$([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2$
1	0,80	0,50	-0,30	0,09
2	7,99	6,00	-1,99	3,96
3	20,5	24,97	4,47	19,99
			$\sum ([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2$	24,04
			$\sum \frac{([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2}{n}$	8,01
			$\sqrt{\sum \frac{([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2}{n}}$	2,83 mg/L

Tabla 6: Predicción visual de la concentración de HP y estimación de su RMSE

El resultado muestra un error de predicción medio RMSE de 2,83 mg/l. Este valor supone un error del 28% sobre el valor medio, 9.8 mg/l, de los problemas analizados.

Por otra parte, se caracterizó el rango dinámico del sistema cromático a partir de las referencias del envase comercial, mediante un ajuste polinómico para cada componente:

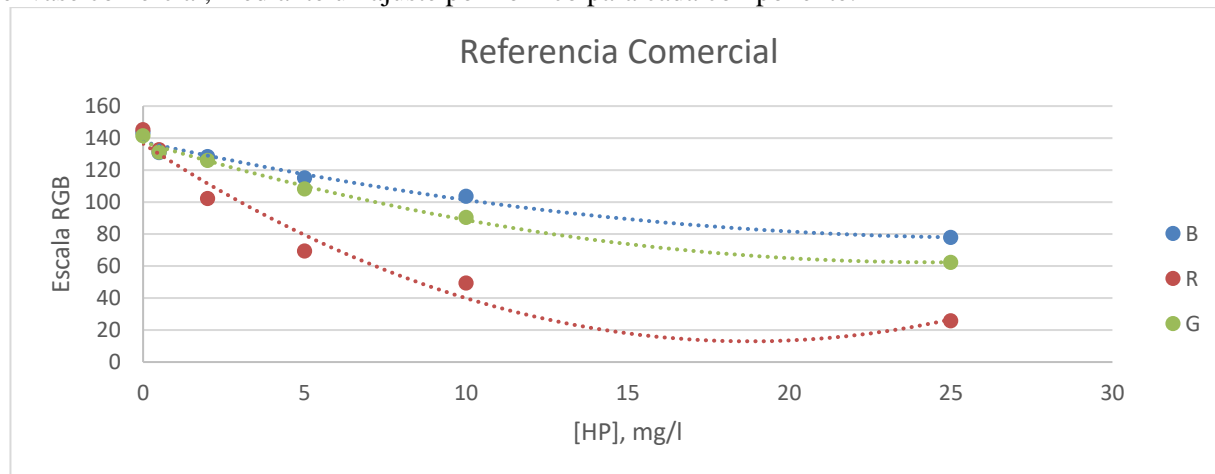


Gráfico 1: Ajuste polinómico para B, R y G

Componente colorimétrica	Rango [HP], mg/l	Ajuste polinómico	Grado del ajuste pol.	R^2
R	0.3-25.0	$y=0.35x^2-13.17x+136.5$	2	0.9675
G	0.7-25.0	$y=0.12x^2-6.12x+137.51$	2	0.9926
B	2.8-25.0	$y=0.08x^2-4.47x+137.63$	2	0.9762

Tabla 7: Ajuste polinómico del rango dinámico con los colores del envase comercial

Y se procedió a la predicción del contenido de HP de las mismas muestras problema que en el caso anterior pero ahora para cada color individual básico BRG.

En la **Tabla 8** se muestra el resultado para la componente R:

n	$[HP]_{teor}, mg/l$	$[HP]_{pred}, mg/l$		$RMSE$
1	0,80	0,66	$\sqrt{\sum \frac{([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2}{n}}$	0,51 mg/L
2	7,99	8,74		
3	20,5	20,41		

Tabla 8: Predicción del RMSE para patrones comerciales, mediante la componente R

El valor de error medio RMSE, representa el 5.2% de error sobre el valor medio 9,8 mg/l de los problemas. Para la componente G, el valor de RMSE fue 0.81 mg/L, y para la componente B, fue 1.11 mg/L.

Por otra parte se ha calculado el error de calibración, también como RMSE. En la **Tabla 9** se dan solo los valores para la componente R e iluminación w.

$[HP]_{teor}, mg/l$	$[HP]_{pred}, mg/l$	$([HP]_{pred} - [HP]_{teor})$	$([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2$
0	-0,44	-0,44	0,19
0,5	0,30	-0,20	0,04
2	2,62	0,62	0,38
5	5,08	0,08	0,01
10	9,57	-0,43	0,18
25	24,91	-0,09	0,01
		$\sum ([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2$	0,81
		$\sum \frac{([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2}{n}$	0,14
		$\sqrt{\sum \frac{([HP]_{pred} - [HP]_{teor})^2}{n}}$	0,37 mg/L

Tabla 9: Error de calibración RMSE para la componente R, medida sobre los colores del envase comercial.

Se observó un % de error sobre el centroide de 3,6%.

1.4.2. Patrones de referencia propios

Como complemento del estudio anterior, se ha preparado una experiencia con patrones de referencia propios de HP, que se adicionan sobre la almohadilla de la tira reactiva y dan lugar al desarrollo de color. Es decir, las ROI serán las almohadillas de las tiras sobre las que se medirán los componentes de color.

Las condiciones experimentales más significativas son: lectura 150 píxeles, formato JPG, iluminación blanca/roja.

- **Prestaciones del método**

En el **Gráfico 2** se presenta el rango lineal del sistema cromático, con ambas iluminaciones w y r.

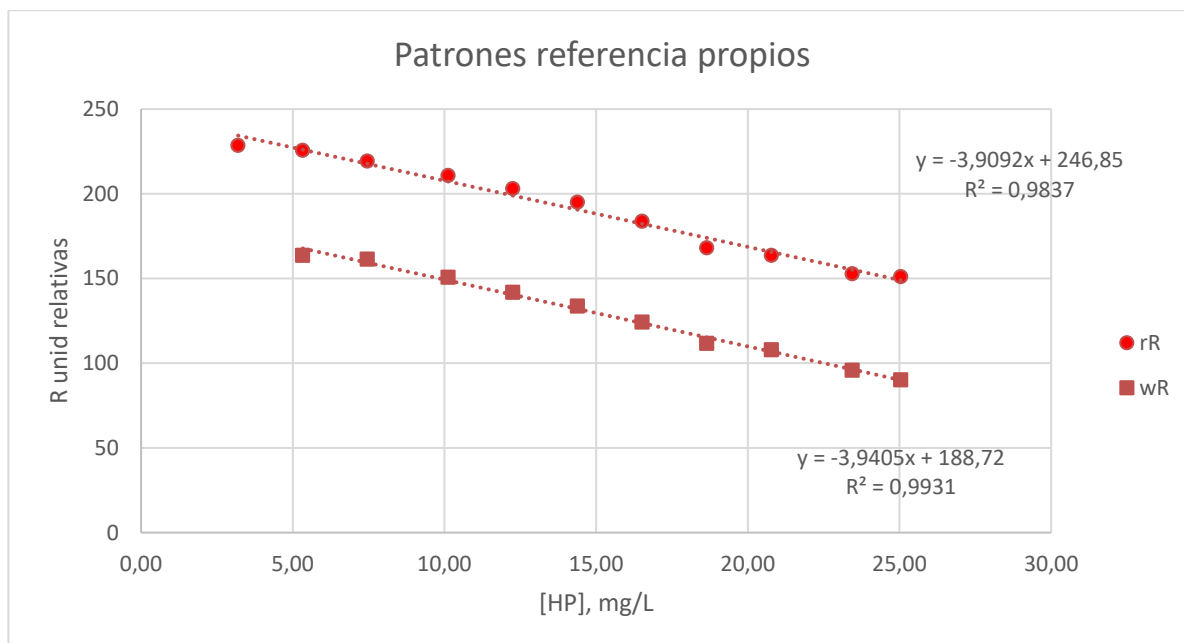


Gráfico 2: Rangos lineales para rR y wR

	Y color = f(X, conc)	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)	wR
	b	O.O.	
pendiente	-3.941	188.722	O. Origen
desvest	0.116	1.934	desvest
r ²	0.993	2.328	error típico
F	1151.115	8.000	gdl (n-2)
ss reg	6236.758	43.344	ss res, PRESS
r	0.997		
LQ, mg/l	5.330		
LML, mg/l	25.042		
LQ, mg/l	5.330		
LD, mg/l	1.599		

	Y color = f(X, conc)	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)	rR
	b	O.O.	
pendiente	-3.909	246.851	O. Origen
desvest	0.168	2.669	desvest
r ²	0.984	3.889	error típico
F	542.693	9.000	gdl (n-2)
ss reg	8206.107	136.090	ss res, PRESS
r	0.992		
LQ, mg/l	3.200		
LML, mg/l	25.042		
LQ, mg/l	3.200		
LD, mg/l	0.96		

Y conc = f(X1, color)	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X1;0=0;0=0)	wR
inversa y estimar el RMSE sobre concentración		
	b	O.O.
pendiente	-0.252	47.668
desvest	0.007	0.969
r ²	0.993	0.589
F	1151.115	8.000
ss reg	398.884	2.772
r		0.527
min	5.330	
max	25.042	
medio rango	15.186	

Y conc = f(X1, color)	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X1;0=0;0=0)	rR
inversa y estimar el RMSE sobre concentración		
	b	O.O.
pendiente	-0.252	62.349
desvest	0.011	2.084
r ²	0.984	0.987
F	542.693	9.000
ss reg	528.230	8.760
r		0.892
min	3.200	
max	25.042	
centroide	15.000	

Figura 15: Prestaciones analíticas y RMSE de calibración para las variables wR y rR

Las prestaciones de las regresiones en las mejores condiciones muestran valores similares. Si bien, la calibración con color rR muestra un rango lineal más extenso lo cual es muy significativo, desde LQ 3.2, hasta el LML de 25.04. Y un valor más bajo de LD de 0.96 mg/l.

Es de destacar los errores de calibración, estimados como RMSE y que referenciados frente a los valores medios de los rangos, dan valores de 3.5% y 5.9%.

Por otra parte y para comparar frente a predicciones anteriores se ha calculado el valor del error de validación de las regresiones, mediante el método: Cross Validation, Leave One Out, RMSE, CV-LOO.

El valor RMSE CV LOO con color wR es de 0.56 mg/l, y cómo % error sobre valor medio de 3.6%. En el caso de calibración con color rR, el valor RMSE CV-LOO es 0.95 mg/l y el % error sobre el medio del rango 6.6 %.

La comparación de resultados con el color wR muestra valores de error muy similares cuando son obtenidos por las referencias comerciales o por los patrones propios. En cuanto a los valores rR tienen la ventaja de ofrecer un LD más bajo y un rango dinámico superior. Experiencias posteriores deben de acabar de validar las tendencias mostradas en estos estudios.

1.4.3. Redes Neuronales

Las redes neuronales artificiales (RNA) son un método de calibración basado en modelos matemáticos y algoritmos con sistemas de aprendizaje y procesamiento de información que tratan de emular al cerebro humano.

- **Optimización de la calibración**

Se ha aplicado un programa desarrollado por nosotros y en Matlab para los procedimientos de calibración.

El programa permite optimizar el número de capas, neuronas y la función de aprendizaje- *logsig*, *purelin*, *tansig* y *radbas*- para obtener el mínimo error de calibración y predicción. Requiere un entrenamiento con patrones de valores conocidos de respuesta: concentración de analito y variables predictorias independientes: colores BRG. Se han aplicado los valores de la **Figura 15**.

Los mejores resultados se han obtenido en la siguiente configuración:

Numero de capas de neuronas: 1 capa oculta.

Numero de neuronas: 4

Función de aprendizaje: *purelin-radbas*.

Patrones de aprendizaje: según colores monocromáticos: R, pero también tricromáticos: BRG.

Los resultados en la calibración se ofrecen comparados con la calibración lineal en la **Tabla 10**:

	Calibración lineal: wR	RNA: BRG
RMSE (mg/l)	0,53	0,81
RMSE-CVLOO (mg/l)	0,54	1,06
LD (mg/l)	1,9	0,36
LQ (mg/l)	5,3	4,43
R^2	0,993	-
rango lineal (mg/l)	5,3 - 25,0	4,43-25,0
sensibilidad ($u \cdot l/mg$)	-3,94	-

Tabla 10: Comparación Regresión Lineal-RNA

Se incluyen solo los valores RMSE de calibración y de RMSE –CVLOO para coloración R con iluminación w.

Los resultados de la **Tabla 10** muestran diferencias entre calibraciones. Así el RMSE y RMSE-CVLOO son superiores en RNA. Sin embargo los valores de LD y LQ mejoran en la RNA al no estar influidos por la pendiente. Con lo que se amplía el rango de aplicación lineal.

Entendemos que la calibración con todos los colores BRG debe de proporcionar más robustez a las respuestas, de modo que podrían dar resultados menos expuestos a interferencias. Son estimaciones que están abiertas y deben de ser más investigadas.

2. CARACTERIZACIÓN QUIMIOMÉTRICA: Varianza Cromática y Análisis Factorial

2.1.- Varianza cromática y Análisis Factorial

La varianza cromática representa el espacio de color de un experimento de cromaticidad digital. Se calcula a partir de la matriz de varianza-covarianza de los colores obtenidos en un experimento de rango dinámico sobre las tiras reactivas. Es un parámetro novedoso que permite caracterizar la magnitud cromática.

Además de lo anterior, se ha realizado el análisis factorial mediante Análisis de Componentes Principales. Esto reduce las variables iniciales, o colores BRG, a nuevos componentes. De modo que permite reconocer las tendencias latentes-intrínsecas del sistema cromático y también la significación de las variables.

Los resultados de estos estudios se ofrecen en el **Anexo 3**.

Los resultados obtenidos demuestran que:

- La matriz de covarianza-varianza, señala al color R como el de mayor varianza cromática del sistema, y por tanto, presenta una gran potencialidad en su sensibilidad analítica. El color R representa el 66.61% de la varianza, mientras que el G el 28.01% y el B un 5.38%.
- El análisis factorial identifica los colores de modo que las tendencias son distintas
- La varianza del sistema se proyecta hasta el 99,97% en solo dos componentes principales, siendo el más significativo el PC1 con un 92.53%.
- El PC1 está correlacionado con los tres colores BRG, mientras que el PC2 está muy correlacionado R y B.

3.- SISTEMA CROMOGENICO: Detección de Aminas Biógenas sobre tiras reactivas.

3.1.- Adaptación del método a Aminas Biógenas.

Se estudia la aplicación del método desarrollado anteriormente a la respuesta de aminas biógenas-AB. En este procedimiento se adiciona la enzima DAO, sobre el soporte de tiras reactivas comerciales, para catalizar la degradación de la AB a aldehído con producción de HP. Este último HP es detectado por la oxidación que produce en el sustrato colorante en presencia de la enzima HRP peroxidasa. Es decir, el procedimiento puede responder a la presencia de AB por la oxidación del colorante sustrato. Este incrementa su color azul con la concentración de AB, según el esquema descrito en la **Figura 5**:

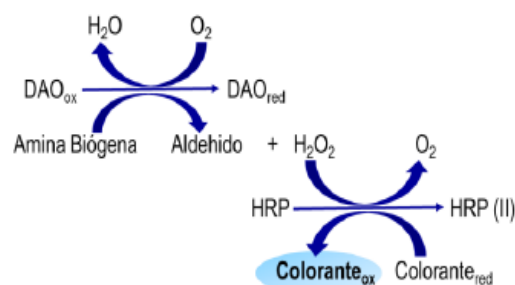


Figura 5-b: Esquema de reacción para las AB

El procedimiento se optimiza inicialmente. Para ello, se fijan concentraciones de referencia de la enzima DAO, según se describe en el procedimiento experimental. Y se estudia la influencia del orden de adición a la tira reactiva de la enzima DAO, la disolución de amina y la presencia de tensioactivo para el desarrollo del color de reacción.

El estudio se llevó a cabo mediante un diseño de experimentos, DOE, tipo: 2^k . Es decir dos niveles y 3 factores, $k=3$ factores. Esto es un total de $2^3=8$ experimentos. El “DOE” se puede observar en la **Tabla 11**, **Tabla 12** y **Tabla 13**.

Orden A
(Tira + DAO) + Muestra
Orden B
(Tira + Muestra) + DAO

Diseño: 2³:

Tabla 11: Orden de adición de reactivos

Factores	Niveles	
	+1	-1
Orden	A	B
TS,%	5	10
Vol. inyección HP, µl	10	5

Tabla 12: Factores y Niveles del DOE para putrescina.

Experimento	Orden	TS	Vol. Adición
1	+1	+1	+1
2	+1	-1	+1
3	+1	+1	-1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	-1	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	-1	-1

Tabla 13: Diseño de experimentos para el estudio de condiciones de putrescina

Los resultados más significativos se muestran en la **Figura 16**. Representan valores de RGB medidos sobre las almohadillas de las tiras reactivas en condiciones de iluminación de referencia. Se observa que la máxima varianza cromática aparecía con el orden de reacción A. Y así mismo en disoluciones sin adición de TS, a diferencia de lo ocurrido en el método de adición de HP directo. Esto se justificó por la influencia del TS sobre la enzima DAO que le haría perder eficacia.

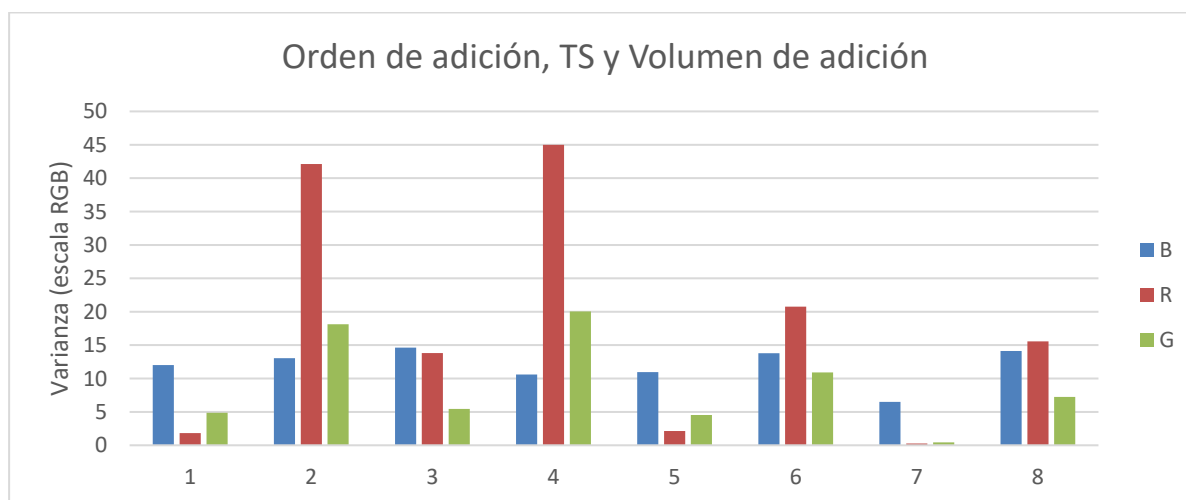


Figura 16: Influencia de condiciones experimentales sobre tiras reactivas para aminas biógenas

3.2.- Caracterización analítica de la determinación de putrescina

Se prepara una experiencia según se describe en la **Tabla 2**, de los procedimientos. Y se estudia el rango dinámico y posteriormente el rango de la putrescina con respuesta lineal, con iluminación blanca, 150 píxeles y sin adición de tensioactivo. El ajuste detallado de los rangos lineales puede observarse en la **Tabla 14**:

Tramo lineal	Rango [HP], mg/l	Recta	R ²
R	8.6-50.0	$y = -1.77x + 213.31$	0.993
G	28.3-50.0	$y = -0.56x + 196.86$	0.979
B	Escasa sensibilidad para la componente B		

Tabla 14: Estudio del tramo lineal para la putrescina

La representación de los datos se observa en el **Gráfico 3**:

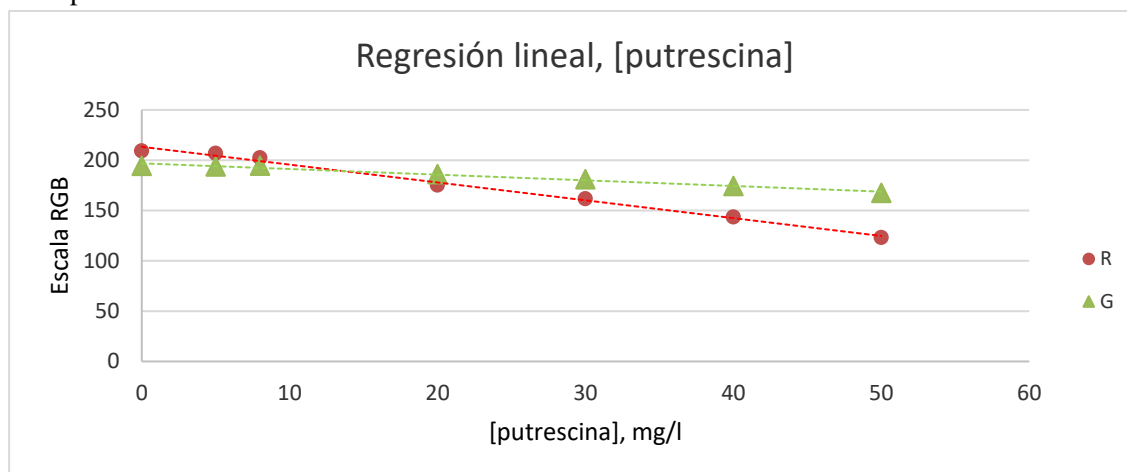


Gráfico 3: Estudio del tramo lineal para la putrescina

La máxima sensibilidad se obtiene para la componente R, seguido por la G. La componente B ofrecía escasas posibilidades analíticas.

Se presenta la estadística de la regresión lineal para la componente R.

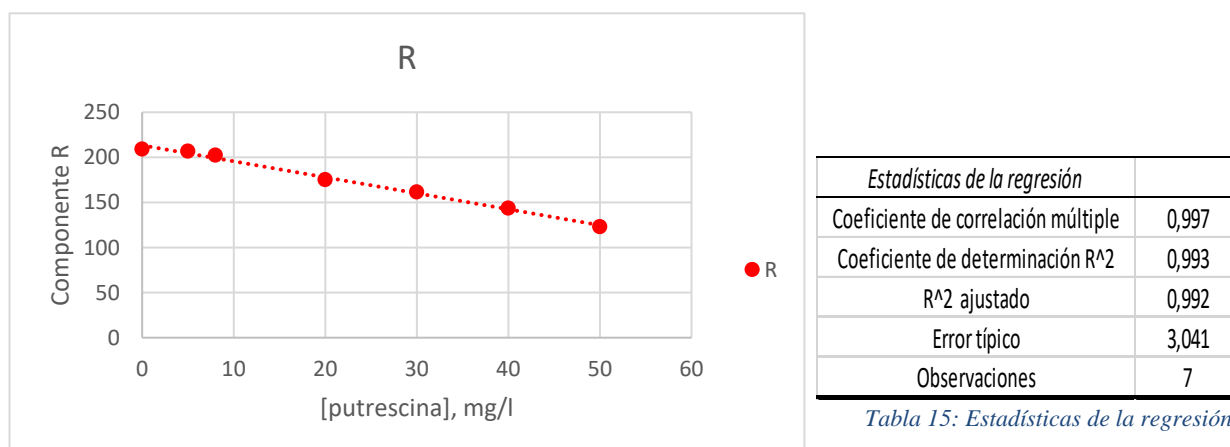


Tabla 15: Estadísticas de la regresión

Gráfico 4: Estudio de regresión lineal para la componente R

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	6736,6	6736,6	728,6	0,0000013
Residuos	5	46,2	9,2		
Total	6	6782,8			

Tabla 16: Análisis de varianza para la componente R

El análisis de los residuales presenta la siguiente información:

Análisis de los residuales			
Observación	Pronóstico R	Residuos	Residuos estándares
1	213,31	-4,14	-1,49
2	204,45	2,36	0,85
3	199,13	3,25	1,17
4	177,86	-2,60	-0,94
5	160,14	1,52	0,55
6	142,42	1,19	0,43
7	124,70	-1,58	-0,57

Tabla 17: Análisis de los residuales para la componente R

De los resultados anteriores se deduce que:

- Sensibilidad, como la pendiente de la recta: $-1.77 \text{ ur} \cdot \text{l/mg}$
- Límite Máximo de Linealidad, LML: 50.0 mg/l
- Límite de cuantificación, LQ: 8.6 mg/l , como: $\text{LD} = (10 \cdot x 0.01 \cdot x R_{\text{blanco}}) / \text{pdte recta}$
- Límite de detección, LD: 2.6 mg/l , calculado como: $\text{LD} = 3 \cdot \text{LQ} / 10$
- Intervalo lineal de la regresión: $8.6\text{-}50 \text{ mg/l}$
- Root Mean Square Error, RMSE: 1.45 mg/l

3.3.- Estudio de interferencias: cadaverina sobre la amina putrescina

La estructura de la cadaverina y putrescina se muestra en la **Figura 17**. Es evidente su similaridad así como la del procedimiento de medida con DAO y HRP. Sin embargo, es conocido que la descomposición de ambas produce aldehídos ligeramente diferentes. En este trabajo se presenta un estudio inicial para determinar las características de su comportamiento cromático mediante DIC.

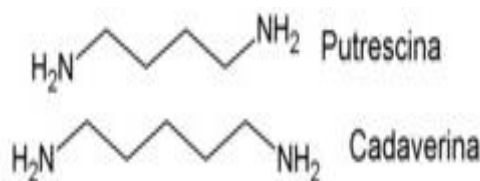


Figura 17: Estructura molecular de la putrescina y cadaverina

Para ello se aplicó un diseño experimental de desarrollo de color con disoluciones mezcla de las dos AB, que se recoge en la tabla siguiente:

[Putrescina], mg/l		[Cadaverina], mg/l	
7	Baja	0	sin
7	Baja	10	Baja
7	Baja	30	Alta
13	Media	0	sin
13	Media	10	Baja
13	Media	30	Alta
20	Alta	0	Sin
20	Alta	10	Baja
20	Alta	30	Alta

Tabla 18: Diseño para el estudio de la Influencia de cadaverina en la colorimetría de putrescina

Se miden los colores BRG en diferentes iluminaciones: w, r, g, b. Los coeficientes de regresión para la putrescina en presencia de cadaverina evidencian la influencia de la interferencia. Se recogen en la **Tabla 19**:

Iluminación	w		b		r	g
Componente	B	R	B	G	R	G
Putrescina sin Cadaverina						
Sensibilidad	-4,81	-5,62	-4,39	-4,68	-6,83	-4,85
R ²	0,972	0,842	0,981	0,996	0,872	0,968
Putrescina + Cadaverina (10 mg/l)						
Sensibilidad	-2,98	-1,88	-3,38	-3,29	-4,22	-4,26
R ²	0,964	0,853	0,998	0,999	0,948	0,979
Putrescina + Cadaverina (30 mg/l)						
Sensibilidad (l/mg)	-2,99	-1,88	-3,31	-3,29	-2,66	-3,97
R ²	0,873	0,809	0,999	0,974	0,944	0,987

Tabla 19: Características analíticas del estudio de interferencias

Los resultados más significativos muestran: condiciones rR, de máxima sensibilidad, y de iluminación g sobre color G, de mínima variación en la sensibilidad para la determinación de putrescina. Estas condiciones evidencian la influencia en condiciones extremas de la cadaverina en la putrescina.

Regresión de la Putrescina en función de la Cadaverina.
Condiciones:
 Iluminación r, y color reflejado R.

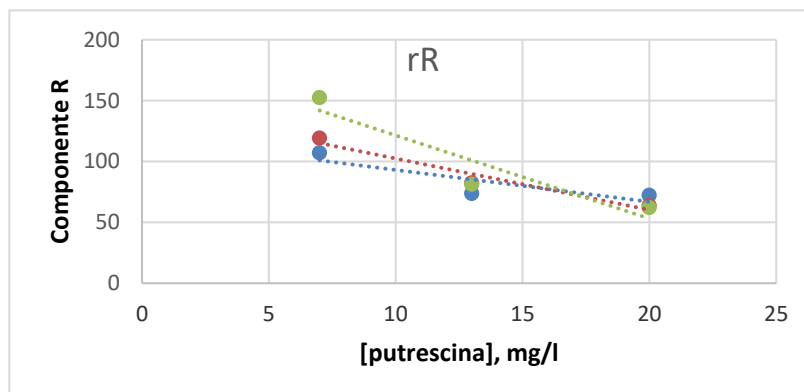


Gráfico 6: Regresión de la putrescina en función de la cadaverina para las condiciones rR

Regresión de la Putrescina en función de la presencia de la Cadaverina.
Condiciones:
 Iluminación g, color reflejado G.

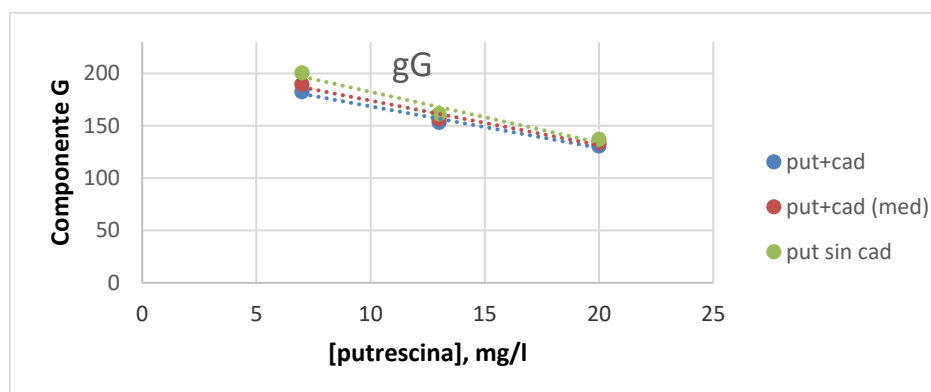


Gráfico 7: Regresión de la putrescina en función de la cadaverina para las condiciones gG

En general, se muestra una clara modificación en la pendiente de las rectas de putrescina con la cadaverina. Así conforme aumenta la cadaverina la pendiente de la Putrescina disminuye. El efecto es muy influyente a bajas concentraciones y tiende a disminuir conforme se aproxima al límite de la respuesta lineal, 20 mg/l.

Es importante observar que el cambio en la pendiente es función de la iluminación. Es decir, la iluminación influye en la magnitud de la respuesta y por tanto en la interferencia. Así con iluminación roja, la putrescina se ve muy afectada por la cadaverina. Sin embargo con iluminación g y componente G, la cadaverina afecta de modo menos pronunciado en la pendiente de la putrescina.

Estos efectos se recogen más claramente en representaciones 3D del **Anexo 4**.

Es decir, la medida de la putrescina está menos influida en condiciones de iluminación g. Por tanto, una señal problema obtenida en estas condiciones puede dar una estimación de Putrescina con una incertidumbre de bajo rango.

En la **Figura 18** siguiente se ilustra el razonamiento para una muestra problema que produce con condición de iluminación r señal S rR y con iluminación g señal S gG.

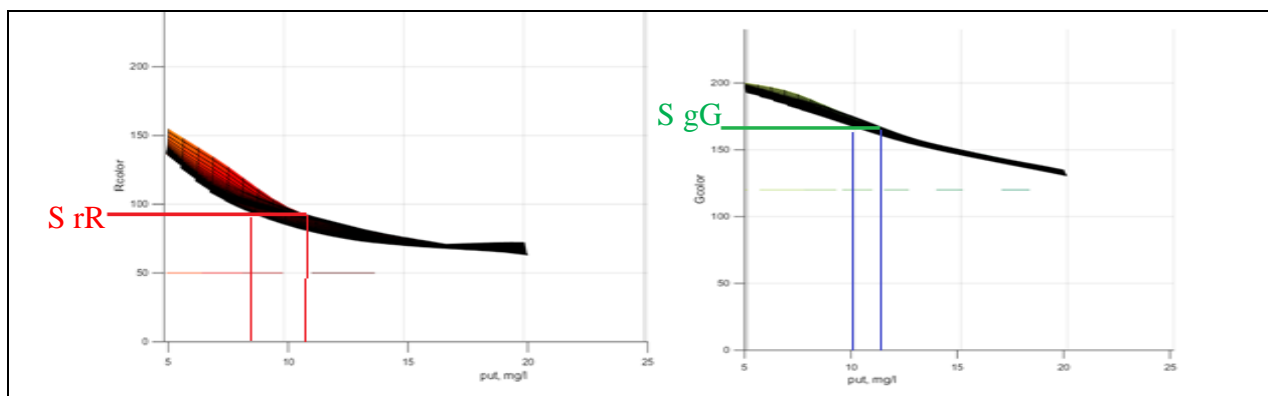


Figura 18: Interpolación aproximada en rR de [cadaverina] para determinar [putrescina] en gG

La intersección booleana de los rangos deducidos de putrescina puede conducir a una estimación de un rango discreto de la concentración de putrescina. Y por extensión del razonamiento a la cadaverina.

4.- APLICACIÓN DEL MÉTODO: Determinación de Aminas Biógenas.

4.1.-Determinación de putrescina en embutidos

En este capítulo se presentan los estudios llevados a cabo en la aplicación del método DIC a la determinación de Aminas Biógenas en muestras reales.

La muestra analizada fue chorizo embutido de la marca “JAMONES Y EMBUTIDOS RUBIELOS, TERUEL. DUROC.”

4.2.-Resultados

Se ha aplicado el método de preparación de muestra real según el procedimiento descrito en la parte experimental, obteniéndose una disolución de muestra atacada. También se ha preparado una muestra sintética simple por dilución de disolución patrón de Putrescina.

A la disolución de muestra atacada, se le ha aplicado el procedimiento de acondicionamiento sobre pocillo de ELISA. Luego se inyectan alícuotas de la disolución del pocillo Elisa en tiras reactivas acondicionadas.

Los resultados obtenidos para la muestra real dan valores por debajo del límite de detección de 2.6 mg/l en la disolución de pocillo ELISA. Según la trazabilidad del proceso:

mg/L	mL	mL	ml/L	mL/L	g	g/Kg
2,6	1	0,65	25	1000	5	1000
mg put/g emb						
20						

Se corresponde con una valor inferior ($<$) a 20 mg/Kg en la muestra. Lo cual es coherente con la comercialización.

Tabla 20: Trazabilidad de la muestra real

Los resultados para las dos muestras sintéticas son los siguientes:

Muestras Sintéticas			Contenido medio
mg/L	mL	mL	mg/L
19,90	1	0,2	99,48

mg/L	mL	mL	mg/L
33,72	1	0,35	96,33

Tabla 21: Contenido medio de las muestras sintéticas, en mg/L

Contenido medio (mg/l)	
Muestra sintética 1	99,48
Muestra sintética 2	96,33

Tabla 22: Contenido de putrescina en la muestra sintética

De modo que el resultado final, expresado en mg/l es el siguiente, con un intervalo de confianza al 95%:

$$[Muestra Sintética] = 97.91 \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} = 97.91 \pm 8.74 \text{ mg/L}$$

Contenido medio de putrescina tras el análisis de 2 muestras sintéticas, valor medio con i. c. al 95% de confianza.

5.2.1. Comparación estadística mediante el test t.

Se comparan estadísticamente el contenido de la muestra patrón de valor conocido 98,91 mg/l frente a los dos resultados obtenidos por la interpolación en la regresión lineal. Se toma como valor de t, para 2-1 grados de libertad y nivel de confianza del 95 %.

[muestra], mg/L	s	
97,91	6,32	
Prueba estadística		t exp
t exp	0,22	$t_{exp} = \frac{ \mu - x }{s} \times \sqrt{n}$
		t tab
t tab	12,7	g.d.l.=1, p=95%
Resultado: t exp < t tab		

Los resultados demuestran que estadísticamente las diferencias se justifican por un error aleatorio y no sistemático (t exp < t tab), para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 23: Comparación estadística de los resultados para un nivel de confianza de 0.95

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA

Como principales **conclusiones** del trabajo se destaca:

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de Hidrogeno peróxido y aminos biógenas mediante imágenes digitales.
- Se ha caracterizado el comportamiento cromático de la reacción de TMB frente a Hidrogeno peróxido en presencia de la enzima HRP y putrescina con la enzima DAO en condiciones óptimas y mediante colores básicos RGB en rangos dinámicos de 0-25 de HP y 0-90 mg/l Putrescina.
- Se comprueba que con la adición de tensioactivo se aumenta la sensibilidad y disminuye el límite de detección para la disolución directa de HP, pero es menos conveniente con la reacción de aminos biógenas.
- Se ha demostrado que la presencia de cadaverina interfiere en la determinación analítica de putrescina sobre tiras reactivas. Sin embargo, se ha evidenciado que el color de iluminación ofrece posibilidades para su diferenciación.
- El método se ha aplicado al análisis de embutidos como muestra real y contrastado con muestras sintéticas en la determinación analítica de putrescina.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹Capitán-Vallvey, L. F., Lopez-Ruiz, N., Martinez-Olmos, A., Erenas, M. M., & Palma, A. J. (2015). Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica chimica acta*, 899, 23-56.
- ²Wongwilai, W., Lapanantnoppakhun, S., Grudpan, S., & Grudpan, K. (2010). Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. *Talanta*, 81(3), 1137-1141.
- ³Byrne, L., Barker, J., Pennarun-Thomas, G., Diamond, D., & Edwards, S. (2000). Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(8), 517-522.
- ⁴Shirai, Y. (2012). *Three-dimensional computer vision*. Springer Science & Business Media.
- ⁵Lopez-Molinero, A., Pino, J., Castro, A., & Castillo, J. R. (2003). Artificial Neural Networks Applied to the Classification of Emission Lines in Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectroscopy. *Analytical letters*, 36(1), 245-262.
- ⁶Corbalán, M. Sistema de visión por computador para control industrial.
- ⁷Brosnan, T., & Sun, D. W. (2004). Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of food engineering*, 61(1), 3-16.
- ⁸W. S. Lyra, et al, *Anal. Methods*, (2011,3,1975-1979).
- ⁹D. Liñán, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2006).
- ¹⁰M.A. Gómez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2009).
- ¹¹J. Jiménez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias (2009).
- ¹²M. Pérez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2014).
- ¹³P. Berlín, Trabajo fin de Grado, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2015).
- ¹⁴L.Gómez, Trabajo fin de Grado, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2016).
- ¹⁵Contreras, M., Izquierdo, P., Allara, M., García, A., Torres, G., & Céspedes, E. (2007). Determinación de aminos biógenos en quesos madurados. *Revista Científica*, 17(1), 89-95.
- ¹⁶González, A. I. D. (2014). Presencia de aminos biógenos en los alimentos. Diseño de un laboratorio para su detección y uso en el control de la calidad alimentaria.
- ¹⁷<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S22.htm>
- ¹⁸Kivirand, K., & Rinken, T. (2011). Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review. *Analytical Letters*, 44(17), 2821-2833.
- ¹⁹Hacia la determinacion in situ de aminos biogenas. López Molinero, Ángel Javier [ART-2017-103796].
- ²⁰Martínez Díaz, V. L., Quilez Oliete, J., Sánchez Bonastre, A., Roura López, X., Francino Martí, O., & Altet Sanahujes, L. (2011). Canine leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 4(57), 0001-5.
- ²¹Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- ²²DAOA. Cogoni, R. Farci, R. Medda, A. Rinaldi & G. Floris (1989) Amine Oxidase from *Lathyrus Cicera* and *Phaseolus Vulgaris*: Purification and Properties, *Preparative Biochemistry*, 19:2, 95-112, DOI: 10.1080/10826068908544901
- ²³<http://linealab.net/peroxido/55-tiras-reactivas-quantofix-peroxido.html>
- ²⁴Moratalla, M. L. L., Carou, M. C. V., Cid, S. B., & Garriga, M. (2005). Aminos biógenos en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*, (141), 41-48.